

Aus der Klinik und Poliklinik für  
Hämatologie und Onkologie der  
Medizinischen Fakultät der  
Humboldt-Universität zu Berlin  
und des Departments für Allgemeine,  
Viscerale und Kinderchirurgie der  
SRH Waldklinikum Gera gGmbH

DISSERTATION

Ergebnisse nach Pankreasresektion  
unter besonderer Berücksichtigung der Expression  
des HER2/neu-Rezeptors

Zur Erlangung des medizinischen Grades  
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Winkler

aus Jena

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof.Dr.med.H.Bosseckert  
2. Prof.Dr.med.H.Schramm  
3. Priv.-Doz.Dr.med.H.Oettle

Datum der Promotion: 30.11.2006

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
<b><u>1</u></b>	<b><u>Aktueller Kenntnisstand zum Pankreaskarzinom</u></b>
1.1	Zur Inzidenz und Ätiologie des Pankreaskarzinoms 5
1.2	Bildgebende Verfahren 7
1.3	Tumormarker 9
1.4	Resektabilität 9
1.5	Histopathologische Klassifikation 10
1.6	Behandlungsstrategien 12
1.7	Epidermale Wachstumsfaktoren-das HER2-Protein 15
<b>2</b>	<b>Arbeitshypothese 21</b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>
3.1.	Material 22
3.1.1	Krankengut und Pankreaspräparate 22
3.1.2	Material zur Aufarbeitung, histologischen und immunhistochemischen Beurteilung 22
3.2	Methoden 23
3.2.1	Immunhistochemischer Nachweis von HER2 23
3.2.1.1	Fixierung und Paraffineinbettung der Pankreasresektate 23
3.2.1.2	Herstellen der Schnitte für Immunhistochemie 25
3.2.1.3	Deparaffinisierung und Rehydrierung und Objektträger-vorbereitung zur immunhistochemischen Untersuchung 26
3.2.1.4	Immunhistochemischer Nachweis 27
3.2.1.5	Beurteilung des HER2-Expressionsgrades 27
3.2.2	Histologische Einstufung und Beurteilung des Grading der Pankreasresektate 29
3.2.3	Patientenbeobachtung und Datenerhebung 29
<b><u>4</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>
4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs 31
4.2	Histologie der Pankreasresektate 32
4.3	Einteilung der Erkrankungsstadien nach UICC (2002) 34

4.4	Frühe Letalität und Todesursachen	34
4.5	Tumorstadien und Überlebenszeit der palliativ behandelten Patienten	35
4.6	Überlebenszeiten der resezierten Pankreaskarzinopatienten	35
4.7	Rezidiv- und metastasenfreie Zeit	45
4.8	Verteilung der Metastasierungen	46
4.9	Überleben der Patienten mit immunhistochemisch positivem HER2-Status	47
4.10	Immunhistochemischer Nachweis von HER2	51
4.11	Überlebenszeit der Patienten mit immunhistochemisch positivem HER2-Status	51
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Übersichten</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>83</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>91</b>
<b>10.</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>92</b>

## 1. Aktueller Kenntnisstand zum Pankreaskarzinom

### 1.1 Zur Inzidenz und Atiologie des Pankreaskarzinoms

Maligne Tumorerkrankungen spielen in der Diagnostik und Therapie der modernen Medizin eine zunehmende Rolle. Hinter den kardiovaskulären Erkrankungen liegen bösartige Neubildungen auf Platz 2 der Todesursachenstatistik. Einige Tumorerkrankungen sind durch die Entwicklung der diagnostischen Möglichkeiten und Operationsverfahren sowie Anwendung neuer Chemotherapeutika heilbar geworden. In Deutschland wird bei etwa 350 000 Menschen jährlich eine maligne Erkrankung diagnostiziert. Nur ungefähr 40 % können einer Behandlung mit kurativer Intention zugeführt werden. Für 60 % der Patienten verbleiben lediglich Möglichkeiten einer palliativen Behandlung mit dem Ziel der Linderung von Tumorsymptomen und des Erreichens einer Lebensverlängerung.

Die gastrointestinalen Malignome stellen in Deutschland mit ca. 32 % bei den Männern und 35 % bei den Frauen neben dem Mamma-, Prostata- und Bronchialkarzinom die größte Gruppe der tumorbedingten Sterbefälle dar.

Die meisten Sterbefälle werden beim Kolonkarzinom (22,6 / 27,9 pro 100 000 Einwohner) angegeben, gefolgt vom Magenkarzinom (18,4 / 16,3 pro 100 000 EW) und Pankreaskarzinom (13,3 / 14,2 pro 100 000 EW), jeweils nach Geschlecht (männlich / weiblich) zugeordnet (Deutschland 1997) (17). Das Pankreaskarzinom ist dabei mit seinen Prognosefaktoren das bösartigste Karzinom des Gastrointestinaltraktes mit der schlechtesten Überlebensrate. Mit einer Inzidenz von etwa 6-10 Fällen pro 100 000 Einwohner und Jahr macht es insgesamt 2-3 % aller malignen Tumoren aus.

In den USA lag das Pankreaskarzinom mit 30 700 Neuerkrankungen und 30 000 Todesfällen im Jahr 2003 an 5. Stelle der Krebstodesursachenstatistik. Die 1-Jahres-Überlebensrate betrug im Durchschnitt 21 %, die 5-Jahres-Überlebensrate 5 % für alle Erkrankungsstadien aller Pankreaskarzinompatienten.

In der Europäischen Gemeinschaft liegt das Pankreaskarzinom mit ca. 30 000 Neuerkrankungen bei Frauen an der 7. Stelle und bei den Männern an 6. Stelle der malignen Tumoren.

Männer erkranken im Verhältnis fast ebenso häufig wie Frauen. Im Erkrankungsalter besteht ein Häufigkeitsgipfel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr.

Als Hauptrisikofaktor gilt nach prospektiven und retrospektiven Studien das Zigarettenrauchen. Raucher erkranken mit einem 2-5 fach erhöhten Risiko am Pankreaskarzinom. Ebenso werden chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus und chemische Noxen als Risikofaktoren angeführt. In Untersuchungen an Patienten mit chronischer Pankreatitis konnte ein erhöhtes Risiko, an einem Karzinom zu erkranken, festgestellt werden, unabhängig von der Ätiologie der Pankreatitis.

Bei über 20 % der Patienten wurde ein Diabetes mellitus vor der Tumorerkrankung festgestellt. Vielfach wird auch der Diabetes mellitus als eine „Präkanzerose“ des Pankreaskarzinoms benannt.

Die Rolle des Alkohols wird kontrovers diskutiert. Besonders der Genuss von Bier, welches mehr Nitrosamine enthält als andere alkoholische Getränke, soll eine Gefahr darstellen. Möglicherweise ist Alkohol ein indirekter Risikofaktor, da bei regelmäßigem Abusus die chronische Pankreatitis als Präkanzerose entstehen kann. Bei positiver Familienanamnese scheint das Risiko, am Pankreaskarzinom zu erkranken, erhöht, eine genetische Disposition soll in etwa 10 % eine Rolle spielen (28,29). Dergham beschreibt bei 81 Fällen von malignen Pankreastumoren eine positive Karzinom-Familienanamnese in 52 % und ein Pankreaskarzinom in der Familienanamnese in 9 % der Fälle (11).

Die meisten Patienten versterben im ersten Jahr nach Diagnosestellung. Da dieses Karzinom lange symptomlos bleibt und oft erst durch Symptome, die Spätsymptome darstellen, entdeckt wird, haben viele Pankreaskarzinome (ca.80 %) vor Einleiten der Primärdiagnostik bereits die Größe von mehr als 2 cm erreicht, so dass von einer Metastasierung oder Infiltration in die umgebenden Lymphknoten ausgegangen werden muss.

Die ersten Symptome sind häufig der schmerzlose Ikterus, Oberbauchschmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken, Inappetenz und Gewichtsverlust, selten sind Thrombosen wegweisend.

In einigen Fällen ist eine vergrößerte Gallenblase im Oberbauch (Courvoisier - Zeichen) palpabel. Weiterhin können Aszites und Unterschenkelödeme gefunden werden.

## 1.2 Bildgebende Verfahren

Diagnosesicherung und Feststellung der Operabilität sollten über einen möglichst kurzen Zeitraum erfolgen.

Neben der klinischen Untersuchung und der Labordiagnostik (Gamma-GT, Alkalische Phosphatase, Bilirubin, GOT, GPT) sowie der Bestimmung der Pankreasenzyme (Amylase, Lipase) spielen die bildgebenden Verfahren eine große Rolle. In der Regel erfolgt als erstes die Oberbauchsonographie. Tumoren können ab einer Größe von 1,5 cm gesehen werden. Zusätzlich erlaubt sie Aussagen über Lymphome und mögliche Gefäßeinbrüche des Tumors. Eingeschränkte Aussagen gibt es dagegen bei dem Erkennen der Peritonealkarzinose. Zur Beurteilung des Tumorstadiums hat sich die Computertomographie (CT) zum Mittel der Wahl entwickelt. Bei Spezifität und Sensitivität liegt sie zwischen 60 und 100 % und ist dabei stark von der Tumorgröße abhängig.

Bezüglich der Sensitivität und Spezifität zeigt sich die ERCP (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) der CT überlegen. Gallengangabbrüche und Gallengangunregelmäßigkeiten sowie Veränderungen am Pankreasgang lassen sich darstellen.

Die perorale Pankreatoskopie mit Gewinnung von Material für eine zytologische Analyse kann eventuell Tumorzellen beweisen. Eine große Verbreitung hat diese Methode noch nicht gewonnen.

Die Angiographie zeigt sich nur in der Einschätzung der Operabilität bei Verdacht auf Einbruch in das Gefäßsystem hilfreich, ist aber oft durch die genaueren Aussagen der Computertomographie und der Magnetresonanztomographie (MRT) nicht mehr notwendig.

Beim Erfassen von Tumoren unter 2 cm Größe ist die Endosonographie die sensitivste Methode. Bei der Unterscheidung von entzündlichen Pankreaskopfveränderungen gegenüber dem Tumor treten jedoch oft kontroverse Einschätzungen auf. Eine geringe Verfügbarkeit von entsprechenden Endosonographiegeräten limitiert zur Zeit noch dieses Verfahren.

Als weitere diagnostische Verfahren zur Tumorerkennung kommen die Immunszintigraphie, der zytologische Bürstenabstrich im Rahmen der ERCP und die CT-gestützte und endosonographisch gestützte Feinnadelpunktion bei bildgebend nicht ausreichend geklärtem Karzinomverdacht zur Anwendung.

Ebenso werden in vielen chirurgischen Zentren die Laparoskopie und der laparoskopische Ultraschall zum Staging und für Entscheidungen zur Resezierbarkeit des Karzinoms eingesetzt (82,77). Beide Verfahren stellen eine gute Ergänzung zur Computertomographie dar und können die Anzahl unnötiger Laparotomien senken.

Neuerungen auf dem Gebiet der kernspintomographischen Diagnostik haben auch positiven Einfluss auf die Diagnostik von Pankreastumoren. So konnten durch Verbesserungen der Soft- und Hardware Magnetresonanztomographie-Bilder mit höheren Sequenzen erreicht werden. In einer vergleichenden Studie von Fink und Mitarbeitern zur Anwendung von Dünnschnitt-Computertomographie (thin-section helical CT) und MRT wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Detektion des Pankreaskarzinoms festgestellt (18). Somit konnte keine Überlegenheit einer Untersuchungsmethode bewiesen werden.

Weitere nichtinvasive Verfahren wie die Magnetresonanzcholangiopankreatikographie (MRCP) und die Magnetresonanzangiographie bieten eine höhere Genauigkeit gegenüber den etablierten bildgebenden Verfahren und einen besseren Patientenkomfort.

Neue Verfahren in der Diagnostik, besonders im Bereich der bildgebenden Verfahren, haben aber insgesamt nicht zu einer möglichen Früherkennung des Pankreaskarzinoms und damit zur Verlängerung der Überlebenszeit sowie insgesamt der Verbesserung seiner Prognose beitragen können. So hat zum Beispiel die Einführung der PET (Positronenemissionstomographie) eine Rolle in der Therapieüberwachung eingenommen, ist aber für die Tumorfrüherkennung ein noch zu teures und nicht ausgereiftes Verfahren.

Differentialdiagnostisch ist es schwierig, den Verdacht auf Pankreaskarzinom von der fokalen chronischen Pankreatitis zu trennen. Klinisch treten häufig die gleichen Symptome auf, in den bildgebenden Verfahren gelangt man zu keiner konkreten Aussage. Oft kann deshalb die Diagnose präoperativ nicht gesichert werden. Bei weiter bestehendem Verdacht auf ein Karzinom sollte daher die Laparoskopie durchgeführt werden. Dabei kann sie evtl. neben der histologischen Sicherung auch Fragen zur Tumorausdehnung und Metastasierung in Peritoneum und Leber klären.

### 1.3 Tumormarker

Laborchemisch hat die Bestimmung der Tumormarker CA 19-9 und CEA (Carcinoembryonales Antigen) einen Stellenwert in der Verlaufsbeobachtung. So zeigt das CEA eine Sensitivität von 30-50 %, das CA 19-9 von 80-90 %. Als sinnvoll haben sich Kombinationen von Tumormarkern erwiesen, so erreicht man für das exokrine Pankreaskarzinom eine Sensitivität von 90 % bei CEA in Kombination mit CA 19-9 (43).

Bei nachgewiesenem negativem Lewis-Genotyp konnten in der Studie von Kolb keine erhöhten CA 19-9-Konzentrationen exprimiert werden trotz bildgebend nachgewiesenem Pankreaskarzinom und Metastasierung (43). Pathologisch erhöhte CA 19-9-Werte konnten nur bei Patienten mit nachweisbarer Lewis-Substanz im Serum gefunden werden. Somit schließen Werte unter 40 U/ml ein Karzinom nicht sicher aus. Die normale Konzentration des Tumormarkers liegt beim gesunden Menschen unter 40 U/ml, bei benignen hepatobiliären Erkrankungen treten leicht erhöhte Markerwerte auf. Physiologisch erhöht kann das CA 19-9 bei Patienten mit positivem Lewis-Sekretor-Status in allen sekretorischen Absonderungen (Galle, Magensaft, Sputum etc.) sein.

Beim Pankreaskarzinom korreliert CA 19-9 gut mit dem klinischen Verlauf. So wird bei primär erhöhtem Marker nach chirurgischer Therapie (Pankreasresektion), adjuvanter Radiatio und Chemotherapie innerhalb von 2-4 Wochen eine Normalisierung des CA 19-9 beobachtet, bei erfolgreicher palliativer Behandlung ein Rückgang. Weiterhin kann ein erneuter Progress der Erkrankung (Lokalrezidiv, Metastasierung) schon Wochen vor dem klinischen Nachweis an einer zunehmenden Erhöhung des CA 19-9 ablesbar sein (44).

### 1.4 Resektabilität

Die Mehrzahl der Pankreaskarzinome sind im Pankreaskopf lokalisiert (70-80 %), 6 bis 13 % entwickeln sich im Corpus und 3 bis 17 % Schwanzbereich. Pankreaskopfkarzinome können frühzeitig in das Duodenum und den Choledochus einwachsen. Karzinome im Corpus und Schwanzbereich wachsen kontinuierlich in das peripankreatische Gewebe und infiltrieren selten die Magenwand und das Colon transversum. Diese frühzeitige Infiltration angrenzender Organstrukturen und eine

schnelle hämatogene und lymphogene Metastasierung lassen oft keinen kurativen Therapieansatz zu.

