

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. K. TAEGER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**QUANTIFIZIERUNG VON TUMORZELLEN IM WUNDBLUT
BEI GASTROINTESTINALEN KARZINOMEN**



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

vorgelegt von
Bernhard Edenharter
aus Kelheim/Lohstadt

2006

Dekan: Prof. Dr. M. Nerlich
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. E. Hansen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Hofstädter

Tag der mündlichen Prüfung: 10. August 2006

**Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Gastrointestinale Karzinome.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Metastasierungswege	2
1.1.3 Prognosefaktoren.....	3
1.2 Disseminierte Tumorzellen und deren klinische Bedeutung	7
1.2.1 Tumorzellen im Knochenmark	7
1.2.2 Disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten	8
1.2.3 Disseminierte Tumorzellen in der Leber.....	8
1.2.4 Tumorzellen in peripherem Blut	9
1.2.5 Tumorzellen in Peritoneallavagen.....	10
1.2.6 Freie Tumorzellen im Wundblut	10
1.3 Prognostische Bedeutung von Tumorzellen im Wundblut	11

2. Zielsetzung.....	13
----------------------------	-----------

3. Material, Methoden und Patientenkollektiv

3.1 Patienten	14
3.2 Sammeln von Wundblut	14
3.3 Isolierung von Tumorzellen	15
3.3.1 Herstellung eines Einstufen-Gradienten.....	15
3.3.2 Separation von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation	16
3.4 Nachweis von Tumorzellen	17
3.4.1 Vitalitätstestung in der Neubauerkammer	17
3.4.2 Zytozentrifugation.....	17
3.4.3 Silberfärbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR)	17
3.4.4 Enzymimmunochemische Färbung der Zytokeratine.....	20
3.4.5 Enzymimmunochemische Färbung von p53.....	23
3.4.6 Quantifizierung der Färbeergebnisse	25
3.5 Statistische Auswertung	26

4. Ergebnisse der Studie

4.1 Tumorzellen im Wundblut.....	27
4.1.1 Nachweis	27
4.1.2 Kontrollen	27
4.1.3 Korrelation Tumorzellzahl und Wundblutvolumen	28
4.1.4 Tumorzellzahl und Tumorlokalisation	29
4.2 Korrelation der Tumorzellzahl zu Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Grading und Residualtumorstatus	30
4.2.1 Gesamtkollektiv	30
4.2.2 Kolonkarzinom	34
4.2.3 Rektumkarzinom	38
4.2.4 Magenkarzinom.....	42
4.2.5 Pankreaskarzinom	47
4.3 Korrelation der Nachweismethoden	52
4.3.1 Korrelation Zytokeratin- und AgNOR-Färbung	52
4.3.2 p53-Nachweismethode	53

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1 Tumorzellnachweis im Wundblut.....	55
5.1.1 Sensitivität.....	55
5.1.2 Spezifität	56
5.2 Tumorzellen im Wundblut in Abhängigkeit von Tumorausdehnung T, Lymphknotenstatus N, Fernmetastasierung M, Grading G und R-Status.....	59
5.3 Herkunft der Tumorzellen im Wundblut	63
5.4 Bedeutung von Tumorzellen im Wundblut.....	66
5.5 Prognostischer Wert disseminierter Tumorzellen	68

6. Zusammenfassung.....

71

7. Anhang

74

8. Literaturverzeichnis

77

9. Danksagungen	87
10. Lebenslauf	88

1. Einleitung

1.1 Gastrointestinale Karzinome

1.1.1 Epidemiologie

Das gastrointestinale Karzinom gilt als Oberbegriff für die Karzinome des Ösophagus, des Magens, des Dünndarms, des Kolons und Rektums, sowie der Leber und der intrahepatischen Gallengänge, der Gallenblase und der extrahepatischen Gallengänge und des Pankreas.

Die Inzidenz in Deutschland für die gastrointestinalen Karzinome lag im Jahr 2000 bei 123,8 pro 100 000 bei den Männern und 77,6 pro 100 000 bei den Frauen, was einem prozentualen Anteil von 27,3% bzw. 27,8% aller Krebsneuerkrankungen entsprach. Damit stehen sie bei den Neuerkrankungen für beide Geschlechter an erster Stelle, gefolgt vom Prostata-Karzinom mit 20,3% und dem Lungenkarzinom mit 15,9% bei den Männern und dem Mamma-Karzinom mit 24,4% und dem Lungenkarzinom mit 5,4% bei den Frauen. Tab. 1 zeigt die Aufgliederung der Inzidenzen für die einzelnen gastrointestinalen Karzinome (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004).

Lokalisation	Neuerkrankungen 2000 (Deutschland)		
	Männlich	Weiblich	Verhältnis m/w
Ösophagus	8,76	1,86	4,71
Magen	19,10	10,58	1,81
Dünndarm	0,64	0,32	2,00
Kolon	37,00	31,13	1,19
Rektum	32,13	18,14	1,77
<i>Kolon und Rektum</i>	<i>69,13</i>	<i>49,27</i>	<i>1,40</i>
Leber	9,60	2,63	3,65
Gallenwege	3,73	4,94	0,76
Pankreas	12,09	7,35	1,64
Sonstiges/n.n.b.	0,69	0,68	1,01
<i>Summe</i>	<i>123,75</i>	<i>77,62</i>	<i>1,59</i>

Tab. 1: Altersstandardisierte Erkrankungsrate je 100 000, alle Altersgruppen

Im Jahr 2000 betrug die altersstandardisierte Mortalitätsrate je 100 000 für gastrointestinale Malignome 77,14 bei den Männern und 47,60 bei den Frauen. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 28% bzw. 31% an allen tumorbedingten Sterbefällen in Deutschland, während 27% der Sterbefälle bei den Männern und 22% bei den Frauen zur Zeit von Malignomen verursacht sind. In Tab. 2 sind die Mortalitätsraten nach Tumorlokalisation aufgelistet (Robert-Koch-Institut 2004).

Lokalisation	Sterbefälle 2000 (Deutschland)		
	männlich	weiblich	Verhältnis m/w
Ösophagus	6,18	1,86	3,32
Magen	13,35	7,86	1,70
Dünndarm	0,43	0,06	7,17
Kolon	20,01	16,44	1,22
Rektum	12,32	6,02	2,05
Kolon und Rektum	32,33	22,46	1,44
Leber	9,08	2,88	3,15
Gallenwege	3,42	4,12	0,83
Pankreas	11,92	8,03	1,48
Sonstige/n.n.b.	0,43	0,33	1,30
Summe	77,14	47,60	1,62

Tab. 2: Altersstandardisierte Mortalitätsrate je 100 000, alle Altersgruppen

1.1.2 Metastasierungswege

Der Ablauf der Metastasierung folgt einem sehr komplexen Mechanismus, der bisher noch weitgehend unentschlüsselt ist. Unklar ist weiterhin, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Menge Tumorzellen auf den Weg gebracht werden (RATH und SCHÖNFELDER 2002).

Innerhalb des Tumors kommt es bei einigen Zellen zu einem Genverlust, der für Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. Integrine kodiert. Es resultiert ein Kohäsionsverlust des Zellverbandes. Zusätzlich werden Motilitätsfaktoren und Chemokine gebildet. Die Tumorzellen sezernieren unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren auch Metalloproteasen, die die Basalmembrankollagene aufspalten und einen Plasminogenaktivator, der Kollagen, Laminin und Fibronectin abbauen kann. Die Zellen können sich somit ungehindert bewegen und in benachbarte Gefäße einbrechen (RATH und SCHÖNFELDER 2002).

Die hämatogene Metastasierung erfolgt in folgenden Phasen (CHAMBERS et al. 2002):

- Intravasation:** Nach Lockerung vom Tumorzellverband kommt es zum Einbruch ins Blutssystem, wobei die meisten Tumorzellen intravasal eliminiert werden.
- Embolisierungsphase:** Die Tumorzellen werden nach Reaktion mit Blutbestandteilen von Thrombozyten und Fibrin eingeschlossen, was einen relativen Schutz gegen das Immunsystem darstellt.
- Implantationsphase:** Die Tumorzellen binden nach Mobilisation aus dem Embulus im postkapillären Venuolenbett an adhäsionsfaktorbestückte Ankerplätze im Endothel bestimmter Organe. Es folgt das Eindringen der Zelle in das Organgewebe mit Induktion der Angiogenese zum Aufbau einer eigenen Gefäßversorgung.

Eine Metastasierung kann lymphogen, hämatogen, kanalikulär oder kavitär erfolgen, wobei die hämatogenen Metastierungswege in Lungentyp/Kavatyp und Lebertyp/Pfortadertyp unterteilt werden können (RIEDE et al. 1999).

Die gastrointestinalen Karzinome metastasieren zuerst überwiegend lymphogen über die regionalen Lymphabflussgebiete, die im wesentlichen der arteriellen Versorgung folgen. Die spätere hämatogene Filialisierung erfolgt entsprechend dem venösen Abfluss über das Pfortadersystem, wobei die Leber das erste Metastasierungsorgan darstellt (Pfortadertyp). Beim Rektumkarzinom treten auch Lungenmetastasen auf, da der venöse Abfluss über die Aa. rectales inferiores zur V. cava führt. Ähnliches gilt für das Ösophaguskarzinom im oberen Drittel, wo die hämatogene Metastasierung über die V. azygos zur V. cava superior erfolgt (SIEBECK et al. 2001, MÜLLER 2003).

1.1.3 Prognosefaktoren

Die Prognose für Patienten, die an gastrointestinalen Karzinomen erkrankt sind, hängt vor allem vom primären Tumorstadium ab. Für die Klassifikation der Ausbreitung sind die TNM-Kategorien der UICC von größter Bedeutung, da sie die aktuelle Tumorausdehnung in Form von Invasionstiefe pT, den lymphnodalen Status pN und das Auftreten von Fernmetastasen pM beschreiben (HERMANEK et al. 1995).

Auch das histologische Grading (NEWLAND et al. 1994; HERMANEK et al. 1995), das über den Differenzierungsgrad des Tumors Auskunft gibt, wurde von der UICC als

Prognoseparameter etabliert. Allerdings konnte man sich immer noch nicht auf eine weltweit einheitliche Klassifikation einigen.

TNM - Klassifikation der gastrointestinalen Karzinome (UICC, 2002)

T Primärtumor

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 Kein Anhalt für Primärtumor

T	Ösophagus	Magen	Kolon/Rektum
Tis	Carcinoma in situ; Tumorzellen intraepithelial;	Carcinoma in situ, auf Lam. epithelialis mucosae beschränkt	Carcinoma in situ; nur Mukosa bis max. Muscularis mucosae
T1	Tumor infiltriert Tunica mucosa und/oder Submucosa	Tumor infiltriert Mucosa bis max. Submucosa (= Frühkarzinom)	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor infiltriert Tunica muscularis propria	Tumor infiltriert Muscularis propria oder Subserosa	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia	Tumor infiltriert Serosa, infiltriert <u>nicht</u> benachbarte Strukturen	Tumor infiltriert Serosa und/oder perikolisches Fettgewebe
T4	Nachbarstrukturen infiltriert	Nachbarstrukturen infiltriert	Nachbarstrukturen infiltriert

T	Pankreas	Leber	Gallenwege
T1	Tumor lokal auf Pankreas begrenzt <2cm	solitärer Tumor <2cm, ohne Gefäßinvasion	Tumor infiltriert Gallengangwand T1a Schleimhaut T1b Muskulatur
T2	Tumor lokal auf Pankreas begrenzt >2cm	solitärer Tumor >2cm, o. G. solitärer Tumor <2cm, m. G.	Tumor infiltriert perimuskuläres Bindegewebe
T3	Tumor infiltriert Duodenum, Duct. choledochus, peripankreatisches Gewebe	solitärer Tumor >2cm, m. G. mehrere Tumoren in einem Leberlappen	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen (Leber, Kolon, Pankreas, Gallenblase, Magen)
T4	Tumor infiltriert Magen, Milz, Pfortader	Mehrere Tumoren in mehr als einem Lappen oder Befall eines größeren Astes d. V. portae od. Vv. hepaticae Invasion von Nachbarorganen	

N Regionäre Lymphknoten

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N	Ösophagus	Magen	Kolon/Rektum
N1	Regionäre LK ; cervicale bzw. mediastinale u. perigastrische LK	Metastasen in 1-6 regionären LK	Metastasen in 1-3 regionären LK; Perikolisch und entlang d. Gefäße
N2		Metastasen in 7-15 regionären LK	Metastasen in >3 regionären LK
N3		Metastasen in >15 regionären LK	

N	Pankreas	Leber	Gallenwege
N1	Regionäre LK; N1a ein LK; N1b mehrere LK;	Regionäre LK-Metastasen; LK am Leberhilus und entlang des Lig. hepatoduodenale	Regionäre LK; am Duct. cysticus, Choledochus, Leberhilus
N2			LK um Pankreaskopf, periduodenal, periportal, zöliakal und/oder oben mesenterial

Für pN0 müssen bei Ösophagus-Karzinom mindestens sechs, bei Magen-Karzinom 20, bei kolorektalem Karzinom zwölf, bei Pankreas-Karzinom zehn und bei Gallengang-Karzinom drei Lymphknoten histologisch untersucht werden.

M Fernmetastasen

- MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M0 Kein Anhalt für Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen, auch nicht lokoregionäre Lymphknoten

G Grading

- GX Differenzierung kann nicht bestimmt werden
- G1 Gut differenziert
- G2 Mäßig differenziert
- G3 Gering differenziert
- G4 Undifferenziert

R Residualtumor

- RX Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
- R0 Kein Residualtumor
- R1 Mikroskopischer Residualtumor
- R2 Makroskopischer Residualtumor

Zusätzlich spielt von chirurgisch therapeutischer Seite vor allem der Residualtumorstatus eine wichtige Rolle für die Prognose (HERMANEK et al. 1994). In diesem Zusammenhang kommt auch der Erfahrung des Zentrums und des behandelnden Chirurgen eine wichtige unabhängige Bedeutung zu (McARDLE et al. 1991; HERMANEK et al. 1995). Ein etablierter tumorbiologischer Faktor mit einer unabhängigen prognostischen Bedeutung für kolorektale Karzinome ist der Tumormarker CEA. Dieser Marker hat bei präoperativ erhöhten Serumwerten (Cut-off-Wert: 5 ng/ml) eine signifikant schlechtere Prognose zur Folge (WANEBO et al. 1978; LINDMARK et al. 1995).

Es gibt eine Fülle von Prognoseparametern für gastrointestinale Karzinome, die in einer Vielzahl von Studien ihre Unabhängigkeit gezeigt haben und bereits teilweise in den Pathologiebericht integriert werden. Für ihre endgültige Etablierung mangelt es nur an der Bestätigung in einer statistisch validen Studie.

So ist die Mikrosatelliteninstabilität beim kolorektalen Karzinom oder dem Magenkarzinom charakterisiert durch die Längenunterschiede von einfachen, repetitiven Mikrosatellitensequenzen, die im gesamten Genom vorkommen. Nachgewiesene Veränderungen in diesen DNA-Sequenzen, meist durch Mutationen von Mismatch-Repair-Genen verursacht, sind mit einer verbesserten Prognose korreliert (SANKILA et al. 1996).

Weitere molekulare Marker des Tumorgewebes in Hinsicht auf das Überleben sind die Mutation des k-ras Gens (CEROTTINI et al. 1998), erniedrigte p27 Protein Werte (LODA et al. 1997), Nachweis des bcl-2 Gen Produktes (OFNER et al. 1995) und die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (HAMELIN et al. 1994).

Zusätzlich gibt es noch Faktoren, die in ersten Studien bereits eine prognostische Tendenz für gastrointestinale Karzinome zeigen konnten, aber noch in weiteren Studien untersucht werden müssen. In diese Kategorie gehören zum Beispiel die Proteasen uPA, der Rezeptor uPA-R und die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2, sowie Kathepsin D (Übersicht bei COMPTON et al. 2000, ALLGAYER et al. 2001).

Beim gastrointestinalen Karzinom kommt als zusätzlicher, biologisch definierter Prognoseparameter noch die minimal residuale Tumorerkrankung in Frage. Diese früh-systemische Tumorkomponente wird als eine sehr wahrscheinliche Ursache für den letztlich doch fatalen klinischen Verlauf vieler Tumorpatienten angesehen, die trotz kurativer Tumorsektion nach Monaten und Jahren ein Rezidiv erleiden. Die signifikante Assoziation des Nachweises disseminierter Tumorzellen zum Operationszeitpunkt konnte bereits für einige Karzinome demonstriert werden (ALLGAYER et al. 2001).

1.2 Disseminierte Tumorzellen und deren klinische Bedeutung

Die Mehrzahl der gastrointestinalen Karzinome kann zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit potentiell kurativer Zielsetzung reseziert werden. Trotzdem kommt es im weiteren Verlauf bei einem erheblichen Prozentsatz dieser Patienten zum Auftreten von Fernmetastasen oder eines Lokalrezidivs. Diese Tumorprogression nach radikaler, kurativer Resektion ist nur durch eine prä- oder auch intraoperative Tumorzell dissemination zu erklären, welche bisher mit den routinemäßig verfügbaren Stagingmethoden in der Klinik nicht ausreichend erfasst werden können (WEITZ et al. 1999).

Das Vorkommen von disseminierten Tumorzellen in den verschiedenen Körperkompartimenten, wie z.B. Knochenmark, peripheres Blut oder Lymphknoten, bei Patienten mit Karzinomerkrankungen wurde während der letzten Jahre von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht (ALLGAYER et al. 2001).

1.2.1 Tumorzellen im Knochenmark

Die meisten bisherigen Studien über disseminierte Tumorzellen basieren auf den Nachweis von Tumor-Einzelzellen in Knochenmark zum Zeitpunkt der primären Tumoroperation (ALLGAYER et al. 2001).

In einer Studie an 88 Patienten mit einem kolorektalem Karzinom fand sich bei 28 Patienten (32%) ein positiver Knochenmarksbefund. Diese Patienten mit immunzytochemisch nachgewiesenen Tumorzellen zeigten eine signifikant schlechtere Prognose, wobei zusätzlich der immunzytochemische Tumorzellnachweis als stärkster unabhängiger Risikofaktor bestätigt werden konnte (LINDEMANN et al. 1992).

Beim Magenkarzinom fanden sich in einer Serie von 219 Patienten, wovon 109 mit Residualtumorstatus R0 reseziert waren, in 51% der Fälle perioperativ Tumorzellen im Knochenmark mit einer signifikanten Assoziation der Prognose. Der alleinige qualitative Nachweis der Zellen war jedoch kein unabhängiger prognostischer Faktor. Erst die Berücksichtigung der Quantität disseminierter Tumorzellen brachte in einer multivariaten Analyse eine signifikante Prognoseassoziation. Diese war besonders deutlich in Tumoren mit der Klassifikation pT1/2-, pN0 und beim Karzinom vom intestinalen Typ nach Laurén, Tumoren, deren Prognose besonders durch die hämatogene Fernmetastasierung bestimmt wird (JAUCH et al. 1996).

In einer weiteren Studie wurde Knochenmark von 51 Patienten mit neu diagnostiziertem kolorektalem Adenokarzinom vor der primären Resektion entnommen und mittels PCR untersucht. Ein positiver Nachweis von epithelialen, CK-positiven Zellen gelang bei 33 Patienten (65%), wobei sie im Stadium pT3/4 häufiger als im Stadium pT1/2 gefunden

wurden und der Lymphknotenstatus keinen Einfluss hatte. Das Auftreten der Zellen im Knochenmark zeigte eine Abhängigkeit vom Tumorstadium, Tumorausbreitung und Tumormarker CA 19-9 (WEIHRAUCH et al. 2002).

1.2.2 Disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten

Die Erfassung von Lymphknotenmetastasen spielt nach den Richtlinien der UICC für die Prognose und die anschließende weitergehende Therapie eine entscheidende Rolle. Durch immunhistochemische Methoden können einzelne Tumorzellen oder kleine Kluster von Zellen entdeckt werden, die man als isolierte Tumorzellen bezeichnet. Für Fälle mit isolierten Tumorzellen in regionären Lymphknoten wurde die TNM-Klassifikation N0 mit dem Zusatz „i+“ erweitert (HERMANEK et al. 1999).

Bei 80 Patienten mit resektablem Pankreaskarzinom wurden 191 Lymphknoten, histopathologisch als tumorfrei klassifiziert, immunhistochemisch auf okkulte Tumorstreuung hin untersucht. Zum Einsatz kam der monoklonale anti-Epithelzell-Antikörper Ber-EP4. In 62 (32,5%) dieser 191 Lymphknoten waren Ber-EP4 positive Einzelzellen oder Zellkluster nachweisbar verteilt auf 45 (56,3%) Patienten. Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen hinsichtlich dem immunhistochemischen Lymphknotenstatus, dem pathohistologischen Primärstadium (pT) oder dem Tumorgrading (G). Jedoch zeigte sich bei den postoperativen Überlebensanalysen, dass Patienten mit Ber-EP4-positiven Zellen in Lymphknoten signifikant früher und häufiger Rezidive entwickelten als Patienten ohne diese Zellen. Außerdem verstarben diese Patienten signifikant früher. Die multivariate Cox-Regressionsanalyse bestätigte den unabhängigen Einfluss von Ber-EP4-positiven Zellen in Lymphknoten für das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben (SCHEUNEMANN et al. 2004).

1.2.3 Disseminierte Tumorzellen in der Leber

Die Leber ist bei den gastrointestinalen Karzinomen meist das erste hämatogene Metastasierungsorgan.

Eine Arbeitsgruppe untersuchte erstmals Biopsien aus der Leber auf disseminierte Tumorzellen bei 121 Patienten mit kolorektalem Karzinom ohne klinischen Nachweis von Lebermetastasen. Die während der primären Tumoroperation entnommenen Proben wurden mittels PCR-RFLP-Assay für k-ras-Mutationen als Marker für disseminierte Tumorzellen untersucht. 54 der 121 Patienten zeigten in ihrem Primärtumor eine k-ras Mutation. Sie hatten im Vergleich zu den anderen Patienten eine signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit und ein größeres Risiko ein Tumorrezidiv zu entwickeln.

Disseminierte Tumorzellen in der Leber wurden bei 14 dieser 54 Patienten (26%) gefunden, von denen in der nachfolgenden Follow-up-Studie neun verstarben. Außerdem trat bei neun der 14 Patienten eine neue Leberfilialisierung auf. Von den 40 Patienten ohne Tumorzellen in der Leber erlagen nur zehn ihrem Tumorleiden, zwölf entwickelten Lebermetastasen (LINNEMANN et al. 2004).

1.2.4 Tumorzellen in peripherem Blut

Bereits vor 70 Jahren konnten mit Einsatz konventioneller zytologischer Untersuchungen von Blutausschüßpräparaten freie Tumorzellen im zirkulierenden venösen Blut beschrieben werden (POOL et al. 1934). Auch in weiteren Studien ließen sich Tumorzellen während der Resektion eines kolorektalen Karzinoms bei 25-67% der Patienten nachweisen (FISHER et al. 1955, ROBERTS et al. 1961, WHITE et al. 1976). Ihre prognostische Bedeutung blieb jedoch wegen der geringen Spezifität des zytologischen Nachweises umstritten (LEATHER et al. 1993).

In den letzten 20 Jahren ist es gelungen, unter Einsatz von immunzytologischen und molekulargenetischen Verfahren, tumorspezifische Marker in peripherem Blut oder Knochenmark mit einer bis zu 1000-fach höheren Sensivität nachzuweisen (WÖRMANN et al. 1997).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zum Tumorstadium konnte mit der Detektion von Tumorzellen unter Verwendung der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) für das Zytokeratin 20-Gen gezeigt werden. Für diesen Nachweis wurden 65 Patienten mit primärem kolorektalen Karzinom oder Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms venöses Blut prä-, intra- und postoperativ entnommen. Zirkulierende Tumorzellen wurden bei 24 der 58 Patienten gefunden mit einer Nachweisquote von 9% im Stadium I, 32% im Stadium II, 44% im Stadium III und 83% im Stadium IV. Durch die sequentiellen Blutabnahmen konnte außerdem eine statistisch signifikante hämatogene Tumorzellaussaat während der Resektion des Karzinoms bei 19% der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (WEITZ et al. 1998).

Bei 41 Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen nach primärer Resektion eines kolorektalen Karzinoms wurden peripher venöse Blutproben ein bis drei Tage vor der Leberresektion entnommen. Die aufgereinigten Proben wurden mittels RT-PCR auf Zytokeratin 20 (CK 20) untersucht. In sechs der 41 Proben fand sich ein CK20-Expression, die mit erhöhten CEA-Werten (Karzinoembryonales Antigen) und großem Tumolvolumen korrelierten. Für ein größeres Rezidivrisiko bei den Patienten mit CK20-positiven Blutproben konnte kein Anhalt gefunden werden (VLEMS et al. 2003).

Auch in weiteren Studien konnten Tumorzellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Jedoch lässt sich über deren prognostischen Bedeutung bisher keine richtungweisende Aussage machen. Zudem ist der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen keinesfalls mit der Entstehung von Metastasen gleichzusetzen, da der Metastasierungsprozess vermutlich sehr ineffektiv ist und zirkulierende Tumorzellen zum großen Teil zerstört werden (WEITZ et al. 1999, WEISS 1990).

1.2.5 Tumorzellen in Peritoneallavagen

Viele Patienten mit gastrointestinalen Malignomen entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung eine Peritonealkarzinose, wodurch die Prognose erheblich verschlechtert wird.

Zahlreiche Studien befassen sich mit dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen in der Peritonealhöhle und deren prognostische Bedeutung. So wurden bei 535 Patienten mit Magenkarzinom unmittelbar nach Eröffnung des Bauchraumes Peritoneallavagen gewonnen, in denen sich bei 7% mikroskopisch freie Tumorzellen fanden. Der Tumorzellnachweis korrelierte mit der Tumorausdehnung, dem Lymphknotenbefall, sowie der kurativen Operationsfähigkeit (BONENKAMP et al. 1996).

Mit immunzytologischen Nachweismethoden fanden sich bei 17 von 36 Patienten (47,2%) mit kurativ resezierbarem Kolonkarzinom und bei 22 von 47 Patienten (46,8%) mit kurativ resezierbarem Magenkarzinom positive Spülzytologien. Während der positive Tumorzellnachweis beim Kolonkarzinom nur mit der Kategorie Metastasierung assoziiert war, korrelierte die positive Spülzytologie beim Magenkarzinom signifikant mit der Tumorausdehnung (pT) und der Fernmetastasierung (M). Patienten mit negativer Zytologie hatten im Vergleich eine längere Überlebenszeit (VOGEL et al. 2000).

1.2.6 Freie Tumorzellen im Wundblut

Der Nachweis von freien Tumorzellen im Wundblut wurde bereits 1975 in einer Studie erbracht. Bei einem Patienten mit Bronchialkarzinom konnte nach Aufbereitung des Blutes zu einem Zellblock in Schnitten Tumorzellen gefunden werden, wobei jedoch rein morphologische Kriterien angewandt wurden (YAW et al. 1975).

Für die Fragestellung zur Rücktransfusion von intraoperativ gesammeltem Wundblut bei Tumoroperationen wurden von einer Arbeitsgruppe 103 operative Eingriffe bei unterschiedlichen Karzinomarten auf freie Tumorzellen im Wundblut untersucht. Die Abtrennung und Anreicherung der Tumorzellen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Anhand der Analyse der angefertigten Zytospin-Präparate nach Nukleolus-organisierenden-Regionen (AgNOR), Zytokeratinen und

zellmorphologischen Kriterien konnten bei 97 der 103 (94%) Patienten Tumorzellen im Wundblut nachgewiesen werden. Die Anzahl der gefundenen Zellen lag zwischen 0 und 10^7 . Die weitere Charakterisierung der Zellen ergab eine hohe Vitalität, Teilungsfähigkeit und Invasivität. Zusätzlich wurde die Tumorigenität der Tumorzellen untersucht, wobei Nacktmäusen Tumorzellen aus Wundblut isolierten Zelllinien subkutan injiziert wurden. Die Injektion einer der beiden Zelllinien führte zur Tumorbildung. Damit konnte das Potential der Tumorzellen im Wundblut zur Metastasenbildung eindeutig nachgewiesen werden (HANSEN et al. 1994, WOLFF 1994).

Bei Operationen von Prostatakarzinomen konnten bei 22 Patienten in 90% der Fälle freie Tumorzellen im Wundblut anhand PCR gefunden werden. Eine Korrelation der Zellzahl mit der Tumorausdehnung konnte nicht nachgewiesen werden (OEFELEIN et al. 1996). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls mittels PCR bei Prostatakarzinomeingriffen freie Tumorzellen in 4 von 11 Fällen (36%) im Wundblut identifizieren (CHENG et al. 1997).

In letzteren Studien blieb jedoch eine prognostische Relevanz von Tumorzellen im Wundblut, sowie deren Auswirkungen auf die Rezidiv- und Metastasenrate ungeklärt.

1.3 Prognostische Bedeutung von Tumorzellen im Wundblut

83 metastasenfremde und R0-tumorresezierte Patienten aus der Studie von HANSEN 1994 und WOLFF 1994 wurden mindestens fünf Jahre nach ihrer Operation nachuntersucht und die prognostische Signifikanz der gefundenen Tumorzellen im Wundblut evaluiert. Dabei wurden die Patienten in eine Gruppe mit einer Tumorzellzahl kleiner 4000, sowie in eine Gruppe mit einer Zellzahl größer bzw. gleich 4000 unterteilt und hinsichtlich Rezidivwahrscheinlichkeit und tumorfreier Überlebenszeit verglichen. Es stellte sich heraus, dass Patienten, die länger als statistisch erwartet lebten signifikant niedrigere Zellzahlen im Wundblut hatten. Außerdem wiesen Patienten, die Metastasen entwickelten, signifikant höhere Werte auf als Patienten ohne Metastasenbildung. In der Kaplan-Meier-Analyse zeigten die Patienten mit der höheren Tumorzellzahl stets signifikant schlechtere Ergebnisse hinsichtlich des Überlebens und des Auftretens von Lokalrezidiven und Metastasen als Patienten mit der niedrigeren Zellzahl. Weiterhin konnte in der univariaten, sowie in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse die prognostisch signifikante Relevanz der Tumorzellzahl im Wundblut als ein von anderen Einflussgrößen unabhängiger Faktor bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte im Vergleich keinerlei Zusammenhang zwischen der Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. dem Auftreten von Metastasen und dem Nachweis von Tumorzellen im zirkulierenden Blut festgestellt werden. Die durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse bestätigte dies. Auch die Cox-Regressionsanalyse ergab keinen

signifikanten Zusammenhang bezüglich Tumorzellen im venösen Blut und Überleben- oder Metastasierungswahrscheinlichkeit (STIERSDORFER 2001).

Jedoch stützten sich die Untersuchungen auf ein äußerst inhomogenes Kollektiv von 14 verschiedenen Tumorentitäten, darunter gastrointestinale Karzinome, oropharyngeale Karzinome oder Prostatakarzinome, die unterschiedlichste Charakteristika vorweisen. Es ist weiter anzumerken, dass gleiche TNM-Klassifikationen verschiedener Tumorarten nicht eine identische Tumorausbreitung bedeuten. Während die Kategorie T1 bei kolorektalen Karzinomen die Beschränkung der Geschwulst auf die Submukosa beschreibt, klassifiziert T1 bei Leberzellkarzinomen einen Tumor, der kleiner als 2 cm im Durchmesser ist.

Dies versuchten die Autoren zu kompensieren, indem sie für jeden Patienten mit seiner individuellen Tumorerkrankung aus dem Krebsregister seine spezielle Überlebenszeit bestimmten und mit der tatsächlich erreichten verglichen. Es ergab sich, dass Patienten mit weniger als 4000 Tumorzellen im Wundblut durchschnittlich länger lebten als nach ihren Tumorstadien prognostiziert und Patienten mit höheren Zellzahlen die erwartete Überlebenszeit häufiger nicht erreichten.

Insgesamt konnte also in dieser Studie ein Einfluss der Größe Tumorzellzahl im Wundblut auf die Prognose der Patienten nachgewiesen werden. Dennoch bleibt die Aussagekraft dieser Studie durch die Heterogenität des Patientengutes und die retrospektive Analyse eingeschränkt.

Für eine Festigung der prognostischen Bedeutung von Tumorzellen im Wundblut ist eine separate Betrachtung einzelner Tumorarten notwendig, wofür eine vorausgehende Quantifizierung der Tumorzellen erforderlich ist. Deshalb wurde als Teil einer prospektiven Studie Wundblut aus gastrointestinalen Karzinomen auf freie Tumorzellen hin untersucht.

2. Zielsetzung

Als Basis für eine prospektive Studie zur Untersuchung der prognostischen Bedeutung von freien Tumorzellen im Wundblut sollte bei tumorchirurgischen Eingriffen an Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen intraoperativ Wundblut gesammelt und auf Tumorzellen hin untersucht werden. Für die einzelnen Tumorentitäten Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Magenkarzinom und Pankreaskarzinom wurden jeweils Fallzahlen zwischen 20 und 30 angestrebt, ausreichend für organspezifische Testungen von Zusammenhängen der Tumorzellzahlen mit dem TNM-System, für einen statistischen Vergleich und für eine spätere Outcome-Nachuntersuchung.

Ziel der Arbeit war die Bestätigung des regelmäßigen Nachweises und die Zahl von Tumorzellen im Wundblut bei abdominalen Tumorerkrankungen.

Für eine hohe Sensitivität des Nachweises sollten die Tumorzellen aus dem Wundblut durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert werden. Die Tumorzellidentifikation war mit dem immunhistochemischen Nachweis von Zytokeratinen und zusätzlich der Färbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR) angestrebt, um für die verschiedenen Tumorarten eine einheitliche und vollständige Tumorzellerfassung zu gewährleisten.

Die ermittelten Tumorzellzahlen aus Zytokeratin- und AgNOR-Nachweis sollten auf mögliche Abhängigkeiten hinsichtlich Tumorausdehnung T, Lymphknotenstatus N, Fernmetastasierung M, Grading G und Residualtumorstatus R überprüft werden. Hier war es wichtiges Ziel, die gefundenen Tumorzellzahlen zusätzlich, jeweils nach Tumorentität und Nachweismethode getrennt, auf diese Zusammenhänge zu testen. Außerdem sollte eine Korrelationsanalyse zwischen Tumorzellzahl und Wundblutmenge vorgenommen werden, um einen etwaigen Zusammenhang zu zirkulierenden Tumorzellen zu prüfen.

Zur Bestätigung der Spezifität der AgNOR-Nachweismethode sollte die immunhistochemische Färbung des p53-Proteins eingesetzt werden. Weiterhin war es notwendig die Ergebnisse aus den verschiedenen Nachweismethoden miteinander zu vergleichen, wobei Korrelationsanalysen der Färbemethoden AgNOR und Zytokeratin-Nachweis, sowie AgNOR und p53-Nachweis durchzuführen waren.

Eine kritische Beurteilung der Ergebnisse mit Studien zu ähnlichen Themen war vorzunehmen, um die Glaubwürdigkeit der Ergebnisse zu verfestigen.

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

Die zur Bestimmung der Tumorzellzahl im Wundblut verwendeten Proben stammten von Patienten, die sich im Klinikum der Universität Regensburg, Klinik und Poliklinik für Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. H. Schlitt), einem tumorchirurgischen Eingriff unterziehen mussten. Es wurde Wundblut aus insgesamt 112 Operationen untersucht. Die wichtigsten untersuchten tumorchirurgischen Operationen sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tumorlokalisation	Operationsart
Kolon	Hemikolektomie rechts/links Erweiterte Hemikolektomie Sigmaresektion
Rektum	Tiefe anteriore Rektumresektion Abdomino-perineale Rektumextirpation
Magen	Totale Gastrektomie Subtotale Gastrektomie
Pankreas	OP nach Whipple Pankreaslinksresektion

Tab. 3: Art der untersuchten Operationen

Das Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Operation zwischen 15 und 83 Jahren mit einem Median von 60 Jahren.

3.2 Sammeln von Wundblut

Das Wundblut aus dem Operationsgebiet wurde mit einem sterilen Saugsystem aufgefangen, wie es zur Maschinellen Autotransfusion verwendet wird. Die Antikoagulation des angesaugten Blutes erfolgte dabei an der Saugerspitze durch Zutropfen einer heparinisierten Kochsalzlösung (25000 IE Heparin / l NaCl 0,9%) in der doppellumigen Saugleitung (*Haemonetics, München*) im Verhältnis von etwa 1:7 (Wundblut), welche mit 200ml der Lösung vorgefüllt war. Um Zellschäden zu minimieren wurde der Sog auf 0,3 mbar begrenzt. Gewebereste und Blutgerinnsel wurden durch den 150µm-Filter des Reservoirs

(LN 205, *Haemonetics, München*) zurückgehalten, in dem das Wundblut gesammelt wurde (HANSEN 1994).

Die Sammlung des Wundblutes begann mit dem Hautschnitt und dauerte bis zur Exstirpation des Tumorgewebes. Für die Untersuchungen wurden 50 ml Wundblut aus dem Reservoir entnommen, wobei das Gesamtvolumen für die späteren Berechnungen notiert wurde. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Material ins Labor transportiert. Anschließend erfolgte eine Bestimmung des Hämatokriten des Wundblutes mittels Blutgasanalyse.

3.3 Isolierung von Tumorzellen

Die Trennung der Tumorzellen von den Blutzellen erfolgte aufgrund ihres unterschiedlichen spezifischen Gewichtes durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten, wobei Zellen in einem Medium mit einem Gradienten zunehmender Dichte solange sedimentieren, bis sie die Dichte ihrem spezifischen Gewicht entsprechend erreicht haben. An diesem Punkt heben sich die auf die Zelle wirkende Zentrifugalkraft und Auftriebskraft auf. Bei einem kontinuierlichen Gradienten ist die Aufnahmekapazität jedoch begrenzt, weshalb zur Separation des Blutes ein Einstufen-Gradient verwendet wurde (HANSEN 1995). Hierbei sedimentieren die Zellen durch ein Medium einer bestimmten, einheitlichen Dichte. Zellen, die ein höheres spezifisches Gewicht als das Medium haben, sinken zu Boden. Diejenigen mit geringerem Gewicht werden über dem Medium zurückgehalten.

3.3.1 Herstellung eines Einstufen-Gradienten

Als Dichtegradientenmedium für den Einstufen-Gradienten wurde Percoll® (*Pharmacia, Uppsala, Schweden*) verwendet. Percoll besteht aus Polyvinylpyrrolidon-beschichteten Silikonpartikeln mit 15-30 nm Durchmesser. Die Substanz zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

- Percoll besitzt eine niedrige Osmolalität, wodurch die physiologischen Bedingungen für die Zellen aufrecht erhalten bleiben.
- Es besitzt keine toxischen Eigenschaften gegenüber den Zellen.
- Biologische Membranen werden nicht durchdrungen, so dass sich das spezifische Gewicht der Zellen während der Zentrifugation nicht verändert.
- Percoll besitzt eine geringe Viskosität auch bei niedrigen Temperaturen. Die Zentrifugation kann zellschonend bei 4°C durchgeführt werden.
- Es kann einfach aus der Zellsuspension ausgewaschen werden.

Die Dichte der Percoll-Grundlösung beträgt 1,120 g/ml \pm 0,005 g/ml (PERCOLL, PHARMACIA 1990). Zur Herstellung des Einstufen-Gradienten mit niedrigerer Dichte wurde

diese Lösung verdünnt. Durch Mischen von neun Teilen eines 10-fach konzentrierten Zellkulturmediums (*RPMI, Seromed Biochrom, Berlin*) zu einem Teil Percoll-Ausgangslösung entstand eine Percoll-Stammlösung. Aus dieser Stammlösung können Medien beliebiger Dichte berechnet werden (PERTOFT 1979).

3.3.2 Separation von Tumorzellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichte des Einstufen-Gradienten zur Separation von Tumorzellen und Blutzellen wurde auf 1.063 g/ml eingestellt, entsprechend dem spezifischen Gewicht gastrointestinaler Tumorzellen, wie sie in vorangegangenen Studien mittels Zentrifugation im kontinuierlichen Gradienten bestimmt worden waren (HANSEN 1994, WOLFF 1994):

Magenkarzinom	1,026 g/ml – 1,049 g/ml
Kolonkarzinom	1,029 g/ml – 1,062 g/ml
Rektumkarzinom	1,024 g/ml – 1,051 g/ml
Pankreaskarzinom	1,028 g/ml – 1,050 g/ml

Damit können Erythrozyten, sowie Granulozyten sicher und ein Teil der mononukleären Zellen (Monozyten, Lymphozyten) von den Tumorzellen abgetrennt werden (HANSEN 1994, THIM 1993).

Je 10ml gekühltes Medium wurde in 50ml-Zentrifugengefäße (*Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg*) vorgelegt und auf Eis zur Weiterverarbeitung gestellt. Die entnommenen 50ml Wundblut wurden zuerst auf die Temperatur des Gradienten abgekühlt und dann mit physiologischer NaCl-Lösung auf einen Hämatokrit von 10% verdünnt. Von der Wundblutsuspension wurden jeweils 40ml vorsichtig auf die 10ml Percollmedium überschichtet, wobei auf die Verhinderung des Vermischens von Gradient und Suspension besonders geachtet wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (*Megafuge 1.0R, Heraeus, Osterode*) der 50ml-Röhrchen für 30 min bei 600 x g und 4°C ohne Bremse. Die so erhaltenen Zellbanden an der Grenzschicht über dem Gradientenmedium wurden gesammelt. Dafür wurde zuerst der zellarme Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Die Bande wurde mit einer Pipette mit kreisenden Bewegungen aufgenommen, Volumen ca. 5ml, und in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Zum Auswaschen des Percoll wurde die Zellsuspension mit NaCl-Lösung auf 50ml aufgefüllt und bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Pellets gesammelt und in 2ml NaCl-Lösung resuspendiert (HANSEN 1994).

3.4 Nachweis von Tumorzellen

3.4.1 Vitalitätstestung in der Neubauerkammer

Die Bestimmung der Vitalität der Tumorzellen in der gewaschenen Suspension erfolgte in einer Zählkammer. Es wurden 100µl der Tumorzellsuspension mit 50µl Trypan-Blau-Lösung (*Seromed Biochrom, Berlin*) für 3min inkubiert. Der Farbstoff dringt durch die Membran in tote Zellen ein und färbt diese blau, während vitale Zellen keinen Farbstoff aufnehmen. In der Neubauerkammer wurden die vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop in 16 Feldern ausgezählt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 15000 erhält man die Zellmenge pro ml Zellsuspension.

Anschließend wurden die toten, angefärbten Zellen nach dem Farbausschlussprinzip ermittelt. Aus dem Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl ergibt sich die Vitalität (in Prozent). Die weiter angegebenen Zellzahlen beziehen sich immer auf lebenden Zellen.

3.4.2 Zytozentrifugation

Die Zytozentrifugation ermöglicht das quantitative und zellschonende Aufbringen von Zellen einer Zellsuspension auf Objektträger durch Zentrifugation, wobei eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf einen eng begrenzten Raum gewährleistet ist. Die Flüssigkeit der Suspension wird von einem Flies, das dem Objektträger aufliegt, aufgenommen.

Von der Zellsuspension wurden jeweils 200µl in einer Zytozentrifuge (*Cytospin 3, Shandon, Frankfurt*) für 10min bei 213 x g und Raumtemperatur auf Objektträger zentrifugiert. Da in vielen Fällen die Zellschicht auf den Zytospins zu dicht war, also Zellen übereinanderlagen oder die Zellzahl für die Auswertung zu groß war, wurden aus der Suspension Verdünnungen von 1:5 und 1:25 mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt. Nach Lufttrocknung der fertigen Zytospins erfolgte die Fixierung der Objektträger in eisgekühltem Aceton/Methanol für 10min und die anschließende tiefgekühlte Aufbewahrung bis zur Färbung. Durch diese Fixierung bleiben die Morphologie der zellulären Strukturen und die Antigenität erhalten, intrazelluläre Antigene werden zugänglich gemacht (BÖCK 1989a).

3.4.3 Silberfärbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR)

Als Nukleolus organisierende Regionen (NOR) werden die Genorte der ribosomalen DNA (rDNA) bezeichnet. Diese ist während der Interphase vorwiegend im Nukleolus gelegen, wo die Transkription von rDNA zu ribosomaler RNA (rRNA) erfolgt. Da rRNA selbst den

Hauptbestandteil der Ribosomen bildet, werden NORs auch als Ribosomenfabrik einer Zelle bezeichnet und sind somit von zentraler Bedeutung für die zelluläre Proteinbiosynthese (FALKAN et al. 1986).

Die Silberfärbung stellt spezifisch Regulatorproteine der rDNA-Transkription dar, die mit den NOR-Genen assoziiert sind (LAPEYRE et al. 1987). Dementsprechend ist die AgNOR-Reaktion eng mit der Proliferation einer Zelle korreliert (DERENZINI et al. 1989, RÜSCHOFF et al. 1992). Die AgNORs imponieren im Lichtmikroskop als kleine schwarze Punkte (Dots) und korrelieren in Zahl, Größe und Verteilung mit Proliferationsrate, Dignität und Malignitätsgrad von Zellen (RÜSCHOFF et al 1992).

Die Qualität der Silberfärbung ist von einigen Einflussfaktoren, wie z.B. Art und Zeitpunkt der Fixierung oder Vitalität der Zellen, abhängig. Besonders die Anpassung der Silber-Inkubationszeit hat einen wichtigen Einfluss auf die Auswertbarkeit der Präparate. Bei kurzer Einwirkzeit werden nur wenige AgNOR angefärbt, bei zu langer Inkubation die Nukleoli vollständig mit Silber gefärbt und die einzelnen AgNOR nicht mehr abgrenzbar (RÜSCHOFF 1992). Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurden Färbereihen von Zytopspinpräparaten mit Zellen der Rektumkarzinomzelllinie SW480 und nach Dichtezentrifugation von Blutproben durchgeführt.

Für den Nachweis von NOR in Tumorzellen ergab sich folgendes Vorgehen:

- Rehydrierung der Objektträger in Aqua bidest. für 5 min
- Mischen der Färbelösung aus 2%iger Gelatine (*Sigma, Deisenhofen*), 1%iger Ameisensäure (*Fluka, Buchs*) und 50%igem Silbernitrat (*Fluka, Buchs*)
- Aufpipettieren der AgNOR-Färbelösung auf die Objektträger
- Inkubation für 27 min bei Raumtemperatur in dunkler, feuchter Kammer
- dreimaliges Waschen in PBS-Puffer für jeweils 5 min
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe
- Fixierung in Xylol für 5 min
- Abdeckung der Objektträger mit Deckglas und Versiegelung mit Entelan (*Merck, Darmstadt*)

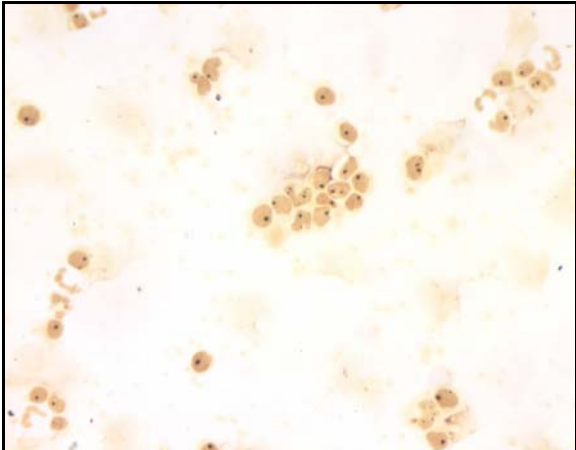


Abb. 1: AgNOR-Färbung von Leukozyten (Negativkontrolle)

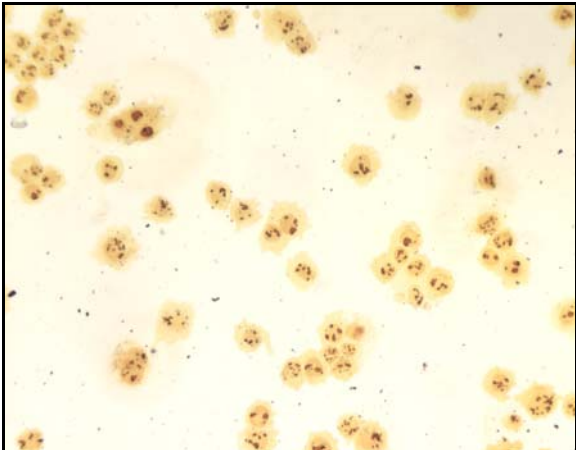


Abb. 2: AgNOR-Färbung von Tumorzellen der Zelllinie SW480 (Positivkontrolle)

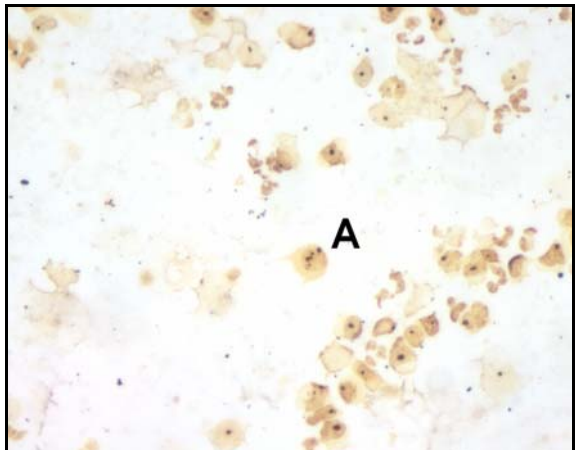


Abb. 3: AgNOR-Färbung von Wundblut eines Kolonkarzinoms
A Tumorzelle

Vor der Auswertung erfolgte jeweils eine Beurteilung der Färbequalität. Wenige große Flecken entsprechen Nukleolen und sind Ergebnis bei Überfärbung. Ockerfarbene, braune Nukleolen ohne nachweisbare silberschwarze intranukleoläre Dots (AgNOR) deuten meist auf eine ungenügende Fixierung hin. Es wurden nur Objektträger für die Auswertung verwendet, bei denen die Positivkontrolle (Zellen der Rektumkarzinomzelllinie SW 480) im Lichtmikroskop zahlreiche silberschwarze Dots als Substrukturen der Nukleolen zeigten (RÜSCHOFF 1992).

Zur Diagnostizierung einer aus Blut isolierten Zelle als „Tumorzelle“ wurde das Vorliegen vieler kleiner AgNORs über einem Großteil des Kerns (AgNOR-Zahl ≥ 6 , AgNOR-Fläche $> \frac{1}{4}$ der Kernfläche) herangezogen (RÜSCHOFF 1992).

3.4.4. Enzymimmunochemische Färbung der Zytokeratine

Der Nachweis von Zytokeratinen ermöglicht die eindeutige Unterscheidung von Zellen epithelialen Ursprungs und Blutzellen (BOURNE 1983, DENK 1989, HARLOZINSKA et al. 1989, MOLL et al. 1982). Epithelzellen oder Zellen epithelialer Herkunft, wie Karzinomzellen, enthalten im Unterschied zu den Blutzellen in ihrem Zytoskelett Zytokeratine, die mittels spezifisch-bindenden Antikörpern angefärbt werden.

Für den Nachweis von Zytokeratinen wurde die indirekte Peroxidase-Methode angewandt. Dabei bindet ein spezifischer Antikörper an das Antigen. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird durch einen zweiten Antikörper, der mit einem Enzym konjugiert ist, lokalisiert und nach Zugabe eines Chromogens durch enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht (BÖCK 1989).

Als spezifischer Antikörper gegen Zytokeratine wurde ein monoklonaler IgG-Antikörper aus der Maus eingesetzt. Der Antikörper KL1 bindet an ein Epitop, das in den verschiedenen Zytokeratinen vorkommt. Somit ist gewährleistet, dass er für den Nachweis von Karzinomzellen aus verschiedenen Organen gleichermaßen geeignet ist. Als Sekundär-Antikörper wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Immunglobuline der Maus, konjugiert mit dem Enzym Meerrettichperoxidase, verwendet. Für die Farbstoffreaktion diente das Chromogen Aminoethylcarbazol (AEC), Substrat für die Peroxidase, das zusammen mit Wasserstoffperoxid ein rotbraunes Farbprodukt bildet. Die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen wurde zuvor mit der Inkubation mit 3%igem Wasserstoffperoxid blockiert. Zur besseren Zellerkennung wurden die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt.

Für den Nachweis der Zytokeratine ergab sich deshalb folgendes Vorgehen:

- Objektträger in PBS-Puffer für 5 min rehydrieren
- Inkubation mit 1%iger H₂O₂/Methanol-Lösung für 15 min
- 3 x Waschen in PBS für jeweils 5 min
- Inkubation mit Primärantikörper (*Dako, Glostrup, Dänemark*) für 60 min bei Raumtemperatur und in feuchter Kammer (50µl einer 1:100 Verdünnung)
- 3 x Waschen in PBS-Puffer für jeweils 5 min
- Inkubation mit Sekundärantikörper (*Dako, Glostrup, Dänemark*) (für 45 min bei Raumtemperatur und in feuchter Kammer) (50µl einer 1:40 Verdünnung)
- 3 x Waschen in PBS-Puffer für jeweils 5 min
- Inkubation mit Aminoethylcarbazol (AEC) (*Beckman-Coulter, Marseille, Frankreich*) für 5 min
- Waschen mit PBS-Puffer für 10 min
- Gegenfärbung in Hämalaun für 5 sec
- Waschen unter laufendem Wasser
- Abdeckelung der Objektträger mit Deckglas und Versiegelung mit Aquatex (*Merck, Darmstadt*)

Um die Ergebnisse einer enzymhistochemischen Färbung eindeutig analysieren zu können werden positive und negative Kontrollen benötigt. Dazu wurden zusätzlich zu den untersuchten Objektträgern eine positive (Tumorzelllinie SW 480) und zwei negative (Färbung mit Aminoethylcarbazol ohne vorherige Antikörperinkubation bzw. Maus-Normal-Antikörper als erster Antikörper) Kontrollen mitgefärbt.

Nach Immunperoxidasefärbung von Zytokeratinen stellt sich das Zytoplasma von Tumorzellen rotbraun dar, so dass sie eindeutig von Blutzellen unterschieden werden können. Da auch normale epitheliale Zellen Zytokeratine aufweisen, mussten zur Identifizierung von Tumorzellen bei der Beurteilung unter dem Lichtmikroskop auch morphologische Kriterien herangezogen werden. Die wichtigsten morphologischen Kennzeichen von Tumorzellen stellen ihre auffallende Größe, die Größe der Kerne, die Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns, Unregelmäßigkeiten der Kernstruktur und Unregelmäßigkeiten in der Form der Zellen dar (GLAVES 1987).

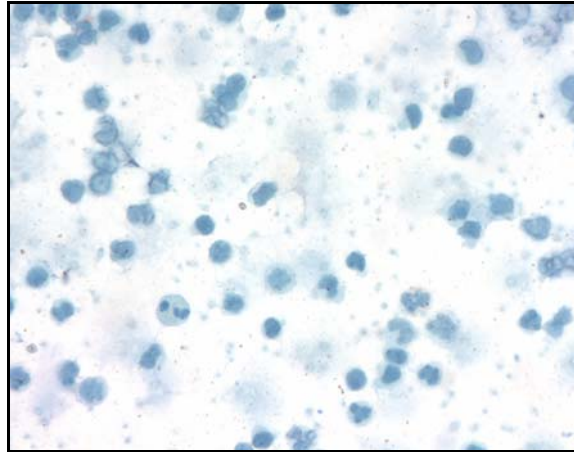


Abb. 4: Zytokeratin-Färbung von Leukozyten (Negativkontrolle)

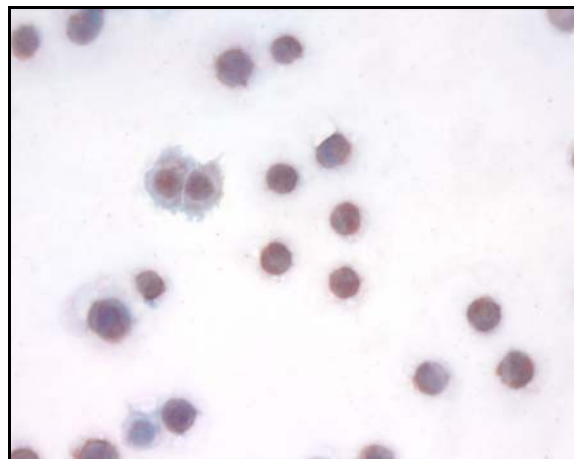


Abb. 5: Zytokeratin-Färbung von Tumorzellen der Zelllinie SW480 (Positivkontrolle)

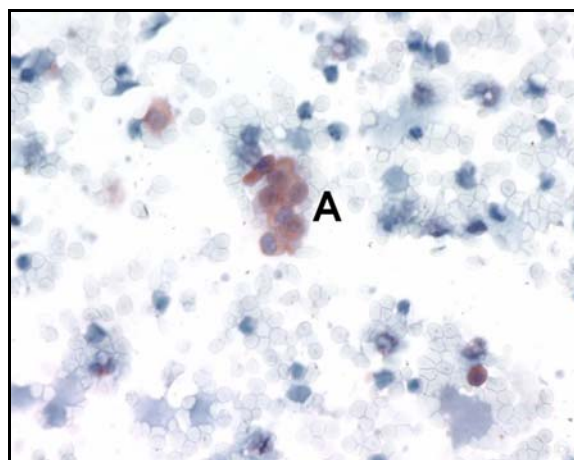


Abb. 6: Immunhistochemischer Zytokeratin-Nachweis von Wundblut eines Magenkarzinoms

A Tumorzellen

3.4.5 Enzymimmunhistochemische Färbung von p53

Das Protein p53 spielt als Tumor-Supressor eine entscheidende Rolle in der Apoptoseinduktion nach DNA-Schäden. Genetische Veränderungen von p53 gehören mit zu den häufigsten bei humanen Malignomen (MOSNIER et al. 1996). Als Tumor-Supressor wird das Protein nach genotoxisch induzierten Schädigungen überexprimiert, um regulierend in einer seiner zwei Funktionen, Zellzyklus und Apoptose, einzugreifen (YIN et al. 1992, SYMONDS et al. 1994). P53 ist also in die Kontrolle des zellulären Wachstums und die Regulation des Zellzyklus involviert (HARRIS et al. 1991). Sein Funktionsverlust stellt möglicherweise einen wichtigen Schritt in der Tumorgenese dar (LEVINE et al. 1991, KO et al. 1996).

In normalem Gewebe ist das p53-Protein wegen seiner kurzen Halbwertszeit nur in so geringer Konzentration vorhanden, dass ein immunhistochemischer Nachweis nicht möglich ist (BARTEK 1990, BARTEK 1991, MIDGLEY et al. 1992). Erhöhte Level des p53-Proteins wurden jedoch in Tumorzellen vieler Gewebe gefunden, da die mutierte Form eine verlängerte Halbwertszeit besitzt (CRAWFORD et al. 1981) und mit anderen Proteinen stabile Komplexe bilden kann. Dadurch resultiert eine Akkumulation der immunhistochemisch nachweisbaren Proteinmenge (FINLEY et al. 1988).

Die enzymimmunhistochemische Färbung des p53-Proteins wurde an einigen Präparaten als zusätzliche Nachweismethode von Tumorzelle in den Blutproben neben der routinemäßigen AgNOR- und Zytokeratin-Färbung durchgeführt.

Der Nachweis des p53-Proteins erfolgte durch die Avidin-Biotin-Methode.

Für den Nachweis des p53-Proteins ergab sich folgendes Vorgehen:

- Objektträger in PBS-Puffer rehydrieren für 5 min
- Objektträger in Target Retrieval Solution (*Dako, Carpinteria, USA*) kochen für 5-8 min
- Objektträger auskühlen lassen
- Überführen der Präparate in PBS-Puffer und für 5min stehen lassen
- Inkubation mit 1%iger H₂O₂/Methanol-Lösung für 15min
- 3 x Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 min
- Inkubation mit Blocking-Reagenz (*Dako, Glostrup, Dänemark*) (1:100 Verdünnung mit Tris-Puffer) für 20 min
- Blocking-Reagenz ablaufen lassen und Antikörper direkt auf Präparat geben
- Inkubation mit p53-Antikörper (*Dako, Glostrup, Dänemark*) (1:50 verdünnt mit Tris-Puffer) bei Raumtemperatur für 60 min

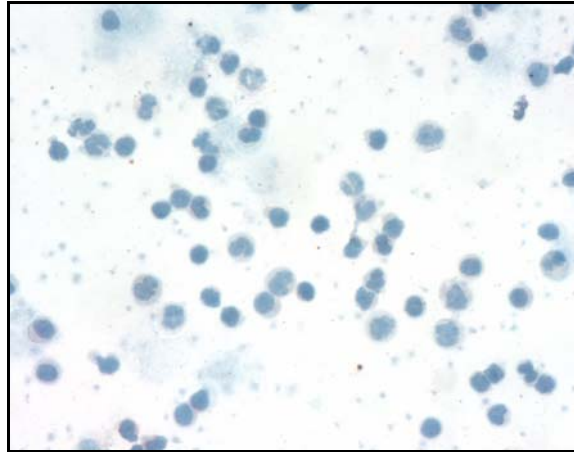


Abb. 7: p53-Färbung von Leukozyten (Negativkontrolle)

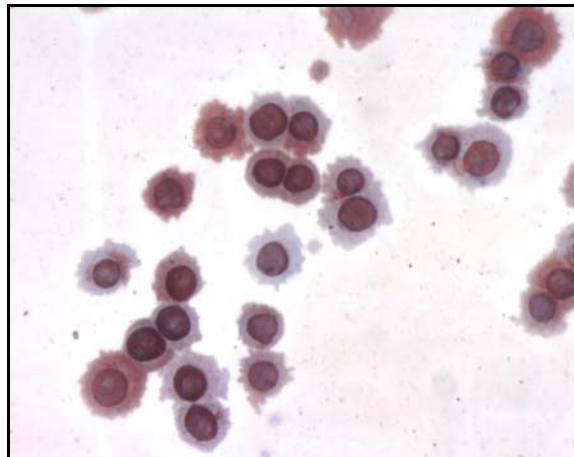


Abb. 8: p53-Färbung von Tumorzellen der Zelllinie SW480 (Positivkontrolle)

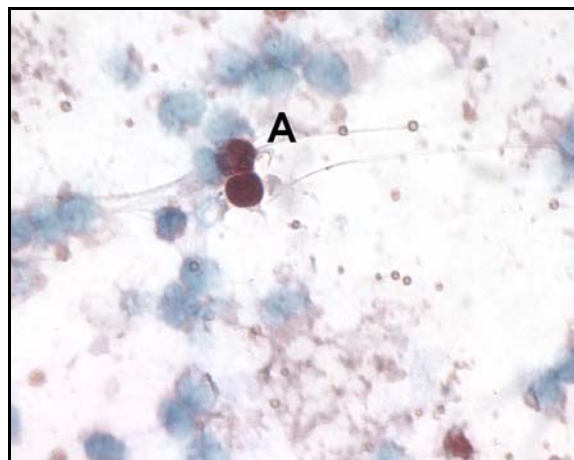


Abb. 9: p53-Nachweis von Wundblut eines Pankreaskarzinoms
A Tumorzellen

- 3 x Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 min
- Inkubation mit Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 45 min
- 3 x Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 min
- Inkubation mit Peroxidase-Enzym-Komplex bei Raumtemperatur für 45 min
- 3 x Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 min
- Inkubation mit Chromogen-Substratlösung (Aminoethylcarbazol) (*Beckman-Coulter, Marseille, Frankreich*) für 23 min
- Wässern unter laufendem Leitungswasser für 5 min
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 5 sec
- Wässern unter laufendem Leitungswasser für 5 min
- Abdeckelung der Objektträger mit Deckglas und Versiegelung mit Aquatex (*Merck, Darmstadt*)

Bei Tumorzellen, die p53 akkumulieren, entsteht infolge der enzymatischen Umsetzung des Chromogens Aminoethylcarbazol (AEC) ein rosarotes Farbprodukt im Zellkern, während Zytoplasma und negative Zellen blau erscheinen.

3.4.6 Quantifizierung der Färbeergebnisse

Die gefärbten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop von jeweils zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet, indem alle positiven Zellen pro Gesichtsfeld gezählt wurden. Es wurde jeweils das gesamte Präparat ausgezählt indem die Präparatfläche meanderförmig gesichtet, alle Gesichtsfelder ausgewertet und zusammengezählt wurden.

Zur Ermittlung der Gesamtzahl der Tumorzellen im Wundblut wurde die gefundene Zellzahl im Präparat anhand folgender Formel hochgerechnet:

$$\begin{aligned}TZ &= V_G / V_P \times V_S / V_Z \times F_Z \times TZ_Z \\ &= V_G / 50\text{ml} \times 2000\mu\text{l} / 200\mu\text{l} \times F_Z \times TZ_Z\end{aligned}$$

TZ = Tumorzellzahl

V_G = Gesamtvolumen Wundblut

V_P = Probenvolumen

V_S = Volumen Zellsuspension

V_Z = Volumen Zytospin

F_Z = Verdünnungsfaktor für Zytospin (1, 5, 25)

TZ_Z = Tumorzellzahl im Präparat

Beispiel:
$$\begin{aligned}TZ &= 1000\text{ml} / 50\text{ml} \times 10 \times 5 \times TZ_z \\ &= 1000 \times TZ_z\end{aligned}$$

3.5 Statistische Auswertung

Für den Vergleich der Tumorzellzahlen in zwei Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Er prüft, ob die Verteilung zweier unterschiedlicher Grundgesamtheiten übereinstimmen oder ob ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen existiert. Die Nullhypothese H_0 lautet, dass die Verteilungskurven der beiden Stichproben identisch sind. Das Signifikanzniveau wird durch den p-Wert dargestellt. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $\alpha=0,05$ akzeptiert. Somit wurden p-Werte kleiner als 0,05 als signifikant bewertet.

Der lineare Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Merkmalen, die in Form von Wertepaaren vorliegen, wird durch den Korrelationskoeffizienten k beschrieben. Dieser Koeffizient liegt zwischen -1 und +1, wobei ein Betrag nahe 1 einen starken, ein Betrag nahe 0 einen schwachen Zusammenhang bedeutet. Das Signifikanzniveau p dieser Tests gibt die Absicherung gegen die Nullhypothese $k=0$ bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit α (hier $\alpha=0,05$) wieder.

Zur Korrelationsanalyse wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman's Rho verwendet.

Sämtliche statistische Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows, Version 13.0.0, berechnet.

Aufgrund des großen Schwankungsbereiches der Tumorzellzahl von 0 bis 10^9 wurden fast sämtliche Berechnungen mit dem logarithmischen Wert der Zellzahl durchgeführt. Dadurch ist in den Diagrammen eine bessere Übersichtlichkeit gegeben.

Die Auseinandersetzung mit der vorhandenen Literatur stützt sich auf eine, die letzten 25 Jahre umfassende, professionelle Medline- und DIMDI-Recherche.

4. Ergebnisse

4.1 Tumorzellen im Wundblut

4.1.1 Nachweis

Zur Analyse wurde das Wundblut aus insgesamt 112 Operationen von gastrointestinalen Tumoren herangezogen, wobei es sich im Einzelnen um Eingriffe bei Kolonkarzinomen (n=18), bei Rektumkarzinomen (n=32), bei Magenkarzinomen (n=30) und bei Pankreaskarzinomen (n=17) handelte. Als Kontrollen dienten abdominalchirurgische Operationen bei gutartigen Veränderungen oder Entzündungen, wie stenosierendes Kolonadenom, chronische Divertikulitis, chronische Pankreatitis oder Pankreaskopfadnom (n=15). Darunter sind Fälle bei denen die Histologie erst nachträglich ergab, dass es sich um keine maligne Erkrankung handelte. Sie können somit als unbeabsichtigte Blindkontrollen angesehen werden.

Die Ermittlung der Tumorzellzahl erfolgte durch zwei Färbemethoden, Zytokeratin-Nachweis und AgNOR-Färbung, die jeweils getrennt ausgewertet wurden. Zusätzlich wurde bei einem Teil der Präparate der Nachweis des Proteins p53 durchgeführt. Da die gefundenen Zellzahlen im Wertebereich zwischen 0 und 10^8 lagen, wurde für die Berechnungen und die Diagramme zur Verbesserung der Übersichtlichkeit eine logarithmische Umformung durchgeführt. Für den nicht definierten $\log_{10}(0)$ wurde der Wert 0 eingesetzt. Außerdem war die Variable $\log_{10}(\text{Tumorzellzahl})$ im Gegensatz zur Tumorzellzahl normalverteilt.

In der Tabelle im Anhang sind sämtliche ermittelten Daten und Ergebnisse des Tumorzellnachweises dargestellt. Die Einteilung in die Kategorien T, N, M, G und R erfolgte aufgrund der pathologisch-histologischen Gutachten. Die Mengenangabe „Volumen“ bezieht sich auf die während der Operation im Reservoir angesammelte Flüssigkeitsmenge und stellt kein reines Blut (Hämatokrit von 8-21%) dar. Nach der Zellseparation lag eine Vitalität der Zellsuspension von 90-97% vor.

Die Werte der Zytokeratin-Auswertung waren regelmäßig höher als die Tumorzellzahlen in der AgNOR-Färbung.

4.1.2 Kontrollen

Auch im Wundblut der 15 Kontrollen fanden sich Zytokeratin-positive Zellen mit einem Median von $3,3 \times 10^4$ Zellen, während sich in der AgNOR-Färbung keine malignen Zellen nachweisen ließen. So fanden sich im Wundblut einer Operation zur Anlage eines aorto-

femoralen Bypasses im Zytokeratin-Nachweis $1,2 \times 10^3$ Zellen, jedoch keine AgNORs. Interessanterweise konnten in zwei Fällen von Sarkomen (Lebersarkom, vaskuläres Sarkom des Duodenums, Jejunums und Ileums) ebenfalls mit der immunhistochemischen Färbung auf Zytokeratine positive Zellen identifiziert werden, obwohl Sarkome nicht epithelialen Ursprungs sind und sich mit dieser Methode nicht anfärben lassen. In der AgNOR-Färbung konnten eindeutig Tumorzellen nachgewiesen werden.

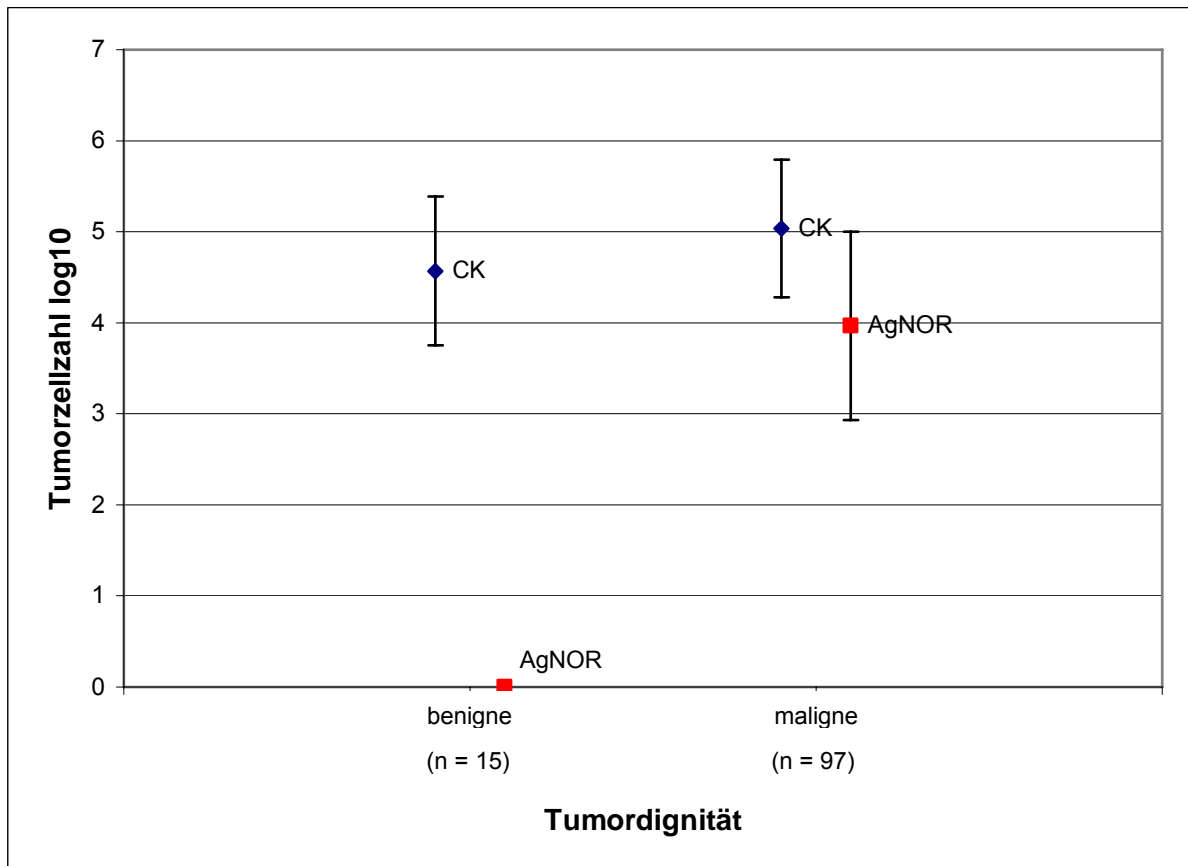


Abb. 10: Kontrollen für den Tumorzellnachweis im Wundblut (Mittelwerte mit Standardabweichungen für Zytokeratin (CK)- und AgNOR-Nachweismethode)

4.1.3 Korrelation Tumorzellzahl und Wundblutvolumen

Das Gesamtvolumen an Wundblut durchlief einen Bereich von 50 bis 2600 ml. In 67 von 97 Fällen (69%) erreichte das Volumen des gesammelten Blutes maximal 1000ml. Die Korrelationsanalyse zeigte mit einem Koeffizienten von $k=0,42$ nur eine geringe Korrelation zwischen Zellzahl und Wundblutvolumen (Abb. 11).