Die Metastasierung geschieht entlang der Arteria mesenterica superior, der Arteria gastroduodenalis, Arteria hepatica communis und Arteria lienalis in die parapankreatischen, paraaortalen Lymphknoten und die Lymphknoten im Leberpfortenbereich. Als Fernmetastasen treten am häufigsten Lebermetastasen auf. Nachfolgend können auch Lunge, Pleura, Skelettsystem und Nebennieren befallen sein.

Die chirurgische Resektion des Pankreaskarzinoms stellt zur Zeit noch die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar. Zum Operationszeitpunkt liegen in über 50 % bereits Lymphknoten- und andere Metastasen vor.

Absolute Kriterien für die Nichtresezierbarkeit sind Peritonealkarzinose, diffuse Lebermetastasen, großflächige Gefäßinfiltrationen sowie andere extrahepatische Fernmetastasen. Im präoperativen Staging muss daher die genaue Ausdehnung des neoplastischen Prozesses gesichert werden. Als wichtige zusätzliche Parameter sind ein guter Allgemeinzustand (Karnofsky-Index >70 %), eine Entlastung der Gallenwege bei häufigem Verschlussikterus und eine ausgeglichene Elektrolyt- und Flüssigkeitsbilanz notwendig. Nach Oberbauchlaparotomie ist der Ausschluss einer Metastasierung der wichtigste Schritt zur Beurteilung der Resektabilität. Feinnadelbiopsie und Schnellschnittuntersuchung, aber auch Probeexzisionen aus verdächtigen Geweben außerhalb des Resektionsbereiches sollen durch den erfahrenen Pathologen beurteilt und eine histologische Sicherung der Malignität, Tumorausbreitung und der Feststellung von residualem Tumorgewebe (R0- / R1-Resektion) vorgenommen werden (73). Besonders wichtig ist eine Beurteilung der dorsalen Resektionsgrenzen zum Retroperitoneum.

### 1.5 Histopathologische Klassifikation

Nach dem Entstehungsort der Pankreaskarzinome werden histologisch die Tumoren des exokrinen Pankreas von den endokrinen malignen Tumoren unterschieden. Die endokrinen malignen Tumoren machen nur einen Anteil von 1 – 3 % aus. Die histopathologische Klassifikation erfolgt nach WHO. In der Änderung von 1996 wurde neben der Trennung zwischen eindeutig malignen und benignen Tumoren eine „Borderline-Gruppe“ mit unsicherer maligner Potenz eingefügt. In dieser

Gruppe finden z.B. muzinös-zystische Tumoren mit mäßiger Dysplasie, intraduktale papillär-muzinöse Tumoren mit mäßiger Dysplasie und solide pseudopapilläre Tumoren Berücksichtigung, die bei langsamem Wachstum in eine maligne Gewebsform übergehen können.

Histologisch stellen die duktaalen Adenokarzinome mit 80 bis 85 % die größte Gruppe der Pankreaskarzinome dar. Mehr als 60 % davon sind im Pankreaskopf lokalisiert. Das duktaale Adenokarzinom des Pankreas entwickelt sich aus den Zellen der Pankreasgänge und präsentiert sich in Form von tubulären oder soliden Epithelformationen.

Das histologische Grading und Staging sind daher auf das duktaale Adenokarzinom bezogen. Die dreistufige Differenzierung hängt von der Mitosezahl der Tumorzellen ab. Eine Einteilung erfolgt in gut, mäßig und gering differenziert (G1 bis G3), wobei wegen unterschiedlich differenzierter Areale innerhalb eines Tumors der am schlechtesten differenzierte Abschnitt in die Gesamtbeurteilung übernommen wird. Klassifikation und Stadieneinteilung erfolgen nach dem TNM-System der UICC von 2002 (Übersicht 1).

**Übersicht 1: Einteilung der Pankreaskarzinome nach UICC (2002)**

**T Primärtumor**

<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor auf Pankreas beschränkt, Größe bis 2 cm im Durchmesser
<b>T2</b>	Tumor auf Pankreas beschränkt, größer als 2 cm im Durchmesser
<b>T3</b>	Tumor wächst in peripankreatisches Fettgewebe
<b>T4</b>	Tumor wächst ein in angrenzende große Gefäße: Aa. und Vv. coeliaca, mesentericae superior

**N Regionäre Lymphknoten**

<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine nachweisbaren regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Regionäre Lymphknotenmetastasen

**M Metastasen**

<b>MX</b>	Fernmetastasen nicht bestimmbar
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

## 1.6 Behandlungsstrategien

Als standardisiertes Operationsverfahren bei Pankreaskopfkarzinomen ist die partielle Pankreatikoduodenektomie (Kausch-Whipple-Operation) mit systematischer Dissektion des umgebenden Lymph-, Nerven- und Bindegewebes in Anwendung. Dabei wird die Bauchspeicheldrüse links der Vena portae durchtrennt. Es wird der Processus uncinatus komplett mitentfernt und eine Lymphknotendissektion entlang der Arteria mesenterica superior durchgeführt. Ebenfalls werden die Lymphknoten im Ligamentum hepatoduodenale bis zum Truncus coeliacus und präcaval entfernt. Es erfolgt die Resektion von Gallenblase, Ductus choledochus und distalem Magen en bloc. Der Anschluss des Pankreasrests kann an eine ausgeschaltete Jejunumschlinge (Y-Roux) oder durch Anastomose in den Magen erfolgen. Als Alternative gilt die pyloruserhaltende Duodenopankreatektomie bei Lokalisation des Karzinoms im Pankreaskopf. Dabei werden Magen und Pylorus erhalten, was funktionelle Vorteile schafft und eine Behandlungsalternative bei kleinen Pankreaskarzinomen darstellt.

Eine Resektion des gesamten Pankreas wird selten durchgeführt, da Tumoren nur zu ca. 3 % die gesamte Bauchspeicheldrüse einnehmen.

Die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie wird bei Pankreasschwanzkarzinomen als klassischer Eingriff angewendet.

Die Operationsverfahren sind in den Stadien T1 – T2 N0 M0 mit kurativer Intention durchführbar, die Operationsletalität liegt in erfahrenen Zentren unter 5 %. Diese erhöht sich, wenn zusätzlich Leberteilresektionen/-segmentresektionen bei Metastasierung oder Resektionen bei Infiltration der Vena mesenterica superior und/oder Vena portae vorgenommen werden. Die Indikation zur Resektion hat unter der Senkung der perioperativen Mortalität eine deutliche Ausweitung erfahren, so dass Resektionsraten von 20–50 % erreicht werden. Aggressiveren Resektionsverfahren mit Lymphknotendissektion und Gefäßresektionen werden nur bei fortgeschrittenen Stadien angewandt. Bei „prophylaktischer“ Resektion ist daher eher mit negativen Ergebnissen zu rechnen.

Insgesamt sind aber nur 10 – 20 % der diagnostizierten Pankreaskarzinome kurativ operabel. Palliative Maßnahmen bei Tumorkomplikationen (Verschlussikterus, Duodenalstenosen) umfassen endoskopisches, radiologisch-interventionelles und operatives Vorgehen.

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei kurativer Operationsintention liegt zwischen 5 und 15 %, die mediane Überlebenszeit zwischen 12 und 24 Monaten.

Bei R0-resezierten Patienten ohne Lymphknotenbefall können aber durchaus auch deutlich längere Überlebenszeiten erreicht werden.

Neoadjuvante Behandlungsstrategien wie die Chemo-, Radio- oder Radiochemotherapie haben das Ziel, eine mögliche peritoneale Tumorausssaat bei der Operation zu verhindern, die Häufigkeit retroperitonealer positiver Resektionsränder zu vermindern (Erhöhung der R0-Resektionen) oder einen scheinbar lokal inoperablen Befund durch down-Staging in ein operables (resektables) Stadium zu überführen. Im Falle einer geplanten adjuvanten, d.h. postoperativen Zusatztherapie bestünde bei postoperativen Komplikationen und schlechter Erholung des Patienten die Gefahr der Unmöglichkeit oder nicht zeitnaher Therapie (30). Eine Standardisierung der Therapie gibt es nicht, Studien sind bisher nur an kleinen Patientenkollektiven durchgeführt worden. Angeführt werden muss, dass im präoperativen Zwischenstaging nach neoadjuvanter Therapie bei 50 % der Patienten eine Metastasierung nachgewiesen werden konnte. So sollte die Entscheidung zur neoadjuvanten Therapie eher beim primär nicht resezierbaren Karzinom angewendet werden, um den Zeitpunkt zur initialen R0-Resektion nicht zu verpassen. In Studien von Kastl und Hoffman wurden Resektionsraten von 37 % und 45 % bei primär nicht resezierbarem Pankreaskarzinom nach neoadjuvanten Therapien beschrieben (26,37,49). Dabei hat sich die präoperative Radiochemotherapie als gut tolerabel erwiesen, eine erhöhte Operationsmortalität konnte nicht beobachtet werden. In der Durchführung der adjuvanten und neoadjuvanten Therapie gibt es vielfältige Möglichkeiten: Radiotherapie allein, Chemotherapie allein oder eine Kombinationstherapie. 1985 zeigte eine Studie der Gastrointestinal Study Group (GITS) eine Überlebenszeitverlängerung mit postoperativer Radiochemotherapie nach R0-Resektion von 20 Monaten gegenüber 11 Monaten (35). Yeo belegte mit seiner Studie 1997 (91) die Wirkung der Radiochemotherapie bei nicht vollständiger Tumorresektion mit der Verbesserung des medianen Überlebens von 5 auf 18 Monate.

Bei R0-resezierten Patienten fanden sich in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse zur Wirksamkeit einer Radiochemotherapie. So wurde in einer großen Studie der EORTC die medianen Überlebenszeiten für die Kontrollgruppe mit 19 Monaten und für die Radiochemotherapiegruppe mit 24,5 Monaten bestimmt (40).

Ein Vorteil der Radiochemotherapie bei Betrachtung der 2-Jahres-Überlebensrate ließ sich dabei nicht erkennen und eine Standardtherapieempfehlung konnte nicht ausgesprochen werden. Willet (86) fand im Gegensatz zu Yeo und Mitarbeitern keinen Überlebensvorteil bei nicht vollständigen Tumorresektionen. In der 1994 begonnenen adjuvanten Phase-III-Studie ESPAC-I konnten zu Wirksamkeit der Radiotherapie mit und ohne Chemotherapie keine Überlebensvorteile abgeleitet werden. Auch bei der adjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluorouracil/Folinsäure konnten nur geringfügige Überlebensvorteile gegenüber den Therapiearmen ohne Chemotherapie verzeichnet werden (54-56).

Neben perkutanen Bestrahlungstechniken werden auch intraoperative Bestrahlungen durchgeführt (36). Dabei zeigt jedoch die intraoperative Radiotherapie ein hohes Potential an Komplikationen, ist auch nur an wenigen Zentren verfügbar (57). Eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit konnte weder durch alleinige Radiotherapie noch in Kombination mit einer Chemotherapie erreicht werden. Die Strahlentherapie spielt bei der Therapie des Pankreaskarzinoms insgesamt eine untergeordnete Rolle. Sie ist bei inoperablem Tumor zur palliativen Behandlung und Schmerztherapie sinnvoll.

Pankreaskarzinome sprechen bisher aber insgesamt wenig auf chemotherapeutische Behandlungen an. So wurde in einer Arbeit von Lionetto und Mitarbeitern 1995 bemerkt, dass es trotz verschiedener Chemotherapeutikaaanwendungen keine Standardtherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinoms gibt (48). Auch Ridwelski beschreibt die schlechte Effizienz der Chemotherapie bei palliativer Behandlung (67), da bis zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden konnte. Unter Therapie mit 5-Fluorouracil als Mono- oder in Kombinationstherapie mit Cisplatin wurden 6-Monats-Überlebensraten 38 % und 28 % erreicht. Heute hat Gemcitabin das 5-Fluorouracil als Erstlinientherapeutikum abgelöst (59,60). Eine Studie von Burris und Mitarbeitern (6) mit Gemcitabin und 5-Fluorouracil zeigte eine Überlebensrate nach 12 Monaten von 18 % beim Gemcitabin und nur 2 % beim 5-Fluorouracil. Kombinationen von Gemcitabin mit Matrix-Metalloproteinase-Hemmer (Marimastat), Fenylyltransferase-hemmer (Zarnestra), Irinotecan und Cisplatin erbrachten dagegen keinen signifikanten Überlebensvorteil (4,9,25,85).

Entsprechende klinische Studien der Phase III mit Anwendung von Gemcitabin als Monotherapie sind in einer multizentrischen Studie der Studiengruppe

Pankreaskarzinom der Charite kurz vor dem Abschluß. Multimodale Therapiekonzepte zeigten in Phase-II-Studien gute Ergebnisse (21,35). Große randomisierte Studien müssen die günstige Beeinflussung von rezidivfreiem Intervall und Gesamtüberleben jedoch erst belegen.

Den Chemotherapeutika werden verschiedene Angriffspunkte im Zellzyklus zugeordnet. Dabei greift Gemcitabin im Zellzyklus in die G1- und S-Phase ein. Mit Einbau in die DNA durch DNA-Polymerasen werden Strangbrüche induziert. Taxane (Vinorelbin) greifen in der G2- und M-Phase in den Zellzyklus ein. Durch Bindung an Tubulin wird die Bildung der Mitosespindel gehemmt. Deshalb werden Taxane auch als Mitosehemmer bezeichnet. Platinderivate (Cisplatin) wirken in der G1- und S-Phase durch Bindung von Platinkomplexen an DNA und Proteine. Es entstehen Platin-DNA-Addukte. Die positivere Wirkung von Gemcitabin ist auf die nicht nur verlängerte Überlebenszeit gegenüber 5-Fluorouracil sondern auf die Linderung der durch die Tumorerkrankung hervorgerufenen Begleitumstände, wie zum Beispiel Schmerzen, und die gute Verträglichkeit zurückzuführen.

Die bisher unzureichende Wirksamkeit dieser Chemotherapeutika lenkt zunehmend das Augenmerk auf weitere Forschungen zum Zellzyklus der Pankreaskarzinomzellen. Eine Möglichkeit liegt eventuell in der Identifikation von Substanzen, die eine Expression des pRB (Retinoblastomgen-Produkt) über das p16 Protein beeinflussen. Über die Beeinflussung dieses Regulationsmechanismus im Zellzyklus könnte eine Chemosensitivität des Pankreaskarzinoms erreichbar sein (64).

### 1.7 Epidermale Wachstumsfaktoren-das HER2-Protein

Wichtige Regulatoren des Zellzyklus sind die epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) und ihrer Rezeptoren. Diese sind für Wachstum, Differenzierung und Transformation in der Zelle verantwortlich und stellen für weitere diagnostische und therapeutische Konsequenzen mögliche Ansatzpunkte dar.

Epidermale Wachstumsfaktoren sind lokal wirkende Peptide, die bei der Zellteilung und Differenzierung eine wichtige Rolle spielen und die größte bekannte Familie von Wachstumsfaktoren bilden. Ihre Expression wird von verschiedenen Hormonen und Zytokinen reguliert. In Karzinomzellen liegt eine verminderte Abhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren vor. Das wird darauf zurückgeführt, dass durch die

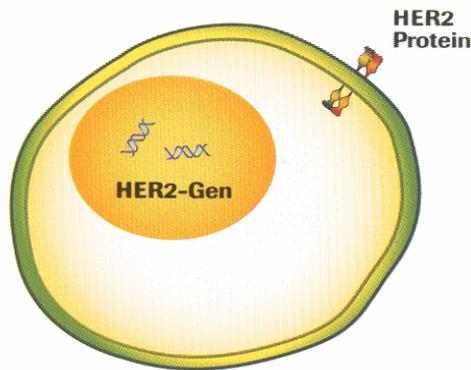
Tumorzelle selbst endogene Wachstumsfaktoren gebildet werden, um sich selbst zu stimulieren. Bei einer Überexpression von membranständigen Wachstumsfaktor-Rezeptoren kann eine Tumorzelle schon bei niedriger Konzentration an Wachstumsfaktoren stimuliert werden.