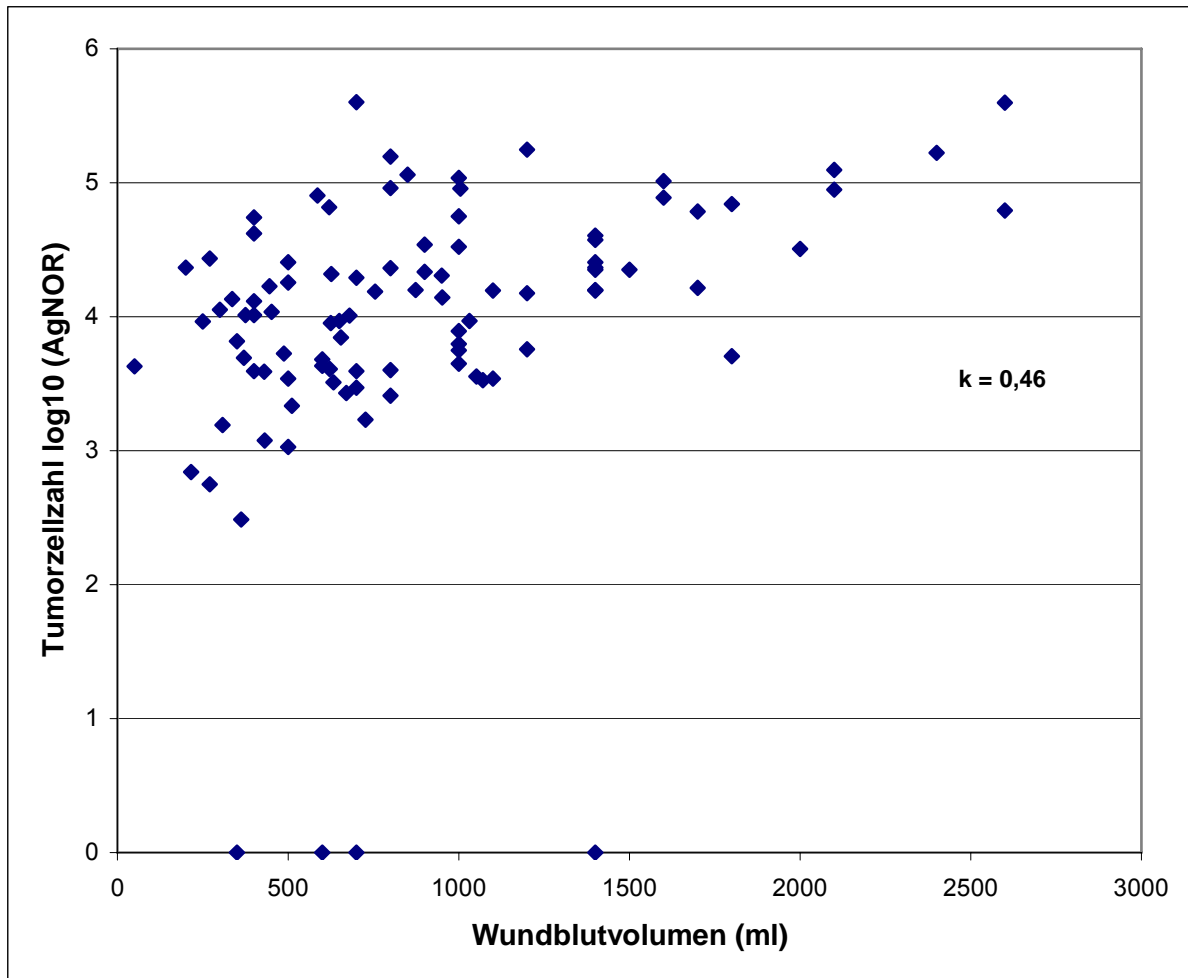


Abb. 11: Korrelation von Tumorzellzahl (AgNOR) und Wundblutvolumen

4.1.4 Tumorzellzahl und Tumorlokalisierung

Die höchsten Werte an Zytokeratin-positiven Zellen mit einer mittleren Zellzahl von 151.000 konnten für das Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Es folgten das Magenkarzinom, Mittelwert 142.000 Zellen, und das Rektumkarzinom, Mittelwert 93.000 Zellen. Mit einer durchschnittlichen Zytokeratin-positiven Zellzahl von 65.000 hatten Patienten mit Pankreaskarzinom die niedrigsten Werte.

Dafür konnten beim Pankreaskarzinom die meisten Tumorzellen mittels AgNOR-Nachweismethode (mittlere Zellzahl 16.000) detektiert werden. Auch Patienten mit Kolonkarzinomen hatten ähnlich hohe Tumorzellzahlen. Deutlich geringere Zellzahlen zeigten Patienten mit Rektumkarzinom (Mittelwert 9.200 AgNOR-Zellen), und Patienten mit Magenkarzinom (4.800 Tumorzellen im Mittel).

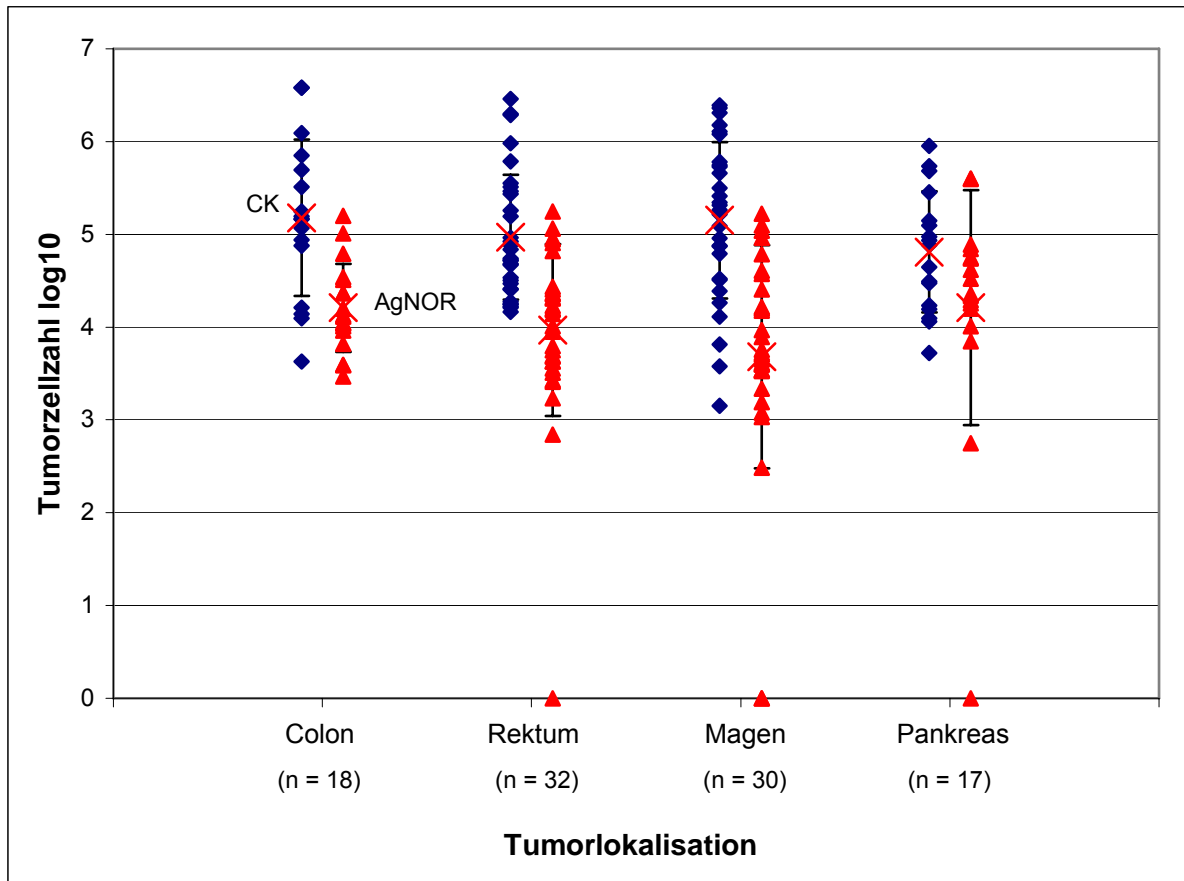


Abb. 12: Tumorzellzahl und Tumorlokalisation (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen für Zytokeratin (CK)- und AgNOR)

4.2 Korrelation der Tumorzellzahl zur Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Grading und Residualtumorstatus

4.2.1 Gesamtkollektiv

Für das Gesamtkollektiv aller eingeschlossenen 97 Patienten ergab sich ein Anstieg der Tumorzellzahlen in Abhängigkeit von der lokalen Ausdehnung des Tumors. Die mittleren Zellzahlen des Zytokeratin-Nachweises stiegen von $5,3 \times 10^4$ (T1-Karzinome) auf $1,6 \times 10^5$ (T4-Karzinome), was eine Verdreifachung der Werte bedeutete. Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Auch der Anstieg von T2 nach T3 erreichte mit $p=0,055$ nicht das Signifikanzniveau.

Einen ähnlichen Verlauf erbrachte die Auswertung der Tumorzellzahlen nach der AgNOR-Nachweismethode. Mit $p=0,021$ war die Zunahme zwischen T2-Karzinomen und T3-Karzinomen signifikant. Weitere signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede ergaben sich für T1/T3 mit $p=0,036$, T1/T4 mit $p=0,001$ und T2/T4 mit $p=0,005$ (Abb. 13).

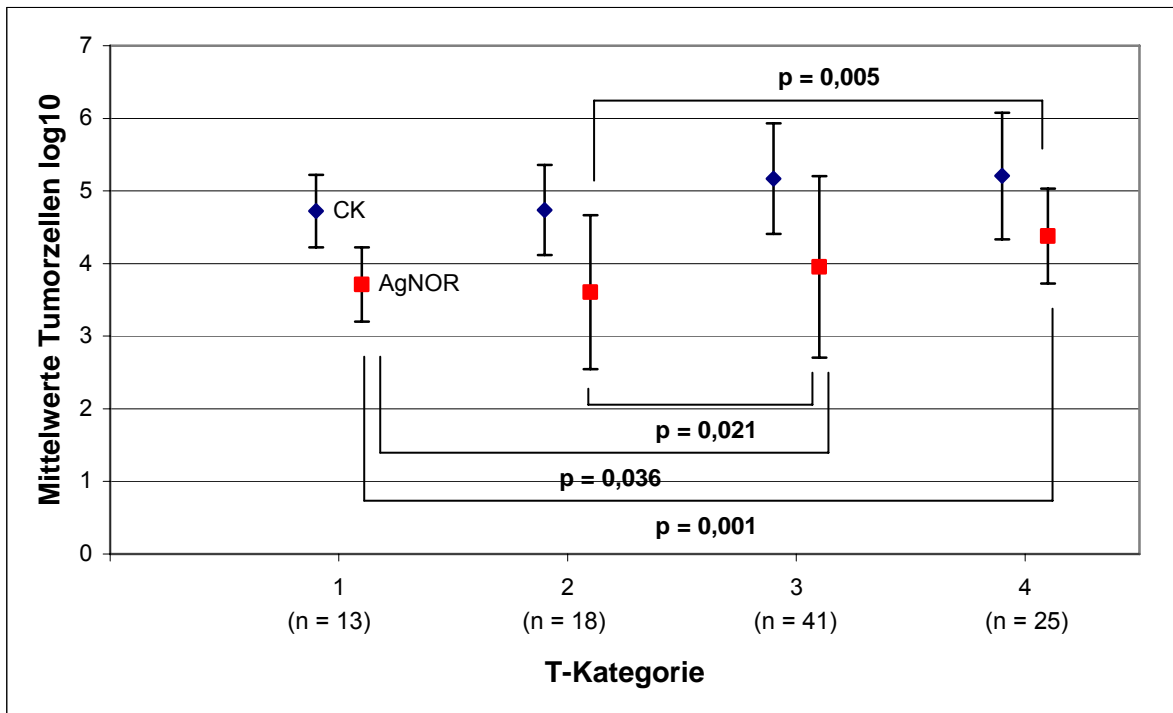


Abb. 13: Abhängigkeit der Tumorzellzahl von der Tumorausdehnung T (Mittelwerte mit Standardabweichungen für Zytokeratin (CK)- und AgNOR-Nachweismethode)

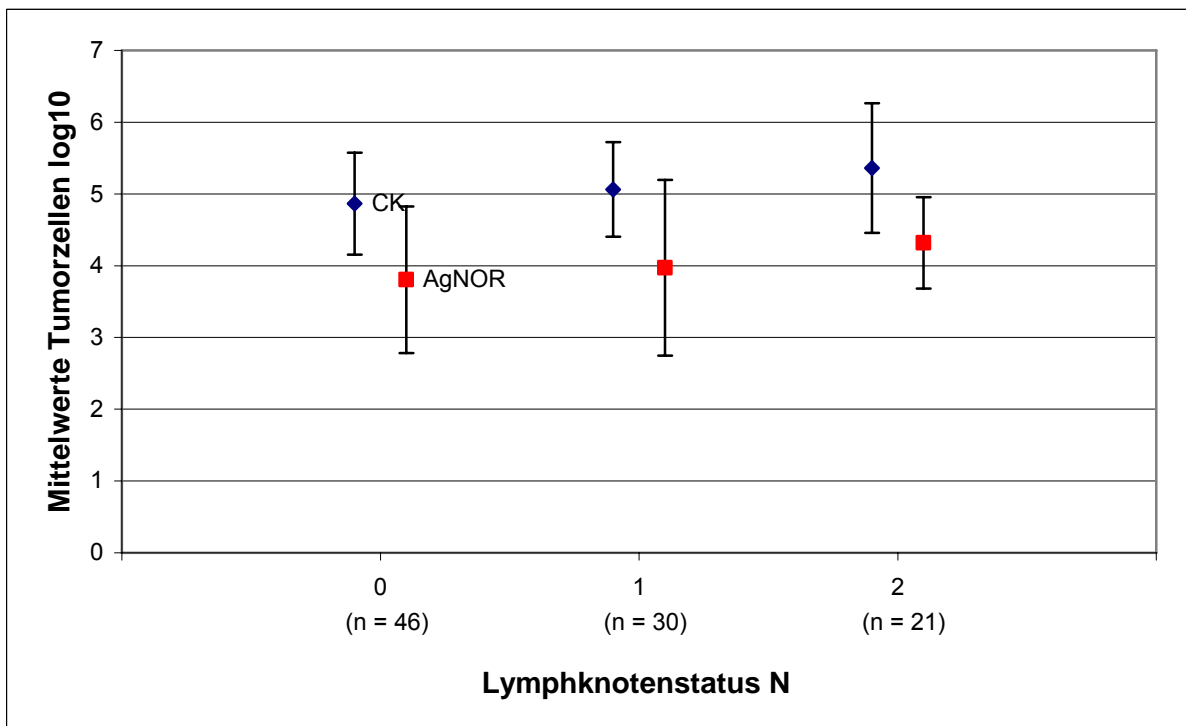


Abb. 14: Abhängigkeit der Tumorzellzahl vom Lymphknotenstatus N (Mittelwerte mit Standardabweichungen für Zytokeratin (CK)- und AgNOR-Nachweismethode)

Trotz des kontinuierlichen Anstiegs der Tumorzellzahlen in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus bei beiden Nachweismethoden, konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Im Gegensatz zu Karzinompatienten ohne Lymphknotenbefall hatten Patienten mit Lymphknotenstatus N2 im Mittel dreimal mehr Tumorzellen im Wundblut (Abb. 14).

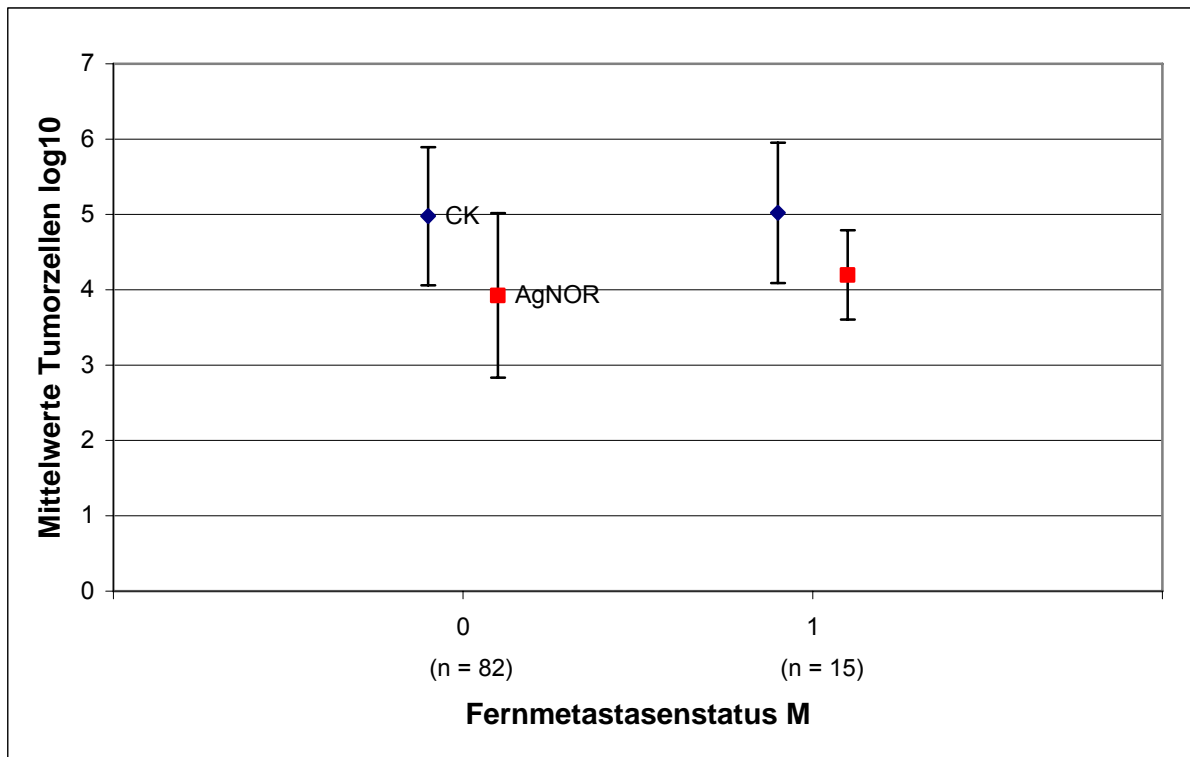


Abb. 15: Abhängigkeit der Tumorzellzahl vom Fernmetastasenstatus M (Mittelwerte mit Standardabweichungen für Zytokeratin (CK)- und AgNOR-Nachweismethode)

Die Existenz von Fernmetastasen schien keinen Einfluss auf die Tumorzellzahl im Wundblut zu haben. Die Mittelwerte der Zytokeratin-positiven Zellen bei Patienten ohne und mit nachgewiesenen Fernmetastasen waren mit 94800 und 105200 ähnlich hoch. Auch der Anstieg der AgNOR-Werte von 8400 Tumorzellen bei Patienten ohne Fernmetastasen auf 15700 bei Patienten mit Metastasen erreichte das Signifikanzniveau nicht (Abb. 15).

Mit zunehmender Entdifferenzierung der Karzinome zeigte sich jeweils eine Zunahme der Tumorzellen im Wundblut. Für den Zytokeratin-Nachweis waren die Zellzahlen zwischen G2- und G3-Karzinomen, sowie G1- und G3-Karzinomen signifikant unterschiedlich ($p=0,011$ bzw. $p=0,018$). Auch in der AgNOR-Auswertung wiesen Patienten mit gering differenzierten (G3) gastrointestinalen Karzinomen signifikant ($p=0,039$) höhere Tumorzellzahlen auf als Patienten mit mäßig differenzierten (G2) Karzinomen (Abb. 16).

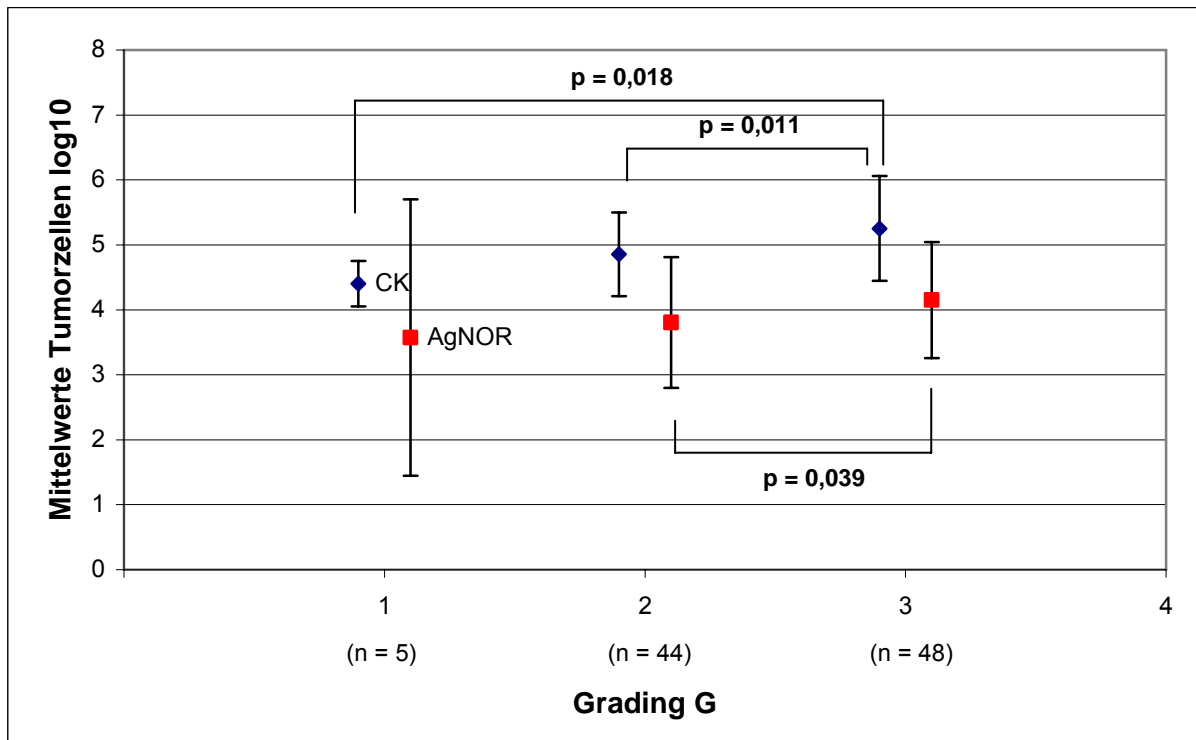


Abb. 16: Abhängigkeit der Tumorzellzahl vom Differenzierungsgrad G (Mittelwerte mit Standardabweichungen für Zytokeratin (CK)- und AgNOR-Nachweismethode)

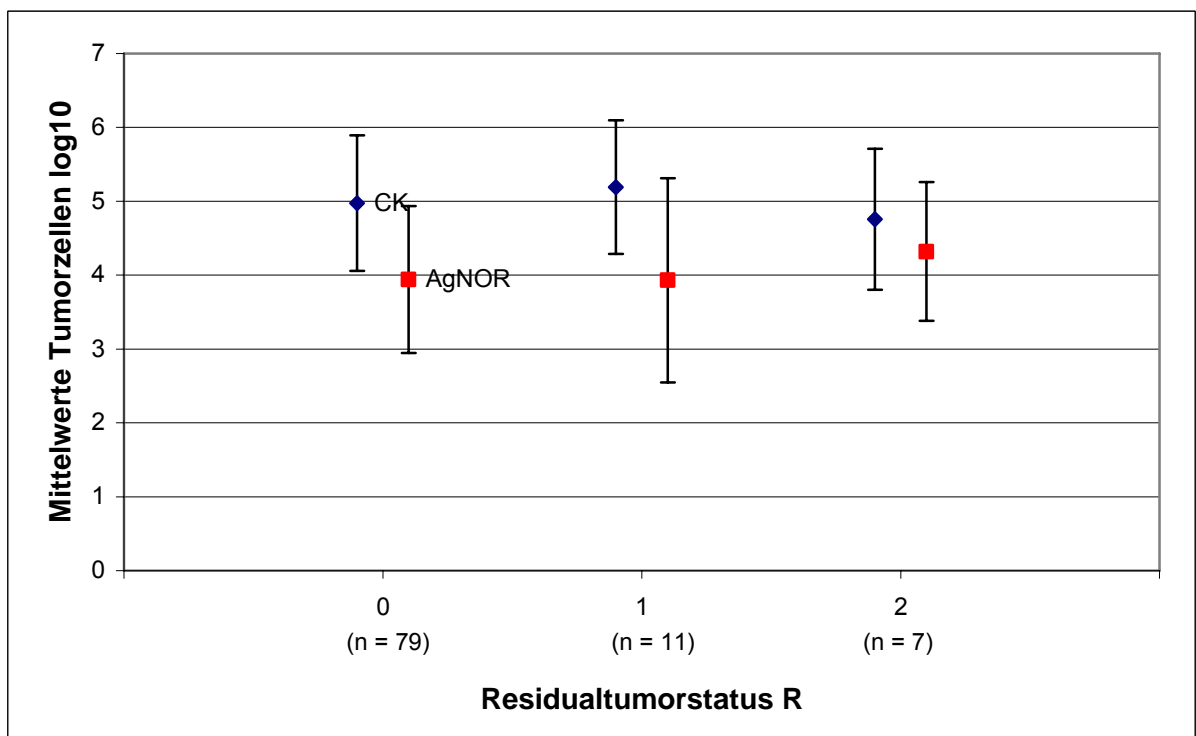


Abb. 17: Abhängigkeit der Tumorzellzahl vom Residualtumorstatus R (Mittelwerte mit Standardabweichungen für Zytokeratin (CK)- und AgNOR-Nachweismethode)

Die Entwicklung der Tumorzellzahlen im Wundblut in Abhängigkeit vom Residualtumorstatus erbrachte keine einheitliche Tendenz. Patienten mit R2-Status zeigten sogar einen Rückgang der Zytokeratin-positiven Zellen im Vergleich zu Patienten, die R1 reseziert wurden (Abb. 17).

4.2.2 Kolonkarzinom

In der Gegenüberstellung der T-Kategorien (Tumorausdehnung) zeigte sich eine Zunahme der Zytokeratin-Zellzahlen sowohl von T2- zu T3-Tumoren als auch von T3- zu T4-Tumoren mit Mittelwerten von $3,1 \times 10^4$, $6,8 \times 10^4$ und $6,1 \times 10^5$. Die Zunahmen waren jedoch nicht signifikant. Für die Klassifikation T1 lag im Beobachtungszeitraum kein Wundblut zur Untersuchung vor (Abb. 18).

Die Tumorzellzahlen, die anhand des AgNOR-Nachweises ermittelt wurden, zeigten im Vergleich der einzelnen T-Kategorien zwar einen deutlichen Anstieg von T2 bis T4, die Zellzunahmen waren jedoch nicht signifikant. Der Unterschied von Tumorzellen im Wundblut bei Patienten mit T2-Kolonkarzinomen und T4-Karzinomen verfehlte mit $p=0,087$ nur knapp das Signifikanzniveau. Die Mittelwerte lagen für T2-Tumoren bei 6.900 Tumorzellen, für T3-Tumoren bei 11.700 Tumorzellen und für T4-Tumoren bei 28.800 Tumorzellen, d.h. Patienten mit Kolonkarzinomen der Klassifikation T4 hatten im Mittel viermal höhere Tumorzellzahlen im Wundblut als Patienten mit T2-Kolonkarzinomen (Abb. 19).

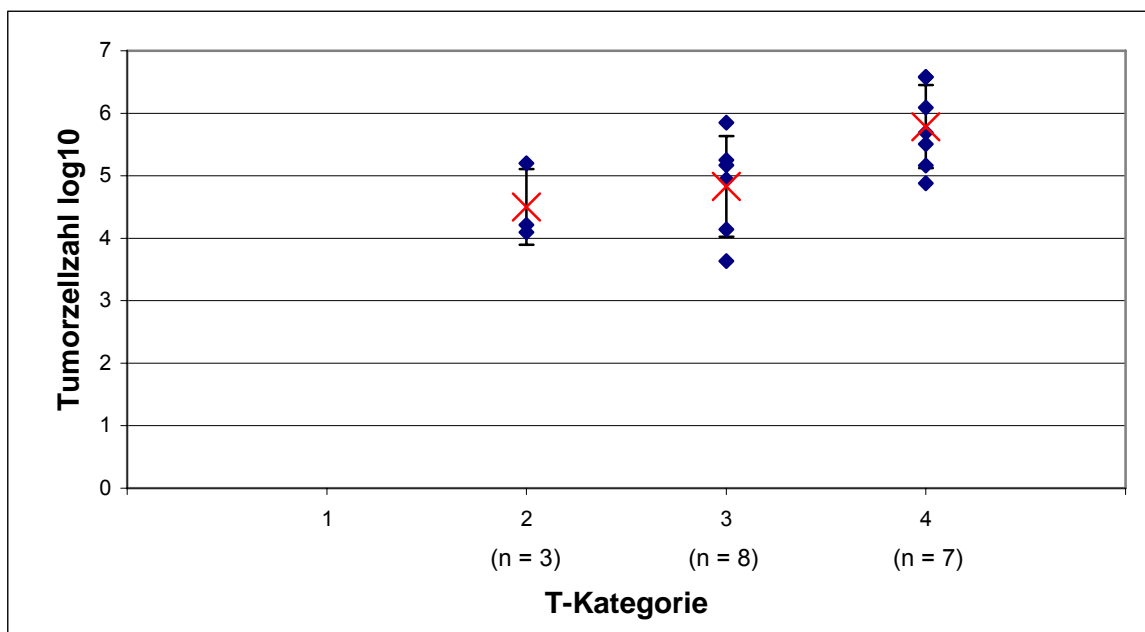


Abb. 18: Tumorzellzahl im Wundblut (Zytokeratin-positiv) von der Tumorausdehnung T beim Kolonkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

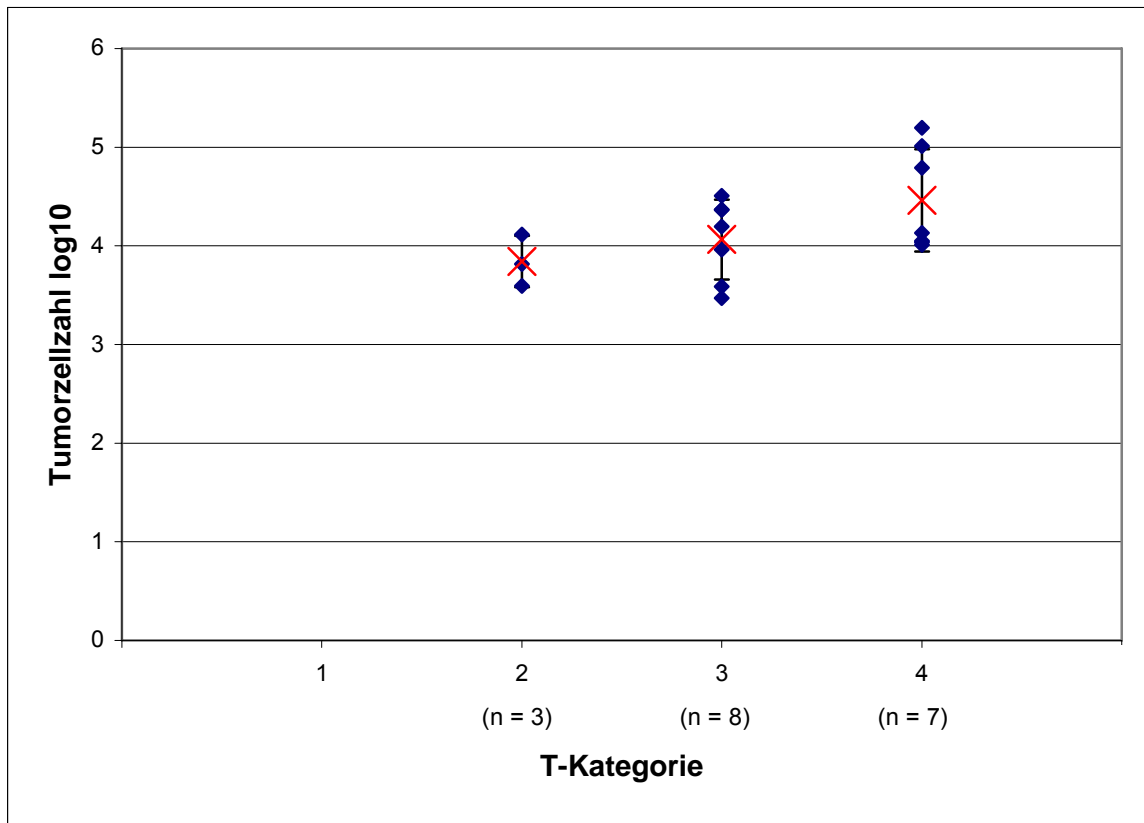


Abb. 19: Tumorzellzahl im Wundblut (AgNOR) und Tumorausdehnung T beim Kolonkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Patienten mit N1-Lymphknotenbefall hatten im Vergleich höhere Zytokeratin-Zellzahlen zur Folge als Patienten ohne Lymphknotenbefall. Jedoch ließ sich auch bei N0-Fällen eine Zellzahl bis 10^6 im Wundblut nachweisen. Der Lymphknotenstatus N2 wurde nur einmal klassifiziert (Abb. 20).

Die Betrachtung der AgNOR-Zellzahlen in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus der Patienten zeigte eine tendenzielle Erhöhung ($p=0,365$) bei Patienten mit Lymphknotenbefall N1. Während im Wundblut bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen im Mittel 13.500 Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, fanden sich bei denjenigen mit Lymphknotenbefall N1 30.900 Tumorzellen. Jedoch zeigte sich auch in der Gruppe N0 ein Einzelwert mit 102.800 Tumorzellen. Die Einbeziehung des Einzelwertes bei N2 ($1,35 \times 10^4$) in die Gruppe N1 hatte keine wesentlichen Änderungen der Verhältnisse zur Folge (Abb. 21).

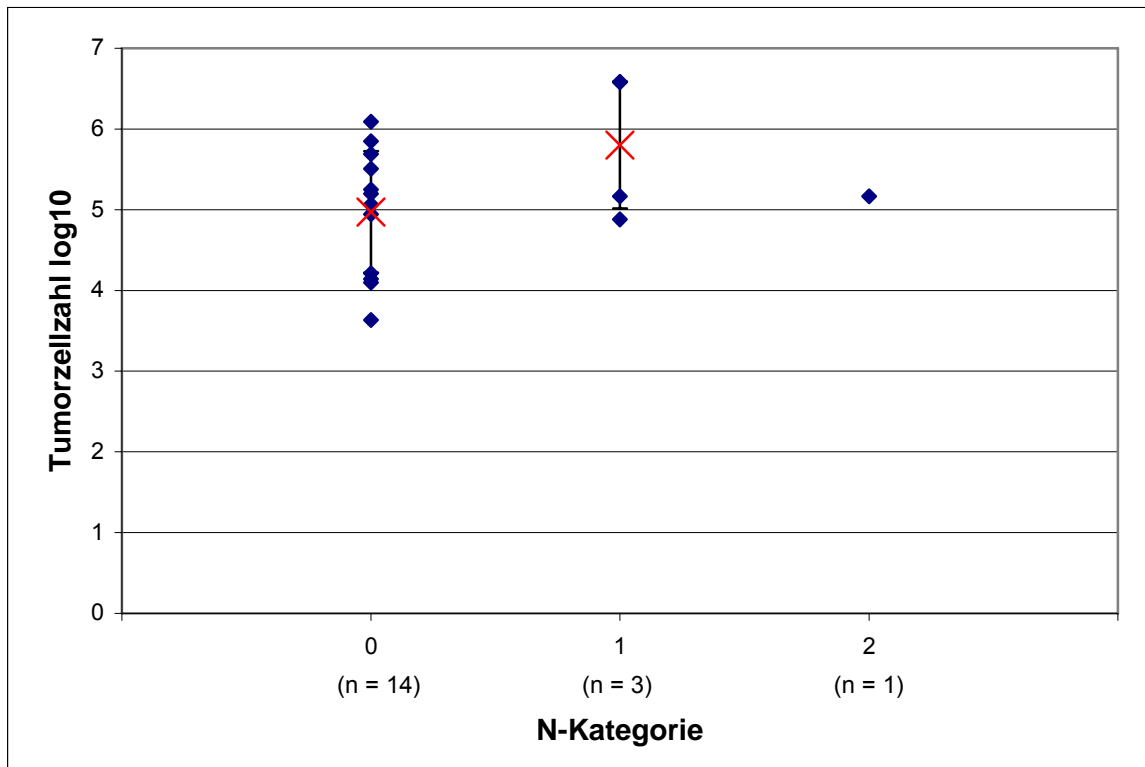


Abb. 20: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Lymphknotenstatus N beim Kolonkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

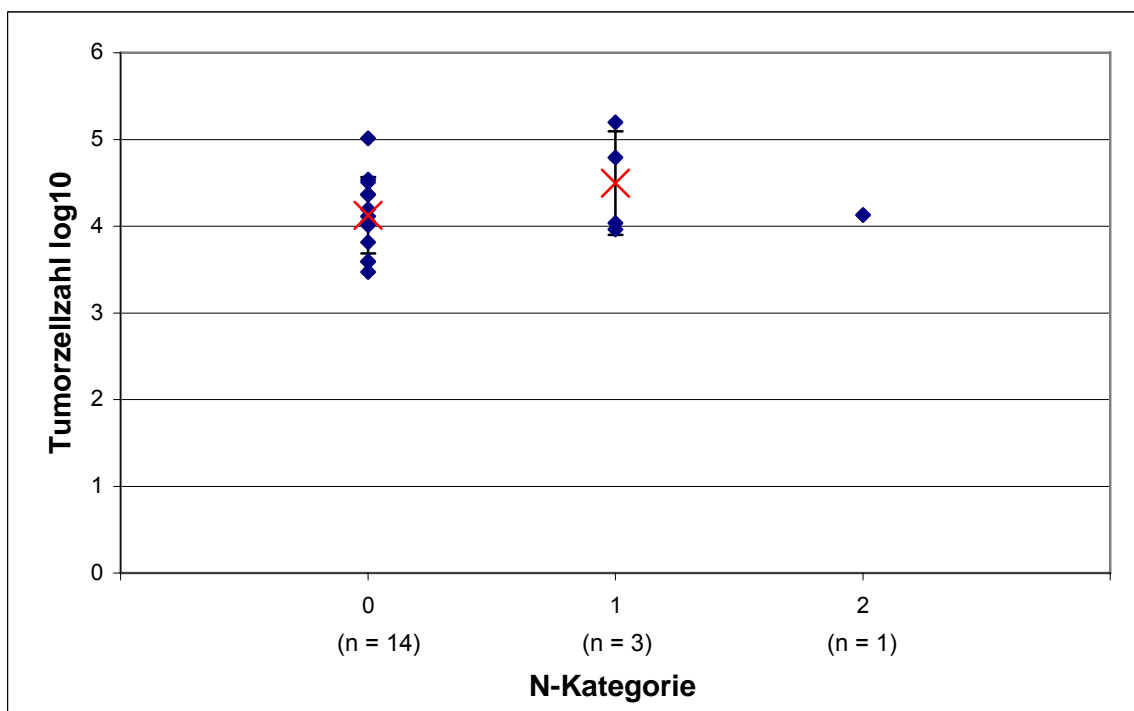


Abb. 21: Tumorzellzahl (AgNOR) und Lymphknotenstatus N beim Kolonkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Sämtliche Kolonkarzinome wurden entweder als mäßig differenziert G2 oder gering differenziert G3 eingestuft, wobei G3-Tumoren mit einer mittleren Anzahl von 1.120.000 Zytokeratin-positiven Zellen deutlich höhere Werte hatten als G2-Tumore mit einer mittleren Zellzahl von 51.000. Dieser Unterschied war mit $p=0,0011$ auch signifikant (Abb. 22).

Im Vergleich der Differenzierungsgrade zeigte sich ähnlich wie beim Zytokeratin-Nachweis ein Anstieg der Tumorzellen. Patienten mit gering differenzierten Kolonkarzinomen hatten durchschnittlich fast viermal mehr Tumorzellen im Wundblut ($3,89 \times 10^4$ Tumorzellen) als Patienten mit mäßig differenzierten Karzinomen ($1,04 \times 10^4$ Tumorzellen). Der Mann-Whitney-U-Test ergab für den Unterschied zwischen den Differenzierungsgraden G2 und G3 eine Signifikanz von $p=0,039$ (Abb. 23).

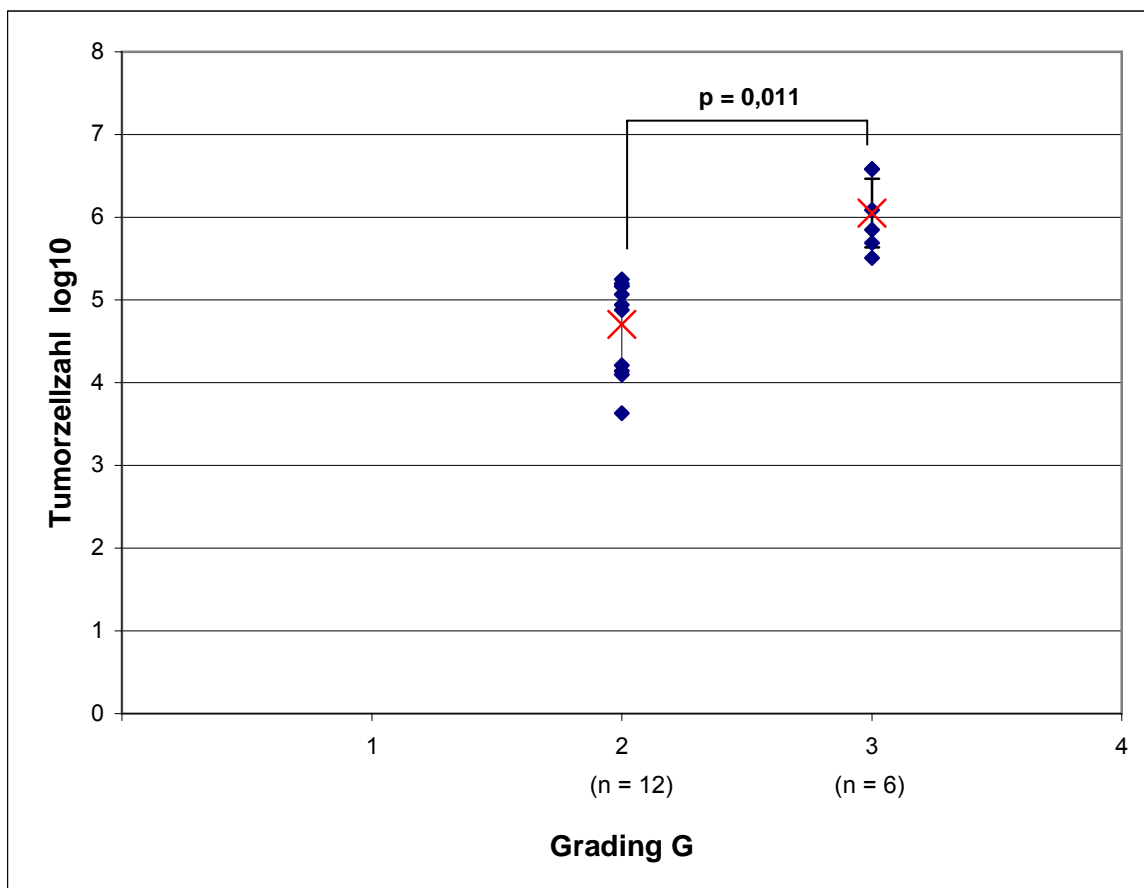


Abb. 22: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Differenzierungsgrad G beim Kolonkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

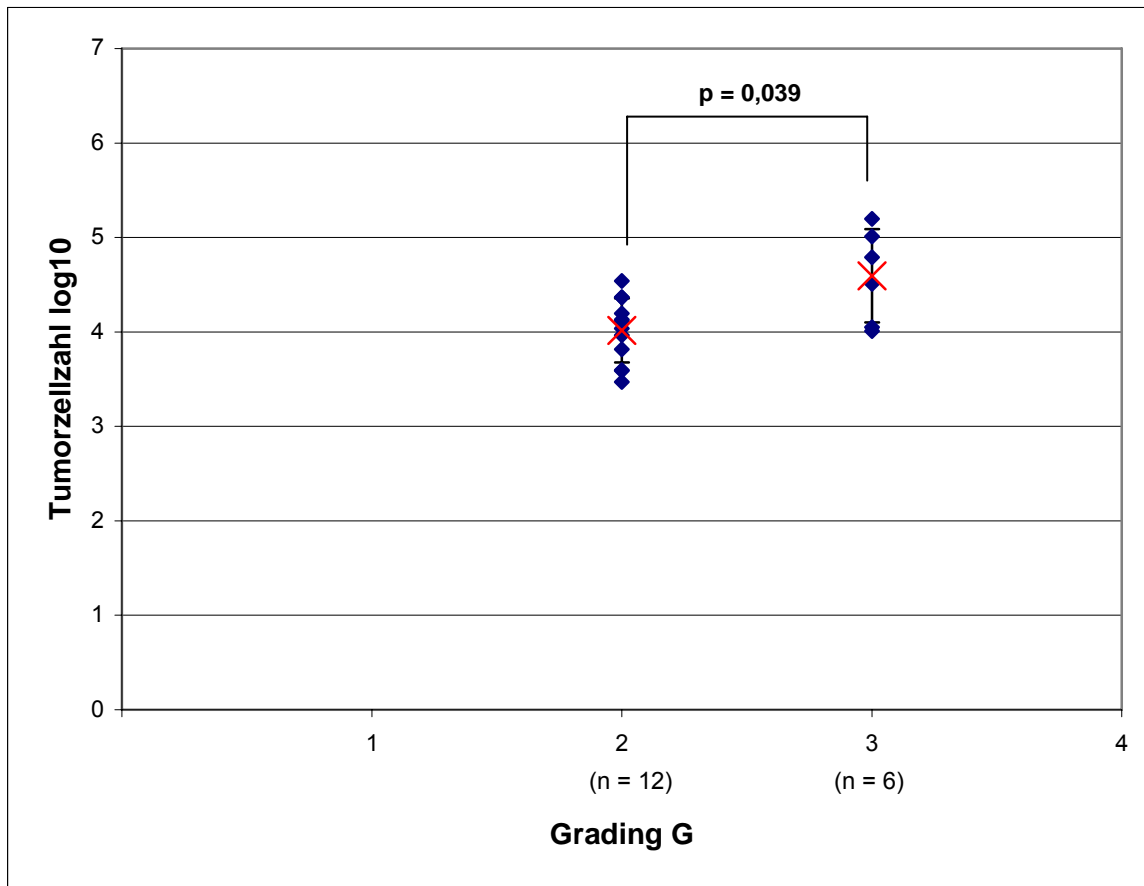


Abb. 23: Tumorzellzahl (AgNOR) und Differenzierungsgrad G beim Kolonkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

4.2.3 Rektumkarzinom

Auch für das Rektumkarzinom ergab sich keine signifikante Abhängigkeit der Zytokeratin-positiven Zellen von der Tumorausdehnung. Die Mittelwerte von T2, T3 und T4 stiegen mit $7,4 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$ und $1,1 \times 10^5$ nur leicht an. Minimal- und Maximalwerte zeigten in allen drei Kategorien ein ähnliches Spektrum (Abb. 24).

Im gegenüberstellenden Vergleich der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Zwar stieg die Zellzahl von der T2- zur T3-Gruppe deutlich an, wegen der breiten Streuung der Werte in T2 ergab sich jedoch keine Signifikanz. Die Werte von Patienten mit T3-Rektumkarzinomen waren denen mit T4-Tumoren ähnlich, was auch die mittleren Tumorzellzahlen bestätigen. Sie betragen für T3-Rektumkarzinome $1,5 \times 10^4$ und für T4-Rektumkarzinome $1,3 \times 10^4$ Tumorzellen. Der Mittelwert der T2-Karzinome lag bei $4,0 \times 10^3$ Zellen. Zudem konnten bei einem Patienten mit dem Tumorstaging T2N0M0G2 keine Tumorzellen mit der AgNOR-Methode nachgewiesen werden (Abb. 25).

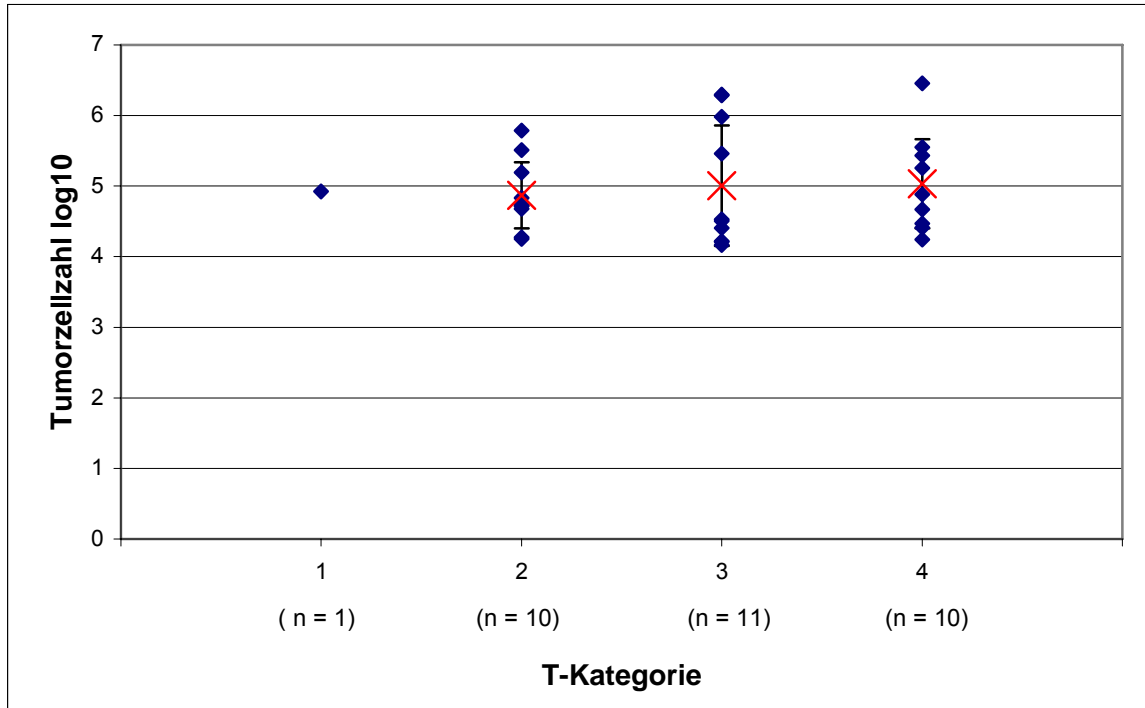


Abb. 24: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Tumorausdehnung T beim Rektumkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

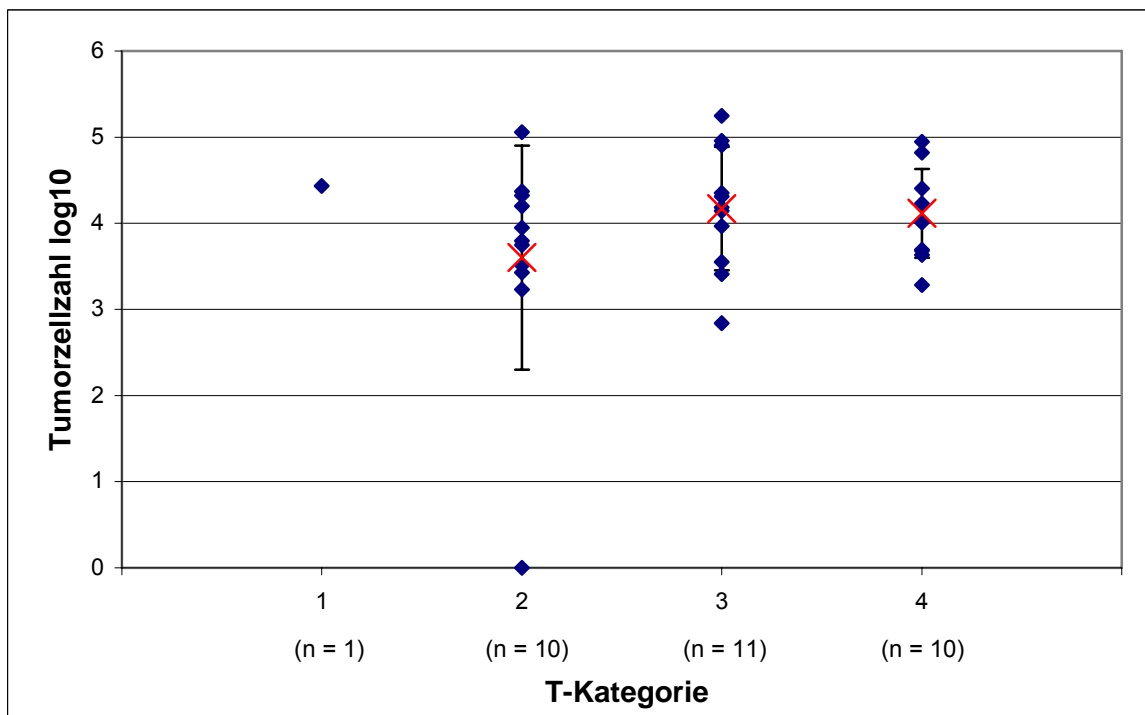


Abb. 25: Tumorzellzahl im Wundblut (AgNOR) und Tumorausdehnung T beim Rektumkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Bei paarweiser Betrachtung der Zytokeratin-positiven Zellen bei Patienten mit Lymphknotenstatus N0 und N1 fiel auf, dass die mittlere Zellzahl in N1 niedriger war als in N0, zwischen N1 und N2 jedoch ein nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen war (Abb. 26). Generell konnten bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen mittels AgNOR-Färbung tendenziell höhere Tumorzellzahlen nachgewiesen werden als bei Patienten ohne Lymphknotenbefall. Während die Zunahme vom Lymphknotenstatus N0 zu N1 nur gering ausfiel, Mittelwerte 6.000 und 9.300 Tumorzellen, war der Anstieg zu N2 auf einen Mittelwert von 20.400 Zellen deutlicher. Die berechneten p-Werte (N0/1: $p=0,894$; N1/2: $p=0,315$; N0/2: $p=0,282$) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Sowohl in der N0-Gruppe als auch in der N2-Gruppe gab es Maximalwerte mit mehr als 100.000 Tumorzellen (Abb. 27).

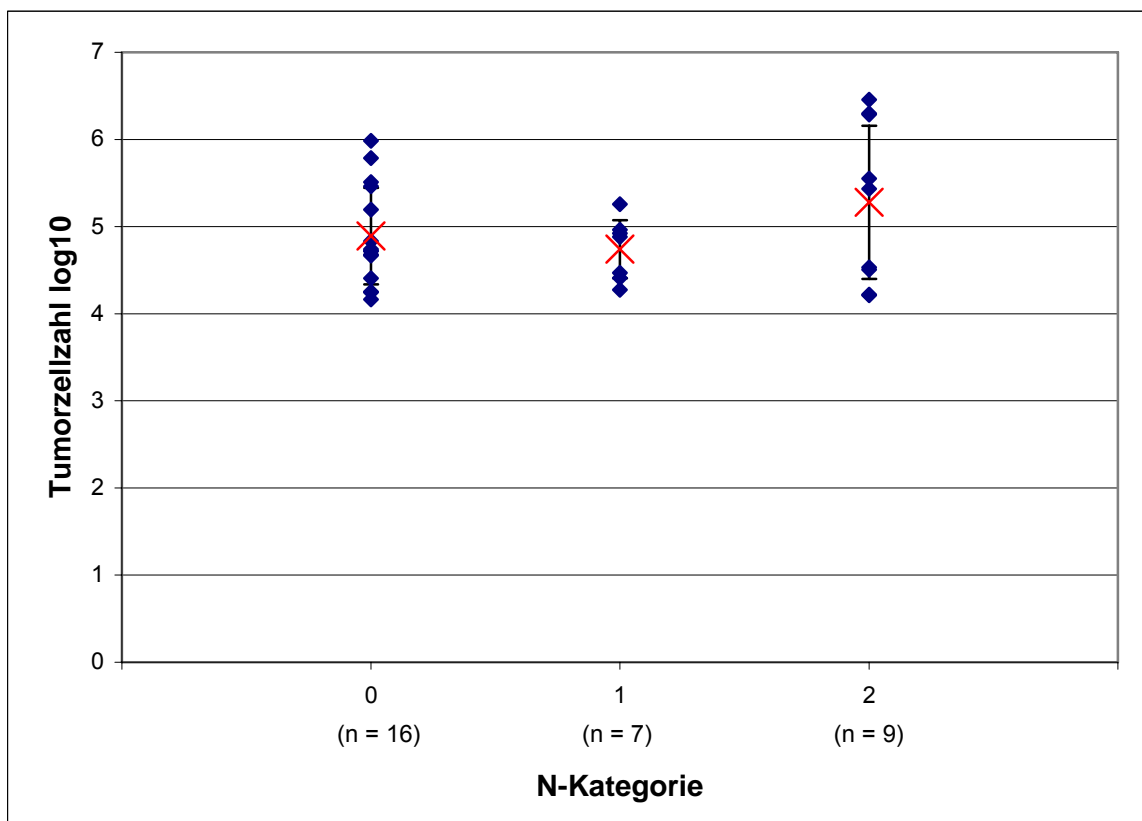


Abb. 26: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Lymphknotenstatus N beim Rektumkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

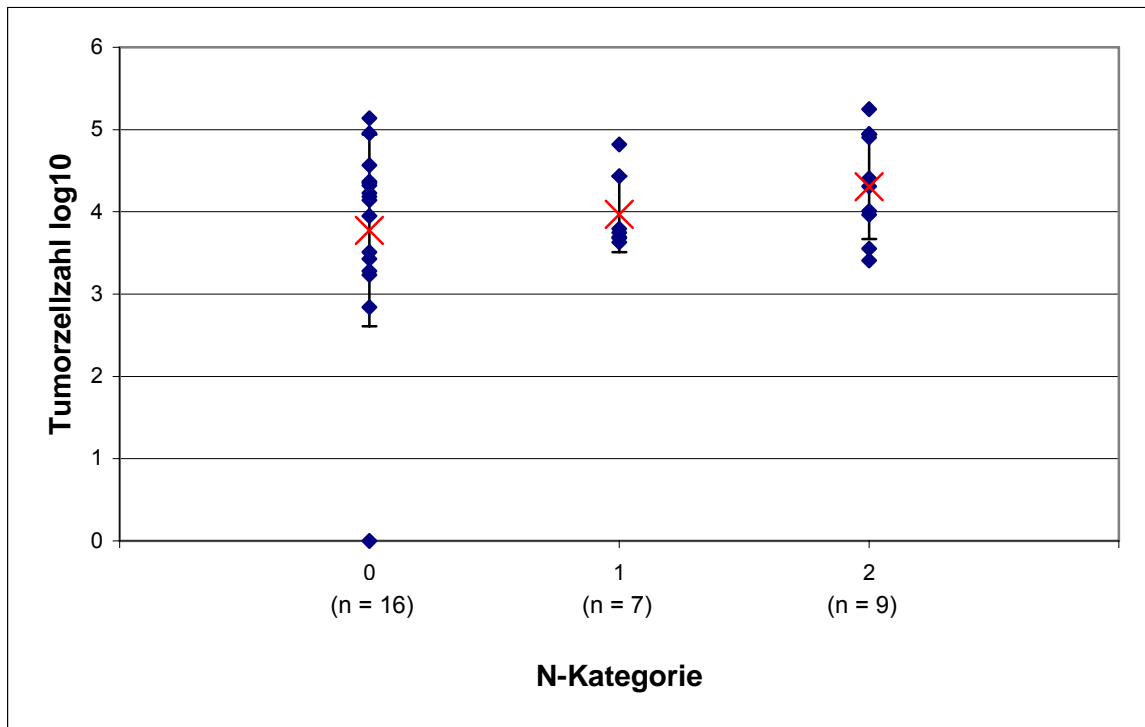


Abb. 27: Tumorzellzahl (AgNOR) und Lymphknotenstatus N beim Rektumkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

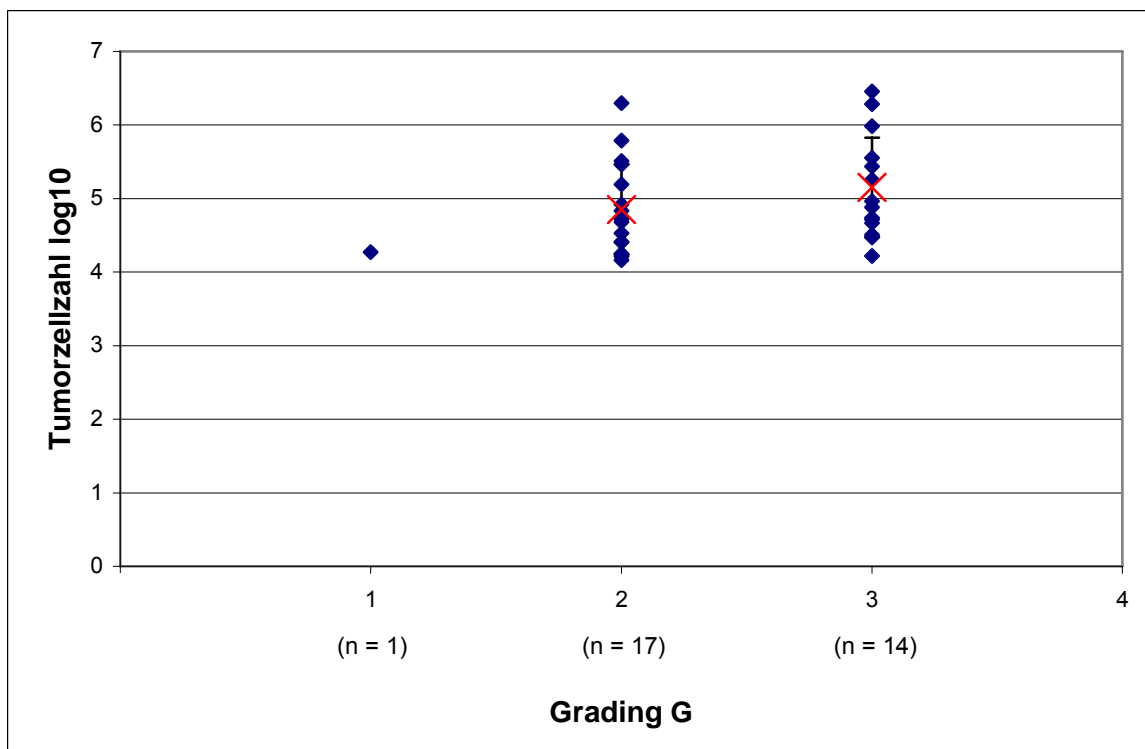


Abb. 28: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Differenzierungsgrad G beim Rektumkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

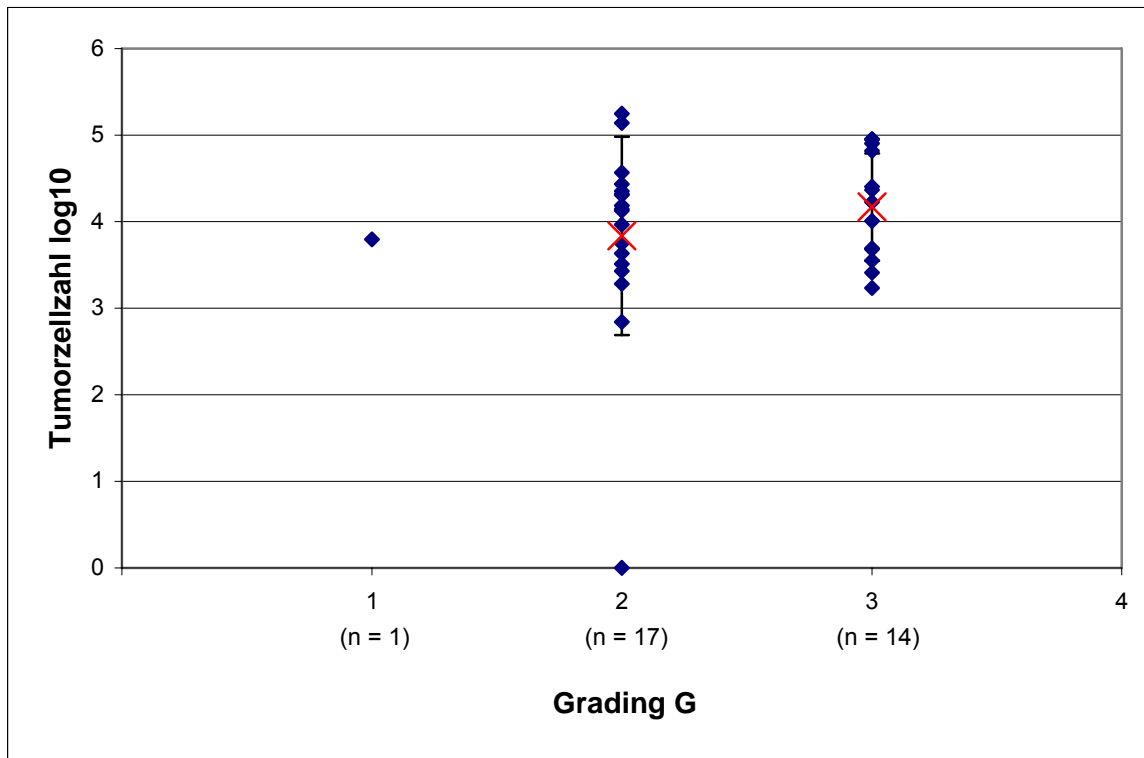


Abb. 29: Tumorzellzahl (AgNOR) und Differenzierungsgrad G beim Rektumkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Mit einer Ausnahme (G1) wurden die Rektumkarzinome den Differenzierungsgraden G2 (n=17) und G3 (n=14) zugeordnet. Obwohl die Zellzahlen des Zytokeratin-Nachweises bei G3 höher lagen als bei G2-Tumoren war der Unterschied nicht signifikant (Abb. 28).

Zwar stiegen die mittleren Tumorzellzahlen (AgNOR) bei Patienten mit Rektumkarzinomen der Differenzierungsgrade G2 und G3 von $6,9 \times 10^3$ auf $1,5 \times 10^4$ Zellen, jedoch ergab sich kein signifikanter Zuwachs ($p=0,49$). Der Streubereich in der Gruppe G2 reichte von 0 bis 176.000 Tumorzellen, auch wurden hier die höchsten Einzelwerte mit $1,3 \times 10^5$ und $1,8 \times 10^5$ malignen Zellen im Wundblut ermittelt (Abb. 29).

4.2.4 Magenkarzinom

Während sich bei den Magenkarzinomen für die Klassifikationen T1 und T2 ähnliche Mittelwerte ergaben, erhöhte sich die Anzahl der Zytokeratin-positiven Zellen für T3-Karzinome um das Zehnfache. Der Anstieg von T1 bzw. T2 zu T3 war mit $p=0,0043$ bzw. $p=0,042$ signifikant. Auch die mittleren Zellzahlen von T3 und T4 zeigten einen signifikanten ($p=0,037$) Unterschied, wobei die Werte in der T4-Gruppe etwa den höchsten Werten für

T3-Magenkarzinome entsprachen. Die mittleren Zellzahlen der Kategorien T1-4 lagen bei $4,3 \times 10^4$, $3,3 \times 10^4$, $3,1 \times 10^5$ und $1,7 \times 10^6$ (Abb. 30).

Das Verteilungsmuster der Tumorzellen, welche mit der AgNOR-Methode ermittelt wurden, zeigte in Abhängigkeit von der T-Klassifikation ein sehr ähnliches Bild wie die Verteilung der Zytokeratin-positiven Zellen. Zwischen T1- und T2-Magenkarzinomen stellten sich nahezu identische mittlere Zellzahlen (2.900 bzw. 2.700 Tumorzellen) ein, wobei jedoch in der T2-Gruppe eine deutlich breitere Streuung zu erkennen war. Während der Anstieg der Zellzahlen von T2 zu T3 mit $p=0,048$ nur knapp signifikant war, betrug das Signifikanzniveau für die Tumorzellzunahme von T3-Karzinomen zu T4-Karzinomen $p=0,036$. Bei Patienten mit T3-Magenkarzinomen wurden mit 18.700 Tumorzellen mehr als sechsmal so viele maligne Zellen im Wundblut nachgewiesen als bei Patienten mit T1- oder T2-Karzinomen, bei Patienten mit T4-Magenkarzinomen zeigte sich sogar eine Steigerung um den Faktor 37. Zusätzlich besteht zwischen den Gruppen T1/T3 bzw. T1/T4 jeweils ein signifikanter Unterschied ($p=0,016$ bzw. $0,011$) (Abb. 31).