Zur EGF-Familie gehören der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Transforming Growth Factor alpha (TGF alpha), der Heparin-binding-EGF (HB-EGF), Amphiregulin (AR), Betacellulin (BTC), Epregrulin (EPR), Neuregulin- (NRG) und die Cripto-Subfamilien.

EGF-verwandte Peptide bestehen aus einer Sequenz mit 6 konservierten Cysteinen innerhalb einer 40 Aminosäuren umfassenden Region. Die Cysteine bilden durch drei intramolekular gelegene Disulfidbrücken eine dreischleifige Struktur. Die Proteine können sowohl membrangebunden als auch sezerniert vorliegen. Die EGF-Rezeptoren gehören zur erbB-Typ-1-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie. Dazu gehören die vier verschiedenen Vertreter EGF-R/erbB, c-erbB-2 (Synonyme: HER2, p185, erbB2, fortlaufend in der Arbeit HER2), c-erbB-3 (HER-3) und c-erbB-4 (HER-4). Diese Rezeptorfamilie ist von besonderem Interesse, da ihre Expression und Gen-Amplifikation in menschlichen Malignomen beschrieben wurden. Bei grundlegend ähnlicher Struktur haben die Rezeptoren einen extrazellulären Anteil, an welchem Liganden binden können, eine kurze juxtamembranöse Sequenz, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Region mit Tyrosinkinaseaktivität, an die ein hydrophiles Carboxylende gekoppelt ist. Bei der Signaltransduktion erfolgen nach Ligandenbindung an den Rezeptor eine ligandeninduzierte Dimerisierung von Rezeptoren, die Rezeptor-Autophosphorylierung und die Bindung von Signalproteinen. Die Folge ist eine Erhöhung der Mitoseaktivität von Tumorzellen. Eine herausragende Rolle in diesem Prozess wird dabei der Überexpression des HER2-Rezeptors zugeschrieben (siehe Abbildung 1); (12,74,75,83).

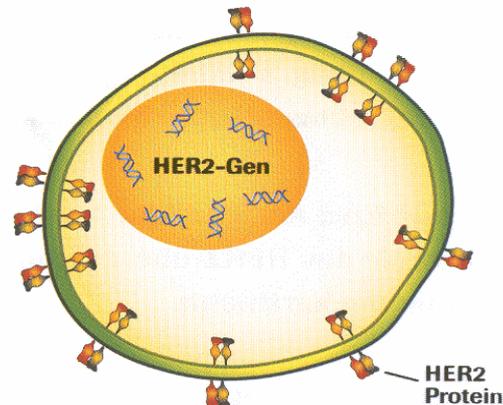
Der Mechanismus des HER2-Rezeptors wurde deshalb Mittelpunkt von Forschungsarbeiten. Eine Überexpression des Proteins in verschiedenen Tumorgeweben und eine erhöhte intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität wurden als Grundmechanismus für eine unkontrollierte Signaltransduktion in der Karzinomzelle angesehen. Nachweise der extrazellulären Domäne des Rezeptors sollten den Charakter eines Biomarkers zur Krebsdiagnostik und Prävention darstellen (5).

### Normale Zelle



*In der normalen Zelle liegt das HER2-Gen in zweifacher Kopie vor.*

### HER2-überexprimierende Tumorzelle



*Eine HER2-überexprimierende Tumorzelle weist in der Regel eine Amplifikation des HER2-Gens auf. Daraus resultiert eine 10-100-fache Überexpression des HER2-Proteins auf der Zelloberfläche.*

**Abbildung 1:** Überexpression von HER2 auf der Tumorzelle im Vergleich zur normalen Zelle (aus Produktinformation Herceptin, „Diagnostik von HER2“, Hoffmann-La Roche AG, 2000)

Das HER2-Gen wurde 1985 erstmals als transformierendes Onkogen bei der Ratte identifiziert. Der HER2-Onkogen-Rezeptor kodiert ein zellmembranständiges Rezeptor-Protein von 185 kDa mit Tyrosinkinaseaktivität auf dem Chromosom 17q12-21.32. Dieses Onkogen gehört zur EGF-Familie und kann bei Ligandenbindung an den extrazellulären Anteil eine Dimerisierung, Rezeptorphosphorylierung und die Bindung von Signalproteinen in der Zelle auslösen. Diese ausgelöste Signalkaskade führt letztendlich in der Tumorzelle zu einem Proliferationsreiz.

Bei vielen menschlichen Karzinomen ist der HER2-Rezeptor mit vermehrter Expression nachgewiesen worden und geht oft mit einer Amplifikation des HER2-Gens einher (34). Nachgewiesen wird das membranständige HER2-Protein mittels Immunhistochemie. Dabei wird das HER2-Protein durch die Bindung an einen spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. Eine weitere Methode stellt die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dar. Immunfluoreszenzmikroskopisch wird die Anzahl der Genkopien (Genamplifikation) nach Hybridisierung nachgewiesen.

Diese beiden Verfahren haben sich in den letzten Jahren bei der beginnenden Routine des HER2-Nachweises durchgesetzt (62).

Beim immunhistochemischen Nachweis wird zunächst die intrazelluläre (endogene) Peroxidase blockiert, um einen Peroxidasenachweis in den Zellen zu verhindern. Danach erfolgt die Inkubation mit Primärantikörpern (Anti-Human-HER2-Antikörper vom Kaninchen), die am HER2-Protein an der Zellmembran binden. Dann wird mit einem Detektionsreagens, welches einen Sekundärantikörper und einen Enzymanteil enthält, inkubiert. Die an den Antikörper gebundenen Liganden werden mit einem Chromogen sichtbar gemacht. Chromogen ist ein farbloses Substrat, das durch den Enzymanteil des Detektionsreagens in ein farbiges Endprodukt umgesetzt wird.

Die immunhistochemische Nachweismethode ist sowohl an in Paraffin eingebettetem Gewebe als auch im Gefrierschnitt möglich. Bei der Auswertung der gefärbten Zellstrukturen sind die Intensitäten der Membranfärbungen mit schwach / mäßig / stark nach einem Score von 0 bis 3 einzuschätzen. Diese Grade entsprechen dabei dem Expressionsgrad des HER2-Proteins von 0 bis 3+. Vorteile der immunhistochemischen Nachweismethode (IHC) liegen im Nachweis des HER2-Rezeptors, also im möglichen therapeutischen Ansatz. Die Methode zeigt eine hohe Spezifität und Sensitivität, ist schnell durchführbar und kostengünstig. Der geringe Aufwand an Reagenzien macht den Test in fast jeder Klinik möglich. Nachteile der IHC liegen in der starken Abhängigkeit von Art und Zeitpunkt der Gewebeverarbeitung und Gewebefixierung.

Ein weiteres Problem liegt in den verwendeten Antikörpern, die bei unterschiedlicher Herkunft keinen Vergleich der Testergebnisse erlauben. Daher müssten zur besseren Vergleichbarkeit Standardisierungen für die verwendeten Antikörper und Reagenzien, Art der Gewebelagerung und -aufarbeitung sowie ein Auswertesystem zur Beurteilung der Gewebefärbung eingeführt werden, da die Aussage sehr untersucherabhängig ist. Dabei wird in vier Stufen (Score 0 bis 3) die Färbung des Präparates eingeschätzt. Wenn weniger als 10 % der Tumorzellen eine schwache oder unvollständige Anfärbung besitzen, ist dies Score 0. Bei inkompletter Anfärbung von mehr als 10 % der Tumorzellen besteht Score 1. Vollständige Membranfärbung mit schwacher bis moderater Intensität in mehr als 10 % der Tumorzellen beschreibt Score 2. Bei vollständiger Anfärbung mit starker Intensität in mehr als 10 % der Zellen liegt Score 3 vor. Eine Überexpression des HER2-Rezeptors liegt bei einem

Vorkommen von Score 2 und 3 vor. Ein Test mit genormtem Antikörper wird von der Firma Hoffmann-La Roche AG der HercepTest™ angeboten.

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wird die Genamplifikation (Genervielfältigung) des HER2-Gens nachgewiesen. In der normalen Zelle liegt das HER2-Gen in zweifacher Kopie vor. In der HER2-überexprimierenden Tumorzelle liegen in der Regel Genamplifikationen von HER2 vor, die eine Überexpression des HER2-Proteins auf der Zelloberfläche bedingen.

Durch Hybridisierung werden die Doppelstränge der DNA unter Wärme getrennt („Hybridisierungsöfen“) und mittels DNA-Sonden mit komplementären chromosomalen Sequenzen für das HER2-Gen beladen. Die DNA-Sonden sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können nachfolgend durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Vorteile liegen in der Nachweismöglichkeit bei frischem und fixiertem oder eingebettetem Gewebe. Weiterhin zeichnet sich FISH durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Das HER2-Gen wird quantitativ bestimmt. Nachteilig sind der hohe technische Aufwand (Fluoreszenzmikroskop, Hybridisierungsarbeitsplatz) und die Notwendigkeit von erfahrenen Untersuchern, was die Anwendung auf wenige spezielle Labor- und Forschungseinrichtungen beschränkt.

Bereits in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms hat sich seit den 1980er Jahren ein therapeutischer Ansatzpunkt über den HER2-Antikörper entwickelt. Dieser wurde mit der Substanz Trastuzumab 1998 in den USA zugelassen. Diese Therapie mit einem monoklonalen Antikörper gegen den HER2-Rezeptor wird als Mono- oder Kombinationstherapie beim Mammakarzinom mit der Substanz Herceptin® durchgeführt. Diese Behandlung setzt eine Überexpression (zwei- bis dreifach) des HER2-Rezeptors im Tumorgewebe voraus, was beim Mammakarzinom in 20 bis 30 % der Fälle vorliegt (74,75). Der Krankheitsverlauf ist bei nachgewiesener Überexpression ungünstiger (22), eine frühzeitigere Metastasierung, Therapieresistenz gegenüber Tamoxifen und Östrogenrezeptor-negativität sind nachweisbar. Das Ansprechen auf verschiedene Therapieschemata ist nachweislich vermindert. Daher wird die HER2-Überexpressionsbestimmung als Routinenachweismethode beim Mammakarzinom angestrebt. Der HER2-Rezeptor ist in den Aufarbeitungen von Karzinomgewebe mit epithelalem Ursprung neben dem Mammakarzinom und Ovarialkarzinom auch in Lungenkarzinomen und Karzinomen des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen worden. In der Arbeit von Peiper wurde

die Zahl der HER2-Überexpression an Pankreaskarzinomzellen mit etwa 50 % beziffert, verbunden mit einer noch schlechteren klinischen Prognose, wie früher peritonealer Metastasierung und kurzer Überlebenszeit (63). Bei gastrointestinalen Tumoren wurde dagegen in anderen Arbeiten eine HER2-Expression in nur 5-10 % der untersuchten Materialien beschrieben (41).

Bei den uns vorliegenden Studien über den Nachweis des HER2-Proteins und des HER2-Gens variieren die prozentualen Angaben für das Pankreaskarzinom stark. Diese liefern damit auch die unterschiedlichsten Aussagen zur klinischen Wertigkeit, den HER2-Rezeptor oder das HER2-Gen als prognostischen Marker oder therapeutischen Ansatzpunkt anzusehen. In einigen Arbeiten erscheinen die niedrige Anzahl an Patienten oder die geringe Anzahl an Pankreasresektaten wenig repräsentativ. Zudem wurden nur in wenigen Studien vergleichbare immunhistochemische Nachweise des HER2-Rezeptors durchgeführt. Auch sind in den bisherigen Arbeiten die untersuchten Materialien (z.B. paraffineingebettete Präparate oder Karzinomzelllinien) und die angewendeten Nachweisverfahren (verwendete Chemikalien und Messgeräte) nicht standardisiert und dadurch nicht vergleichbar.

## **2. Arbeitshypothese**

Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Überlebensraten von 113 Patienten nach Pankreasresektion bei Pankreaskarzinom im Zeitraum von 1994 bis 2000 zu analysieren. Hierbei wollten wir im Besonderen die Überexpression des HER2-Rezeptors als möglichen prognostischen Marker hinsichtlich des klinischen Verlaufes und der Überlebenszeit berücksichtigen.

Folgende Fragestellungen versuchten wir im Einzelnen zu beantworten:

- Wie ist die Zusammensetzung des Patientenkollektivs mit Alter, maligner Vorerkrankung und der Begleiterkrankung Diabetes mellitus Typ 2?
- Wie ist die histologische Klassifikation der Pankreaskarzinome im gesamten Patientenkollektiv?
- Wie ist die Verteilung der Tumorstadien zum Operationszeitpunkt?
- Wieviele Patienten konnten postoperativ einem kurativen Therapieansatz zugeführt werden?
- Bei wievielen Patienten wurde postoperativ ein palliativer Therapieverlauf verzeichnet?
- Wie hoch war das Risiko der Pankreasresektion gemessen an der frühen Letalität innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage?
- War das Auftreten der frühen Letalität abhängig vom diagnostizierten Tumorstadium?
- Wie verhielten sich die Überlebenszeiten im gesamten Patientenkollektiv?
- Gelingt der immunhistochemische Nachweis der HER2-Expression mit einem standardisierten immunhistochemischen Test?
- Wie hoch ist der Anteil einer HER2-Überexpression im Gesamtkollektiv?
- Wie beeinflusst die HER2-Überexpression die Überlebenszeit der Patienten?
- Wie beeinflusst der HER2-Status das Auftreten von Rezidiven und Metastasen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1 Krankengut und Pankreaspräparate

Von 113 Patienten, die sich im Department für Allgemeine, Viszerale und Kinderchirurgie der SRH Waldklinikum Gera gGmbH zwischen 1994 und 2000 einem pankreaschirurgischen Eingriff unterzogen, wurde Pankreaskarzinomgewebe reseziert. Die Aufarbeitung, histologische Untersuchung und Paraffineinbettung des Pankreaskarzinomgewebes erfolgten im pathologischen Institut der SRH Waldklinikum Gera gGmbH.

##### 3.1.2 Material zur Aufarbeitung, histologischen und immunhistochemischen Beurteilung

- Formalinlösung 1:10, 3,5 % (40 % Formaldehyd 100 ml, pH 7,0; 4 g Natriummonophosphat, 6,5 g Dinatriumphosphat in 900 ml Aqua bidest)
- Natriumchloridlösung 0.85 %
- Ethanolreihe: 30 %, 50 %, 75 %, 85 % (v/v) Ethanol in 0,85 % (w/v) Natriumchloridlösung, 95 % Ethanol in Wasser und 100 % Ethanol
- Benzollösung
- Paraffin (Schmelzpunkt ca. 56 – 58 °C)
- Mikrotom (Schlittenmikrotom Reichert-Jung)
- Xylollösung
- Ethanolreihe: 96 % Ethanol in Wasser, 85 %, 75 %, 50 %, 30 % (v/v) in 0,85 % (w/v) NaCl
- Wasserstoffperoxidlösung in Methanol (3 % v/v)
- EDTA-Lösung (10 mM, pH 7,0)
- Trypsinlösung (0,1 % in Aqua bidest mit 0,1 % Kalziumchlorid, pH-Einstellung auf 7,8 mit 0,1 N Natronlauge)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-phosphat buffer solution; 0,01 M, pH 7,2)

- Monoklonaler Antikörper (MAb-Novocastra, Newcastle upon Tyne, GB, Konzentration 1:20)
- Polyklonaler Antikörper Dako c-erbB-2 (Dako, High Wycombe, GB)
- Zitratpufferlösung (0,01 M, pH 6,0)
- Objektträger
- Mikrowelle
- Dako Tech Mate 500 plus
- Kontrollobjektträger mit 3 Zelllinien für HercepTest™
- „Atlas for Interpretation of HercepTest™ Staining“ (DAKO-Broschüre NR.20210)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von HER2/neu

Das zum immunhistochemischen Nachweis der HER2/neu-Expression verwendete Tumormaterial wurde von insgesamt 113 pankreasresezierten Patienten mit Pankreaskarzinom gewonnen.