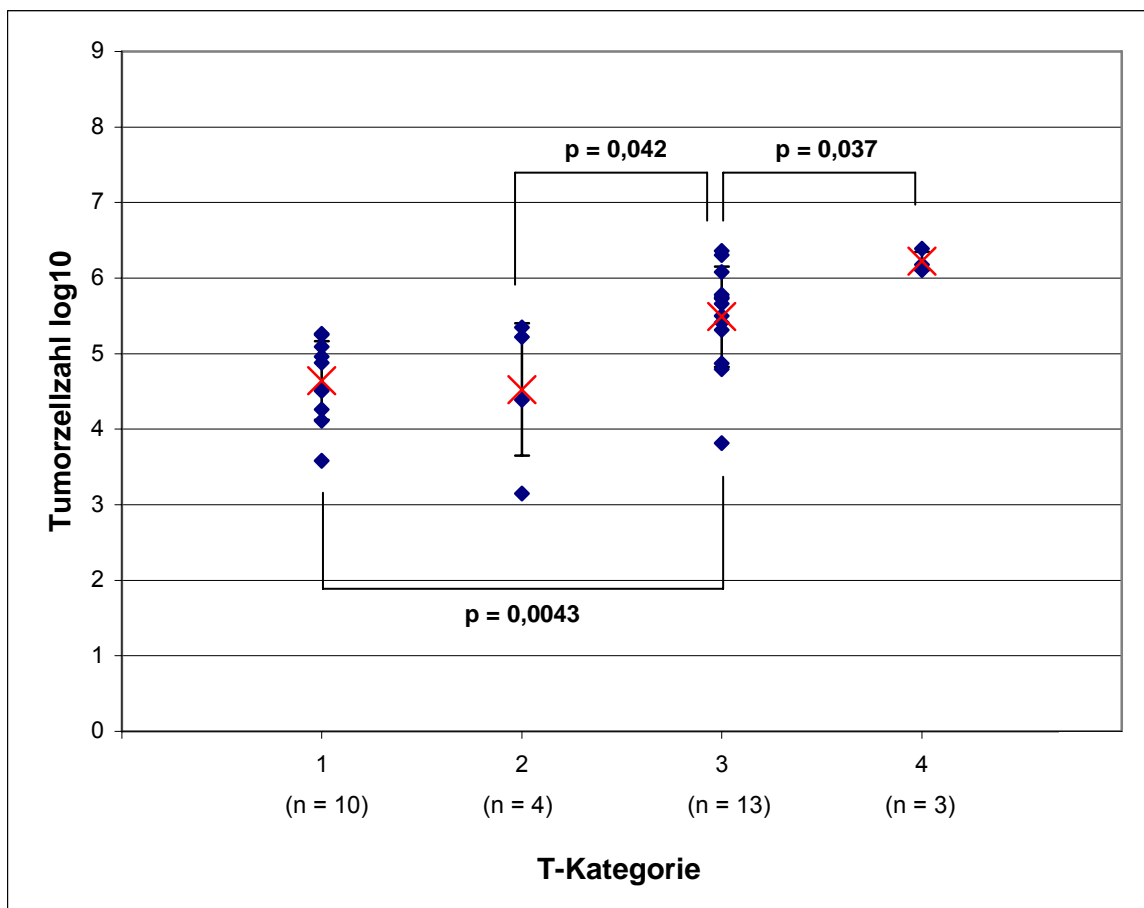


Abb. 30: Tumorzellzahl im Wundblut (Zytokeratin-positiv) und Tumorausdehnung T beim Magenkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

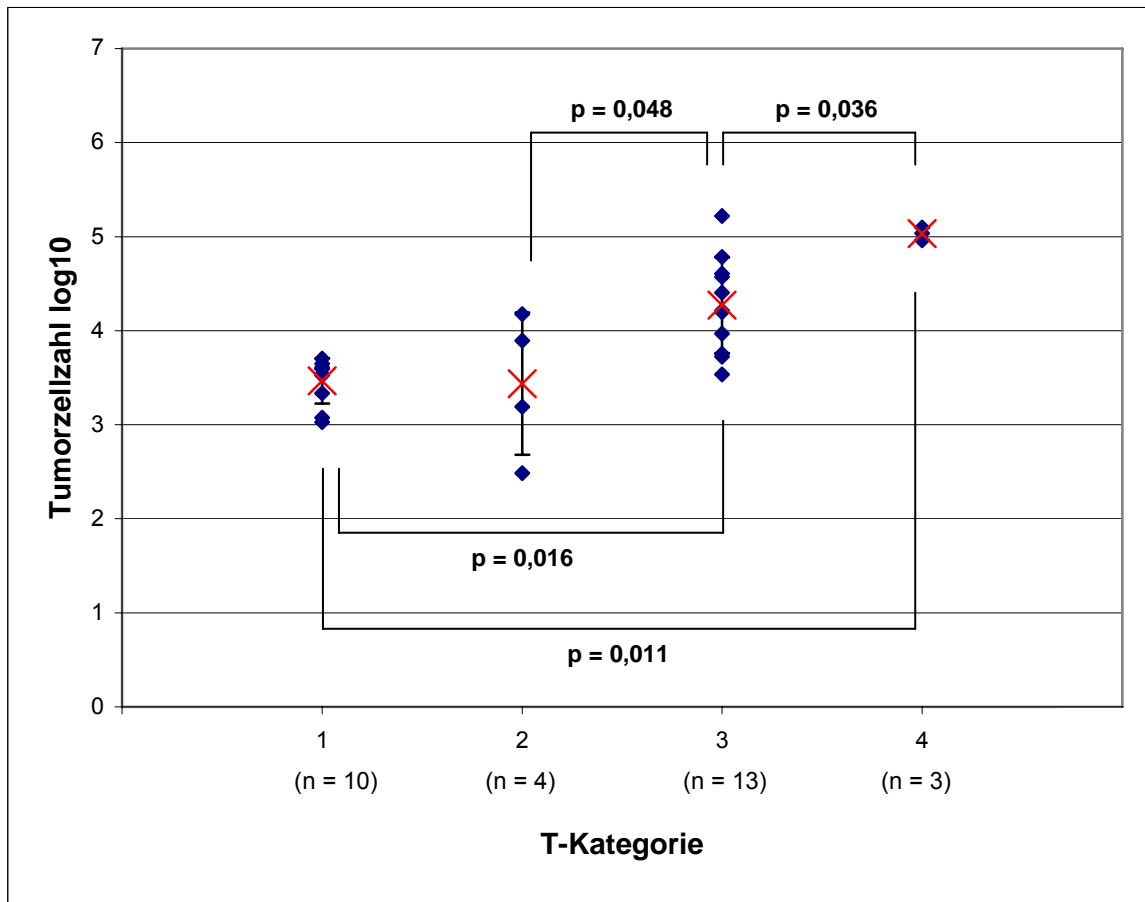


Abb. 31: Tumorzellzahl im Wundblut (AgNOR) und Tumorausdehnung T beim Magenkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Mit zunehmendem Lymphknotenbefall beim Magenkarzinom konnte eine Steigerung der Zytokeratin-positiven Zellzahlen von N0 bis N2 beobachtet werden. Besonders deutlich zeigte sich ein Anstieg von N0 nach N2, der mit $p=0,043$ signifikant war. Die Mittelwerte in den drei Gruppen erreichten folgende Werte: $4,5 \times 10^4$ (N0), $1,3 \times 10^5$ (N1) und $6,1 \times 10^5$ (N2). Somit ergab sich eine Erhöhung der Tumorzellzahlen von Lymphknotenstatus N0 zu N2 um den Faktor 14 (Abb. 32).

Der Befall von Lymphknoten beim Magenkarzinom beeinflusste die Tumorzellzahl (AgNOR) im Wundblut deutlich. Patienten mit N1-Lymphknotenbeteiligung hatten signifikant mehr Tumorzellen als Patienten mit freien Lymphknoten ($p=0,013$). Noch stärker war der Unterschied zwischen N0- und N2-Patienten mit $p=0,003$ im Mann-Whitney-U-Test. Die deutliche Zunahme vom N1- zum N2-Lymphknotenstatus erreichte das Signifikanzniveau nicht mehr ($p=0,093$) (Abb. 33).

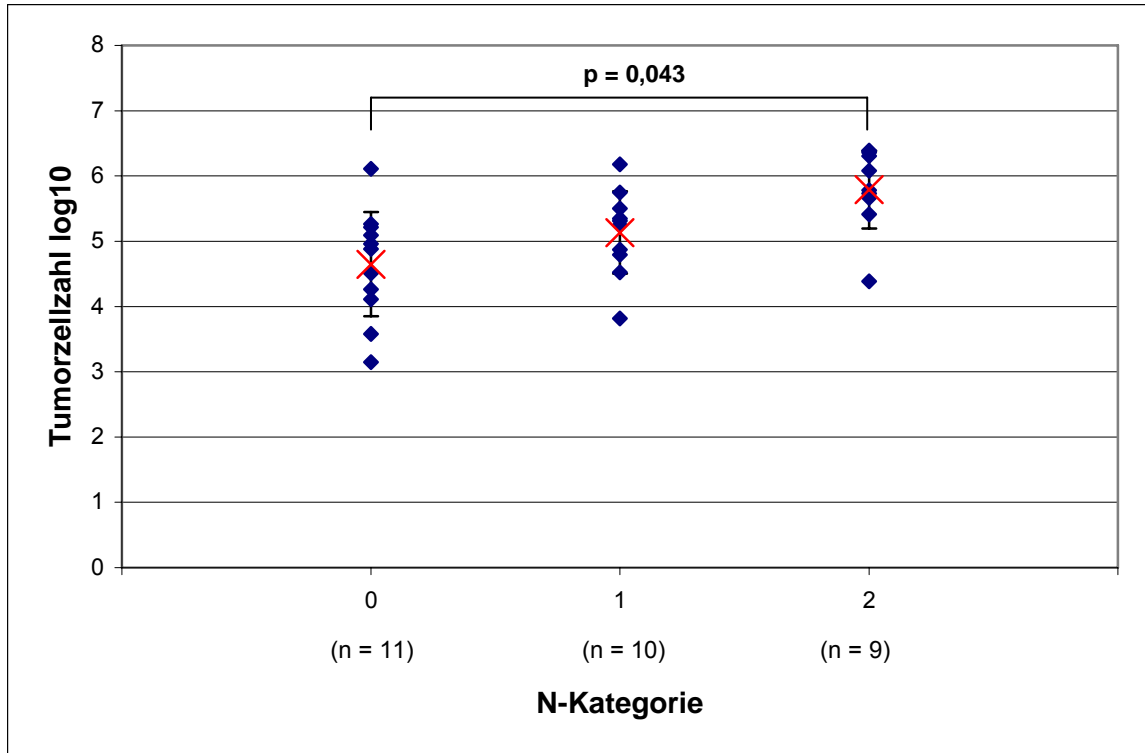


Abb. 32: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Lymphknotenstatus N beim Magenkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

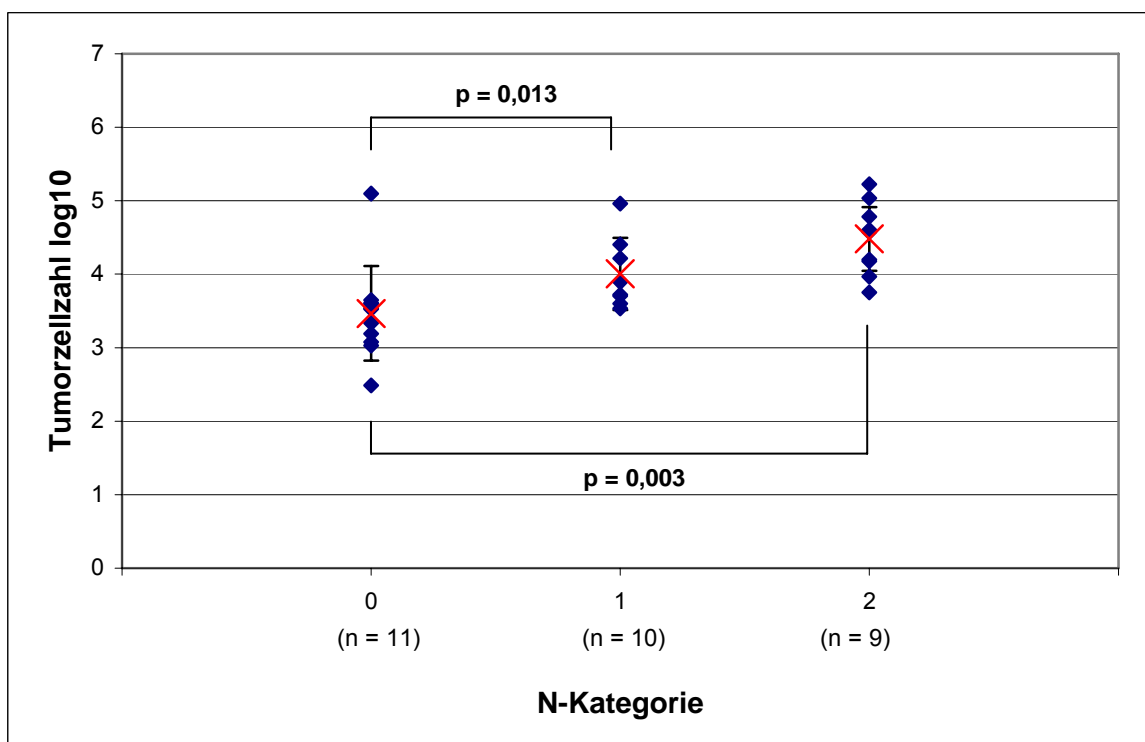


Abb. 33: Tumorzellzahl (AgNOR) und Lymphknotenstatus N beim Magenkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

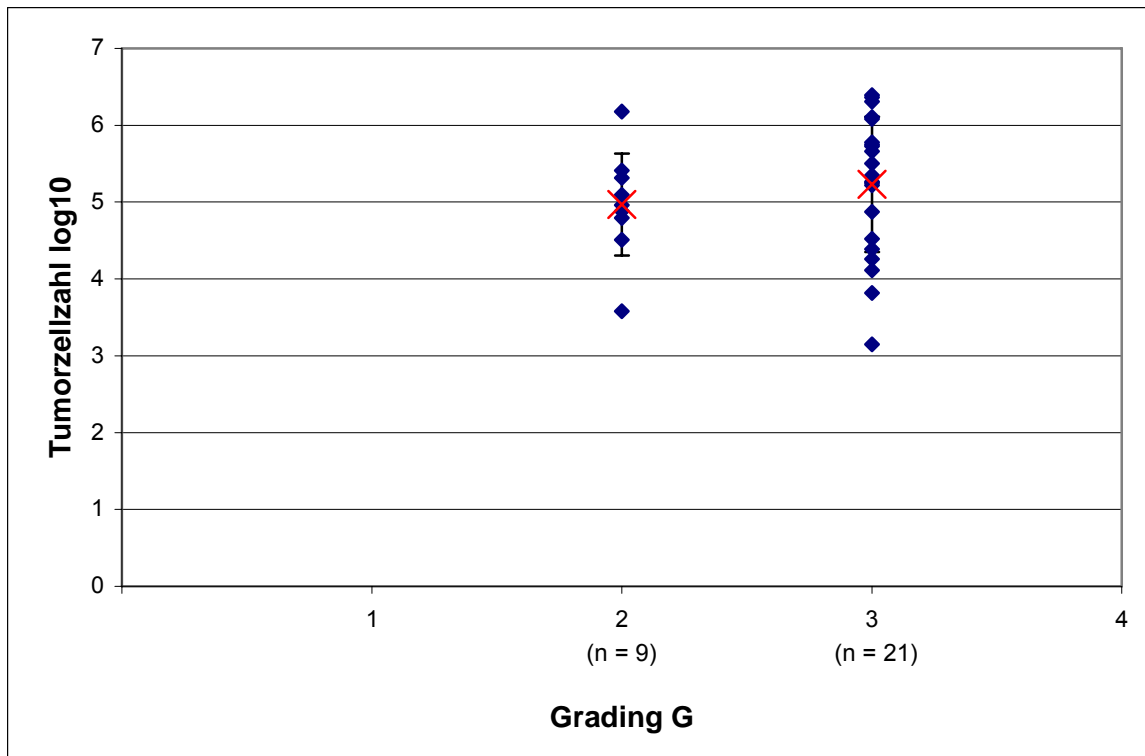


Abb. 34: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Differenzierungsgrad G beim Magenkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

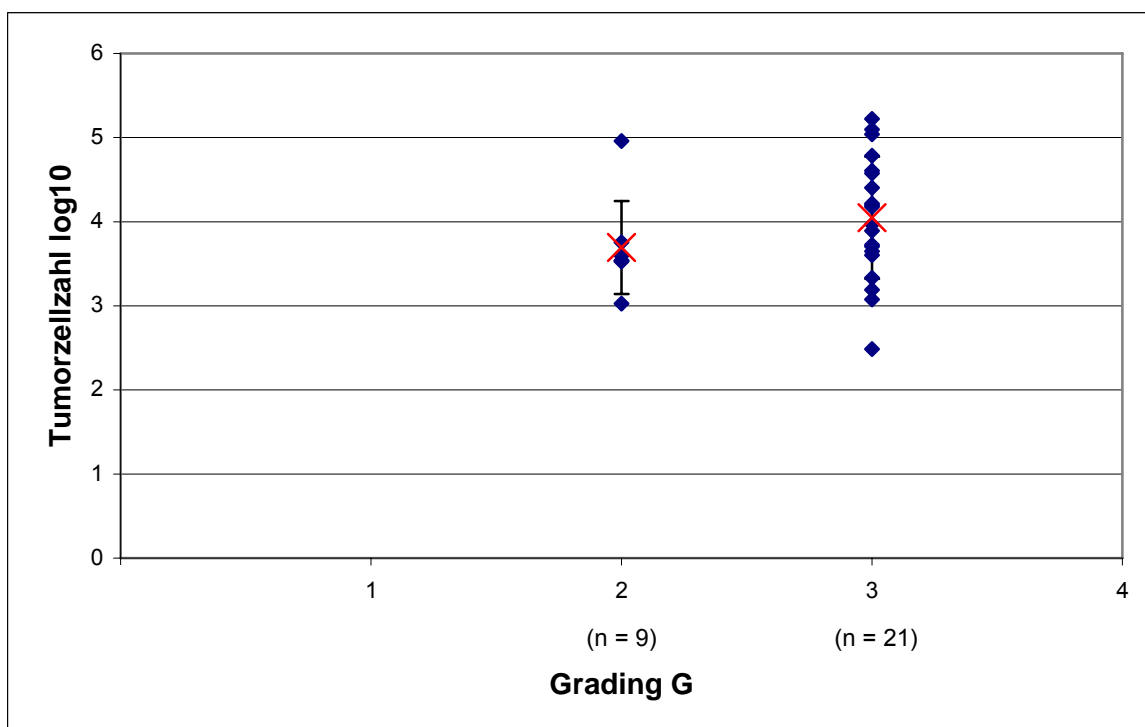


Abb. 35: Tumorzellzahl (AgNOR) und Differenzierungsgrad G beim Magenkarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Obwohl sich ein Anstieg der Mittelwerte von $9,3 \times 10^4$ nach $1,7 \times 10^5$ für die Differenzierungsgrade G2 und G3 zeigte, war dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,309$). Außerdem war der Streubereich für die G3-Gruppe größer, in der sowohl der höchste als auch der niedrigste Einzelwert lag (Abb. 34).

Ähnliches zeigte die AgNOR-Auswertung. Eine signifikante Abhängigkeit der Tumorzellzahl vom Differenzierungsgrad konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,093$). Zwar stiegen die Mittelwerte von G2 ($4,9 \times 10^3$) nach G3 ($1,1 \times 10^4$) an, die beiden Gruppen waren aber anteilmäßig ungleich verteilt und zeigten jeweils eine breite Streuung der Werte (Abb. 35).

4.2.5 Pankreaskarzinom

16 der 17 Pankreaskarzinome wurden pathologisch den T-Stadien T3 ($n=10$) und T4 ($n=6$) zugeordnet, nur ein Tumor wurde mit T1 klassifiziert. Paradoxe Weise zeigte sich ein signifikanter Rückgang ($p=0,025$) der Zytokeratin-Zellzahlen von T3- zu T4-Tumoren (Abb. 36).

Das Pankreaskarzinom zeigte eine heterogene Verteilung der AgNOR-Einzelwerte über die T-Klassifikationen T3 und T4. Die Mittelwerte ($1,2 \times 10^4$ und $2,2 \times 10^4$) täuschten eine leichte Steigerung der Tumorzellzahlen für die AgNOR-Auswertung vor, die jedoch auf keinen statistischen Trend schließen ließen ($p=1,00$). Bei einem Patienten (T3N0M0G1) fanden sich keine Tumorzellen im Wundblut mittels der AgNOR-Methode. In beiden Gruppen wurden maximale Einzelwerte mit $4,0 \times 10^5$ Tumorzellen im Wundblut gezählt (Abb. 37).

Patienten mit N1-Lymphknotenbefall hatten zwar höhere Zellzahlen als Patienten ohne Befall, der Unterschied war aber nicht signifikant. Auffällig war jedoch der Rückgang der nachgewiesenen Zytokeratin-positiven Zellen bei Patienten mit Lymphknotenstatus N2 mit einem Mittelwert von $7,7 \times 10^3$ gegenüber N1 ($8,1 \times 10^4$) bzw. N0 ($6,0 \times 10^4$) (Abb. 38).

Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Vergleich der AgNOR-Auswertung in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus. Auch hier gaben die Mittelwerte einen Zuwachs von malignen Zellen bei Patienten mit Status N0 nach N1 vor ($p=0,906$). Der Mittelwert der Gruppe N2 lag unter dem Niveau von denen mit Lymphknotenstatus N0 und N1 (Abb. 39).

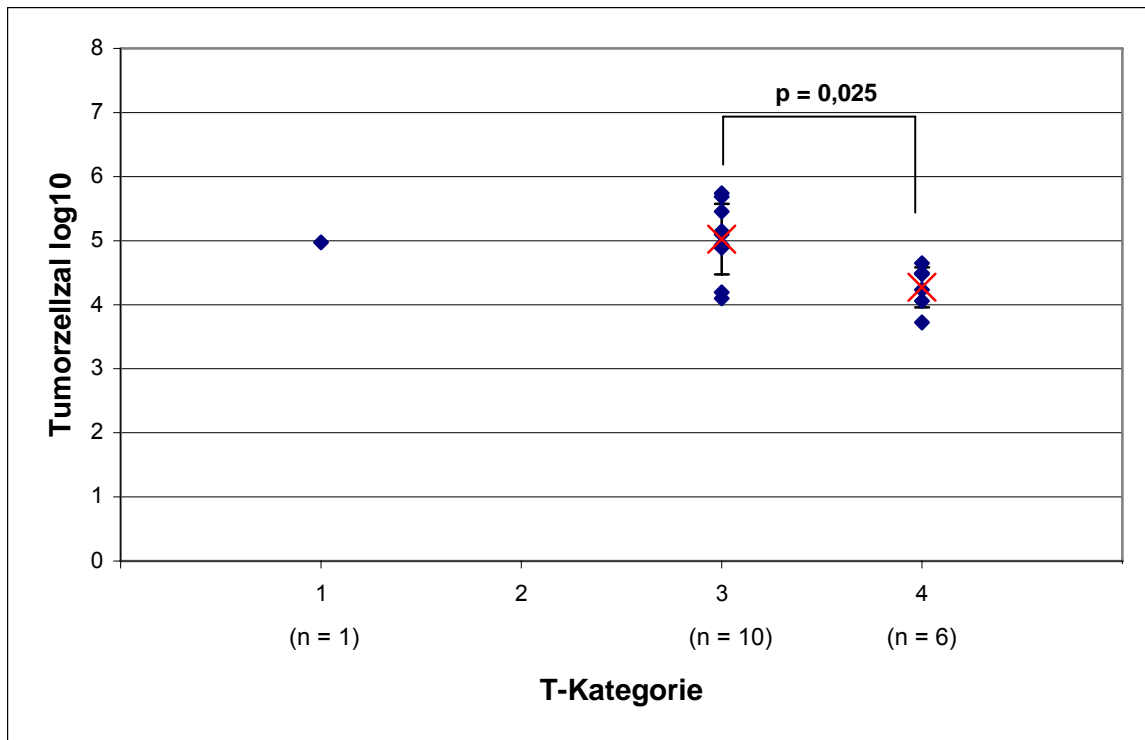


Abb. 36: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Tumorausdehnung T beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

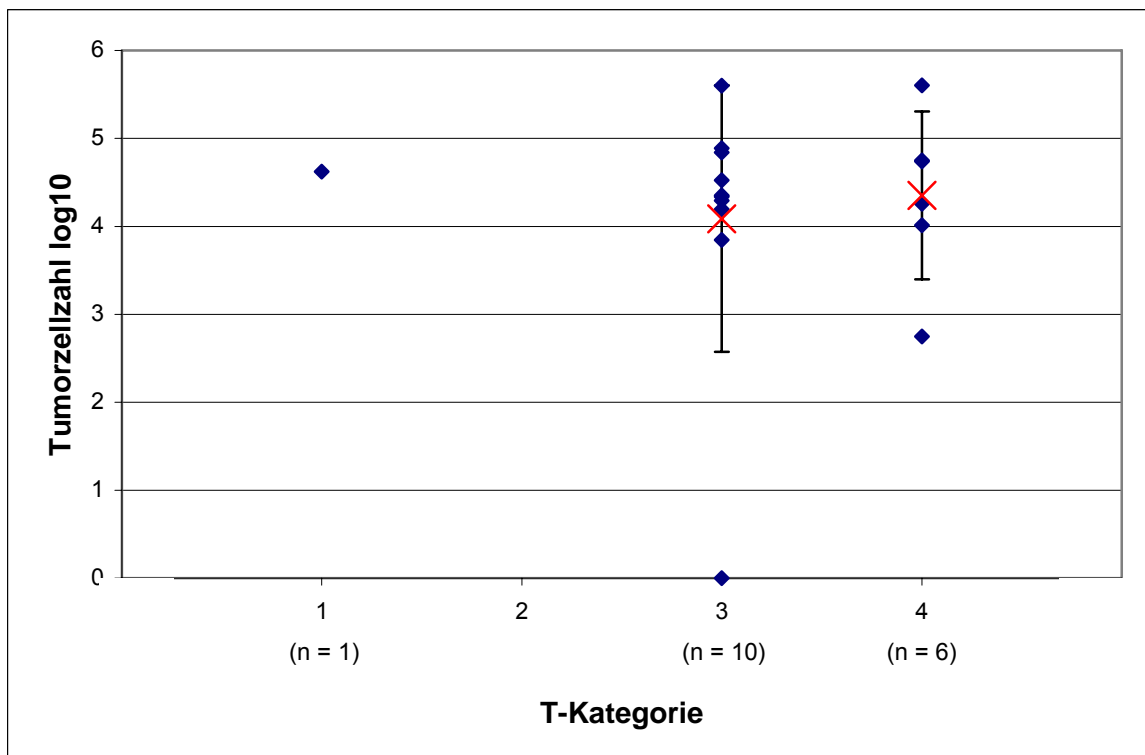


Abb. 37: Tumorzellzahl im Wundblut (AgNOR) und Tumorausdehnung T beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

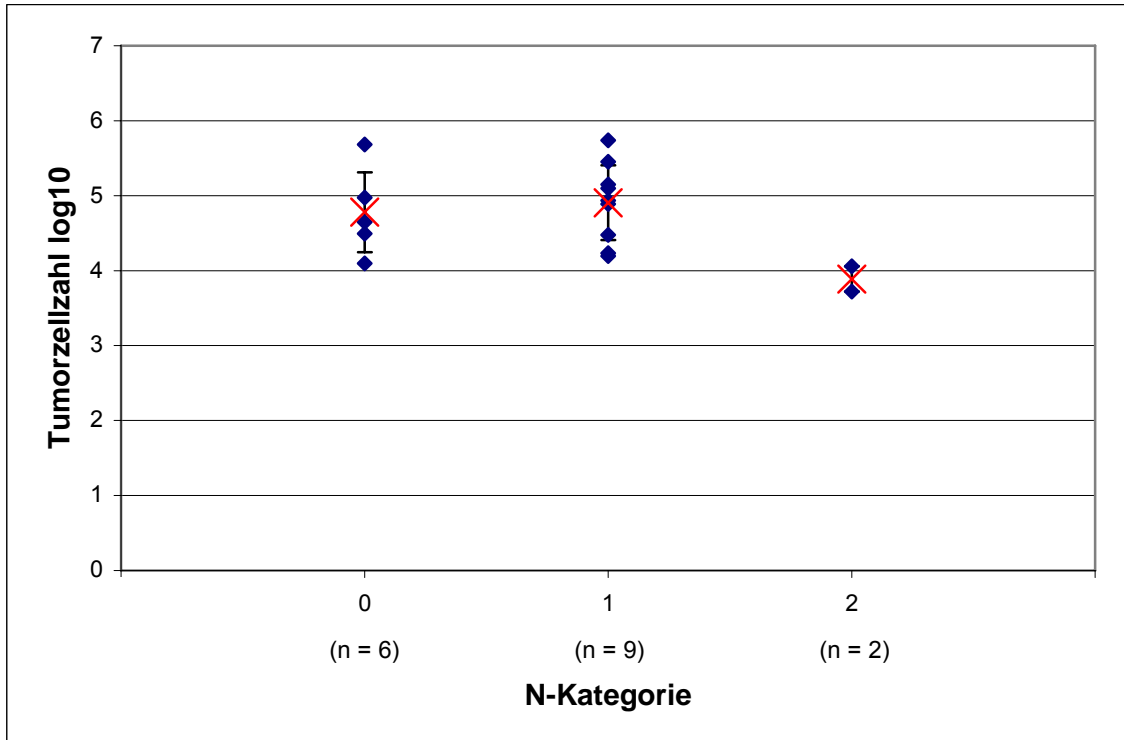


Abb. 38: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Lymphknotenstatus N beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

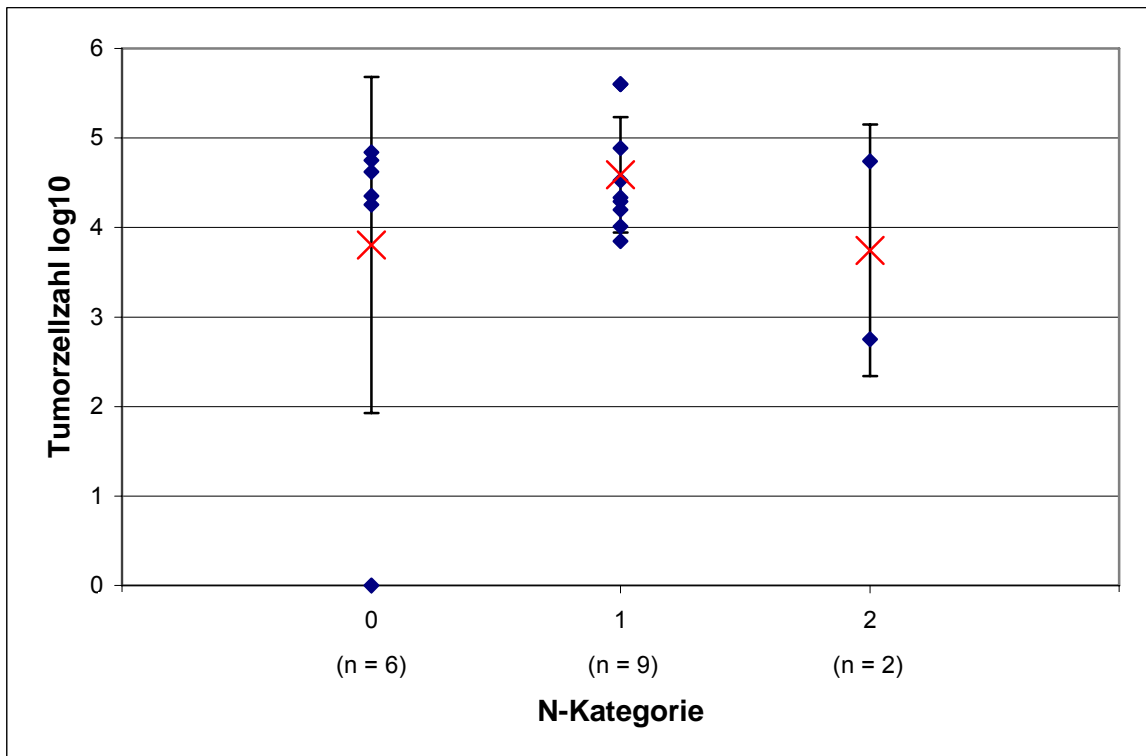


Abb. 39: Tumorzellzahl (AgNOR) und Lymphknotenstatus N beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

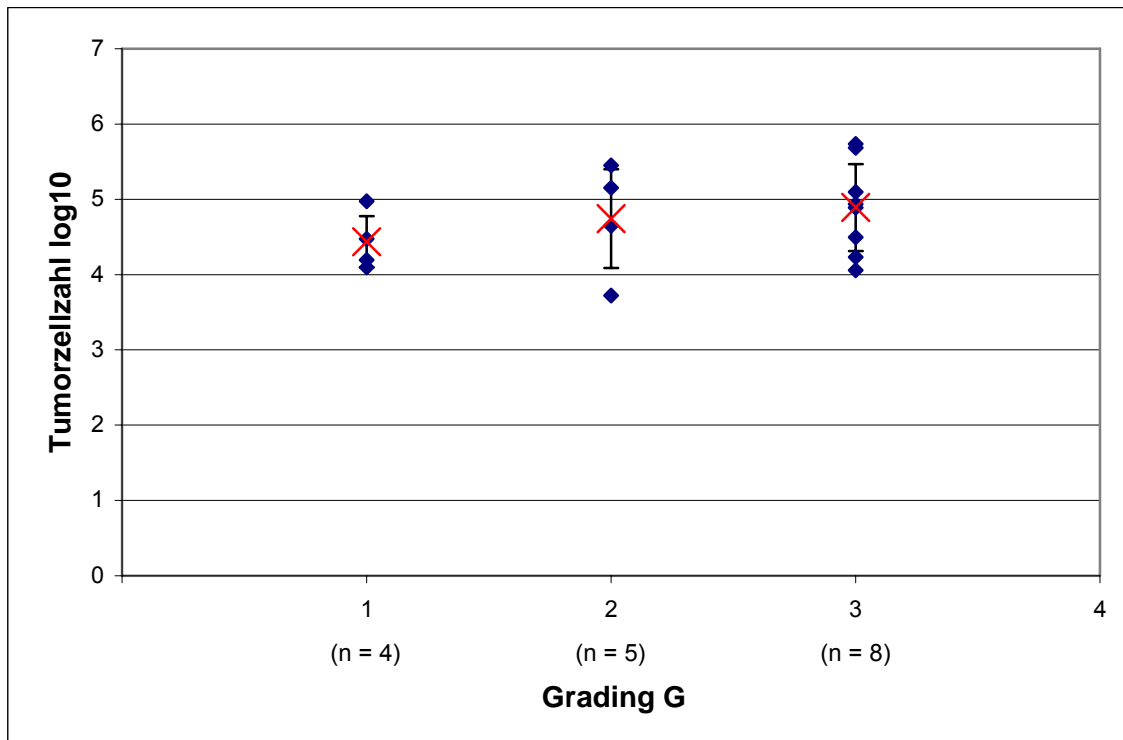


Abb. 40: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Differenzierungsgrad G beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

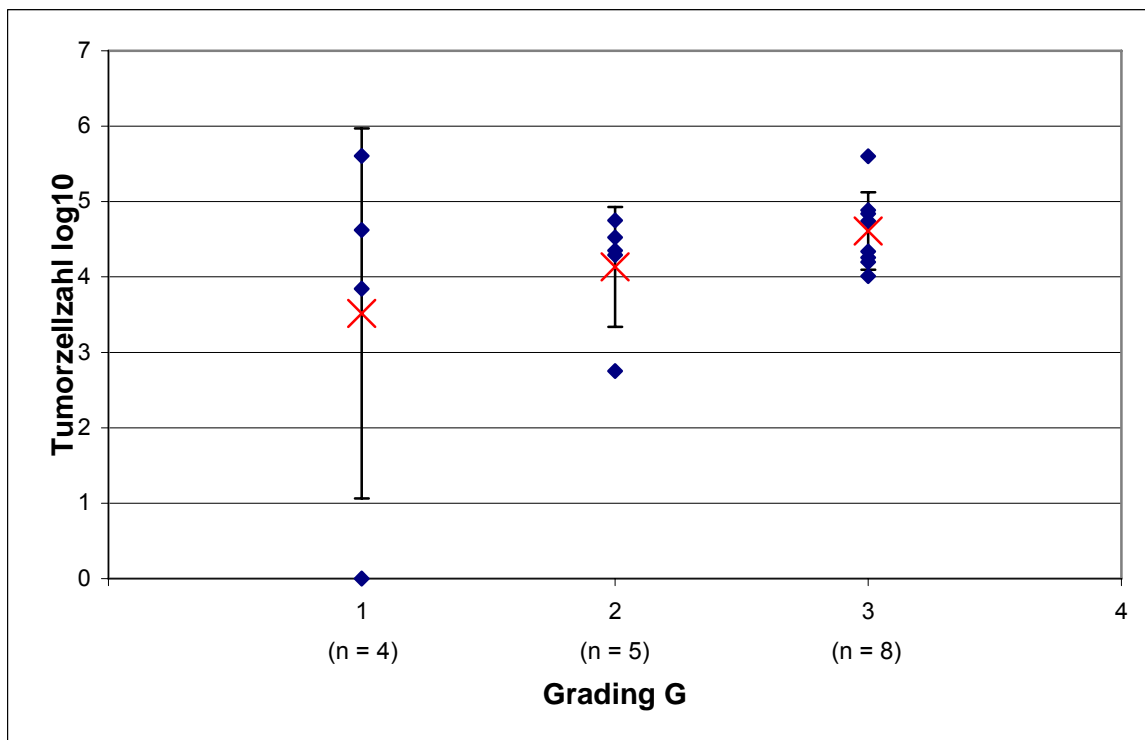


Abb. 41: Tumorzellzahl (AgNOR) und Differenzierungsgrad G beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

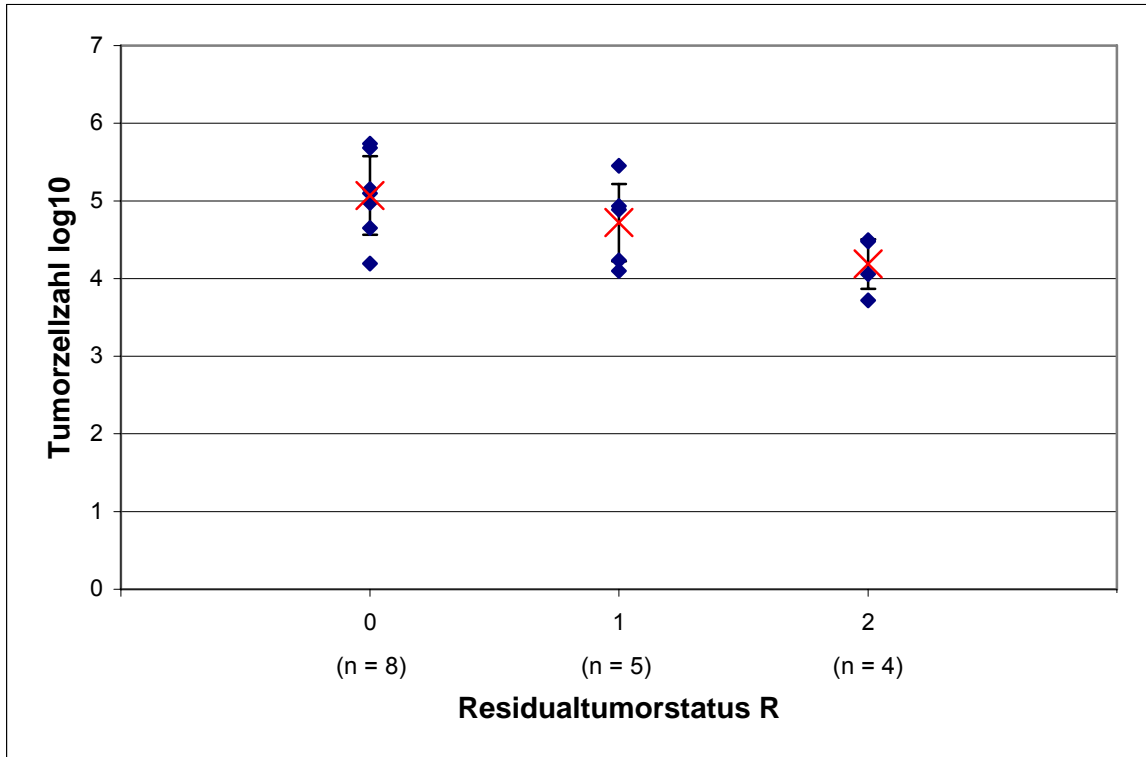


Abb. 42: Tumorzellzahl (Zytokeratin-positiv) und Residualtumorstatus R beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

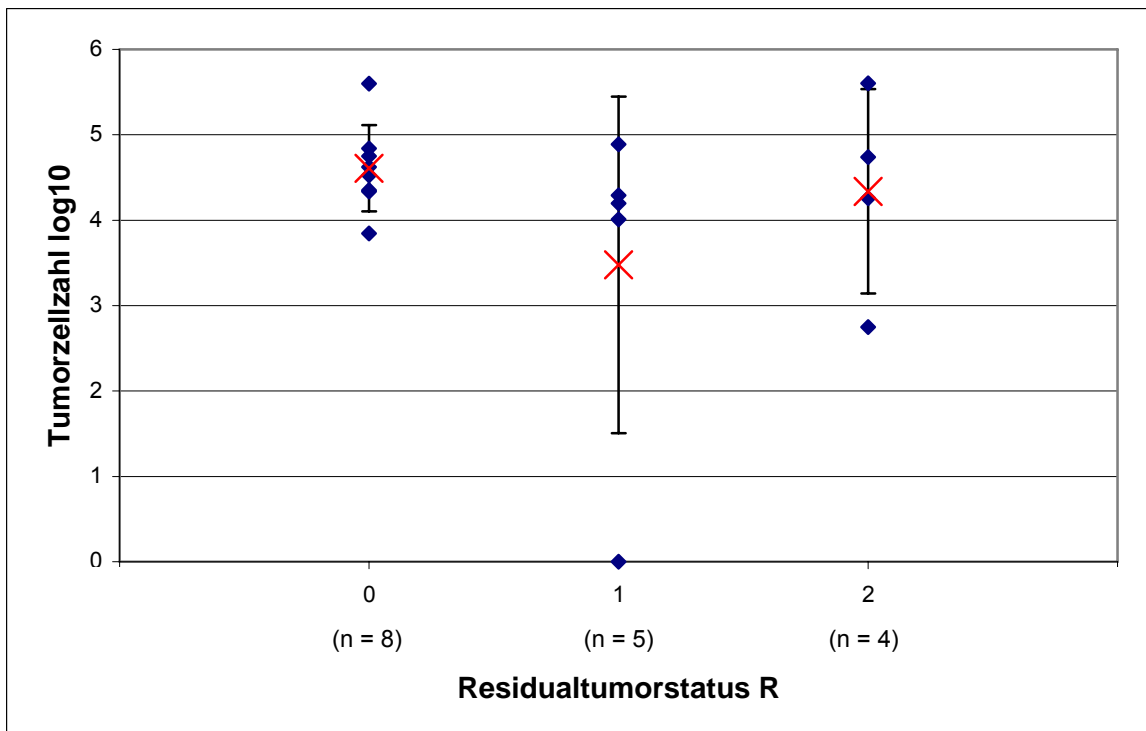


Abb. 43: Tumorzellzahl (AgNOR) und Residualtumorstatus R beim Pankreaskarzinom (Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichungen)

Beim Vergleich von differenzierten (G1), mäßig differenzierten (G2) und gering differenzierten (G3) Pankreaskarzinomen stellte sich nur eine leichte, nicht signifikante Zunahme der Zytokeratin-Werte ein (Abb. 40).

Eine tendenzielle Zunahme der Tumorzellen (AgNOR) bei Patienten mit Pankreaskarzinomen stellte sich mit abnehmender Differenzierung des Tumors dar. Ein signifikanter Unterschied war jedoch nicht nachzuweisen. Immerhin lag der höchste Einzelwert mit $4,0 \times 10^5$ Tumorzellen in der G1-Gruppe (Abb. 41).

Aufgrund ausreichender Fallzahlen konnte für das Pankreaskarzinom auch die Abhängigkeit zum Residualtumorstatus untersucht werden. Die Auswertung der positiven Befunde ergab jedoch eine negative Korrelation. Während bei Patienten mit R0-resezierten Tumoren im Mittel 117.000 Zytokeratin-positive Zellen auftraten, waren es bei Patienten mit R2-Tumorstatus nur noch 15.000 Zellen. Alle R2-resezierten Patienten hatten T4-Tumoren, die sich im Operationsverlauf als nicht mehr kurativ behandelbar herausstellten (Abb. 42).

Eine Zunahme des Residualtumorstatus führte zu keiner Erhöhung der Tumorzellzahlen beim Pankreaskarzinom. Ebenso wie bei der Zytokeratin-Auswertung konnten die höchsten Einzelwerte bei Patienten mit R0-resezierten Karzinomen nachgewiesen werden. Im Wundblut eines Patienten mit Status R1 befanden sich keine Tumorzellen. Die Mittelwerte der Gruppen R0 bis R2 lagen bei $4,1 \times 10^4$, $3,0 \times 10^3$ und $2,4 \times 10^4$ Tumorzellen (Abb. 43).

4.3 Korrelation der Nachweismethoden

4.3.1 Korrelation Zytokeratin- und AgNOR-Färbung

Zur Untersuchung der Korrelation der Tumorzellzahlen, die mittels des Zytokeratin-Nachweises und der AgNOR-Färbung bestimmt wurden, wurden alle 97 Patienten mit Karzinomen eingeschlossen. In zwei Fällen fanden sich im Wundblut zwar Zytokeratin-positive Zellen, aber keine Tumorzellen in der AgNOR-Färbung.

Mit einem hochsignifikanten ($p=0,0001$) Korrelationskoeffizienten von $k=0,55$ stellte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen beiden Nachweismethoden dar. Jedoch zeigte sich eine schwächere Korrelation der Tumorzellzahlen als zwischen AgNOR- und p53-Färbung (Abb. 44).

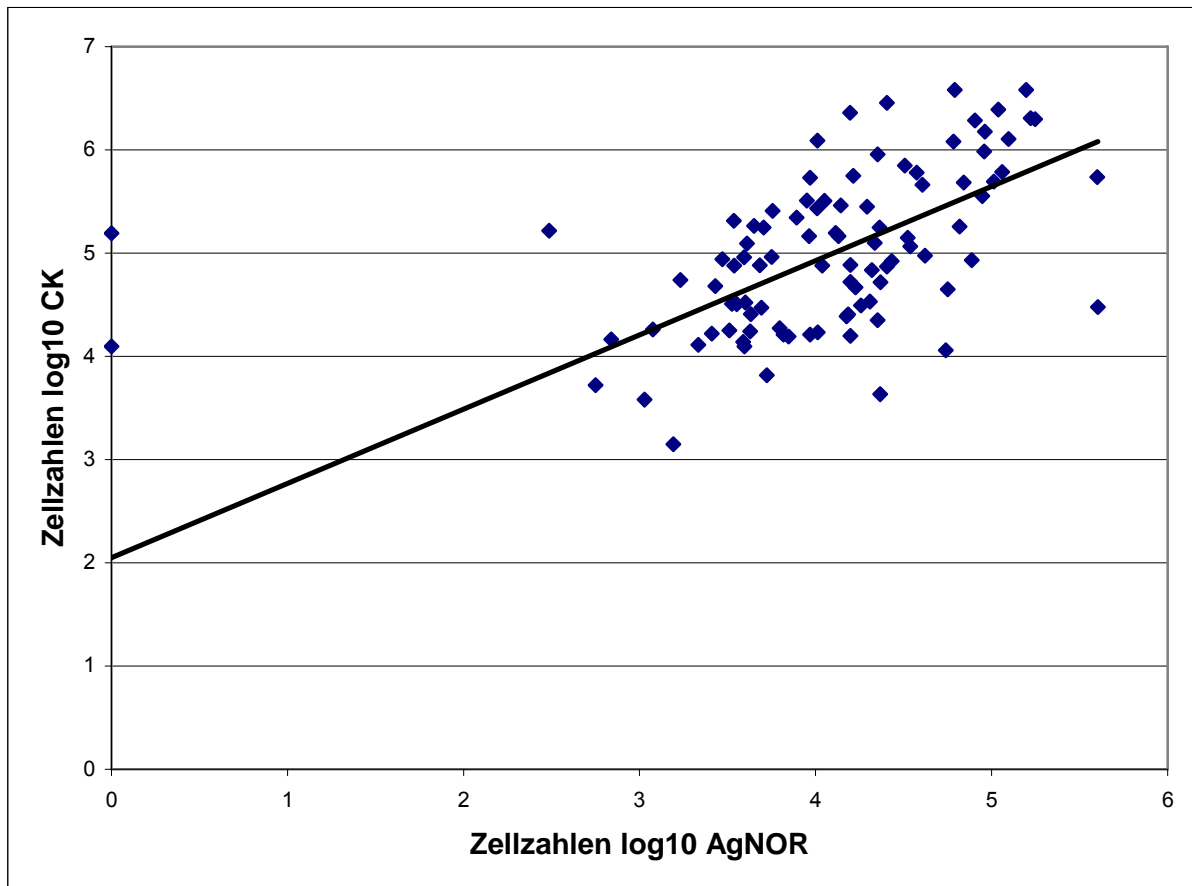


Abb. 44: Zusammenhang zwischen ermittelten Tumorzellzahlen nach AgNOR und Zytokeratin
n = 97

4.3.2 p53-Nachweismethode

Insgesamt wurde das Wundblut aus 33 Operationen mit der p53-Nachweismethode auf Tumorzellen hin untersucht. Darunter waren zwei Kolonkarzinome, elf Rektumkarzinome, 17 Magenkarzinome, ein Ösophaguskarzinom und zwei Pankreaskarzinome. Die Auswertung ergab 14 p53-negative (42%) und 19 p53-positive Fälle (58%).

Die Tumorzellzahlen nach der p53-Methode zeigten im Größenverhältnis zu den in der AgNOR-Färbung ermittelten Zellzahlen sehr ähnliche Werte. Nur bei einem Ausreißer, einem Pankreaskarzinom mit intraepithelialen Dysplasien, wurden anhand der p53-Färbung mit 186.000 Tumorzellen viermal mehr positive Zellen gezählt als nach der AgNOR-Methode. In der Korrelationsanalyse bestätigte sich eine hochsignifikante ($p=0,0001$) Korrelation mit einem Wert von $k=0,95$ zwischen den Tumorzellzahlen nach der AgNOR- und p53-Nachweismethode (Abb. 45).

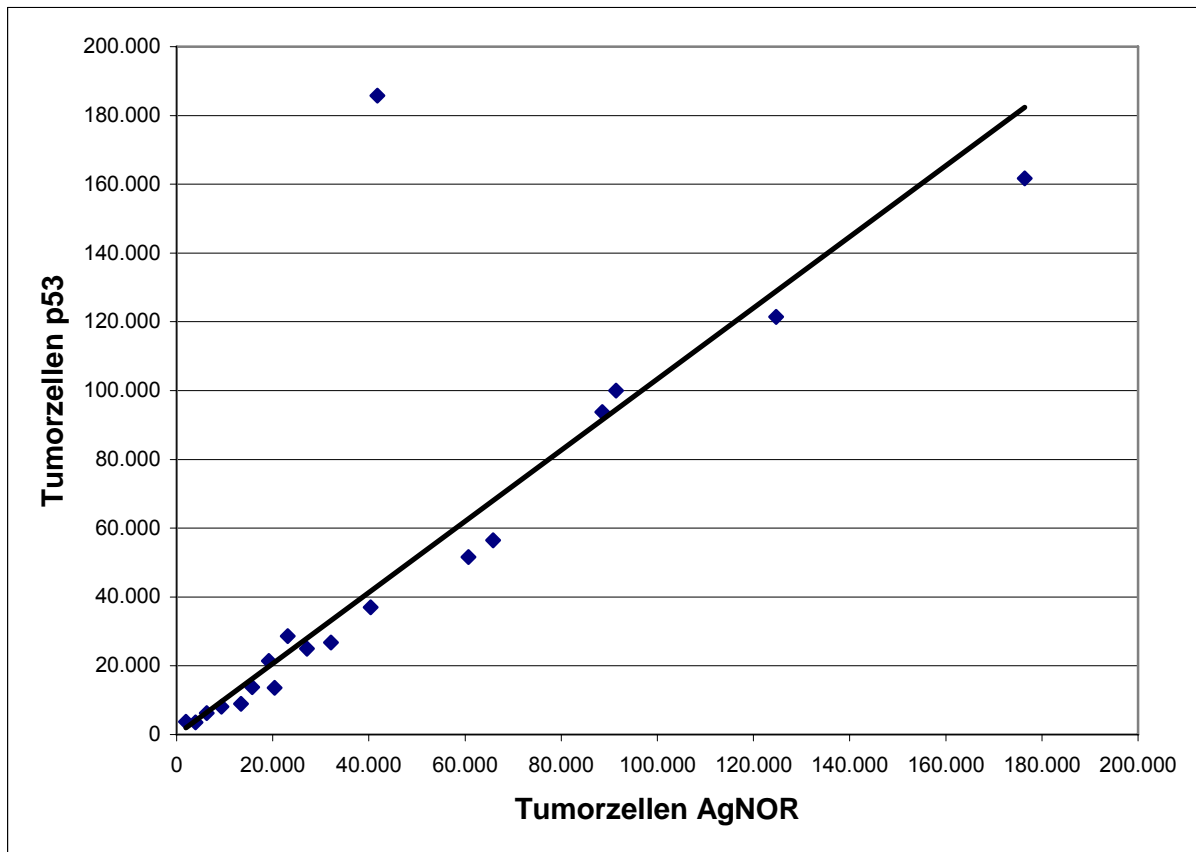


Abb. 45: Zusammenhang zwischen ermittelten Tumorzellzahlen nach AgNOR und p53
(für p53-positive Fälle)
n = 19

5. Diskussion

5.1 Tumorzellnachweis im Wundblut

5.1.1 Sensitivität

Die Dichtegradientenzentrifugation mit dem Medium Percoll® nützt zur Separation die unterschiedlichen Dichten von Blut- und Tumorzellen. Aufgrund der Ergebnisse von Studien, die das spezifische Gewicht verschiedener Karzinomtypen untersuchten (KOPPER et al. 1982, HAMBURGER et al. 1985, HANSEN 1994, WOLFF 1994) wurde der Einstufengradient mit 1,063 g/ml eingestellt. Tumorzellen besitzen im Vergleich ein relativ niedriges spezifisches Gewicht, dass durch deren relativ hohen Gehalt an Lipiden und Mukopolysacchariden erklärt wird (HAMBURGER et al. 1985). Damit konnten Erythrozyten, Granulozyten und ein großer Teil der Lymphozyten und mononukleären Zellen aus dem Wundblut entfernt werden, ohne einen größeren Verlust von Tumorzellen zu riskieren. Eigene Experimente mit Gradienten der Dichte 1,055 g/ml oder 1,025 g/ml, die eine noch bessere Abtrennung der störenden mononukleären Zellen bewirkt hätten, zeigten jedoch einen größeren bis totalen Verlust der Tumorzellen.

Das Problem der Mengenverhältnisse von wenigen Tumorzellen in vielen Blutzellen konnte so weitgehend bewältigt werden, da diese physikalische Trennmethode eine hohe Trennkapazität besitzt. Außerdem werden dadurch Zellmerkmale und -eigenschaften kaum beeinträchtigt. Eine hohe Vitalität der Zellen war vor allem für die anschließende AgNOR-Färbung eine wichtige Voraussetzung.

Bei der Analyse des gesamten Zellmaterials mittels Dichtegradientenzentrifugation könnte eine maximale Sensitivität von einer Tumorzelle zu 1×10^8 mononukleären Zellen (MNZ) erreicht werden (HANSEN et al. 1995). Beruhend auf der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit nur ein Teil des Gesamtvolumens eingesetzt wurde, reduzierte sich die Sensitivität auf ca. eine Tumorzelle zu 1×10^6 mononukleäre Zellen. Jedoch besitzen die nachfolgend angewendeten Färbemethoden keine höheren Sensitivitäten. Mit einer Nachweisquote von etwa einer Tumorzelle auf 10^5 - 10^6 mononukleäre Zellen weist die Zytokeratin-Färbung eine ähnlich hohe Empfindlichkeit auf (JOHNSON et al. 1995, ORUZIO et al. 1997). Aufgrund der Berechnungsformel für die Gesamttumorzellzahl (siehe 3.4.6) kann jedoch als kleinstmögliche Tumorzellzahl nur der Wert 10 errechnet werden (Gesamtvolumen 50ml, Verdünnungsfaktor 1). Dieser Wert steigt mit höherem Verdünnungsfaktor und größerem Gesamtvolumen als 50ml. In jeweiliger Abhängigkeit von Wundblutvolumen und Verdünnungsfaktor können kleinere Tumorzellzahlen nicht entstehen. Als Konsequenz wäre

eine größere Zahl an negativen Fällen zu erwarten gewesen, die sich jedoch aufgrund der hohen Tumorzellanreicherung und der Sensitivität der Methodik nicht einstellten. Dass die absolute Höhe der Tumorzellzahl und vor allem sehr niedrige Tumorzellzahlen nur sekundär von Bedeutung sind, konnte bereits in der Arbeit von STIERSDORFER 2001 gezeigt werden. Hier war es für die Prognose der Patienten hauptsächlich von Bedeutung, ob deren Tumorzellzahl im Wundblut ober- oder unterhalb des ermittelten Median von 4000 Tumorzellen lag.

5.1.2 Spezifität

Der Nachweis der Tumorzellen wurde anhand von drei unterschiedlichen Färbemethoden begründet, der immunenzymatische Nachweis von Zytokeratinen, die Silberfärbung Nukleolus-organisierender Regionen und der Nachweis des Proteins p53.

In zahlreichen Studien zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark oder im peripheren Blut wurde die Zytokeratin-Färbung zur eindeutigen Unterscheidung von Karzinomzellen gegenüber Blutzellen eingesetzt, Endothelzellen werden dabei ebenfalls nicht angefärbt (SCHLIMOK 1991, LEATHER et al. 1993, THORBAN 1996, VOGEL 1999). Im Wundblut ist jedoch mit dem Auftreten von epithelialen Zellen zu rechnen, die im Rahmen der Resektion frei werden und falsch-positive Ergebnisse verursachen können. Zwar werden in der Literatur Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper und Farbstoffablagerungen in 1-3% der Fälle beschrieben (WÖRMANN 1997, ORUZIO 1997, XU 2000), die positiven Ergebnisse im Wundblut aus Operationen benigner Prozesse können sie aber nicht ausreichend erklären. Immerhin konnten bei allen 15 Kontrollen Zytokeratin-positive Zellen mit einer mittleren Zellzahl von $3,3 \times 10^4$ nachgewiesen werden. Für die Spezifität der Färbung spricht, dass bei der Resektion einer Brustwirbelkörpermetastase eines Malignen Melanoms keine Anfärbung von Zellen stattgefunden hatte: Die Melanomzellen sind nicht epithelialen Ursprungs und das Wundblut wurde aus einem epithelfreien Resektionsgebiet abgesaugt. Anders verhielt es sich mit zwei Operationen von Tumoren, die sich histologisch als Sarkome herausstellten. Auch hier dürften sich die Tumorzellen nicht anfärben. Bei diesen abdominalchirurgischen Eingriffen konnten jedoch zwischen 10.000 und 20.000 Zytokeratin-positive Zellen nachgewiesen werden. Die morphologische Beurteilung der Zellen ist durch die blaue Gegenfärbung mit Hämalan nur eingeschränkt möglich, die eine Unterscheidung von Tumorzellen und Epithelzellen schwer zulässt. In der AgNOR-Färbung konnte aber die Existenz freier Epithelzellen im Wundblut morphologisch eindeutig bestätigt werden.

Mit der Silberfärbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR) können maligne Zellen anhand der Zahl, Größe und Verteilung der AgNORs eindeutig identifiziert werden. Zudem

ist sie für alle Malignome in gleicher Weise anwendbar und aussagekräftig (RÜSCHOFF et al. 1992). Neben der Beurteilung der AgNORs können die Zellen in dieser Färbung auch nach morphologischen Kriterien beurteilt werden. Für die AgNOR-Reaktion ist die Zellerhaltung von wesentlicher Bedeutung, da sich nur in fixierten Zellen, die nach dem Anreicherungs- und Reinigungsprozess noch vital waren, intensiv schwarz gefärbte Niederschläge ausbilden. Schlecht erhaltene Zellen färben sich schwach an und zeigen unspezifische ockergelbe Nukleoli (RÜSCHOFF 1992).

Die Spezifität der Silberfärbung erwies sich auch in der Auswertung der Kontrollen. In keiner der 15 Untersuchungen, von denen sich die meisten erst nachträglich bei der pathologischen Untersuchung als benigne Erkrankungen herausstellten, wurden Tumorzellen gefunden.

Wie in den vorausgegangenen Studien (HANSEN 1994, WOLFF 1994) lagen die Zahlen der AgNOR-Färbung gewöhnlich unter denen des Zytokeratin-Nachweises (Abb. 11). Ein Grund dafür dürfte hier die bereits erwähnte notwendige Vitalität der Zellen für die Anfärbbarkeit der AgNORs sein. In den Untersuchungen lag nach der Zellseparation regelmäßig eine Vitalität der Zellsuspension von mindestens 90% vor. Außerdem handelt es sich bei einem Teil der Zytokeratin-positiven Zellen um normale Epithelzellen, die in der Silberfärbung eindeutig als nicht maligne entartet erkannt werden. Möglicherweise wird während der Organresektion eine größere Menge an Epithelzellen ins Wundblut freigesetzt. Weiterhin bleibt zu diskutieren, ob zirkulierende Epithelzellen aus dem venösen Blut ins Operationsgebiet gelangen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich besonders nach Operationen Zytokeratin-positive epitheliale Vorläuferzellen im Blutkreislauf befinden (GOMPERS et al. 2006).

Obwohl man von einer Verunreinigung des Wundblutes mit Epithelzellen ausgehen kann, woraus zwangsläufig erhöhte Zellzahlen im Zytokeratin-Nachweis resultieren, zeigt die Auswertung in Abhängigkeit der einzelnen zu untersuchenden Variablen keine großen Abweichungen zu den ermittelten AgNOR-Ergebnissen. Die relativen Veränderungen hinsichtlich der pathologischen Parameter sind stets gleich (Abb. 13-17). Trotz der erheblichen Zahlenunterschiede beider Methoden, ergab sich dennoch eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Zytokeratin- und AgNOR-Nachweismethode (Abb. 44).

Um zu beweisen, dass es sich bei den im Wundblut nachgewiesenen Zellen wirklich um Tumorzellen handelte, wurde als Ergänzung bei einem Teil der Fälle der Nachweis des Proteins p53 als dritte Färbemethode durchgeführt. Das p53-Protein ist in die Kontrolle des zellulären Wachstums und in die Regulation des Zellzyklus involviert, wobei es in seiner natürlichen Form („wild-type“) das unkontrollierte Zellwachstum verhindert (HARRIS 1991,

McNUTT et al. 1994). In normalen Zellen liegt das p53-Protein aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit nur in sehr geringen Mengen vor, die mit immunhistochemischen Methoden nicht nachgewiesen werden können (BARTEK et al. 1991). Dagegen finden sich in Tumorzellen erhöhte Mengen des Proteins p53, da die mutierte Form eine verlängerte Halbwertszeit von mehreren Stunden besitzt (LEVINE et al. 1991). Durch Akkumulation ergibt sich eine immunhistochemisch relevante Proteinmenge (FINLEY et al. 1988). Tumorzellen mit vermehrter Expression von p53 zeigen meistens eine Anfärbung im Zellkern, aber es können auch zytoplasmatische Reaktionen beobachtet werden (SUN et al. 1992).

Insgesamt wurde das Wundblut von 33 Patienten mittels der immunhistochemischen p53-Nachweismethode untersucht. In 14 Fällen zeigte sich keine Anfärbung, wobei ein negativer Befund nicht mit einer fehlenden Existenz von Tumorzellen gleichzusetzen ist. Nicht jedes Karzinom zeigt eine vermehrte Anreicherung von p53. In einer Studie zur Analyse der Expression von p53 bei 125 Patienten mit Magenkarzinomen konnte bei 57% erhöhte Level des Proteins dargestellt werden (MARTIN et al. 1992). Für das kolorektale Karzinom fand sich eine p53-Akkumulation in 51% der untersuchten Fälle (SUN et al. 1992).

Die Korrelationsanalyse der Zellzahlen bei p53-positiven Fällen mittels der immunhistochemischen p53-Nachweismethode mit den Ergebnissen aus der AgNOR-Färbung zeigte einen hochsignifikanten Zusammenhang, der auch in der direkten Betrachtung der einzelnen Werte deutlich wurde. Abgesehen von kleineren Abweichungen zeigten beide Methoden identische Tumorzellzahlen. Diese Ergebnisse stützen zudem die hohe Spezifität der AgNOR-Färbung. Nur bei einem Patienten wurden im Wundblut mit der p53-Methode mehr Tumorzellen nachgewiesen als mit der AgNOR-Reaktion. Es handelte sich dabei um ein Pankreaskarzinom, das zusätzlich zahlreiche intraepitheliale Dysplasien aufwies. Möglicherweise hatten die dysplastischen Zellen bereits erhöhte, anfärbbare p53-Proteinmengen, während die Zellen in der AgNOR-Färbung noch nicht die Kriterien maligner Zellen erfüllten (Abb. 45).

Für die Identifizierung von Tumorzellen im Wundblut schien also zusammenfassend die AgNOR-Färbung am besten geeignet. Nicht zuletzt wegen ihrer hohen Spezifität und geringen Anfälligkeit gegenüber störenden Zellen lieferte sie verlässliche und aussagekräftige Ergebnisse.

In vielen Studien zum Nachweis von disseminierten Tumorzellen wird die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet, da sie mit einer Nachweisquote von 1 Tumorzelle auf 10^7 mononukleären Zellen eine hohe Sensivität vorweisen kann. Jedoch sind dabei hohe falsch-positive Ergebnisse immer noch ein großes Problem (SU 2005).

Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) weist die Expression eines Markergens (m-RNA) nach, welches in den Tumorzellen, aber nicht im ursprünglichen Gewebe exprimiert wird. Da

freie m-RNA extrem instabil ist, ist der Nachweis von m-RNA mit dem Nachweis von lebenden Zellen gleichzusetzen. Bei der Anwendung von RT-PCR ist die Spezifität aufgrund der hohen Amplifikationsrate besonders zu beachten. Falsch-positive Ergebnisse können durch Kontamination der Proben während der Aufarbeitung, durch Amplifikation von Pseudogenen und durch illegitime Expression der Zielgene entstehen. Unter dem Begriff illegitime Expression versteht man eine geringe Expression von als gewebetypisch angesehenen Genen in anderen Geweben (CHELLY et al. 1989, KAPLAN et al. 1992, RUUD et al. 1999). So konnte bei 20% gesunden Probanden CK19-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen werden (KRISMANN et al. 1995). Ähnliches konnte für andere Marker, wie CEA und Muc1, gezeigt werden (BEROIS et al. 2000).

Häufig werden mittels PCR tumorspezifische DNA-Mutationen (z.B. k-ras) nachgewiesen, wobei auch hier die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen durch den Nachweis von Fragmenten freier Tumor-DNA besteht (WEITZ 1999). Die Punktmutation k-ras konnte zwar zu 71-100% im Adenokarzinom des Pankreas identifiziert werden, weshalb sie oft als Marker eingesetzt wird, jedoch fand sie sich auch bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und in normalem Gewebe (LÖHR et al. 2000, QUENEAU et al. 2001).

Ein weiterer Nachteil der PCR besteht in der eingeschränkten Möglichkeit einer Quantifizierung und der fehlenden morphologischen Beurteilbarkeit der nachgewiesenen Tumorzellen.

Während die PCR für jedes Karzinom spezifisch angepasst werden muss, kann die Zytokeratin- und AgNOR-Nachweismethode bei allen Karzinomen zur Detektion freier Tumorzellen eingesetzt werden. Somit sind die Ergebnisse durch die Verwendung eines gemeinsamen Nachweisverfahrens uneingeschränkt miteinander vergleichbar.

5.2 Tumorzellen im Wundblut in Abhängigkeit von Tumorausdehnung T, Lymphknotenstatus N, Fernmetastasierung M, Grading G und R-Status

Im Gegensatz zu vorausgegangenen Arbeiten (HANSEN 1994, WOLFF 1994), die das Auftreten von Tumorzellen im Wundblut bei verschiedensten Tumorentitäten untersuchten und als Gesamtheit auswerteten, wurde diese Arbeit auf Untersuchungen bei gastrointestinalen Karzinomen beschränkt, wobei ausreichende Fallzahlen für das Kolonkarzinom, das Rektumkarzinom, das Magenkarzinom und das Pankreaskarzinom zustande kamen.

Die Vermutung, dass sich im Wundblut umso mehr Tumorzellen befinden je größer die Tumorausdehnung ist, liegt nahe. Schließlich besteht mit Ausdehnung des Tumors

zunehmend die Gefahr das Blut- und Lymphgefäße erodiert und Tumorzellen verschleppt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Tumorzellzahlen im Wundblut beim Kolonkarzinom (Abb. 18, 19), beim Rektumkarzinom (Abb. 24, 25) und beim Magenkarzinom (Abb. 30, 31) mit der Tumorausdehnung T zunehmen. Auch bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs kann für beide Nachweismethoden eine Zunahme der Tumorzellzahlen beobachtet werden (Abb. 13). Vor allem das Magenkarzinom weist hier eine signifikante Abhängigkeit auf. Bei allen 30 Patienten mit Magenkarzinom wurden Tumorzellen im Wundblut gefunden. Einen deutlichen Anstieg der Zellzahlen verzeichnen Patienten ab Tumorausdehnung T3, d.h. wenn das Karzinom die Serosa infiltriert. Auch in Studien, die freie Tumorzellen in Peritoneallavagen untersuchten, konnten signifikant höhere Detektionsraten ab Infiltration der Serosa nachgewiesen werden (VOGEL et al. 1999, WANG et al. 2005). Patienten mit positiven Spülzytologien hatten alle eine Tumorausdehnung in die Tunica Serosa (MANZONI et al. 2002).

Während das Kolonkarzinom einen deutlichen Anstieg der Tumorzellen von T2 bis T4 aufweist, zeigen sich für das Rektumkarzinom eher stagnierende Werte (Abb. 24, 25). Die Infiltration des Tumors in die Serosa scheint jedoch auch beim Rektumkarzinom eine entscheidende Rolle zu spielen, denn in der AgNOR-Auswertung stellt sich eine Zunahme der Tumorzellen von T2- zu T3-Karzinomen dar. Eine weitere Steigerung der Zellzahlen bei T4-Rektumkarzinomen, wie sie beim Magen- und Kolonkarzinom beobachtet wird, bleibt aber aus. Da das Rektum anatomisch teilweise retroperitoneal und vor allem extraperitoneal liegt, muss eine Tumorausdehnung jenseits der Organgrenzen nicht zwangsläufig zu einer Dissemination von Tumorzellen in die Peritonealhöhle führen. Leider können für das Kolon- und Rektumkarzinom keine Angaben über die Tumorklassifikation T1 gemacht werden. Der Grund dürfte sein, dass T1-Tumore häufig Zufallsbefunde bei Rekto-Koloskopien sind, die endoskopisch entfernt und keinen weiteren operativen Eingriff bedürfen (JUNGINGER 2002). Zum Vergleich korrelierten im Knochenmark höhere T-Klassifikationen (T1/T2 versus T3/T4) signifikant mit häufigerem Auftreten von epithelialen, Zytokeratin-positiven Zellen (WEIHRAUCH et al. 2002).

Bei 16 von 17 (94%) Patienten mit Pankreaskarzinomen konnten eindeutig Tumorzellen im Wundblut nachgewiesen werden. Die Auswertung der beiden Nachweismethoden lassen aber keinen Zusammenhang mit der Tumorausdehnung erkennen (Abb. 36, 37). Leider konnten keine ausreichenden Daten für T1- und T2-Pankreaskarzinome gesammelt werden, da das Pankreaskarzinom meist erst in fortgeschrittenem Stadium erkannt wird. Andere Studien standen ebenfalls vor diesem Problem (ISHIKAWA et al. 2003). Jedoch deutet der Einzelwert in T1 auch auf ähnlich hohe Tumorzellzahlen für T1- bzw. T2-Pankreaskarzinomen hin. Es wird davon ausgegangen, dass Pankreaskarzinome bereits in

einem sehr frühen Stadium Tumorzellen ins Peritoneum freisetzen und eine systemische Erkrankung verursachen (WARSHAW 1991, RIDWELSKI et al. 2001). Außerdem wurde bestätigt, dass die zunehmende Präsenz von Tumorzellen in peritonealen Spülzytologien mit der Tumorausdehnung zunimmt (YACHIDA et al. 2002).

Die gastrointestinalen Karzinome metastasieren zuerst überwiegend lymphogen über die regionalen Lymphabflussgebiete, die im wesentlichen der arteriellen Versorgung folgen. Die Auswertung der Gesamtheit aller untersuchten gastrointestinaler Karzinome hat einen kontinuierlichen Anstieg der Tumorzellzahlen in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus zum Ergebnis (Abb. 14). Gerade beim Magenkarzinom ist eine frühe lymphogene Metastasierung möglich, da sich schon in der Mucosa Lymphgefäße befinden (SIEBECK et al. 2001, MÜLLER 2003). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorzellzahl und Lymphknotenstatus kann für das Magenkarzinom im Zytokeratin-Nachweis (Abb. 30) und vor allem mit der AgNOR-Färbung (Abb. 31) nachgewiesen werden. Patienten mit einem Lymphknotenbefall N1 haben signifikant mehr maligne Zellen im Wundblut als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0). Bei noch ausgedehnterem Befall, Lymphknotenstatus N2, verstärkt sich dieser Unterschied nochmals deutlich. Auch in einer Untersuchung von Peritoneallavagen auf disseminierte Tumorzellen zeigte sich eine signifikante Korrelation zum Lymphknotenstatus. Während bei Patienten mit N0-Lymphknotenstatus nur in 16,7% der Fälle positive Ergebnisse gefunden wurden, waren es bei Patienten mit Lymphknotenbefall 50% ($p=0,05$) (VOGEL et al. 1999).

Sowohl beim Kolonkarzinom (Abb. 20, 21) als auch beim Rektumkarzinom (Abb. 26, 27) nimmt die Tumorzellzahl in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus zu, wobei der Anstieg bei Patienten mit Rektumkarzinomen verhaltener ausfällt. Eine Studie, die mögliche Ursachen für eine Tumoraussaat in die Peritonealhöhle bei kolorektalen Karzinomen untersuchte, identifizierte die Lymphknotenbeteiligung ebenfalls als Einflussfaktor (HASE et al. 1998).

Die Auswertung des Einflusses des Lymphknotenbefalls auf die Tumorzellzahl beim Pankreaskarzinom ergibt wieder eine Besonderheit (Abb. 38, 39). Zwar steigen die Zahlen bei Patienten mit Lymphknotenbeteiligung N1 gegenüber Patienten mit N0 an, eine N2-Metastasierung der Lymphknoten erbringt jedoch niedrigere Werte. Diese Werte sind sogar kleiner als bei Patienten ohne Lymphknotenbeteiligung. Der Grund dürfte vor allem darin liegen, dass die Fallzahl bei Status N2 mit zwei Fällen sehr niedrig und nur beschränkt aussagekräftig ist. Zum anderen handelt es sich bei diesen beiden Fällen um Patienten, die nicht kurativ operiert wurden, da sich während der Operation ein bereits fortgeschrittenes Tumorgeschehen darstellte. Beide Patienten wurden nach erfolgter Exploration mit einer Gastroenterostomie palliativ versorgt. Eine Traumatisierung des Operationsgebietes mit

möglicher Manipulation am Tumor, Blutungen und das Eröffnen von Lymphgefäßen, die eine Freisetzung von Tumorzellen bewirken könnte (STIERSDORFER 2001), erfolgte hier nicht.