#### 3.2.1.1 Fixierung und Paraffineinbettung der Pankreasresektate

Vor der Einbettung in Paraffinwachs mussten die Pankreasresektate fixiert, ausgewaschen, entwässert und mit einem Intermedium vorbehandelt werden.

#### Fixieren und Auswaschen:

- Formalinlösung 1:10, 3,5 % (40 % Formaldehyd 100 ml, pH 7,0; 4 g Natriummonophosphat, 6,5 g Dinatriumphosphat in 900 ml Aqua bidest)
- Natriumchloridlösung 0,85 %

Ziel der Fixierung ist die Verhinderung der Autolyse durch zelleigene Enzyme im Gewebe. Damit können intrazelluläre Stoffwechselforgänge gestoppt und durch gleichzeitige Konservierung durch das Fixierungsmittel der augenblickliche Zustand der Gewebeprobe erhalten werden.

Formalin wurde bei unseren Geweben zu einer 3,5 %-igen Formalinlösung mit einem pH von 7,0 gemischt (neutral gepuffertes Formol nach Lillie) und die jeweilige Gewebeprobe eingelegt. Die Menge des Fixativs betrug für unsere Gewebestücke ca. 200 ml, um eine ausreichende Durchdringung zu gewährleisten.

Die Fixierung erfolgte bei 4 °C über 24 Stunden im Kühlschrank.

Die fixierten Gewebeproben wurden anschließend zur Formalinentfernung in 0,85 %-iger Natriumchloridlösung 30 Minuten im Wässerungssieb ausgewaschen.

#### Entwässerung:

- Ethanolreihe: 30 %, 50 %, 75 %, 85 % (v/v) Ethanol in 0,85 % (w/v) Natriumchloridlösung, 95 % Ethanol in Wasser und 100 % Ethanol

Die Entwässerung erfolgt zur Wasserentfernung aus den fixierten Gewebeproben mit einer Ethanolreihe. Bei unserer kurzen Auswaschdauer wurde die Entwässerung deshalb schon mit niedrigeren Konzentrationen der Ethanolreihe und bei der großen Probenanzahl ein häufiges Wechseln der Alkoholverdünnungen vorgenommen. Die damit zu befürchtende Verunreinigung der Lösungen durch Fixierlösung, Wasser und Gewebefett sollte somit gering gehalten werden.

Wir verwendeten in der Abfolge aufsteigend 30 %, 50 %, 75 %, 85 % (v/v) Ethanol in 0,85 % (w/v) Natriumchloridlösung, 95 % Ethanol in Wasser und 100 % Ethanol. Jeweils 30 Minuten verblieben die Proben in den jeweiligen Ethanolkonzentrationen. Der Entwässerungsvorgang erfolgte in entsprechenden Glasschalen. Die Proben wurden in ein reichlich bemessenes Alkoholbad eingebracht und sollten dabei nicht den Gefäßboden berühren.

#### Intermedium:

- Benzollösung

Nach der Entwässerung musste über ein Intermedium Restalkohol aus den Gewebeproben geschwemmt werden. Dadurch sollte eine gute Durchdringung des Gewebes mit Paraffin ermöglicht und neben der schon unter Entwässerung bestehenden Schrumpfung des gesamten Gewebeblockes eine Härtung der Probe

verhindert werden. Benzol besitzt die Eigenschaft der Mischbarkeit mit Alkohol und Paraffin.

Aus dem Alkoholbad (Ethanol 100 %) wurden die Proben für 30 Minuten in reines Benzol eingebracht. Dabei war die Benzollösung mehrfach zu wechseln, da durch den ausgeschwemmten Alkohol eine Verunreinigung stattfindet.

#### Paraffineinbettung:

- Benzollösung
- Paraffin (Schmelzpunkt ca. 56 – 58 °C)

Nach der Behandlung der Proben im Intermedium wurden diese in eine Benzol-Paraffinlösung eingebracht. Die Lösung lag als gesättigte Lösung von Paraffin und Benzol bei einer Temperatur von etwa 40 °C im Wärmeschrank vor. In einem dicht verschlossenem Gefäß wurden die Proben für 60 Minuten im Benzol-Paraffin belassen.

Die Proben wurden dann in geschmolzenem reinem Paraffin bei einer Temperatur von ca. 60 °C in drei Portionen durchtränkt. Dabei konnte in der letzten Stufe des Durchtränkens reines Paraffin in das Gewebe eindringen, das vorher noch durch Benzolreste verunreinigt war. In jedem der drei Paraffingläser verblieben die Proben für 3 Stunden.

Einbetträhmchen aus Metall wurden in der gewünschten Größe auf eine Metallunterlage gestellt und mit einer Klammer fixiert. In diese Form wurde dann flüssiges Paraffin eingefüllt und das paraffindurchtränkte Präparat eingesetzt. Die gesamte Form wurde in eine Schale gelegt und mit kaltem Wasser (Raumtemperatur) bis zum Oberrand der Einbettungsrähmchen aufgefüllt. Nach Erstarren des Paraffins wurden die Rähmchen abgelöst, die Ränder des Paraffinblockes glattgeschnitten und die Blöcke nach Patientenzugehörigkeit markiert.

#### 3.2.1.2 Herstellen der Schnitte für die Immunhistochemie

Um die immunhistochemische Untersuchung durchführen zu können, mussten entsprechende Schnitte aus den paraffineingebetteten Gewebeproben hergestellt werden. Die Schnitte wurden mit dem Mikrotom (Schlittenmikrotom Reichert-Jung) in

einer Stärke von 4 µm angefertigt, anschließend auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht auf einer Heizplatte bei 40 °C getrocknet.

### 3.2.1.3 Deparaffinisierung, Rehydrierung und Objektträgervorbereitung zur immunhistochemischen Untersuchung

- Xylollösung
- Ethanolreihe: 96 % Ethanol in Wasser, 85 %, 75 %, 50 %, 30 % (v/v) in 0,85 % (w/v) NaCl
- Wasserstoffperoxidlösung in Methanol (3 % v/v)
- EDTA-Lösung (10 mM, pH 7,0)
- Trypsinlösung (0,1 % in Aqua bidest mit 0,1 % Kalziumchlorid, pH-Einstellung auf 7,8 mit 0,1 N Natronlauge)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-phosphat buffer solution; 0,01 M, pH 7,2)

Die Objektträger wurden zuerst mit einer Immersionslösung (10 mM EDTA-Lösung, pH 7,0) vorbehandelt und in eine Mikrowelle bei 850 Watt über 15 Minuten eingebracht. Anschließend erfolgte die 15-minütige Abkühlung bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden zur immunhistochemischen Untersuchung mit Xylol deparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger für 30 Minuten auf einen 60 °C warmen Ofen gelegt, anschließend sofort für 5 Minuten in das Xylolbad eingebracht und danach für 5 Minuten mit Wasser gespült. Die Erwärmung vor Entparaffinisierung sollte der möglichst vollständigen Entfernung des Einbettmediums dienen. Wir achteten darauf, dass nicht mehr als 20 Objektträger pro Xylolbad eingelegt wurden, um eine ausreichende Umspülung zu ermöglichen. Nach 2,5 Minuten wurden die Objektträger in ein zweites frisches Xylolbad eingebracht. Nach Entparaffinisierung von 40 Objektträgern wurden die Xylolbäder erneuert.

Die Rehydrierung erfolgte in einer Ethanolreihe absteigend (96 % Ethanol in Wasser, 85 %, 75 %, 50 %, 30 % (v/v) in 0,85 % (w/v) NaCl). Spülen der Objektträger mit Wasser und Einlegen in ein Pufferbad (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) für 5 Minuten.

Um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen, legten wir die Schnitte in Wasserstoffperoxidlösung mit Methanol (3% v/v) für 15 Minuten ein.

Eine Proteasen-Vorbehandlung mit Trypsin sollte der Erhöhung der spezifischen immunhistochemischen Reaktivität dienen. Die Schnitte wurden deshalb bei 37 °C in das Trypsinbad eingebracht und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend Spülen der Objektträger mit Wasser.

#### 3.2.1.4 Immunhistochemischer Nachweis

- Monoklonaler Antikörper (MAb – Novocastra, Newcastle upon Tyne, GB, Konzentration 1:20)
- Polyklonaler Antikörper Dako c-erbB-2 (Dako, High Wycombe, GB)
- Zitratpufferlösung (0,01 M, pH 6,0)

Die Präparate wurden im Wasserbad mit Zitratpuffer bei 104°C über 40 Minuten gekocht. Dann Spülen und Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit vom Objektträger.

Anschließend wurden die Schnitte mit 4-6 Tropfen des monoklonalen Antikörpers MAb (monoclonal antibody – Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, Großbritannien) in einer Konzentration 1:20 bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Spülen der Objektträger mit Aqua bidest und 1 Minute Einlegen im Zitratpufferbad. Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit vom Objektträger.

Danach erfolgte eine zweite weitere Inkubation mit 4-6 Tropfen des polyklonalen Antikörpers Dako c-erbB-2 (Dako, High Wycombe, Grossbritannien). Spülen der Objektträger und Einlegen in Zitratpuffer für 1 Minute.

Die Färbung wurde im Dako Tech Mate 500 plus mit der APAAP-Farbreaktion (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex-Methode) automatisch durchgeführt. Dabei entstand mit Naphthol-AS-MX-Phosphat eine rote Färbung.

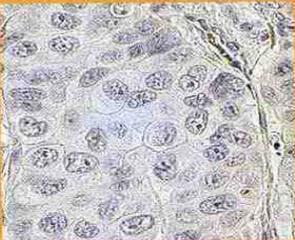
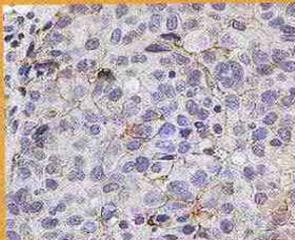
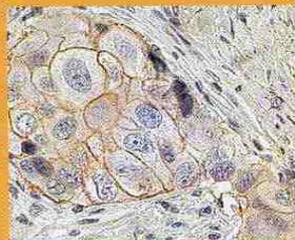
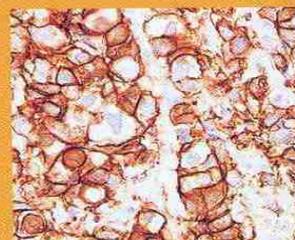
#### 3.2.1.5 Beurteilung des HER2-Expressionsgrades

Zur Beurteilung des Expressionsgrades des HER2-Proteins wurde ein Referenzschnitt eines hochexprimierenden Mammakarzinoms im Dako Tech Mate mitgefärbt (Expressionsgrad 3+).

Die so gewonnenen gefärbten Objektträger wurden dann der Beurteilung unterzogen. Um eine größtmögliche Genauigkeit und Sicherheit in der Darstellung

des Expressionsgrades der Pankreaskarzinomschnitte zu erreichen, wurden die Auswertung und Beurteilung von zwei unabhängigen Pathologen durchgeführt. Zum HercepTest™ mitgelieferte Kontrollobjektträger mit 3 Zelllinien dienen zur Kontrolle der Färbeprozedur, also der korrekten Anwendung der standardisierten Behandlungsverfahren im Rahmen des immunhistochemischen Verlaufes. Für die Beurteilung des Anfärbegrades unserer Pankreasschnitte wurde der „Atlas for Interpretation of HercepTest™ Staining“ (DAKO-Broschüre NR.20210) als Richtlinie benutzt. Die entsprechenden Färbemuster unterliegen einem Scoresystem (Abb. 2). Dabei liegt Score 0 (HER2-negativ) vor, wenn weniger als 10 % der Tumorzellen eine membranständige Anfärbung zeigen.

Abbildung 2: Übersicht zur Färbemusterbeurteilung von HER2 (aus Produktinformation HercepTest™, Hoffmann-La Roche AG, 2000)

	Keine Färbung zu sehen oder <b>weniger als 10%</b> der Tumorzellen zeigen eine membranständige Anfärbung.	0	Negativ
	Eine schwache oder kaum sichtbare Membranfärbung ist in <b>mehr als 10%</b> der Tumorzellen zu sehen. Die Zellen zeigen eine nur <b>unvollständige</b> Membranfärbung.	1+	Negativ
	Eine schwache bis moderate <b>komplette</b> Membranfärbung wird in <b>mehr als 10%</b> aller Tumorzellen festgestellt.	2+	Schwach Positiv
	Eine <b>starke</b> , die komplette Membran umfassende Färbung wird in <b>mehr als 10%</b> aller Tumorzellen beobachtet.	3+	Stark Positiv

Bei einer schwachen oder kaum sichtbaren Membranfärbung in mehr als 10 % der Tumorzellen wird Score 1+ (HER2-negativ) eingetragen. Die Membranfärbung ist hierbei unvollständig. Score 2+ (HER2-schwach positiv) stellt sich bei schwacher bis moderater aber kompletter Membranfärbung bei mehr als 10 % der Tumorzellen dar. Liegt eine intensive Färbung der kompletten Membran der Tumorzelle vor, wird von einem stark positiven HER2-Nachweis (Score 3+) gesprochen.

### 3.2.2 Histologische Einstufung und Beurteilung der Pankreasresektate

Die histologische Erstdiagnose (Malignitätsnachweis) wurde durch Schnellschnitt und Feinnadelbiopsie intraoperativ im Institut für Pathologie des SRH Waldklinikums Gera gestellt. Postoperativ erfolgte die Aufarbeitung des gesamten Pankreasresektates sowie der exstirpierten Lymphknoten mit der entsprechenden Zuordnung zu Gewebetyp und Differenzierungsgrad. Weiterhin wurde im Institut für Pathologie der SRH Waldklinikums Gera bis zur Paraffinisierung in Blöcken.

Die Herstellung von Schnitten aus den paraffineingebetteten Pankreasresektaten und die Durchführung des HercepTests™ wurden im immunhistochemischen Labor der Charite Berlin durchgeführt.

### 3.2.3 Patientenbeobachtung und Datenerhebung

Die postoperative Verlaufsbeobachtung der pankreasresezierten Patienten und Patienten mit palliativer Behandlung erfolgte über die regelmäßigen Vorstellungen der Patienten im Abstand von 6 Monaten in der chirurgischen Ambulanz unserer Klinik oder über regelmäßigen telefonischen Kontakt mit den behandelnden Hausärzten oder Internisten am Heimatort, wenn eine Vorstellung in Gera nicht möglich war. Der Beobachtungszeitraum reichte von 1994 bis November 2004. Es wurde ein Erhebungsbogen erarbeitet, in dem Alter, Geschlecht, Operationsdatum, maligne Zweiterkrankung, maligne Erkrankung in der Familienanamnese, Diabetes mellitus Typ 2, Überlebenszeit, Zeitpunkt für den Nachweis von Rezidiv oder Metastasen, Histologie, Grading, Tumorstadium und HER2-Status erfasst wurden.