Der Zusammenhang zwischen Tumorzellzahl und dem Status der Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Operation konnte nur am Gesamtkollektiv untersucht werden, da hier ausreichende Fallzahlen vorhanden waren. Wie in den Vorgängerstudien (HANSEN 1994, WOLFF 1994, STIERSDORFER 2001) stellen sich höhere Zellzahlen bei Patienten mit Fernmetastasen dar (Abb. 15). Eine Zunahme der Tumorzellzahlen ist hier auch zu erwarten, da Patienten mit Metastasen offensichtlich an einer systemisch disseminierten Tumorerkrankung leiden. Auch in Spülzytologien konnten bei Patienten mit einer bekannten Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Tumorresektion signifikant häufiger maligne Zellen gefunden werden als bei M0-Patienten (VOGEL et al. 1999).

Mit Abnahme der Differenzierung der Karzinome stellen sich bei allen vier Tumorentitäten, sowie beim Gesamtkollektiv höher Tumorzellzahlen im Wundblut ein. Besonders ausgeprägt ist dieser Zusammenhang beim Kolonkarzinom (Abb. 22, 23). Patienten mit mäßig differenzierten (G2) Karzinomen haben signifikant weniger maligne Zellen im Wundblut als Patienten mit gering differenzierten (G3) Karzinomen. Untersuchungen von Peritonealzytologien hatten bei G3-Magen- und Kolonkarzinomen häufiger und mehr Tumorzellen zum Ergebnis als bei G1-, G2-Karzinomen. Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant (VOGEL et al. 1999, VOGEL et al. 2000). Auch in den vorangegangenen Studien ergab sich durch Vergleich ein signifikanter Unterschied in der Tumorzellzahl zwischen G1- und G2- bzw. G3-Tumoren (HANSEN 1994, WOLFF 1994, STIERSDORFER 2001).

Ausreichende Fallzahlen für die Untersuchung der Abhängigkeit der Tumorzellzahl im Wundblut vom Residualtumorstatus R waren nur für das Pankreaskarzinom gegeben. Ein Zusammenhang konnte nicht gefunden werden. Während die Zellzahlen im Zytokeratin-Nachweis (Abb. 42) von R0 zu R2 sogar kontinuierlich abnehmen, zeigen sich in der AgNOR-Färbung (Abb. 43) für den R0- und R2-Status ähnliche Werte. Nur der Mittelwert in der Gruppe der R1-resezierten Karzinome ist aufgrund eines Negativbefundes deutlich niedriger. Die AgNOR-Einzelwerte in den drei Gruppen unterscheiden sich im Verhältnis kaum. Die niedrigen Tumorzellzahlen in der R2-Gruppe gegenüber R0-Patienten lassen sich dadurch erklären, dass es sich bei den Operationen um reine palliative Maßnahmen handelte. Größere Manipulationen im Bauchraum blieben laut OP-Berichte aus. Die gefunden Tumorzellen dürften somit disseminierten Tumorzellen entsprechen, wie sie in

Peritonealspülzytologien vorkommen. Ein zusätzlicher Eintrag an malignen Zellen konnte kaum stattfinden.

Die Betrachtung der Tumorzellzahlen für das gesamte Kollektiv zeigt ein ähnliches Bild wie die Auswertung des Pankreaskarzinoms. Dies rührt vor allem daher, dass viele R1- und R2-Patienten aus der Pankreasgruppe stammen. In der Vorgängerstudie stellte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Tumorzellzahl und Residualtumorstatus heraus. Die Mittelwerte in den Gruppen waren annähernd identisch. Negative Befunde wurden dabei sowohl bei R0- als auch bei R1/2-resezierten Tumoren gefunden (STIERSDORFER 2001). Eine japanische Gruppe untersuchte Drainageflüssigkeit aus dem Pankreasbett nach Resektion des Pankreaskarzinoms. Es wurden deutlich häufiger Tumorzellen bei R1-resezierten Patienten (75%) und R2-resezierten Patienten (67%) gefunden als bei Patienten mit vollständig entferntem Tumor (R0; 28%). Die Tumorzellzahl zwischen R1- und R2-resezierten Patienten nahm auch hier nicht mehr zu, sie zeigte sogar einen leichten Rückgang (ISHIKAWA et al. 2003).

5.3 Herkunft der Tumorzellen im Wundblut

In der vorliegenden Studie konnten im Wundblut bei 95 von 97 Patienten (98%) mit pathologisch gesicherten gastrointestinalen Karzinomen eindeutig freie Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieses regelmäßige Erscheinen von Tumorzellen im Wundblut könnte sich mittels mehreren Einflussfaktoren erklären.

Am nächstliegenden ist die Vermutung, dass die Tumorzellen im Wundblut aus der Zirkulation stammen. Dagegen spricht ihre niedrige Inzidenz, Konzentration und geringe Korrelation zur Wundblutmenge. Bei einer vergleichenden Untersuchung von Tumorzellen im Wundblut und im zentral venösen Blut fanden sich im Wundblut bei 92% der Fälle maligne Zellen, wobei im venösen Blut nur bei 23% der Patienten Tumorzellen identifiziert werden konnten (HANSEN 1994, STIERSDORFER 2001). In weiteren Studien stellten sich ähnliche Detektionsraten für freie Tumorzellen im zirkulierenden Blut dar (HARDINGHAM et al. 1995, YEH et al. 1998). Die hohen Nachweisraten im Wundblut lassen sich nicht durch die Herkunft der Tumorzellen aus dem Blutkreislauf erklären. Auch die durchgeführte Korrelationsanalyse von Tumorzellzahl und Wundblut liefert nur eine geringe Korrelation (Abb. 44). Eine starke Abhängigkeit müsste aber erwartet werden, wenn der Großteil der malignen Zellen aus dem Blutkreislauf stammen würden, d.h. mit höherem Blutverlust müssten mehr Tumorzellen aus der Zirkulation ins Wundblut gelangen. Dabei wurde festgestellt, dass ein großer Teil der Patienten mehr Tumorzellen im Wundblut hatten als rechnerisch aus der Zirkulation erklärbar waren (STIERSDORFER 2001). Außerdem ließ sich in der vorausgegangenen Arbeit zwischen der Konzentration der Tumorzellen im

Wundblut und im zirkulierenden Blut nur eine schwache Korrelation nachweisen (STIERSDORFER 2001).

Andererseits ist es unzweifelhaft, dass gerade während der Operation vermehrt Tumorzellen in den Blutkreislauf gelangen, die bei Blutungen auch in das Operationsgebiet eingeschwemmt werden können (WEITZ et al. 1998).

Die Manipulation am tumorösen Organ kann dazu führen, dass vermehrt Tumorzellen in drainierende Venen gelangen. Während der Resektion von kolorektalen Lebermetastasen wurde über einen Lebervenenkatheter Blut abgenommen. Durch die Mobilisation und Resektion der Leber wurden vermehrt Tumorzellen in abführendem Blut gemessen (FRÜHAUF et al. 2005). Bei Blutungen aus den Lebervenen könnten so vermehrt freie Tumorzellen ins Wundblut gelangen. Zur Verhinderung, dass aus eröffneten tumordrainierenden Venen direkt Tumorzellen freigesetzt werden können, wird meist die „no-touch isolation“-Technik angewandt. Das Konzept dieser Methodik sieht vor, dass keine Manipulation am Tumor vorgenommen wird, bevor nicht alle drainierenden Blut- und Lymphgefäße abgebunden wurden. Die Wirksamkeit dieser Methode konnte bei Patienten mit Pankreaskarzinomen gezeigt werden, deren Blut aus der Portalvene hinsichtlich abgelöster Tumorzellen untersucht wurde. In fünf von zehn Fällen (50%) identifizierte man Tumorzellen im portalvenösen Blut nach der Tumormanipulation, während nur in einem von acht Fällen (13%), die mit der „no-touch isolation“-Technik operiert wurden, Tumorzellen nachgewiesen wurden. Sowohl die Rezidivrate, als auch die Überlebenszeit war bei Patienten, behandelt mit „no-touch isolation“-Technik, signifikant besser (HIROTA et al. 2005). Für das kolorektale Karzinom konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob ein Unterschied zwischen beiden Operationsverfahren existiert (WIGGERS et al. 1988).

Aus den Operationsberichten geht hervor, dass die meisten Resektionen der untersuchten gastrointestinalen Karzinome (Magen, Kolon, Rektum, Pankreas) mit der „no-touch isolation“-Technik durchgeführt wurden. Ein Vergleich mit herkömmlichen Methoden und deren Auswirkung auf die Tumorzellzahl konnte nicht erfolgen.

Die gastrointestinalen Karzinome metastasieren häufig zuerst lymphogen, so dass auch bei Eröffnung von Lymphbahnen während der Tumorsektion freie Tumorzellen ins Wundblut gelangen können. Gerade das Magenkarzinom zeigt eine signifikante Zunahme der Tumorzellzahlen bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (Abb. 32, 33), aber auch das Kolon- und Rektumkarzinom (Abb. 20, 21, 26, 27), sowie bedingt das Pankreaskarzinom (Abb. 38, 39), zeigen eine Steigerung zwischen freien Lymphknoten und Lymphknotenbefall. Bei der Untersuchung der Dissemination der Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom in die verschiedenen Kompartimente, Lymphknoten, Knochenmark und Blutkreislauf, konnte eine

frühere lymphogene, als hämatogene Tumorzeldissemination nachgewiesen werden (WEITZ et al. 1999). Ein histopathologischer Befund eines tumorfreien Lymphknotens bedeutet nicht, dass nicht doch disseminierte, maligne Zellen im Lymphknoten vorhanden sind. In zahlreichen Studien fanden sich mittels immunzytochemischen oder molekularbiologischen Nachweismethoden freie Tumorzellen in Lymphknoten, trotz histopathologischer N0-Begutachtung (MAEHARA et al. 1996, SIEWERT et al. 1996, SCHEUNEMANN et al. 2004). Eine Ausschwemmung von Tumorzellen bei Eröffnung des Lymphsystems kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Selbst im Pankreassaft konnten bei Patienten mit Pankreaskarzinom Tumorzellen nachgewiesen werden, die während der Resektion in das Operationsfeld gelangten. Ähnliche Resultate lieferten die Analysen von Galle bei malignen Lebererkrankungen (VOGEL und KALTHOFF 2001).

Als weitere Möglichkeit über die Herkunft von Tumorzellen im Wundblut können einzelne, verbliebene Tumornester an den Resektionsrändern diskutiert werden. Eine japanische Studie untersuchte die Drainageflüssigkeit aus dem Resektionsbett bei Patienten mit Pankreaskarzinom. Selbst bei 16 der 58 (28%) R0-resezierten Patienten fanden sich positive Zytologien. Patienten mit R1-Resektion hatten im Vergleich in 75% der Fälle Tumorzellen in der Drainageflüssigkeit (ISHIKAWA et al. 2003). Der Grund könnte die mikroskopische Infiltration in retroperitonealer Richtung mit Einbeziehung des Nervenplexus und des lymphatischen Gewebes sein, wobei der Primärtumor eine makroskopische Begrenzung vortäuscht (OHIGASHI et al. 2000, DEMEUURE et al. 1998). Auch in anderen Studien konnten mittels Peritoneallavagen bei kurativ (R0) resezierten gastrointestinalen Karzinomen in hohen Prozentsätzen freie Tumorzellen nachgewiesen werden (BROLL et al. 1996).

Obwohl der fehlende Unterschied zwischen der Tumorzellzahl von R0- und R1/2-operierten Tumoren (STIERSDORFER 2001) in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte, ist eine mögliche Dissemination einzelner Tumorzellen von den Resektionsrändern gegeben.

Ein Großteil der Tumorzellen könnte bereits vor Operationsbeginn in das Operationsgebiet eingewandert sein. Für diese These sprechen die zahlreichen Berichte über Tumorzellen, die in Peritonealspülzytologien vor Beginn der Operation gefunden wurden. Am häufigsten konnten freie Tumorzellen bei Tumoren mit tieferer Organinfiltration (T3/T4) nachgewiesen werden, doch auch bei T1-Karzinomen erfolgte eine Identifikation von Tumorzellen in der Spülzytologie. Solche Ergebnisse fanden sich sowohl beim Magen- und Kolonkarzinom (VOGEL et al. 1999, VOGEL et al. 2000), sowie beim Pankreaskarzinom (WARSHAW 1991, YACHIDA et al. 2001).

Die geschilderten Möglichkeiten für die Herkunft der Tumorzellen im Wundblut zeigen zwar häufig positive Befunde, dennoch wurde in keinem der untersuchten Kompartimente ein solch regelmäßiges Auftreten von Tumorzellen nachgewiesen wie es im Wundblut der Fall ist. Als Schlussfolgerung bleibt also nur eine gewisse Summation aller genannten Kriterien.

5.4 Bedeutung von Tumorzellen im Wundblut

Die Disseminierung von Tumorzellen bei gastrointestinalen Karzinomen in die verschiedenen Kompartimente Blutkreislauf, Knochenmark, Lymphsystem oder Peritonealhöhle scheint ein weit verbreitetes Phänomen zu sein. Jedoch muss sich daran nicht unweigerlich eine makroskopische Metastasierung anschließen. Das körpereigene Abwehrsystem, wie z.B. zytotoxische Killerzellen oder Makrophagen, reduziert einen Großteil der disseminierten Tumorzellen, die oft zusätzlich einer Apoptoseinduktion unterliegen (FOURNIER et al. 1999). So ist es zu erklären, dass die künstliche Zufuhr von Tumorzellen in die Blutzirkulation durch Anlage eines peritonealvenösen Shunts zur Entlastung eines malignen Aszites kaum zu vermehrtem Auftreten von Metastasen führte (STRAUS et al. 1979, SOUTER et al. 1983).

In Tierversuchsmodellen konnte gezeigt werden, dass etwa eine Anzahl von 10^3 Tumorzellen notwendig ist, um eine Metastase zu setzen (HARDINGHAM et al. 1995). Bei den meisten Patienten in der vorliegenden Arbeit wurden Tumorzellzahlen weit über 1000 identifiziert. Wenn also nur ein geringer Bruchteil der gestreuten Zellen überlebt, ist ein ausreichendes Potenzial zur Bildung von solitären Metastasen gegeben. Zudem wurde dargestellt, dass Tumorzellen sich Angriffen des Immunsystems durch Effekte wie Fibrinablagerungen, Thrombozytenaggregation und mechanische Adhäsion um die Tumoremboli schützen (FOURNIER et al. 1999).

Neben der Überlebensfähigkeit im Organismus müssen die Tumorzellen in der Lage sein, sich in einer neuen Umgebung festsetzen zu können. Eine Ausstattung mit Proteasen, Cathepsinen, Kollagenasen und Plasminogenaktivatoren für die Zerstörung und Durchdringung von Basalmembranen besitzt eine außerordentliche Bedeutung (LIU et al. 1992).

Die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen aus dem Wundblut wurde anhand einiger Tests auf Invasivität, Klonogenität und Tumorigenität nachgewiesen. Der komplexe Vorgang der Invasion konnte durch die in-vitro-Invasivitätstestung in der Boyden-Kammer untersucht werden, wobei Karzinomzellen aus dem Wundblut in neun von 24 Fällen in der Lage waren, durch enzymatischen Abbau und aktive Bewegung, eine Bindegewebsmatrix zu durchdringen. Tumorzellen aus Wundblut konnten in 13 von 40 untersuchten Fällen Kolonien in Zellkultur bilden, was ihre Teilungsfähigkeit und Klonogenität hinreichend bewies. Als aussagekräftigster Beweis für die Malignität der Tumorzellen aus dem Wundblut ist die

Tumorneubildung in der Nacktmaus anzusehen. Mit zwei aus Wundblut isolierten und passagierbaren Zelllinien konnten jeweils ausreichend große Zellzahlen injiziert werden. In Nacktmäusen konnte durch eine der beiden Zelllinien aus Wundblut ein Tumor induziert werden (HANSEN 1994).

In zahlreichen Studien über das Auftreten von freien Tumorzellen in der Peritonealhöhle, die mittels Spülzytologien identifiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass positive Ergebnisse das Auftreten von Lokalrezidiven fördern und beschleunigen können (KONISHI et al. 2002, HASE et al. 1998, de MANZONI et al. 2002). Analog wurde diskutiert, ob auch die freien Tumorzellen im Wundblut die Entstehung von Lokalrezidiven erklären könnten. Immerhin traten bei einer Untersuchung sechs von sieben registrierten Lokalrezidiven in der Bauchhöhle auf (drei Magenkarzinome, ein kolorektales Karzinom, ein Nierenzellkarzinom und ein Ovarialkarzinom). Außerdem zeigte sich, dass die sieben Patienten, bei denen Lokalrezidive auftraten, im Mittel höhere Zellzahlen im Wundblut aufwiesen als die Patienten, bei denen kein Rezidivereignis auftrat. Weiterhin war die Rezidivwahrscheinlichkeit bei Malignomen mit einer Zellzahl über 4000 signifikant größer als bei Karzinomen die weniger als 4000 Tumorzellen im Wundblut hatten (STIERSDORFER 2001).

Die „minimal residual tumor disease“ (MRD) bezeichnet die okkulte mikroskopische Streuung von Tumorzellen in den Körper. Diese Tumorzellen können mit herkömmlichen Methoden des Tumorstagings, wie z.B. Computertomographie, nicht erfasst werden (WÖRMANN et al. 1997). Jedoch werden sie als Ursache für das Wiederauftreten einer Tumorerkrankung bei primär kurativ resezierten Patienten und selbst nach langer Zeit der Tumorfreiheit angesehen (RIETHMÜLLER und JOHNSON 1992). Die absolut überwiegende Zahl der disseminierten Tumorzellen befinden sich im mitotisch inaktiven Zustand, der sogenannten G₀-Phase („tumor cell dormancy“). Dies ist auch ein Grund, warum konventionelle Chemotherapeutika, die vor allem in den aktiven Teilungsprozess einer Zelle eingreifen, die Last an freien Tumorzellen kaum vermindern. In diesem Zustand der Ruhephase scheinen die Zellen vom Zeitpunkt der Aussaat bis zur Metastasenentstehung zu verharren (PANTEL et al. 1997).

In den meisten Studien zur Mikrodissemination basierten die Ergebnisse bislang auf den Nachweis von Tumor-Einzelzellen in Knochenmark zum Zeitpunkt der primären Tumoroperation (ALLGAYER und HEISS 2001). Mittlerweile wird auch die Detektion von Tumorzellen in der Peritonealhöhle mittels Spülzytologien als eine systemische Streuung des Primärtumors betrachtet, die für das Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen, sowie für die Überlebenszeit weitreichende Folgen hat (DONGMING et al. 2005, de MANZONI et al. 2002, VOGEL et al. 2000, HASE et al. 1998). Es ist möglich, dass auch das Auftreten von Tumorzellen im Wundblut als Indikator für eine systemische Dissemination betrachtet

werden kann. Schließlich ist die Herkunft der Tumorzellen nicht auf einen einzigen Ursprung zurückzuführen und vereinigt somit die Kompartimente wie peripheres Blut, Lymphsystem und Peritonealhöhle, in denen eine Mikrodissemination erfolgen kann.

5.5 Prognostischer Wert disseminierter Tumorzellen

Eine Abhängigkeit der Prognose von der Tumorzellzahl im Knochenmark konnte bei Patienten mit Magenkarzinom gezeigt werden. Es fanden sich in einer Serie von 219 Patienten, wovon 109 mit Residualtumorstatus R0 reseziert waren, in 51% der Fälle perioperativ Tumorzellen im Knochenmark mit einer signifikanten Assoziation der Prognose. Der alleinige qualitative Nachweis der Zellen war jedoch kein unabhängiger prognostischer Faktor. Erst die Berücksichtigung der Quantität disseminierter Tumorzellen brachte in einer multivariaten Analyse eine signifikante Prognoseassoziation. Diese war besonders deutlich in Tumoren mit der Klassifikation pT1/2-, pN0 und beim Karzinom vom intestinalen Typ nach Laurén, Tumoren, deren Prognose besonders durch die hämatogene Fernmetastasierung bestimmt wird (JAUCH et al. 1996).

Ein positiver Nachweis von epithelialen, CK-positiven Zellen gelang mittels PCR bei 33 von 51 Patienten (65%) mit neu diagnostiziertem kolorektalen Adenokarzinom, wobei sie im Stadium pT3/4 häufiger als im Stadium pT1/2 gefunden wurden und der Lymphknotenstatus keinen Einfluss hatte. Das Auftreten der Zellen im Knochenmark zeigte eine Abhängigkeit vom Tumorstadium, Tumorausbreitung und Tumormarker CA 19-9 (WEIHRAUCH et al. 2002).

Auch die peritonealen disseminierten Tumorzellen haben prognostische Bedeutung. Bei 140 Patienten, die sich einer kurativen Resektion eines kolorektalen Karzinoms unterzogen, wurden nach Eröffnen und vor dem Schließen der Bauchhöhle Spülzytologien angefertigt. Es konnten in 15% bzw. 9% der Lavagen Tumorzellen gefunden werden. Insgesamt hatten Patienten mit einer positiven Zytologie eine verkürzte Überlebenszeit, sowie einen größeren Einfluss auf die Entstehung von Rezidiven und Metastasen. Gerade die Ergebnisse in den Spülzytologien am Ende der Operation waren mit den postoperativen Langzeitresultaten beim kolorektalen Karzinom korreliert (HASE et al. 1998).

Der Einfluss von Tumorzellen in der Bauchhöhle auf die Überlebenszeit der Patienten bestätigte sich ebenso für das Magenkarzinom. Die univariate Analyse erbrachte eine signifikante Assoziation zwischen Tumorzellen in der Lavage und einer ungünstigen Prognose trotz eines kurativ resezierten Magenkarzinoms. Während des Beobachtungszeitraums starben 90,9% der Patienten mit positiven Ergebnissen im Gegensatz zu 42,3% bei negativen Resultaten (VOGEL et al. 2000). Für das

Magenkarzinom konnten auch andere Studien einen prognostischen Zusammenhang feststellen (BONENKAMP et al. 1996, de MANZONI et al. 2002).

In vielen Studien, die das Pankreaskarzinom bezüglich freier Tumorzellen in Peritoneallavagen untersuchten, konnte ein prognostischer Zusammenhang hergestellt werden. Die Detektionsraten von malignen Zellen mittels zytologischen Methoden lagen zwischen 14% und 23% bei Patienten, deren Karzinom kurativ R0-reseziert wurde. Das positive Ergebnis in der Spülzytologie hatte auch hier eine verkürzte Überlebenszeit, sowie ein schnelleres Rezidivrisiko zur Folge. Weiterhin war die Fernmetastasierungsrate erhöht (MAKARY et al. 1998, KONISI et al. 2002, JIMENEZ et al. 2000). Ältere Studien unterstützten diese Aussagen (HEECKT et al. 1992, JUHL et al. 1994).

Bisher wurde die prognostische Aussagekraft von Tumorzellen im Wundblut nur anhand einer Studie statistisch untersucht (STIERSDORFER 2001). Die Ergebnisse basierten auf den Daten von 83 Patienten, die sich tumorchirurgischen Eingriffen an einem Primärtumor unterzogen hatten (HANSEN 1994, WOLFF 1994) und nachuntersucht wurden.

Zur Untersuchung des Parameters Tumorzellzahl auf die Überlebenszeiten wurde die Kaplan-Meier-Methode eingesetzt. Dafür wurde das gesamte Patientenkollektiv in zwei Gruppen geteilt, wobei der Median der Tumorzellen mit 4000 Zellen als Trenngrenze diente. Die beiden Überlebenskurven zeigten, dass Patienten mit höheren Zellzahlen schneller verstarben, als Kranke mit einer Zellzahl unter 4000. Ähnliches erbrachte die Auswertung der Metastasenwahrscheinlichkeit, die ebenfalls höher bei Tumorzellzahlen über 4000 war. Diese Aussagen waren jeweils für einen Variationsbereich von 100 bis 6500 Tumorzellen signifikant. Außerhalb dieses Bereichs konnte immerhin noch bestätigt werden, dass Patienten mit höheren Zellzahlen regelmäßig schlechter abschnitten als Patienten mit der geringeren Tumorzellzahl im Wundblut (STIERSDORFER 2001).

Da nachgewiesen wurde, dass Abhängigkeiten zwischen der Tumorzellzahl und den Parametern Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall und Differenzierungsgrad existierten, war es notwendig verschiedene Stratifizierungsansätze durchzuführen. Auch hier wurde in den Untergruppen die Tumorgrenzzahl mit den Wert 4000 gewählt. Die Tests ergaben, dass Patienten mit höheren Zellzahlen schlechtere Ergebnisse in der Überlebenszeit und metastasenfremen Zeit aufwiesen. Sowohl in der univariaten, als auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnte die prognostisch signifikante Relevanz der Tumorzellzahl im Wundblut bestätigt und als ein von anderen Einflussgrößen unabhängiger Faktor bestätigt werden. Der Vergleich der speziellen Überlebenszeit anhand von Daten aus dem Saarländischen Krebsregister mit der tatsächlichen Überlebenszeit eines jeden Patienten ergab, dass Patienten mit weniger als 4000 Tumorzellen im Wundblut durchschnittlich länger

lebten als nach ihren Tumorstadien prognostiziert und Patienten mit höheren Zellzahlen die erwartete Überlebenszeit häufiger nicht erreichten (STIERSDORFER 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Median der gefundenen Tumorzellen mit 13.500 (AgNOR) und 92.000 (CK) für die Gesamtheit der untersuchten gastrointestinalen Karzinome errechnet (Abb. 10). Somit wird die prognostische Trenngrenze für die folgenden statistischen Erhebungen deutlich höher liegen.

Als quantitativer Teil der prospektiven Studie ist die vorliegende Arbeit wichtige Voraussetzung für die anschließende prognostische Auswertung, die nicht Aufgabe dieser Arbeit war. Zumal die dafür notwendigen Beobachtungszeiträume noch zu kurz sind. Ein Großteil der Ergebnisse ist nicht älter als drei Jahre. Die Beschränkung der Untersuchung auf gastrointestinale Karzinome, speziell hier auf das Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Magenkarzinom und Pankreaskarzinom, hatte zur Folge, dass relativ homogene Gruppen entstanden. Sie können die Basis für eine sich später anschließende prognostische Auswertung bilden, die nun separat für die jeweilige Tumorentität erstellt werden kann. Trotz einiger signifikanter Zusammenhänge zwischen Tumorzellzahl und pathologischen Parametern bei der Gesamtheit der analysierten gastrointestinalen Karzinome und bei den vier Einzelgruppen stellten sich keine regelmäßigen Korrelationen ein. Es ist zu erwarten, dass sich ähnlich wie in der Studie von STIERSDORFER 2001 die Tumorzellzahl im Wundblut als neuer, eigenständiger und zusätzlicher Prognosefaktor bestätigt.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der Fragestellung zur intraoperativen Autotransfusion bei tumorchirurgischen Eingriffen wurde erstmals von HANSEN 1994 das Wundblut verschiedenster Tumorentitäten auf Tumorzellen hin systematisch untersucht. Es konnten regelmäßig Tumorzellen mit weiterhin malignem Potenzial gefunden werden. Die Nachuntersuchung der Patienten und die statistische Auswertung von STIERSDORFER 2001 konnte einen prognostischen Zusammenhang zwischen der Tumorzellzahl im Wundblut und den Parametern Rezidivwahrscheinlich, Auftreten von Fernmetastasen und der Überlebenszeit darstellen. Eingeschränkt ist die Aussagekraft dieser retrospektiven Studie durch die große Heterogenität der untersuchten Tumoren mit unzureichender Gruppengröße.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Quantifizierung von Tumorzellen aus dem Wundblut bei gastrointestinalen Karzinomen als Teil einer prospektiven Studie. Durch die Beschränkung sollten für die einzelnen Tumorentitäten ausreichende Fallzahlen ermöglicht werden, die eine spätere prognostische Auswertung untermauern.

Zur Anreicherung der Tumorzellen aus dem Wundblut wurde die zellschonende Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll® durchgeführt. Die anschließende Identifizierung und Zählung erfolgte nach Zytozentrifugation und zytologischen Färbungen. Dabei kamen der enzymimmunochemische Nachweis von Zytokeratinen, die Silberfärbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR) und teilweise der enzymimmunochemische Nachweis des Proteins p53 zum Einsatz.

Zur Analyse wurde das Wundblut aus insgesamt 112 Operationen von gastrointestinalen Tumoren herangezogen, wobei es sich im Einzelnen um Eingriffe bei Kolonkarzinomen (n=18), bei Rektumkarzinomen (n=32), bei Magenkarzinomen (n=30) und bei Pankreaskarzinomen (n=17) handelte. Als Kontrollen dienten abdominalchirurgische Operationen bei gutartigen Veränderungen oder Entzündungen, wie stenosierendes Kolonadenom, chronische Divertikulitis, chronische Pankreatitis oder Pankreaskopfadenom (n=15).

Bei 95 von 97 (98%) Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen konnten eindeutig Tumorzellen im Wundblut mit einem Medianwert von 13500 (AgNOR) nachgewiesen werden. In zwei Fällen fanden sich im Wundblut zwar Zytokeratin-positive Zellen, aber keine Tumorzellen in der AgNOR-Färbung. In den Kontrollen konnten keine Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine Korrelationsanalyse zwischen der Tumorzellzahl und dem Wundblutvolumen erbrachte mit $k=0,46$ nur eine geringe Korrelation.

Die erreichte Gruppengröße erlaubte es, Zusammenhänge zwischen Tumorzellzahl und Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung, Differenzierungsgrad bzw. Residualtumorstatus nicht nur für das gesamte Kollektiv, sondern erstmalig für jede Tumorentität getrennt zu untersuchen.

Für die Gesamtheit aller gastrointestinalen Karzinome konnten steigende Tumorzellzahlen in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung, dem Lymphknotenstatus, der Fernmetastasierung und dem Grading nachgewiesen werden. Ein Anstieg der Tumorzellzahlen in Zusammenhang mit dem Residualtumorstatus stellte sich nur zwischen R0- und R1-resezierten Patienten ein.

Das Kolonkarzinom zeigte eine Steigerung der Tumorzellzahlen mit zunehmender Tumorausdehnung und bei Lymphknotenmetastasen. Eine signifikante Korrelation der Zellzahlen bestand zwischen mäßig (G2) und gering differenzierten (G3) Kolonkarzinomen in beiden Färbungen.

Nur geringe Tumorzellzunahmen in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung, dem Lymphknotenstatus, sowie dem Grading konnten bei Patienten mit Rektumkarzinomen beobachtet werden.

Die deutlichsten Unterschiede konnten für das Magenkarzinom nachgewiesen werden. Die Tumorzellzahlen bei Karzinomen geringerer Tumorausdehnung T1 und T2 unterschieden sich signifikant mit denen tieferer Invasion. Außerdem hatten Magenkarzinompatienten mit Lymphknotenbefall signifikant mehr Tumorzellen im Wundblut als Patienten ohne Lymphknotenmetastasen. Der Einfluss des Differenzierungsgrades auf die Werte war nur gering.

Uneinheitliche Tendenzen der Tumorzellzahlen zeigten sich beim Pankreaskarzinom in Zusammenhang mit der Invasionstiefe des Tumors und vom Lymphknotenstatus. Mit Abnahme der Differenzierung der Karzinome wurden jeweils mehr maligne Zellen im Wundblut identifiziert. Die hier erfolgte Auswertung des Residualtumorstatus erbrachte keinen Einfluss auf die Tumorzellzahlen.

Die Ergebnisse bestätigten den Sinn der einzelnen Betrachtung der Tumorzellzahlen für jede einzelne Tumorentität. Eine zusammenfassende Betrachtung der gastrointestinalen Karzinome hätte zu unscharfen Resultaten geführt.

Um zu bestätigen, dass im Wundblut wirklich Tumorzellen nachweisbar waren wurde eine weitere Färbemethode eingesetzt, nämlich der immunhistochemische Nachweis des Proteins p53. Insgesamt wurden 33 Präparate untersucht, wobei 19 Fälle p53-positiv waren. Eine anschließende Korrelationsanalyse zwischen den Tumorzellzahlen nach der AgNOR- und p53-Färbung zeigte eine hochsignifikante Korrelation mit $k=0,95$.

Auch für die Ergebnisse aus dem Zytokeratin-Nachweis und der AgNOR-Methode konnte eine hochsignifikante Korrelation mit $k=0,55$ nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung und Auswertung der Tumorzellen aus dem Wundblut bei gastrointestinalen Karzinomen stellte den Basisteil im Rahmen einer prospektiven Studie zur Untersuchung der prognostischen Bedeutung von Tumorzellen im Wundblut dar. Die weitere Begleitung der Patienten wird Aufschluss über eine mögliche prognostische Relevanz geben können.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte der regelmäßige Nachweis von Tumorzellen im Wundblut als Form von disseminierten Tumorzellen eindeutig bestätigt werden. Sie können daher als weiterer Hinweis für das Vorliegen einer systemischen Tumorerkrankung gewertet werden.