Unsere Arbeit enthält die Auswertung von 113 Patienten aus den Jahren 1994 bis 2000. Alle Patienten wurden im Department für Allgemeine, Viscerale und Kinderchirurgie am Waldklinikum Gera unter kurativer Intention operiert. Dabei

erfolgte bei 103 Patienten postoperativ ein kurativer Therapieansatz, bei 11 Patienten nur ein palliatives Vorgehen wegen eines lokal fortgeschrittenen Befundes oder des Vorliegens einer Metastasierung.

Aus dem Nachweis der HER2-Expression sollte ein Bezug zum klinischen Verlauf hergestellt werden. Als Beurteilungskriterien dienten uns dabei die rezidiv- und/oder metastasenfremde Zeit nach der Pankreasresektion und die Gesamtüberlebenszeit.

Weitere statistische Daten konnten aus dem Register des Tumorzentrums Gera gewonnen werden, um Todeszeitpunkt und Todesursache zu ermitteln.

Die statistische Datensammlung wurde mit Microsoft® Excel 2000 vorgenommen, die Berechnung der Kaplan-Meier-Kurven erfolgte im Tumorzentrum Gera mit dem Software-Paket SPSS für Windows Version 11.5.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

In dieser Arbeit wurden 113 Patienten berücksichtigt, die im Department für Allgemeine, Viscerale und Kinderchirurgie der SRH Waldklinikum Gera gGmbH zwischen 1994 und 2000 einem pankreaschirurgischen Eingriff unterzogen wurden. Von jedem Patienten wurde ein Datenerhebungsbogen angelegt und nach vorliegenden anamnestischen Daten aus dem Krankenblatt, dem Operationsprotokoll, der Histologie und den Aufzeichnungen der chirurgischen Ambulanz, des Tumorzentrums Gera und den telefonisch kontaktierten Hausärzten ausgefüllt und zum Erhebungszeitpunkt ausgewertet. Abbildung 3 zeigt einen Überblick über die Altersgruppenverteilung im Patientenkollektiv. Der Median der Altersverteilung betrug 61 Jahre, der Range 35 bis 81 Jahre.

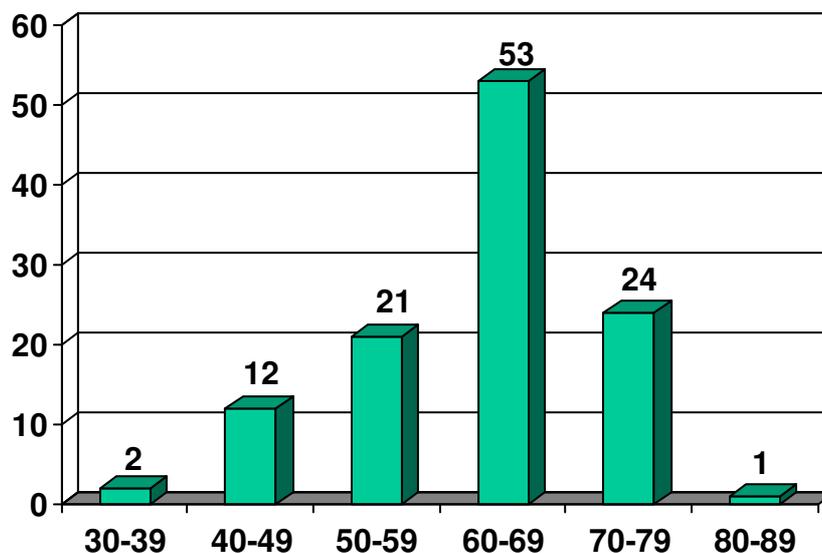


Abbildung 3: Altersgruppenverteilung im Patientenkollektiv

Die Patientenverteilung nach Geschlecht (weiblich/ männlich) betrug 51 zu 63 also 45 % zu 55 %. Für die Patienten konnten im Datenerhebungsbogen keine malignen Zweiterkrankungen registriert werden. Die Familienanamnesen waren in Bezug auf Malignomerkrankungen bei allen 113 Patienten negativ. 53 % der Patienten (n=60)

hatten vor Diagnostik des Pankreaskarzinoms einen Diabetes mellitus Typ 2 in der Anamnese angegeben. Präoperativ wurden alle Patienten zur Sicherung der Pankreaskarzinomerkrankung einer Abdomensonographie, einem Computertomogramm des Abdomens, einer Gastroskopie (bei Ikterus einer ERCP mit Gallengangsentlastung), nach Etablierung in unserer Klinik einer Endosonographie und einer Angiographie der Mesenterialgefäße zur Beurteilbarkeit der Resektabilität des Pankreaskarzinoms unterzogen.

Bei den durchgeführten Operationen konnte in 102 Fällen ein kurativer Ansatz verfolgt werden, bei 11 Patienten konnte nur eine palliative Operation durchgeführt werden. Sieben der elf Patienten hatten initial eine intraoperativ nachgewiesene Metastasierung der Leber und/oder der abdominellen Lymphknoten. Bei drei Patienten war das Karzinom wegen seiner Größe nicht vollständig resezierbar (R1-Resektion), bei einem weiteren Patienten konnte die unter kurativer Intention begonnene Operation wegen Blutungskomplikation nicht weitergeführt werden. Somit verblieb intraoperativ Tumorgewebe (R2-Resektion) und eine weitere palliative Behandlung schloß sich zwangsläufig an.

#### 4.2 Histologie der Pankreasresektate

Die erste Diagnose wurde intraoperativ durch die zytologische Untersuchung eines Feinnadelpunktats des Pankreas und durch Schnellschnittuntersuchung eines Resektates gestellt. Nach Eingang des zytologischen und histologischen Untersuchungsergebnisses konnte eine entsprechende Entscheidung hinsichtlich des operativen Eingriffes getroffen werden. Die postoperative Untersuchung des Pankreasresektates erfolgte in unserem Institut für Pathologie, um die Erstdiagnose des Schnellschnittergebnisses bzw. des Zytologiebefundes histologisch zu sichern. Eine Übereinstimmung des Schnellschnittergebnisses mit der postoperativen Histologie lag in allen Fällen vor. Die nachfolgende Tabelle stellt die histologische Aufarbeitung der Pankreasresektate in Zugehörigkeit zu den bekannten Karzinomgeweben dar.

**Tabelle 1: Histologische Aufarbeitung der Pankreasresektate (n=113)**

Adenokarzinom	103 (91 %)
Zystadenokarzinom	3 (2,6 %)
Neuroendokrines Karzinom	2 (1,8 %)
Adenosquamöses Karzinom	2 (1,8 %)
Pleomorphes Karzinom	1 (0,9 %)
Malignes Insulinom	1 (0,9 %)
Azinuszellkarzinom	1 (0,9 %)

In etwa 91 % der histologischen Aufarbeitungen war ein Adenokarzinom oder ein muzinöses Karzinom des Pankreas nachzuweisen, gefolgt vom Zystadenokarzinom und vom neuroendokrinen Karzinom. Eine weitere Einteilung der histologischen Befunde erfolgte nach dem Differenzierungsgrad des Karzinomgewebes. Die Gruppe der Einteilung G1 entspricht den gut differenzierten Karzinomgeweben, die Gruppe G2 den mittelgradig differenzierten und die Gruppe G3 dem schlecht differenzierten Karzinom. Dabei zeigten sich in der großen Gruppe der Adenokarzinome überwiegend mittelgradig- und schlecht differenzierte Gewebe.

**Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung nach dem Grading des Tumorgewebes**

Histologie	G1*	G2**	G3***	Gx
Adenokarzinom (n=103)	10	36	38	19
Zystadenokarzinom (n=3)	1		2	
Neuroendokrines Karzinom (n=2)	2			
Adenosquamöses Karzinom (n=2)	1		1	
Pleomorphes Karzinom (n=1)		1		
Malignes Insulinom (n=1)				1
Azinuszellkarzinom (n=1)		1		

\* gut differenziert    \*\* mittelgradig differenziert    \*\*\* schlecht differenziert

Die gewonnenen Pankreasresektate der Patienten wurden nach der histologischen Beurteilung im Institut für Pathologie zur Konservierung und Weiterbearbeitung in Paraffin eingebettet und archiviert.

### 4.3 Einteilung der Erkrankungsstadien nach UICC (2002)

Bei der präoperativen Betrachtung wurden alle Patienten nach den erhobenen Befunden der bildgebenden Diagnostik als resektabel eingestuft und mit kurativer Intention dem Operationsverfahren der Pankreasresektion zugeführt. Bei der klinischen Stadieneinteilung zum Operationszeitpunkt fand sich in der überwiegenden Anzahl (n=62) das Stadium III mit einer Tumorgöße über 2 cm und einer Infiltration der regionären Lymphknoten. Es mussten intraoperativ jedoch sieben Patienten mit einer Metastasierung der Leber dem Stadium IV B zugeordnet werden. Tabelle 3 gibt die klinische TNM-Stadieneinteilung aller 113 Patienten wieder.

**Tabelle 3: Einteilung der operierten Patienten mit malignem Pankreastumor (n=113) in TNM-Stadien nach UICC (2002)**

<b>Tumorstadien nach TNM</b>	<b>Patientenzahl (Prozentsatz)</b>
Stadium 0 (Tis, N0, M0)	-
Stadium I (T1-2, N0, M0)	15 (13 %)
Stadium II (T3, N0, M0)	19 (17 %)
Stadium III (T1-3, N1, M0)	62 (55 %)
Stadium IV A (T4, NX, M0)	10 (9 %)
Stadium IV B (TX, NX, M1)	7 (6 %)

### 4.4 Frühe Letalität und Todesursachen

Zehn der kurativ operierten Patienten mit duktalem Karzinom und ein Patient mit adenosquamösem Karzinom verstarben innerhalb der ersten 30 Tage nach Operation. 8 dieser Patienten waren R0-, zwei R1- und ein Patient R2-reseziert.

Ursachen für die frühe Letalität waren sechsmal Multiorganversagen, zweimal Herz-Kreislauf-Insuffizienz, einmal hämorrhagischer Schock und einmal Sepsis als Todesursache bei postoperativer intensivmedizinischer Betreuung aufgeführt. Ein Patient verstarb während der Operation. In Betrachtung der elf Fälle frühpostoperativer Letalität war für uns von Interesse, ob ein fortgeschrittenes Tumorstadium oder eine intraoperativ festgestellte Metastasierung als Komplikation für den intra- und postoperativen Verlauf eine Rolle spielten.

102 Patienten konnten nachstationär weiterbetreut werden. Die postoperative Nachsorge erfolgte über die chirurgische Ambulanz des Waldklinikums Gera in einem Abstand von jeweils 6 Monaten. Weitere Untersuchungsbefunde zum möglichen Rezidiv oder Tod des Patienten bei nicht wahrgenommenen Nachsorgeterminen wurden über die betreuenden Hausärzte oder Onkologen angefordert und in den Datenerhebungsbögen dokumentiert.

#### 4.5 Tumorstadien und Überlebenszeit der palliativ behandelten Patienten

Bei allen 113 Patienten erfolgte präoperativ ein kurativer Behandlungsansatz zur Resektion des Pankreaskarzinoms mit entsprechender Aussage in der Diagnostik zum Ausschluß von Metastasen und ausgedehnten Tumordinfiltrationen. Intraoperativ musste jedoch in 7 Fällen eine Metastasierung der Leber festgestellt werden, bei 3 Patienten wurde intraoperativ eine Tumorausdehnung festgestellt, die letztendlich in der beweisenden histologischen Aufarbeitung der Resektionsränder eine R0-Resektion unmöglich gemacht hatte. Bei einem Patienten musste eine kurative Resektion wegen Blutungskomplikationen abgebrochen werden. In den beschriebenen Fällen handelt es sich um 12 R1-Resektionen und 9 R2-Resektionen, wobei Tumor- oder Metastasengewebe postoperativ verblieben ist. Somit handelt es sich in der weiteren Betrachtung um Patienten mit palliativer Behandlung.

Als signifikanter Einflussfaktor auf das Überleben erwies sich die Histomorphologie des Tumors.

#### 4.6 Überlebenszeiten der resezierten Pankreaskarzinompatienten

Es wurden die Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier ermittelt. Dabei wurde auf Informationen der behandelnden Hausärzte, Onkologen und des Tumorzentrums Gera zu registrierten Todesfällen zurückgegriffen. Im retrospektiven Betrachtungszeitraum von 1994 bis zum November 2004 waren bereits 105 Patienten verstorben.

Es überlebten nur 51 Patienten die ersten 12 Monate, 62 verstarben innerhalb dieses Zeitraumes. 11 Todesfälle machten die Patienten mit früher Letalität innerhalb der ersten 4 Wochen nach der Operation aus. Auch die überwiegende Zahl der palliativ behandelten Patienten verstarb innerhalb der ersten 12 Monate.

Als Zielereignis wurde entweder der Tod des Patienten oder - nach R0-Resektion – das Wiederauftreten von Tumor als lokoregionäres Rezidiv oder hämatogene Metastasierung gewertet. Bei allen Patienten liegen Informationen hinsichtlich des Überlebens vor, die Informationen über den Tumorstatus konnte von 3 Patienten nicht erhoben werden.

Das beobachtete Überleben des Gesamtkollektivs von 113 Patienten wird in der nachfolgenden Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Das mediane Überleben der Patienten betrug 11 Monate. Die 5-Jahresüberlebensrate betrug 5,8 %.

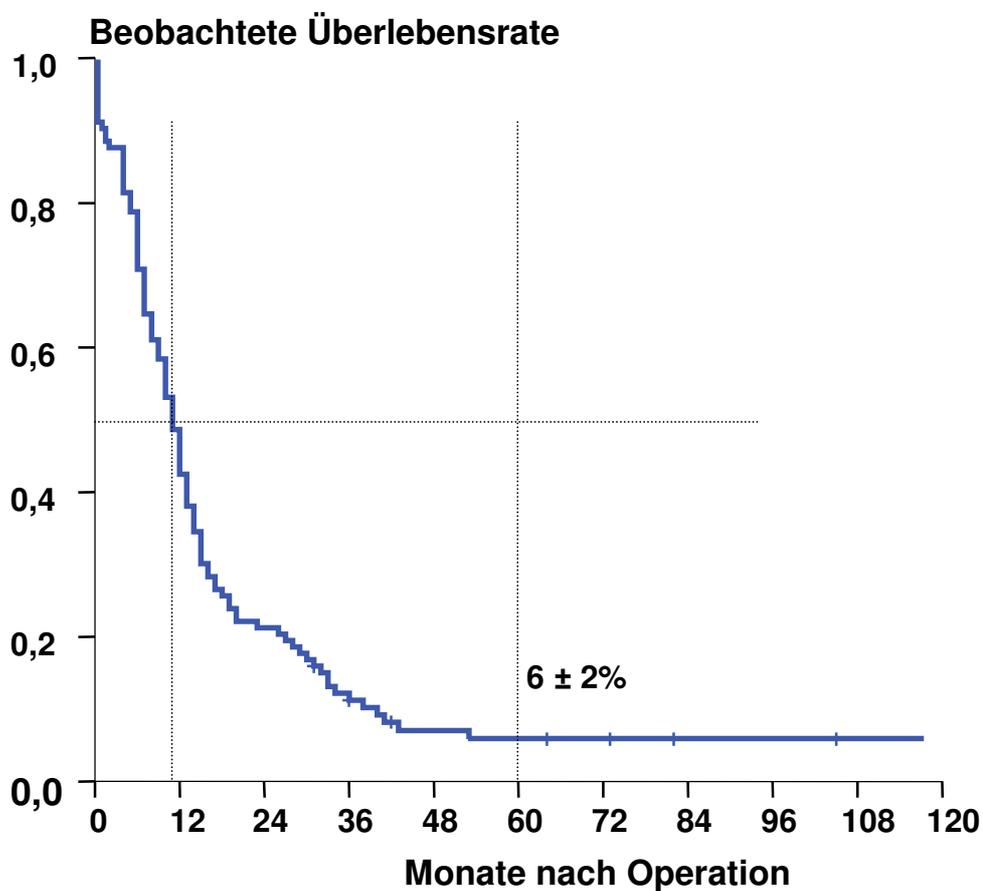


Abbildung 4: Darstellung der Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs (n=113).

Um einen besseren Vergleich der Daten zu führen wurden die Karzinome in die histologischen Gruppen der duktaalen (n=103) und nicht-duktaalen Karzinome (n=10) eingeteilt.

Die Überlebensraten beim nicht-duktaalen Karzinom sind signifikant höher als beim duktaalen Adenokarzinom. Beim nicht-duktaalen Karzinom (n=10) überlebten 2 Patienten 5 Jahre bei einem medianen Überleben von 29 Monaten, beim duktaalen Karzinom (n=103) 3 Patienten. Das mediane Überleben betrug für diese Patientengruppe 11 Monate. Die Darstellung erfolgt in Abbildung 5 (p=0,013).

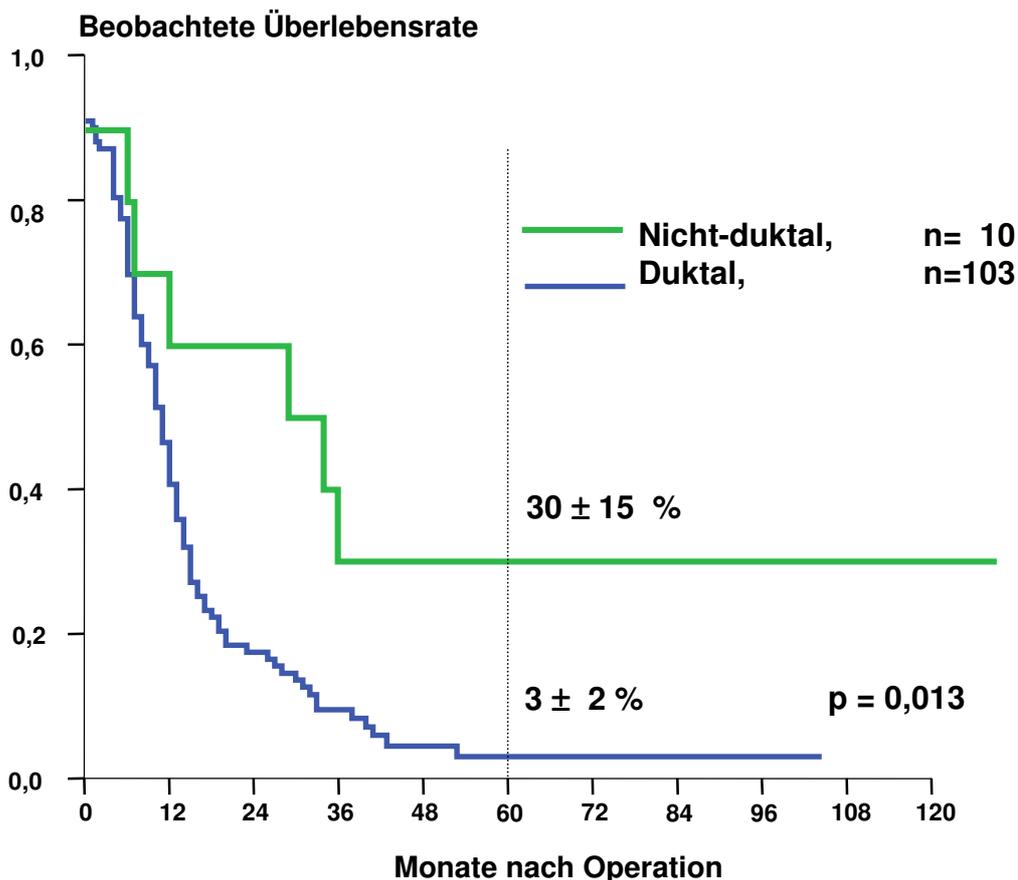


Abbildung 5: Überlebensraten der Patienten mit duktaalem und nicht duktaalem Pankreaskarzinom.

Dieser Effekt bleibt bei der Darstellung in Abbildung 6 nach Ausschluß der Patienten mit Operationsletalität (früher Letalität) erhalten. Das mediane Überleben der Patienten mit duktalem Karzinom betrug hier 12 Monate, das der Patienten mit nicht duktalem Karzinom wurde mit 34 Monaten berechnet ( $p=0,01$ ).

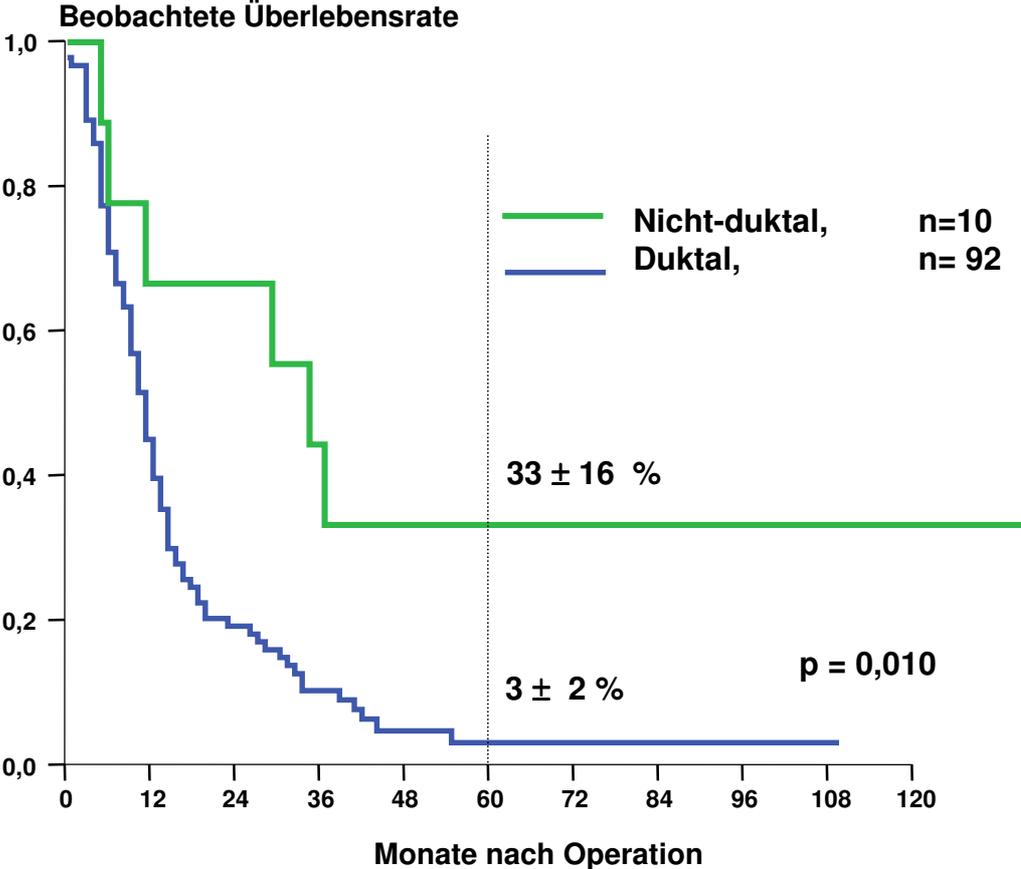


Abbildung 6: Überlebensraten der Patienten mit duktalem und nicht duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der Operationsletalität.

Die Überlebensraten aller Patienten, ausschließlich derer mit früher Letalität, unterschieden sich je nach R-Klassifikation. Die medianen Überlebenszeiten bei R2-, R1- und R0-Resektion betragen 6, 7 und 12 Monate respektive. Die Darstellung erfolgt in Abbildung 7. Die 5-Jahreüberlebensrate betrug bei den R0-resezierten Patienten 6,5 %, bei den R1-resezierten 10 %. Bei den R2-resezierten Patienten waren nach 15 Monaten alle verstorben. Es fand sich ein signifikanter Vergleich zwischen R0 und R2 ( $p=0,005$ ). Kein signifikanter Vergleich konnte zwischen R0 und R1 ( $p=0,5$ ) und R1 und R2 ( $p=0,196$ ) gefunden werden.

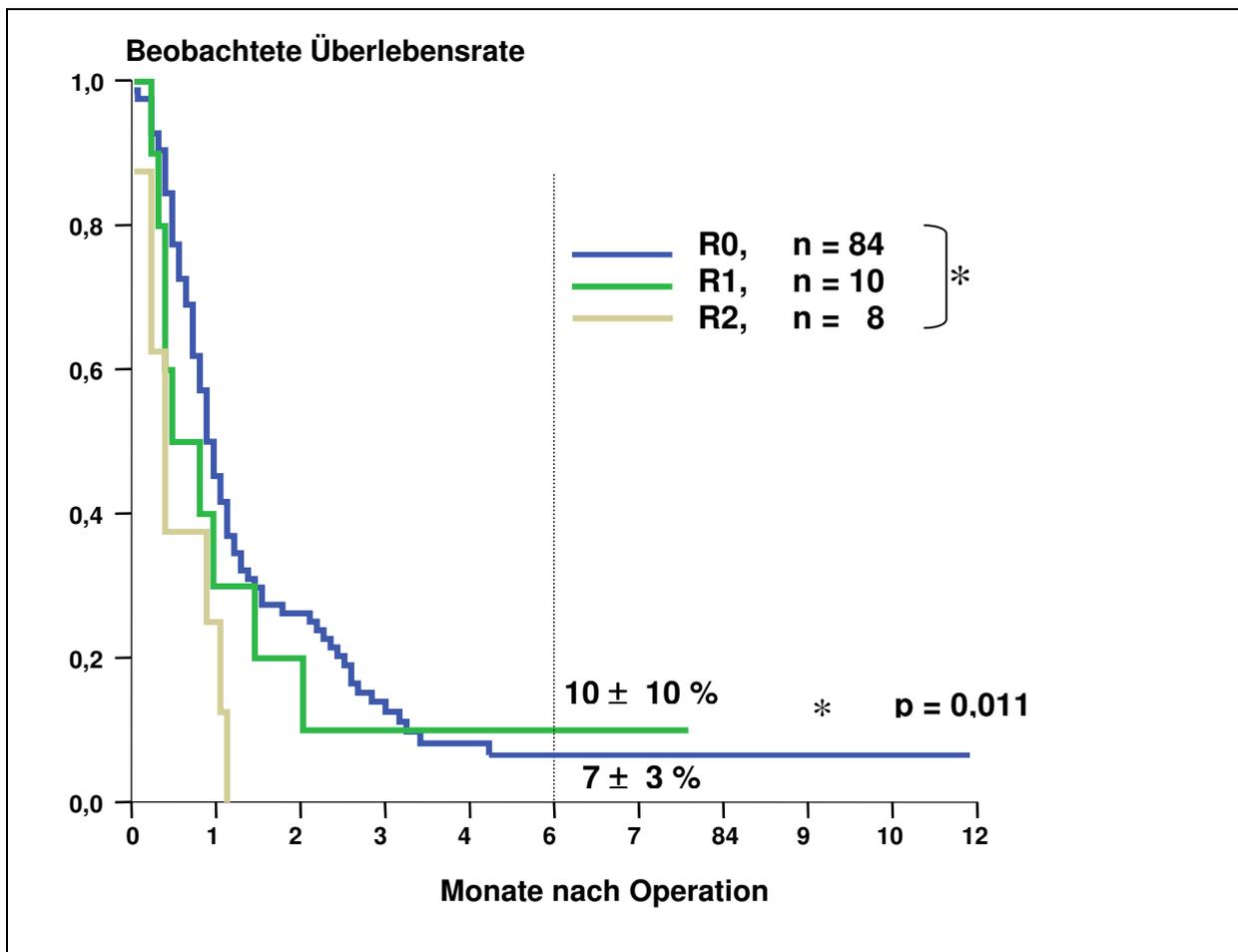


Abbildung 7: Überlebensraten der Patienten mit duktalem und nicht duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach R-Klassifikation.

Bei der Betrachtung der Überlebensfunktion duktaler Karzinome nach R-Klassifikation fand sich kein Langzeitüberlebender nach unradikaler Tumorentfernung (Abbildung 8).

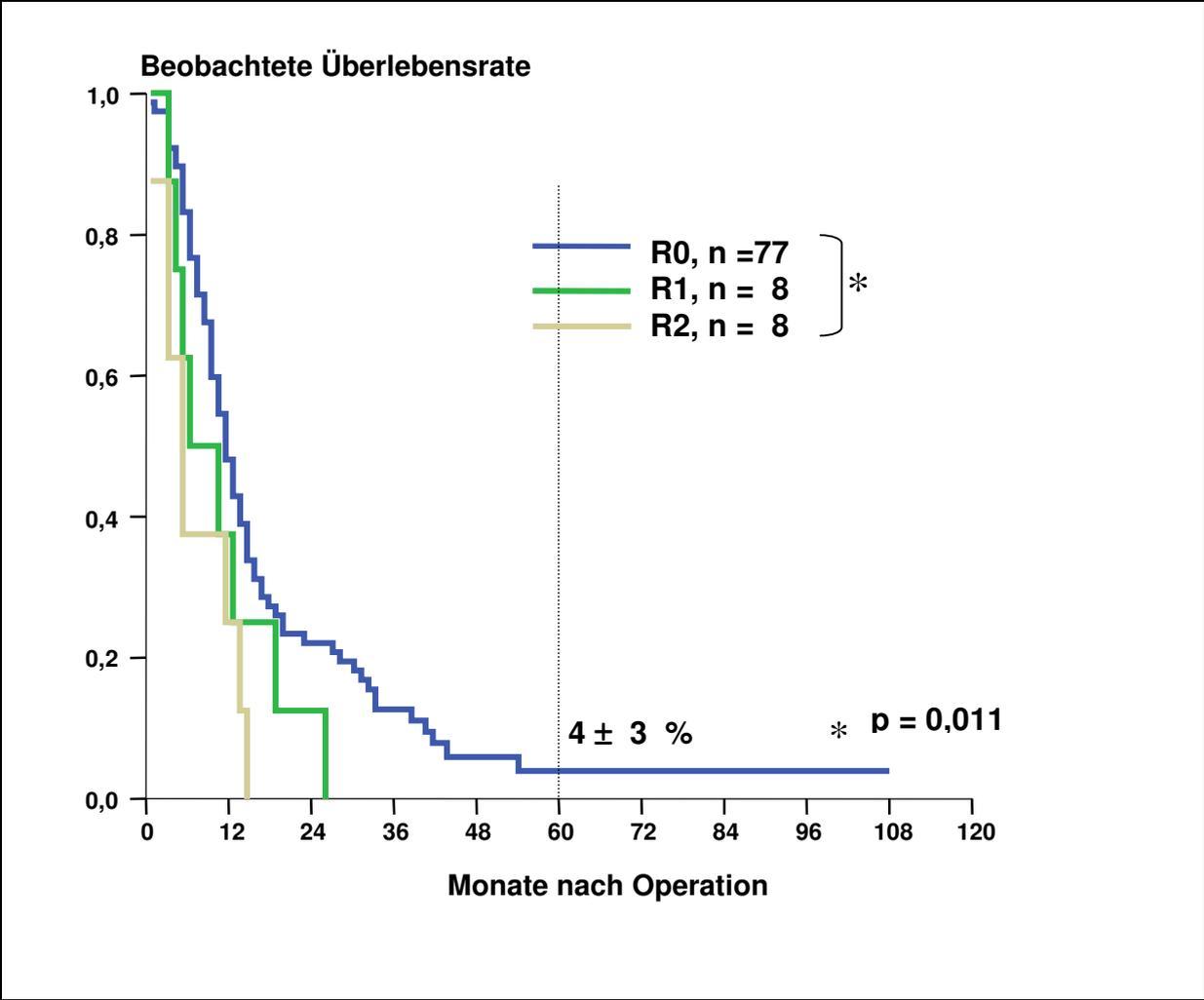


Abbildung 8: Überlebensraten der Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach R-Klassifikation.