7. Anhang

Nr.	Karzinom- typ	T	N	M	G	R	Alter	Volumen (ml)	Tumorzellzahl					
									CK	CK log10	NOR	NOR log10	p53	p53 log10
1	Colon	2	0	0	2	0	70	350	$1,63 \times 10^4$	4,2	$6,56 \times 10^3$	3,8		
2	Colon	2	0	0	2	0	52	400	$1,57 \times 10^5$	5,2	$1,30 \times 10^4$	4,1		
3	Colon	2	0	1	2	0	62	700	$1,25 \times 10^4$	4,1	$3,93 \times 10^3$	3,6		
4	Colon	3	0	0	2	0	70	873	$1,89 \times 10^5$	5,3	$1,58 \times 10^4$	4,2		
5	Colon	3	0	0	2	0	63	700	$8,75 \times 10^4$	4,9	$2,95 \times 10^3$	3,5		
6	Colon	3	0	0	2	0	83	800	$1,77 \times 10^5$	5,2	$2,31 \times 10^4$	4,4	$2,86 \times 10^4$	4,5
7	Colon	3	0	0	2	0	58	200	$4,29 \times 10^3$	3,6	$2,33 \times 10^4$	4,4		
8	Colon	3	0	0	3	0	21	900	$1,16 \times 10^5$	5,1	$3,45 \times 10^4$	4,5		
9	Colon	3	0	0	3	0	76	2000	$7,05 \times 10^5$	5,8	$3,21 \times 10^4$	4,5	$2,68 \times 10^4$	4,4
10	Colon	3	0	1	2	0	66	430	$1,38 \times 10^4$	4,1	$3,88 \times 10^3$	3,6		
11	Colon	3	1	1	2	0	66	250	$1,47 \times 10^5$	5,2	$9,20 \times 10^3$	3,9		
12	Colon	4	0	0	3	0	63	300	$3,22 \times 10^5$	5,5	$1,12 \times 10^4$	4,1		
13	Colon	4	0	0	3	0	76	375	$1,23 \times 10^6$	6,1	$1,02 \times 10^4$	4,0		
14	Colon	4	1	0	2	0	42	452	$7,57 \times 10^4$	4,9	$1,09 \times 10^4$	4,0		
15	Colon	4	1	0	3	0	45	800	$3,81 \times 10^6$	6,6	$1,57 \times 10^5$	5,2	0	-
16	Colon	4	1	0	3	0	69	2600	$3,81 \times 10^6$	6,6	$6,18 \times 10^4$	4,8		
17	Colon	4	2	1	2	0	64	336	$1,46 \times 10^5$	5,2	$1,35 \times 10^4$	4,1		
18	Colon	4	0	0	3	1	47	1600	$4,91 \times 10^5$	5,7	$1,03 \times 10^5$	5,0		
19	Rektum	1	1	0	2	0	68	270	$8,36 \times 10^4$	4,9	$2,71 \times 10^4$	4,4	$2,50 \times 10^4$	4,4
20	Rektum	2	0	0	2	0	80	626	$6,84 \times 10^4$	4,8	$2,09 \times 10^4$	4,3		
21	Rektum	2	0	0	2	0	74	1400	$5,25 \times 10^4$	4,7	$1,58 \times 10^4$	4,2		
22	Rektum	2	0	0	2	0	70	670	$4,79 \times 10^4$	4,7	$2,69 \times 10^3$	3,4		
23	Rektum	2	0	0	2	0	55	625	$3,24 \times 10^5$	5,5	$8,93 \times 10^3$	3,9	$8,93 \times 10^3$	3,9
24	Rektum	2	0	0	2	0	43	700	$1,56 \times 10^5$	5,2	0	-		
25	Rektum	2	0	0	2	0	52	633	$1,78 \times 10^4$	4,3	$3,23 \times 10^3$	3,5		
26	Rektum	2	0	0	3	0	65	727	$5,49 \times 10^4$	4,7	$1,71 \times 10^3$	3,2		
27	Rektum	2	0	0	3	0	41	1400	$5,22 \times 10^4$	4,7	$2,33 \times 10^4$	4,4	0	-
28	Rektum	2	1	0	1	0	60	1000	$1,88 \times 10^4$	4,3	$6,25 \times 10^3$	3,8	$6,25 \times 10^3$	3,8
29	Rektum	2	1	0	3	0	55	1000	$9,20 \times 10^4$	5,0	$5,62 \times 10^3$	3,8		
30	Rektum	2	0	1	2	0	66	850	$6,12 \times 10^5$	5,8	$1,15 \times 10^5$	5,1	0	-
31	Rektum	3	0	0	2	0	45	1400	$5,31 \times 10^5$	5,7	$2,25 \times 10^4$	4,4		
32	Rektum	3	0	0	2	0	54	951	$2,90 \times 10^5$	5,5	$1,39 \times 10^4$	4,1		
33	Rektum	3	0	0	2	0	67	215	$1,46 \times 10^4$	4,2	$6,90 \times 10^2$	2,8		

Nr.	Karzinom- typ	T	N	M	G	R	Alter	Volumen (ml)	Tumorzellzahl					
									CK	CK log10	NOR	NOR log10	p53	p53 log10
34	Rektum	3	0	0	3	0	49	1005	$9,65 \times 10^5$	6,0	$9,06 \times 10^4$	5,0		
35	Rektum	3	2	0	2	0	53	650	$1,63 \times 10^4$	4,2	$9,29 \times 10^3$	4,0	0	-
36	Rektum	3	2	0	2	0	60	1200	$1,98 \times 10^6$	6,3	$1,76 \times 10^5$	5,2	$1,62 \times 10^5$	5,2
37	Rektum	3	2	0	2	0	44	950	$3,39 \times 10^4$	4,5	$2,04 \times 10^4$	4,3	$1,36 \times 10^4$	4,1
38	Rektum	3	2	0	3	0	40	1051	$3,21 \times 10^4$	4,5	$3,56 \times 10^3$	3,6		
39	Rektum	3	0	1	2	0	56	755	$2,54 \times 10^4$	4,4	$1,53 \times 10^4$	4,2		
40	Rektum	3	2	1	3	0	60	800	$1,66 \times 10^4$	4,2	$2,57 \times 10^3$	3,4		
41	Rektum	3	2	1	3	1	82	586	$1,93 \times 10^6$	6,3	$8,04 \times 10^4$	4,9		
42	Rektum	4	0	0	3	0	52	445	$4,66 \times 10^4$	4,7	$1,69 \times 10^4$	4,2		
43	Rektum	4	1	0	3	0	76	620	$1,81 \times 10^5$	5,3	$6,58 \times 10^4$	4,8	$5,65 \times 10^3$	3,8
44	Rektum	4	1	0	3	0	75	600	$7,61 \times 10^4$	4,9	$4,82 \times 10^3$	3,7		
45	Rektum	4	2	0	3	0	76	680	$2,72 \times 10^5$	5,4	$1,02 \times 10^4$	4,0		
46	Rektum	4	2	0	3	0	57	2100	$3,56 \times 10^5$	5,6	$8,85 \times 10^4$	4,9	$9,38 \times 10^4$	5,0
47	Rektum	4	0	0	2	1	71	50	$1,75 \times 10^4$	4,2	$4,25 \times 10^3$	3,6	$3,75 \times 10^3$	3,6
48	Rektum	4	2	0	3	1	70	1400	$2,87 \times 10^6$	6,5	$2,54 \times 10^4$	4,4		
49	Rektum	4	1	1	3	1	63	370	$2,96 \times 10^4$	4,5	$4,92 \times 10^3$	3,7		
50	Rektum	4	1	1	2	2	55	600	$2,57 \times 10^4$	4,4	$4,29 \times 10^3$	3,6	0	-
51	Magen	1	0	0	2	0	77	400	$9,11 \times 10^4$	5,0	$3,93 \times 10^3$	3,6	$3,57 \times 10^3$	3,6
52	Magen	1	0	0	2	0	74	1070	$3,22 \times 10^4$	4,5	$3,35 \times 10^3$	3,5		
53	Magen	1	0	0	2	0	63	622	$1,24 \times 10^5$	5,1	$4,08 \times 10^3$	3,6		
54	Magen	1	0	0	2	0	67	500	$3,80 \times 10^3$	3,6	$1,07 \times 10^3$	3,0		
55	Magen	1	0	0	2	0	57	500	$7,59 \times 10^4$	4,9	$3,45 \times 10^3$	3,5		
56	Magen	1	0	0	3	0	50	1000	$1,83 \times 10^5$	5,3	$4,46 \times 10^3$	3,7	0	-
57	Magen	1	0	0	3	0	36	431	$1,82 \times 10^4$	4,3	$1,19 \times 10^3$	3,1		
58	Magen	1	0	0	3	0	67	511	$1,29 \times 10^4$	4,1	$2,15 \times 10^3$	3,3		
59	Magen	1	1	0	3	0	56	800	$3,33 \times 10^4$	4,5	$4,00 \times 10^3$	3,6		
60	Magen	1	1	0	3	0	78	1800	$1,77 \times 10^5$	5,2	$5,08 \times 10^3$	3,7	0	-
61	Magen	2	0	0	3	0	74	308	$1,41 \times 10^3$	3,2	$1,55 \times 10^3$	3,2		
62	Magen	2	0	0	3	0	66	363	$1,65 \times 10^5$	5,2	$3,06 \times 10^2$	2,5		
63	Magen	2	1	0	3	0	69	1000	$2,22 \times 10^5$	5,3	$7,81 \times 10^3$	3,9	0	-
64	Magen	2	2	0	3	0	63	1200	$2,44 \times 10^4$	4,4	$1,50 \times 10^4$	4,2	0	-
65	Magen	3	1	0	2	0	73	600	$6,21 \times 10^4$	4,8	$3,01 \times 10^4$	4,5	0	-
66	Magen	3	1	0	2	0	73	1100	$2,06 \times 10^5$	5,3	$3,44 \times 10^3$	3,5	0	-
67	Magen	3	1	0	3	0	78	2400	$2,03 \times 10^6$	6,3	$4,01 \times 10^4$	4,6	0	-
68	Magen	3	1	0	3	0	43	500	$7,42 \times 10^4$	4,3	$2,54 \times 10^4$	4,4	0	-
69	Magen	3	1	0	3	0	59	488	$6,54 \times 10^3$	3,8	$5,23 \times 10^3$	3,7		

Nr.	Karzinom- typ	T	N	M	G	R	Alter	Volumen (ml)	Tumorzellzahl					
									CK	CK log10	NOR	NOR log10	p53	p53 log10
70	Magen	3	2	0	2	0	63	1200	$2,57 \times 10^5$	5,4	$5,69 \times 10^4$	3,8		
71	Magen	3	2	0	3	0	67	1400	$4,58 \times 10^5$	5,7	$4,04 \times 10^4$	4,6	$3,70 \times 10^4$	4,6
72	Magen	3	2	0	3	0	48	1700	$1,21 \times 10^6$	6,1	$6,07 \times 10^4$	4,8	$5,16 \times 10^4$	4,7
73	Magen	3	2	0	3	0	62	1400	$6,00 \times 10^5$	5,8	$3,75 \times 10^4$	4,6	0	-
74	Magen	3	2	0	3	0	70	1032	$5,36 \times 10^5$	5,7	$9,31 \times 10^3$	4,0	$8,15 \times 10^3$	3,9
75	Magen	3	3	0	3	0	78	2400	$2,03 \times 10^6$	6,3	$1,67 \times 10^5$	5,2		
76	Magen	3	2	1	3	1	61	1100	$2,30 \times 10^6$	6,4	$1,57 \times 10^4$	4,2	$1,38 \times 10^4$	4,1
77	Magen	3	1	0	3	2	50	1700	$5,59 \times 10^5$	5,7	$1,64 \times 10^4$	4,2	0	-
78	Magen	4	0	0	3	0	55	2100	$1,28 \times 10^6$	6,1	$1,25 \times 10^5$	5,1	$1,21 \times 10^5$	5,1
79	Magen	4	1	1	2	0	73	800	$1,50 \times 10^6$	6,2	$9,14 \times 10^4$	5,0	$1,00 \times 10^5$	5,0
80	Magen	4	2	1	3	2	29	1000	$2,46 \times 10^6$	6,4	$1,09 \times 10^5$	5,0		
81	Pankreas	1	0	0	1	0	74	400	$9,42 \times 10^4$	5,0	$4,17 \times 10^4$	4,6	$1,86 \times 10^5$	5,3
82	Pankreas	3	0	0	2	0	53	1500	$9,03 \times 10^5$	6,0	$2,25 \times 10^4$	4,4		
83	Pankreas	3	0	0	3	0	78	1800	$4,82 \times 10^5$	5,7	$6,94 \times 10^4$	4,8		
84	Pankreas	3	1	0	2	0	52	1000	$1,41 \times 10^5$	5,2	$3,33 \times 10^4$	4,5		
85	Pankreas	3	1	0	3	0	68	2600	$5,46 \times 10^5$	5,7	$3,97 \times 10^5$	5,6		
86	Pankreas	3	1	0	3	0	68	900	$1,25 \times 10^5$	5,1	$2,17 \times 10^4$	4,3		
87	Pankreas	3	1	1	1	0	59	655	$1,56 \times 10^4$	4,2	$7,01 \times 10^3$	3,8	0	-
88	Pankreas	3	0	0	1	1	78	350	$1,25 \times 10^4$	4,1	0	-		
89	Pankreas	3	1	0	2	1	71	700	$2,83 \times 10^5$	5,5	$1,96 \times 10^4$	4,3		
90	Pankreas	3	1	0	3	1	36	1600	$8,57 \times 10^4$	4,9	$7,71 \times 10^4$	4,9		
91	Pankreas	3	1	0	3	1	68	1400	$7,69 \times 10^4$	4,9	$1,57 \times 10^4$	4,2		
92	Pankreas	4	0	0	2	0	69	1000	$4,46 \times 10^4$	4,7	$5,62 \times 10^4$	4,8		
93	Pankreas	4	1	0	3	1	68	400	$1,71 \times 10^4$	4,2	$1,03 \times 10^4$	4,0		
94	Pankreas	4	0	0	3	2	80	500	$3,13 \times 10^4$	4,5	$1,81 \times 10^4$	4,3		
95	Pankreas	4	1	0	1	2	73	700	$3,00 \times 10^4$	4,5	$4,01 \times 10^5$	5,6		
96	Pankreas	4	2	0	2	2	81	270	$5,25 \times 10^3$	3,7	$5,62 \times 10^2$	2,8		
97	Pankreas	4	2	1	3	2	67	400	$1,14 \times 10^4$	4,1	$5,49 \times 10^4$	4,7		
98*	Ösophagus	3	2	0	3	0	77	1000	$5,00 \times 10^4$	4,7	$1,92 \times 10^4$	4,3	$2,14 \times 10^4$	4,3

Tab. 4:

Tumorzellen im Wundblut bei Tumoroperationen

CK = Zytokeratin-Nachweis

NOR = AgNOR-Färbung

p53 = Nachweis Protein p53

* Werte nur für Berechnung Vergleich Tumorzellzahl AgNOR – p53 verwendet

8. Literaturverzeichnis

- 1 Allgayer H, Heiss MM, Höfler H
Neue Prognosefaktoren bei gastrointestinalen Karzinomen
Manual Gastrointestinale Tumoren, Tumorzentrum München; 2001
- 2 Allgayer H und Heiss M
Die minimal residuale Tumorerkrankung: Prognostische Aussagekraft und therapeutische Konsequenz
Fortschritte der Medizin Originalien 119 Jg./Nr. I: 1-4; 2001
- 3 Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B
Pattern of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro
Int J Cancer 46: 839-844; 1990
- 4 Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B
Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies
Oncogene 6: 1699-1703; 1991
- 5 Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P
Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK-19, MUC1 and CEA using RT-PCR
Eur J Cancer 36: 717-723; 2000
- 6 Böck P
Theorie der chemischen Fixierung
In: Romeis mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore, 1989, S. 69-111
- 7 Böck P
Färben der Schnitte
In: Romeis mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore, 1989, S. 179-249
- 8 Böck P
Untersuchung des Blutes und des blutbildenden Knochenmarks
In: Romeis mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore, 1989, S. 469-490
- 9 Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, van de Velde CJH
Prognostic value of positive cytology findings from abdominal washings in patients with gastric cancer
Brit J of Surg 83: 672-674; 1996
- 10 Bourne JA
Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden
DAKO Corporation: Hamburg; 1983
- 11 Broll R, Lembcke K, Stock C, Zingler M, Duchrow M, Schimmelpenning H, Strik M, Müller G, Kujath P, Bruch HP
Tumorzell dissemination in das Knochenmark und in die Peritonealhöhle
Langenbecks Arch Chir 381: 51-58; 1996
- 12 Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J
The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer
Am J Surg 175: 198-202; 1998

-
- 13 Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC
Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites
Nature Reviews Cancer 2: 563-572; 2002
 - 14 Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, Colquhoun K
A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer.
Br.J.Surg. 72: 698-702; 1985
 - 15 Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A
Illegitimate transcription: Transcription of any gene in any cell type
Proc Natl Acad Sci USA 86: 2617-2621; 1989
 - 16 Cheng DLW; Savannah GA, Liu BCS; Stone N, Kirschenbaum A, Droller MJ
Intraoperative autotransfusion during radical retropubic prostatectomy: Detection and significance of micrometastasis using reverse transcription polymerase chain reaction
Proc Am Urol Ass 153 (Suppl 392A): 655; 1995
 - 17 Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP
American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group
Cancer 88: 1739-1757; 2000
 - 18 Crawford LV, Pim DC, Gurney EG
Detection of a common feature in several human tumor cell lines – a 53.000-dalton protein
Proc Nat Acad Sci USA 78: 41-45; 1981
 - 19 Demeure MJ, Doffek KM, Komorowski RA,
Adenocarcinoma in the pancreas: detection of occult metastases in regional lymph nodes by a polymerase chain reaction-based assay
Cancer 83: 1328-1334; 1998
 - 20 Denk H
Immunohistochemische Färbemethoden
In: Romeis mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore, 1989, S. 251-261
 - 21 Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Treré D, Badiali M, Dehan P
Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines
Am J Pathol 134: 925-932; 1989
 - 22 Falkan S, Hernandez Verdun D
The nucleolus and the nucleolar organizer regions
Biol Cell 56: 189-205; 1986
 - 23 Finley CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ
Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsp-70-p53 complex with altered half life
Mol Cell Biol 8: 531-539; 1988
 - 24 Fisher ER, Turnbull RB
The cytological demonstration and significance of tumor cells in the mesenteric venous blood in patients with colorectal carcinoma
Surg Gynecol Obstet 100: 102-108; 1955
 - 25 Fournier MV, Carvalho MG, Pardee AB
A strategy to identify genes associated with circulating solid tumor cell survival in peripheral blood
Mol Med 5(5): 313-319; 1999

-
- 26 Frühauf NR, Kasimir-Bauer S, Görlinger K, Lang H, Kaudel CG, Kaiser GM, Oldhafer KJ, Broelsch CE
Peri-operative filtration of disseminated cytokeratin positive cells in patients with colorectal liver metastasis
Langenbecks Arch Surg 390(1): 15-20; 2005
- 27 Glaves D
Methods for the purification of malignant cells from blood
In: Pretlow TG and Pretlow TP: Cell separation: Methods and selected applications. Bd. 4,
New York: Academic press, 1987, S. 331-352
- 28 Gomperts BN, Belperio JA, Rao PN, Randell SH, Fishbein MC, Burdick MD, Strieter RM
Circulating Progenitor Epithelial Cells Traffic via CXCR4/CXCL12 in Response to Airway Injury
J Immunol 176(3): 1916-1927; 2006
- 29 Hamburger AW, Dunn FE, White CP
Percoll density gradient separation of cells from human malignant effusions
Br J Cancer 51: 253-258; 1985
- 30 Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jeco N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G
Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer
Gastroenterology 106: 42-48; 1994
- 31 Hansen E
Intraoperative Autotransfusion in der Tumorchirurgie
Habilitation; Universität Regensburg; 1994
- 32 Hansen E, Wolff N, Knuechel R, Rüschoff J, Hofstaedter F, Taeger K
Tumor cells in blood shed from the surgical field
Arch Surg 130: 387-393; 1995
- 33 Hansen E, Hofstädter F, Taeger K
Autologe Transfusion bei Tumoroperationen
Infusionsther Transfusionsmed 21: 337-347; 1994
- 34 Hansen E, Knüchel R, Rüschoff J, Taeger K
Intraoperative Autotransfusion in der Tumorchirurgie
Anaesthesist 43: 813; 1994
- 35 Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Eaton MC, Pascoe VH, Dobrovic A
Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease
Mol Med 1: 789-794; 1995
- 36 Harlozinska A, Bar JK, Rabczynski J, Noworolska A, Richter R, Cislo M
Density distribution and antigenic characterisation of cell subpopulations isolated from cystic fluids of ovarian serous neoplasms.
Anticancer Res 9: 161-166; 1989
- 37 Harris AL
Telling changes of base
Nature 350: 377-378; 1991
- 38 Hase K, Ueno H, Kuranaga N, Utsunomiya K, Kanabe S, Mochizuki H
Intraperitoneal exfoliated cancer cells in patients with colorectal cancer
Dis Colon Rectum 41: 1134-1140; 1998

-
- 39 Heeckt P, Safi F, Binder T, Büchler M
Freie intraperitoneale Tumorzellen beim Pankreaskarzinom - Bedeutung für den klinischen Verlauf und die Therapie
Chirurg 63: 563-567; 1992
- 40 Hermanek P, Wittekind C: Residual tumor (R) classification and prognosis.
Semin Surg Onco. 10: 12-20; 1994
- 41 Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH
Prognostic factors in cancer
Springer: Berlin; 1995
- 42 Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind C
Classification of isolated tumor cells and micrometastasis
Cancer 86: 2668-2673; 1999
- 43 Hirota M, Shimada S, Yamamoto K, Tanaka E, Sugita H, Egami H, Ogawa M
Pancreatectomy using the no-touch isolation technique followed by extensive intraoperative peritoneal lavage to prevent cancer cell dissemination: A pilot study
J Pancreas 6(2): 143-151; 2005
- 44 Ishikawa O, Wada H, Ohigashi H, Doki Y, Yokoyama S, Noura S, Yamada T, Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai T, Matsunaga T, Takenaka A, Nakaizumi A
Postoperative Cytology for drained fluid from the pancreatic bed after "curative" resection of pancreatic cancers: Does it predict both the patient's prognosis and the site of cancer recurrence?
Ann Surg 238: 103-110; 2003
- 45 Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner U, Funke I, Pantel K, Babic R, Eissner HJ, Riethmüller G, Schildberg FW
Prognostic significance of bone marrow micrometastases in patients with gastric cancer
J Clin Oncol 14: 1810-1817; 1996
- 46 Jimenez RE, Warshaw AL, Rattner DW, Willet CG, McGrath D, Fernandez-del Castillo C
Impact of laparoscopic staging in the treatment of pancreatic cancer
Arch Surg 135: 409-415; 2000
- 47 Johnson PWM, Burchill SA, Selby PJ
The molecular detection of circulating tumor cells
Br J Cancer 72: 268-276; 1995
- 48 Juhl H, Kalthoff H, Krüger U, Schott A, Schreiber HW, Henne-Bruns D, Kremer B
Immunzytologischer Nachweis disseminierter Tumorzellen in der Bauchhöhle und im Knochenmark von Pankreaskarzinompatienten
Chirurg 65: 1111-1115; 1994
- 49 Junginger T (Hrsg.), Deutsche Krebsgesellschaft e.V.
Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002. Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen
3.Aufl., Zuckerschwerdt: München, 2002
- 50 Kaplan JC, Kahn A, Chelly J
Illegitimate transcription: Its use in the study of inherited disease
Hum Mutat 1: 357-360; 1992
- 51 Konishi M, Kinoshita T, Nakagohri T, Inoue K, Oda T, Takahashi S
Prognostic value of cytologic examination of peritoneal washings in pancreatic cancer
Arch Surg 137(4): 475-480: 2002

-
- 52 Kopper L, Casillo S, Rustum Y, Slokum H, Frankfurt O, Takita H
Separation and characterisation of human tumor cells on a discontinuous Percoll gradient
Proc Am Ass Cancer Res 23: 30; 1982
- 53 Ko LJ, Prives C
p53: puzzle and paradigm
Genes Dev 10: 1054-1072; 1996
- 54 Krismann M, Todt B, Schroder J, Gareis D, Muller KM, Seeber S
Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination
J Clin Oncol 13: 2769-2769; 1995
- 55 Lapeyre B, Bourbon HM, Amalric F
Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells. An unusual protein structure revealed by nucleotide sequence
Proc Natl Acad Sci 84: 1472-1476; 1987
- 56 Leather AJM, Gallegos NC, Kocjan G, Savage F, Smales CS, Hu W, Boulos PB, Northover JMA, Phillip RKS
Detection and enumeration of circulating tumor cells in colorectal cancer
Br J Surg 80: 777-780; 1993
- 57 Levine AJ, Momand J, Finlay CA
The p53 tumor suppressor gene
Nature 351: 453-456; 1991
- 58 Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G
Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients
Lancet 340: 685-689; 1992
- 59 Lindmark G, Bergstrom R, Pahlman L, Glimelius B
The association of preoperative serum tumour markers with Dukes' stage and survival in colorectal cancer
Br J Cancer 71: 1090-1094; 1995
- 60 Linnemann U, Schimanski CC, Gebhardt C, Berger MR
Prognostic value of disseminated colorectal tumor cells in the liver: results of follow-up examinations
Int J Colorect Dis 19: 380-386; 2004
- 61 Liu BCS, Weiss RE, Gordon JN, Droller MJ
Biology of metastasis: Clinical implications
Sem Surg Oncol 8: 267-273; 1992
- 62 Löhr M, Maisonnneuve P, Lowenfels AB
K-ras mutations and benign pancreatic disease
Int J Pancreatol 27: 93-103; 2000
- 63 Makary MA, Warshaw AL, Centeno BA, Willet CG, Rattner DW, Fernandez-del Castillo C
Implications of peritoneal cytology for pancreatic cancer management
Arch Surg 133(4): 361-365; 1998
- 64 Maehara Y, Oshiro T, Endo K, Baba H, Oda S, Ichiyoshi Y, Kohnoe S, Sugimachi K
Clinical significance of occult micrometastasis in lymph nodes from patients with early gastric cancer who died of recurrence
Surgery 119: 397-402; 1996

-
- 65 de Manzoni G, Di Leo A, Tomezzoli A, Pedrazzani C, Piubello Q, Bonfiglio M, Valloncini E, Veraldi GF
Prognostic value of peritoneal lavage cytology in gastric cancer
Chir Ital 52: 1-6; 2002
- 66 Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F
P53 expression and prognosis in gastric carcinoma
Int. J. Cancer 50: 859-862; 1992
- 67 McArdle CS, Hole D
Impact of variability among surgeons on postoperative morbidity and mortality and ultimate survival
BMJ 302: 1501-1505; 1991
- 68 McNutt NS, Saenz-Santamaria C, Volkenandt M, Shea CR, Albino AP
Abnormalities of p53 protein expression in cutaneous disorders
Arch. Dermatol. 130: 225-232; 1994
- 69 Michelassi F, Ayala JJ, Balestracci T, Goldberg R, Chappell R, Block GE
Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma
Ann Surg 214: 11-18; 1991
- 70 Midgley CA, Fisher CJ, Bartek J, Vojtesek B, Lane D, Barnes DM
Analysis of p53 expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in *Escherichia coli*
J Cell Sci 101: 183-189; 1992
- 71 Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R
The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.
Cell 31: 11-24; 1982
- 72 Mosnier JF, Perret AG, Vindimian M, Dumollard JM, Balique JG, Perpoint B, Boucheron S
An immunohistochemical study of the simultaneous expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in epithelial tumors of the colon and rectum
Arch Pathol Lab Med 120: 654-659; 1996
- 73 Müller M
Chirurgie für Studium und Praxis
6. Aufl., Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach; 2003
- 74 Newland RC, Dent OF, Lyttle MN, Chapuis PH, Bokey EL
Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients.
Cancer 73: 2076-2082; 1994
- 75 Oefelein MG, Kaul K, Herz B, Blum MD, Holland JM, Keeler TC, Cook WA, Ignatoff JM
Molecular detection of prostate epithelial cells from the surgical field and peripheral circulation during radical prostatectomy
J Urol 155: 238-242; 1996
- 76 Ofner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A, Rumer A, Totsch M, Spechtenhauser B, Bocker W, Schmid KW
Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma - correlation with tumour stage and long-term survival
J Pathol: 175 441-448; 1995

-
- 77 Ohigashi H, Ishikawa O, Sasaki Y
K-ras point mutation in the nerve plexus around the superior mesenteric artery in resectable adenocarcinoma of the pancreatic head
Arch Surg 135: 1450-1455; 2000
- 78 Oruzio D, Hempel D, Schlimok G
„Knochenmarksmikrometastasen“ epithelialer Tumoren
Onkologe 3: 66-72; 1997
- 79 Queneau PE, Adessi GL, Thibault P
Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: Diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice
Am J Gastroenterol 96: 700-704; 2001
- 80 Pantel K, von Knebel-Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G
Disseminierte Tumorzellen: Diagnostik, prognostische Relevanz, Phänotypisierung und therapeutische Strategien
Chirurg 68: 1241-1250; 1997
- 81 Pertoft H, Hirtenstein M, Kagedal L
Cell separations in a new density gradient medium, Percoll
In: Reid E: Cell populations, methodological surveys biochemistry. Bd. 9, West Sussex UK: Chichester, 1979, S. 67-80
- 82 Pool EH, Dunlop GR
Cancer cells in the blood-stream
Am J Surg 21: 99-102; 1934
- 83 Rath FW und Schönfelder M
Weichteilsarkome des Erwachsenen: Standards, Molekularbiologie, Perspektiven
Beiträge zur Onkologie 56, Karger Verlag Freiburg, Basel 2002
- 84 Riede UN, Schaefer HE
Allgemeine und spezielle Pathologie
4. Aufl. Thieme Verlag Stuttgart, New York; 1999
- 85 Ridwelski K, Meyer F, Fahlke J, Kasper U, Roessner A, Lippert H
Value of cytokeratin an Ca 19-9 antigen in immunohistological detection of disseminated tumor cells in lymph nodes in pancreas carcinoma
Chirurg 72: 920-926; 2001
- 86 Riethmüller G, Johnson JP
Monoclonal antibodies in the detection and therapy of micrometastatic cancers
Curr Opin Immunol 4: 647-655; 1992
- 87 Robert-Koch-Institut
Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe
Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland
Saarbrücken 2004
- 88 Ruud P, Fodstad O, Hovig E
Identification of a novel cytokeratin pseudogene that may interfere with reverse transcriptase polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells
Int J Cancer 80: 119-125; 1999
- 89 Roberts S, Jonasson O, Long L
Clinical significance of cancer cells in the circulating blood: Two to five year survival
Ann Surg 154: 362-370; 1961

-
- 90 Rüschoff J
Nukleolus organisierende Regionen (NORs) in der pathomorphologischen Tumordiagnostik
In: Denk H, Dohm G, Dietel M. Bd. 139, Gustav Fischer: Stuttgart, Jena, New York; 1992
- 91 Rüschoff J, Barth P
Theorie und Praxis der Silberfärbung Nukleolus organisierender Regionen (AgNOR)
Pathologe 13: 13-19; 1992
- 92 Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP
Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer
Gastroenterology 110: 682-687; 1996
- 93 Scheunemann P, Stoecklein NH, Rehders A, Bidde M, Peiper M, Eisenberger C, Knoefel WT, Hosch SB
Inzidenz und prognostische Bedeutung von okkult fröhdisseminierten Tumorzellen in Lymphknoten bei Patienten mit resektablem Pankreaskarzinom
Vortrag 121. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin; 2004
- 94 Schlimok G, Funke I, Pantel K, Strobel F, Lindemann F, Witte J, Riethmüller G
Micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer: Methodological aspects of detection and prognostic significance
Eur J Cancer 27: 1461-1465; 1991
- 95 Siebeck M, Aust D, Gross M, Lau-Werner U, Lersch C, Ruppert R, Sackmann M, Schalhorn A, Schmidbauer S, Wilkowski R, Zimmermann F
Rektumkarzinome
Manual Gastrointestinale Tumore, Tumorzentrum München, 2001
- 96 Siewert JR, Kestlmeier R, Busch R, Böttcher K, Roder JD, Müller J, Fellbaum C, Höfler H
Benefits of D2 lymph node dissection for patients with gastric cancer and pN0 and pN1 lymph node metastases
Br J Surg 83: 1144-1147; 1996
- 97 Stiersdorfer F
Prognostischer Wert des Nachweises von Tumorzellen im Wundblut
Dissertation, Universität Regensburg, 2001
- 98 Straus AK, Roseman DL, Shapiro TM
Peritoneovenous shunts in the management of malignant ascites
Arch Surg 114 (4): 489-491; 1979
- 99 Souter RG, Tatin D, Kettlewell MGW
Peritoneovenous shunts in the management of malignant ascites
Br J Surg 70: 478-481; 1983
- 100 Su D, Yamaguchi K, Tanaka M
The characteristics of disseminated tumor cells in pancreatic cancer: a blackbox needs to be explored
Pancreatology 5: 316-324; 2005
- 101 Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, Stal O, Wingren S, Hatschek T, Nordenskjöld B
Prognostic significance of cytoplasmatic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma
Lancet 340: 1369-1373; 1992
- 102 Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, Van Dyke T
p53-dependant apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo
Cell 78: 703-711; 1994
- 103 Thim A
Reduktion von Tumorzellen im Blut durch Leukozytenfilter
Dissertation, Universität Regensburg, 1993

-
- 104 Thorban S, Roder JD, Nekarda H, Funk A, Siewert JR, Pante K
Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with esophageal carcinoma
J Natl Cancer Inst 88: 1222-1227; 1996
- 105 UICC International Union Against Cancer
TNM-Klassifikation maligner Tumoren
Hrsg.: Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F
6. Auflage, Springer Berlin, Heidelberg, New York; 2002
- 106 Vleems FA, Diepstra JHS, Punt CJA, Ligtenberg MJL, Cornelissen IMHA, van Krieken JHJM, Wobbes T, van Muijen GNP, Ruers TJM
Detection of disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients undergoing hepatic resection for metastasis of colorectal cancer
Br J Surg 90: 989-995; 2003
- 107 Vogel I, Kruger U, Marxsen J, Soeth E, Kalthoff H, Hennis-Bruns D
Disseminated tumor cells in pancreatic cancer patients detected by immunocytology: a new prognostic factor
Clin Cancer Res 5(3): 593-599; 1999
- 108 Vogel I, Kalthoff H
Disseminated tumor cells. Their detection and significance of prognosis of gastrointestinal and pancreatic carcinomas
Virchows Arch 439(2): 109-117; 2001
- 109 Vogel P, Rüschoff J, Kümmel S, Zirngibel H, Hofstädter F, Hohenberger W, Jauch KW
Immunocytology improves prognostic impact of peritoneal tumor cell detection compared to conventional cytology in gastric cancer
Eur J Surg Oncol 25: 515-519; 1999
- 110 Vogel P, Rüschoff J, Kümmel S, Zirngibel H, Hofstädter F, Hohenberger W, Jauch KW
Prognostic value of microscopic peritoneal dissemination: Comparison between colon and gastric cancer
Dis Colon Rectum 43: 92-100; 2000
- 111 Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG., Stearns M, Schwartz MK, Oettgen HF
Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer
N Engl J Med 299: 448-451; 1978
- 112 Wang JY, Lin SR, Lu CY, Chen CC, Wu DC, Chai CY, Chen FM, Hsieh JS, Huang TJ
Gastric cancer cell detection in peritoneal lavage: RT-PCR for carcinoembryonic antigen transcripts versus the combined cytology with peritoneal carcinoembryonic antigen levels
Cancer Letters 223: 129-135; 2005
- 113 Warshaw AL
Implications of peritoneal cytology for staging of early pancreatic cancer
Am J Surg 161: 26-29; 1991
- 114 Weihrauch MR, Skibowski E, Koslowsky TC, Voiss W, Re D, Kuhn-Regnier F, Bannwarth C, Siedek M, Diehl V, Bohlen H
Immunomagnetic enrichment and detection of micrometastases in colorectal cancer: Correlation with established clinical parameters
J Clin Oncol 20: 4338-4343; 2002
- 115 Weiss L
Metastatic inefficiency
Adv Cancer Res 54: 159-211; 1990

-
- 116 Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehner Th, Herfarth Ch, von Knebel Doeberitz M
Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer
Clin Cancer Res 4: 343-348; 1998
- 117 Weitz J, Koch M, von Knebel Doeberitz M
Bedeutung disseminierter Tumorzellen bei gastrointestinalen Tumoren
Chir Gastroenterol 15: 173-180; 1999
- 118 Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert Th, Herfarth Ch, von Knebel Doeberitz M
Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow
Clin Cancer Res 5: 1830-1836; 1999
- 119 Wiggers T, Jeekel J, Arends JW, Brinkhorst AP, Kluck HM, Luyk CI, Munting JD, Povel JA, Rutten AP, Volovics A, Delgado S, Bond J, Martin S
No-touch isolation technique in colon cancer: A controlled prospective trial
Br J Surg 75: 409-415; 1988
- 120 White H, Griffiths JD, Salisbury AJ
Circulating malignant cells and fibrinolysis during resection of colorectal cancer
Proc R Soc Med 69: 467-469; 1976
- 121 Wolff N
Tumorzellen im Wundblut
Dissertation; Universität Regensburg; 1994
- 122 Wörmann B, Wulff GG, Griesinger F, Hiddemann W
Sensitiver Nachweis disseminierter Tumorzellen - Prognostische Bedeutung und Therapieansätze
Internist 38: 1083-1091; 1997
- 123 Yachida S, Fukushima N, Sakamoto M, Matsuno Y, Kosuge T, Hirohashi S
Implications of peritoneal washing cytology in patients with potentially resectable pancreatic cancer
Br J Surg 89: 573-578; 2002
- 124 Yaw PB, Sentany M, Link WJ, Wahle WM, Glover JL
Tumor cells carried through autotransfusion
JAMA 231: 490-491; 1975
- 125 Yeh KH, Chen YC, Yeh SH, Chen CP, Lin JT, Cheng AL
Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 (K19) – possible clinical significance in advanced gastric cancer
Anticancer Res 18: 1283-1286; 1998
- 126 Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM
Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles
Cell 70: 937-948; 1992

9. Danksagungen

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Kai Taeger, dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie am Klinikum der Universität Regensburg, für die Möglichkeit, in seiner Klinik die vorliegende Dissertation zu verfassen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ernil Hansen für die Überlassung des Themas, die zuvorkommende Unterstützung, sowie den kritischen und anregenden Diskussionen.

Ganz herzlichen Dank sagen möchte ich Herrn Dr. Volker Bechmann für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit und für die vielen Stunden zur Lösung der anstehenden Probleme.

Danken möchte ich auch der Medizinisch-technischen Assistentin Frau Ruth Späth für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Untersuchungen.

10. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Bernhard Josef Edenharter
Wohnort: Lohstraße 38
93309 Kelheim
Tel.: 09405/3654

Geburtstag und -ort: 07. September 1977, Regensburg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

09/1984 – 07/1988 Grundschule Kelheimwinzer
09/1988 – 06/1997 Donaugymnasium Kelheim

Wehrdienst

07/1997 – 05/1998 Grundwehrdienst beim Heeresmusikkorps 4 Regensburg

Studium

10/1998 – 09/2000 Vorklinisches Studium / Universität Regensburg
09/2000 Vorärztliche Prüfung
10/2000 – 09/2001 Klinisches Studium / Universität Regensburg
09/2001 1. Staatsexamen
10/2001 – 09/2003 Klinisches Studium / Universität Regensburg
09/2003 2. Staatsexamen
10/2003 – 09/2004 Praktisches Jahr / Uniklinikum Regensburg
10/2004 3. Staatsexamen
11/2004 – 03/2006 Promotionsstudiengang / Universität Regensburg
seit 04/2006 Assistenzarzt Chirurgie / Evangelisches Krankenhaus
Regensburg

Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen:

03/2001 Innere Medizin / Kreiskrankenhaus Kelheim
02/2002 – 04/2002 Anästhesiologie / Uniklinikum Regensburg
03/2003 Allgemeinmedizin / Praxis Dr. Voigtländer Sinzing

Sonstiges

Freizeit: Dirigent für Blasorchester