Tumorbiologische Einflussfaktoren wurden für die R0-resezierten Patienten mit duktalem Karzinom unter Ausschluß der Frühletalität untersucht.

Beim duktalem Karzinom zeigten sich unter Berücksichtigung der pT-Kategorie mediane Überlebenszeiten von 12 Monaten bei pT1, 13 Monaten beim Stadium pT2, 15 Monaten beim Stadium pT3 und 7 Monate beim pT4-Tumor. Die Darstellung erfolgt in Abbildung 9. Ein statistisch signifikanter Unterschied fand sich zwischen T1 und T4 ( $p=,023$ ), T2 und T4 ( $p=0,000$ ) und T3 und T4 ( $p=0,001$ ).

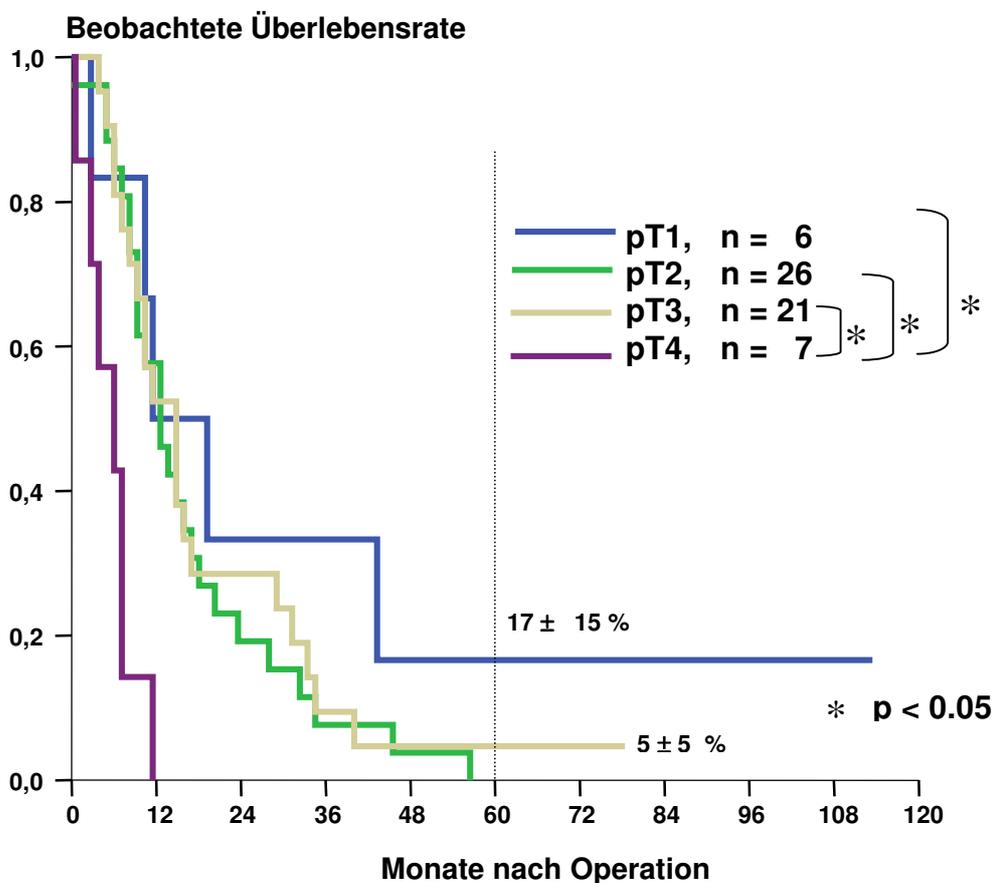


Abbildung 9: Überlebensraten der Patienten mit duktalem R0-reseziertem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach pT-Kategorie.

Bei 17 Patienten lagen keine genauen Angaben über die Tumorklassifikationen vor und wurden deshalb in der Abbildung nicht berücksichtigt.

In Abbildung 10 werden die Überlebenszeiten hinsichtlich des Lymphknotenbefalles für die Patienten mit duktalem Karzinom ohne frühe Letalität dargestellt. Es ergaben sich mediane Überlebenszeiten von 15 Monaten für die Kategorie pN0 und 12 Monate für pN1 ( $p=0,071$ ).

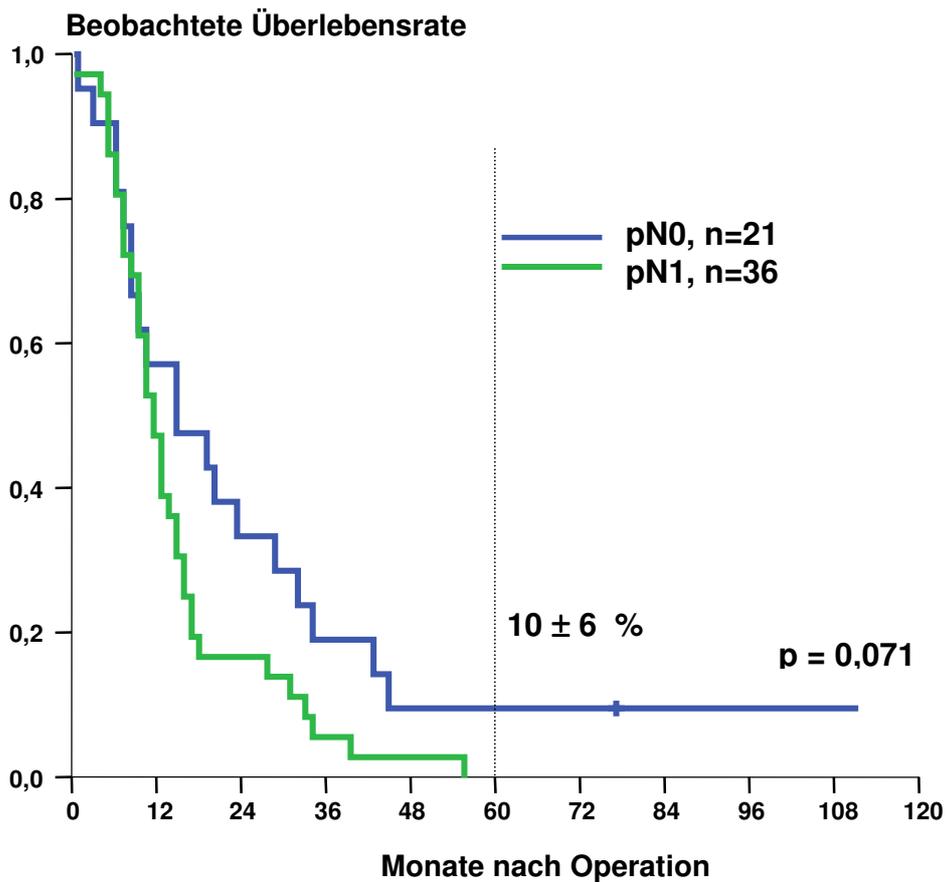


Abbildung 10: Überlebensraten der Patienten mit duktalem R0-reseziertem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach pN-Kategorie.

Einen statistisch signifikanten Einfluß auf die Überlebensraten hatte der Nachweis synchroner Fernmetastasen in der Leber (Abbildung 11). Patienten mit duktalem Karzinom mit Metastasierungen hatten ein medianes Überleben von 4 Monaten. Patienten ohne Metastasierung hatten ein medianes Überleben von 12 Monaten bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 3,5% ( $p=0,000$ ). Bei den Patienten mit Metastatsierung waren nach 12 Monaten alle verstorben.

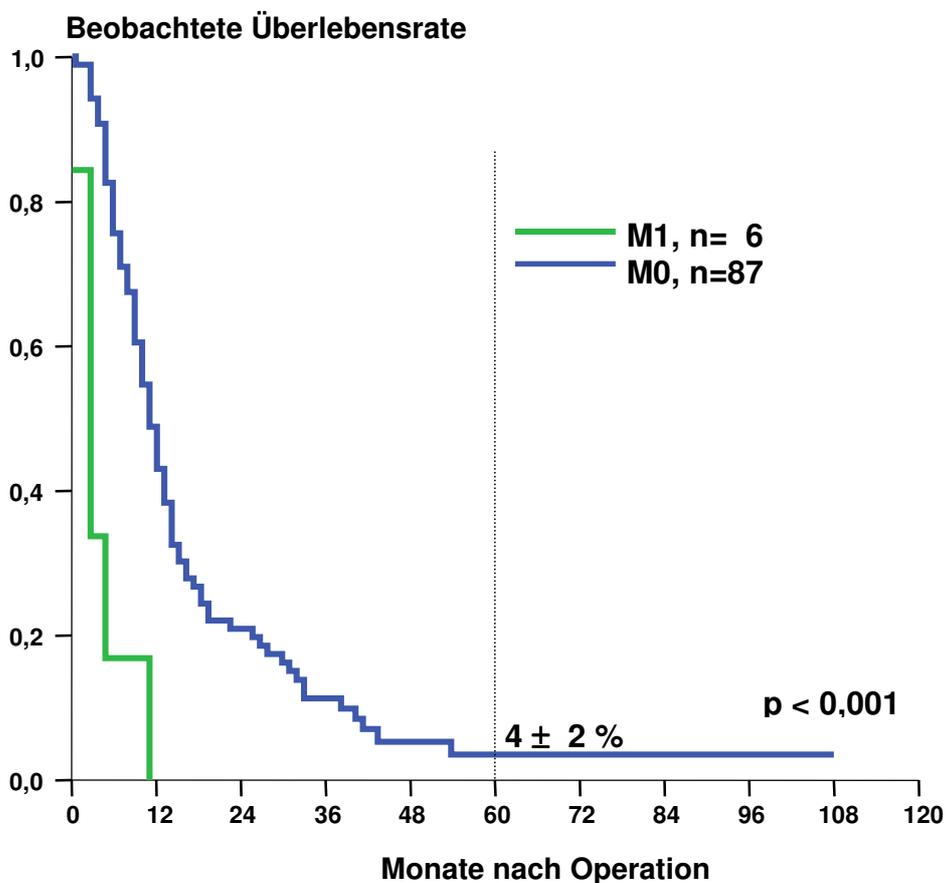


Abbildung 11: Überlebensraten der Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach M-Kategorie.

In der Betrachtung des Überlebens unter Berücksichtigung des Gradings der R0-resezierten dukalen Karzinome ergaben sich mediane Überlebenszeiten für G1 mit 15 Monaten, G2 mit 13 Monaten und G3 mit 11 Monaten. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich zwischen G1 und G2 ( $p=0,013$ ), G1 und G3 ( $p=0,041$ ), aber nicht zwischen G2 und G3 ( $p=0,827$ ) (Abbildung 12).

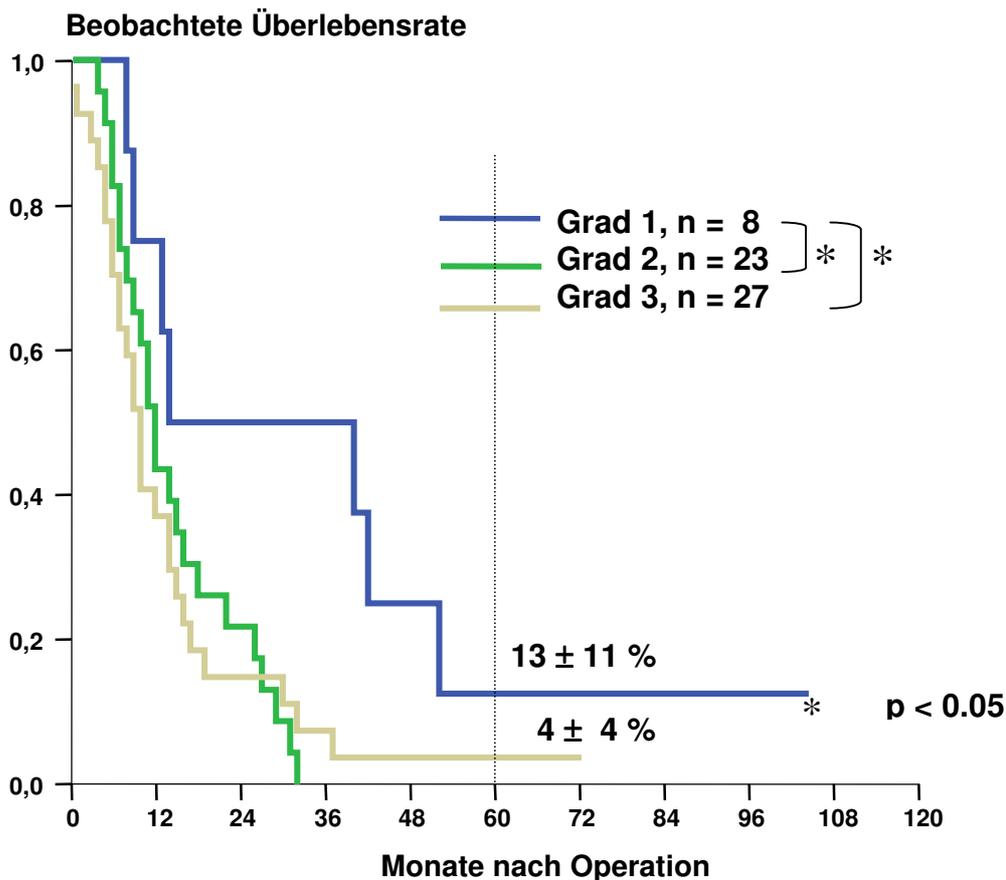
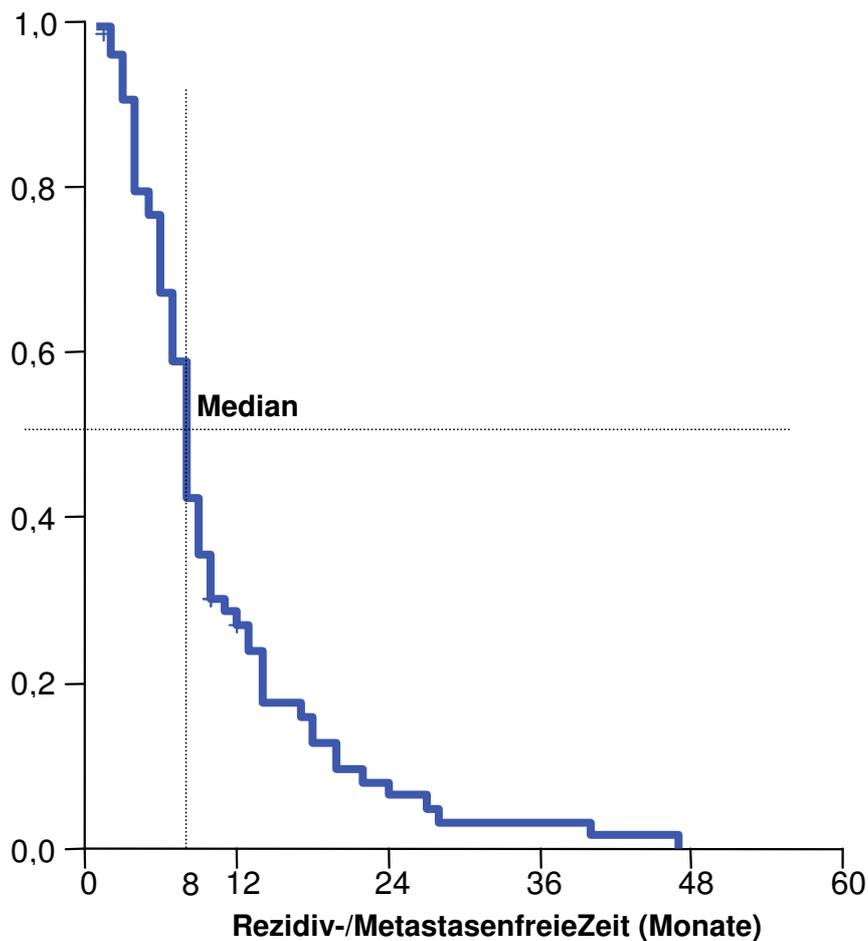


Abbildung 12: Überlebensraten der Patienten mit dukalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach Malignitätsgrad.

Das Grading war nur für die oben aufgeführte Anzahl an Patienten mit dukalem Pankreaskarzinom ( $n=58$ ) eindeutig bestimmt. Ebenso waren Angaben über die Tumorklassifikation und Lymphknotenbefall nicht klar beschrieben und nachvollziehbar. Eingang in die Auswertung fanden daher nur eindeutig zuordnungsfähige Aussagen.

#### 4.7. Rezidiv- und metastasenfreie Zeit

Im postoperativen Beobachtungszeitraum der Patienten wurde von uns das Zeitintervall bis zum Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Metastasierung festgehalten. In den meisten Fällen lagen entsprechende Nachweise mittels Oberbauchsonographie oder Abdomen-Computertomographie vor. In wenigen Fällen wurde eine Peritonealkarzinose oder ein Lokalrezidiv bei zunehmender Kachexie und Aszites klinisch angenommen, wenn die Patienten wegen ihres schlechten Allgemeinzustandes keiner bildgebenden Diagnostik mehr unterzogen werden konnten. Als Grundlage dienten uns die Befunde der jeweiligen bildgebenden Nachweisverfahren (Computertomographie, Sonographie, Röntgenaufnahmen), die bei der ambulanten Betreuung der Patienten durch den Hausarzt angefertigt wurden. Ein Patient verstarb durch Suizid nach 5 Monaten. Bei allen anderen verstorbenen Patienten steht als Todesursache die maligne Tumorerkrankung fest. In den uns vorliegenden Daten der nachbetrachteten Patientenkollektive lagen die Zeiträume bis zum Auftreten einer Metastasierung und/oder eines Lokalrezidives zwischen 2 und 31 Monaten. Im Median traten Lokalrezidive und Metastasen nach 8 Monaten auf (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Rezidiv-/Metastasenfreie Zeit für alle Patienten mit R0-reseziertem duktalem Pankreaskarzinom (n=74).

#### 4.8 Verteilung der Metastasierungen

Die häufigste Metastasierung tritt bekannterweise in der Leber auf, gefolgt von einer peritonealen Metastasenaussaat. Keine Rolle spielten insgesamt Lungen- und Knochenmetastasen (n=3 bzw. n=2). Mehrfachnennungen bei der Metastasierung sind in einigen Fällen bei kombinierten Aussaaten, zum Beispiel in Leber und Peritoneum, vorgekommen. Die intraoperativ festgestellten Metastasen der oben genannten palliativ behandelten Patienten sind hier nicht enthalten. Angaben von 93 Patienten wurden bei dieser Erhebung berücksichtigt und in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4:** Häufigkeitsverteilung der erfassten Metastasierungen im Follow up

<b>Art der Metastasen</b>	<b>Nachgewiesene Häufigkeit der Metastasierung</b>
Lebermetastasen	43
Peritonealkarzinose	36
Lungenmetastasen	3
Knochenmetastasen	2

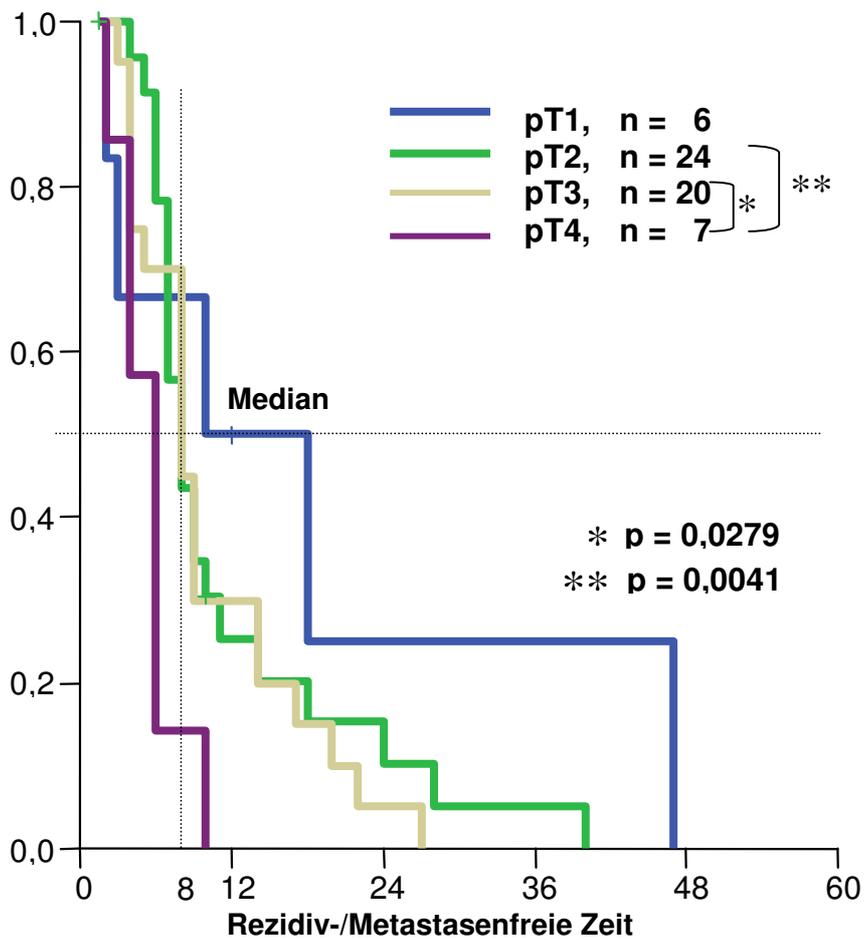
**4.9 Rezidiv- und metastasenfreie Zeit der Patienten mit positivem HER2-Status**

Ein besonderes Augenmerk hatten wir dabei auf die Patienten mit positivem HER2-Status (n=21) gelegt. In einem Fall lag ein Zustand nach R1-Resektion vor. Zwei Patienten fielen aus der Betrachtung wegen früher Letalität heraus. Bei 2 Patienten lagen keine Angaben zu einem möglichen Rezidiv oder dem Auftreten von Metastasen vor. Metastasen oder Rezidive wurden bei Patienten mit positivem HER2-Status in einer Streuung von einem Monat bis zu 27 Monaten beobachtet (siehe Tabelle 5). Durchschnittlich traten Rezidive und Metastasen (durch bildgebende Verfahren wie Sonographie und Computertomogramm gesichert) bei allen berücksichtigten Patienten nach 11 Monaten auf.

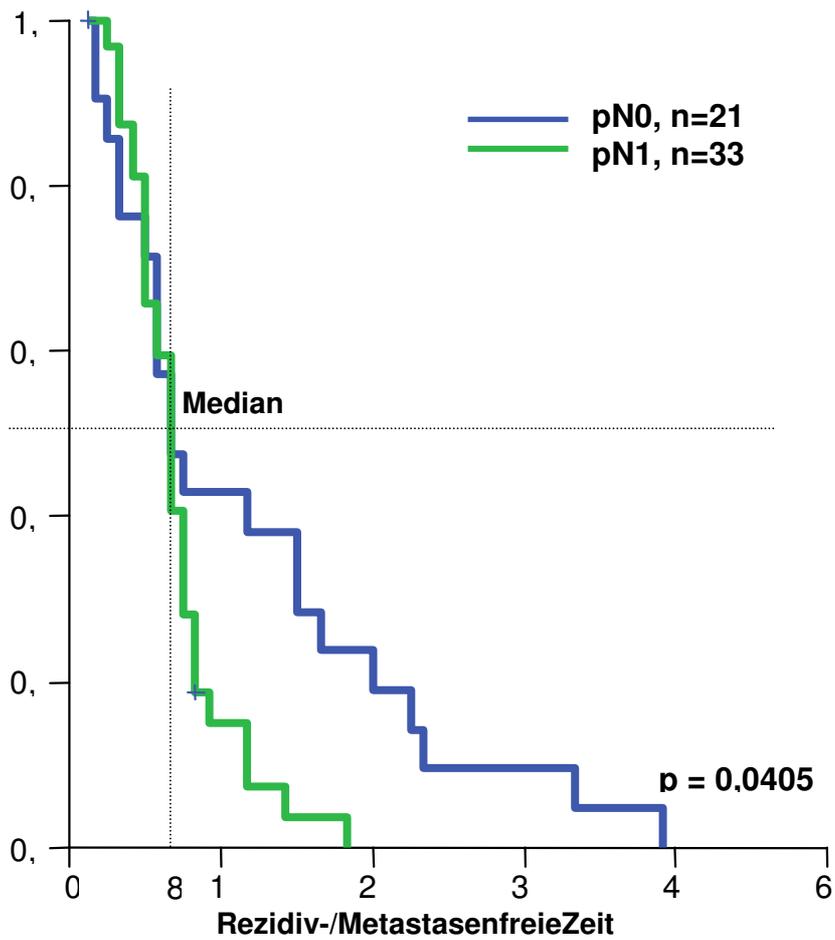
**Tabelle 5:** Verteilung von Rezidiv und Metastasierung bei Patienten mit positivem HER2-Status

<b>HER2-Status immunhistochemisch</b>	<b>Zeitpunkt Rezidiv/Metastase</b>	<b>Medianes Auftreten von Rezidiv/Metastase</b>
Schwach positiv (+1) n=11	1-27 Monate	12 Monate
Positiv (+2) n=4	6-10 Monate	7 Monate
Positiv (+3) n=1	12 Monate	12 Monate

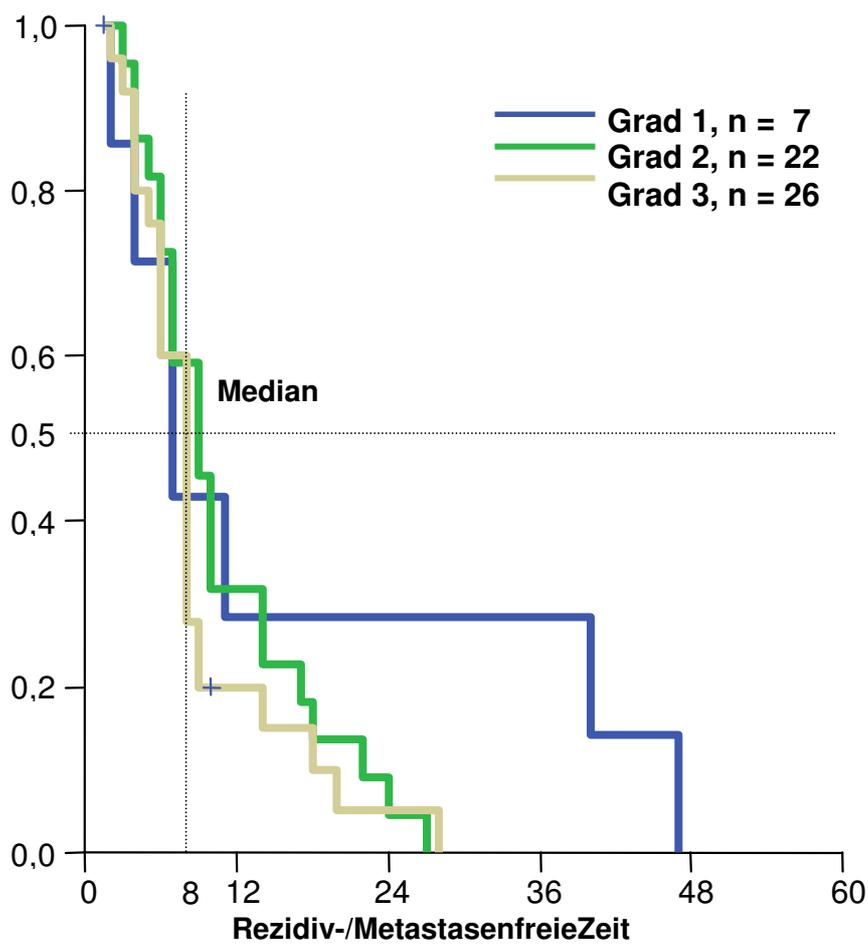
In den Abbildungen 14 bis 16 werden die rezidiv/ metastasenfreien Zeiten in Abhängigkeit von pT-, pN-Kategorie und vom Malignitätsgrad dargestellt.



**Abbildung 14:** Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfreien Zeit in Abhängigkeit von der pT-Kategorie des duktales, R0-resezierten Pankreaskarzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität.



**Abbildung 15:** Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfremen Zeit in Abhängigkeit von der pN-Kategorie des duktafen, R0-resezierten Pankreas-karzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität.



**Abbildung 16:** Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfreien Zeit in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad des duktales, R0-resezierten Pankreas-karzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität.

#### 4.10 Immunhistochemischer Nachweis von HER2

Der immunhistochemische Nachweis von HER2 wurde an allen 113 Pankreasresektaten, die im immunhistochemischen Labor des pathologischen Instituts der Charite Berlin in Form von paraffineingebetteten Blöckchen vorlagen, durchgeführt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Nachweismethode der HER2-Expression wurde durch zwei unabhängig arbeitende Pathologen unter dem Lichtmikroskop nach der Einteilung aus dem „Atlas for Interpretation of HercepTest™ Staining“ (DAKO-Broschüre NR.20210) und durch Vergleich mit den mitgelieferten Referenzschnitten des Mammakarzinoms vorgenommen. Dabei ließen sich in insgesamt nur 5 Fällen von 113 Expressionen von +2 und +3 als positiver Rezeptorstatus nach den Einteilungskriterien des Hercep -Testes™ nachweisen (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Verteilung der HER2-Protein-Expression aus den Pankreaskarzinomresektaten mittels Immunhistochemie (Hercep-Test™) (n=113)**

<b>HER2-Status immunhistochemisch</b>	<b>Anzahl</b>
Negativ	92
Schwach positiv (+1)	16
Positiv (+2)	4
Stark positiv (+3)	1

#### 4.11 Überlebenszeit der Patienten mit immunhistochemisch positivem HER2-Status

In unseren statistischen Berechnungen wurden auch die Patienten mit schwach positivem HER2-Nachweis (+1) mit einbezogen, um alle färbetechnisch positiv getesteten Patienten zu berücksichtigen. Dies sind 16 Patienten mit dem Färbescore +1 und 5 Patienten mit den Färbescores +2 und +3.

Bei den Patienten mit positivem HER2-Nachweis (+2 und +3) lagen die Überlebenszeiten zwischen 6 Monaten und > 60 Monaten, wobei 2 Patienten zum Erhebungszeitpunkt noch lebten. Die beiden HER2 (+2) Patienten, die zum Erhebungszeitpunkt im November 2004 verstorben waren, hatten dabei ein

Überleben von 48 Monaten, der eine HER (+3)-Patient eine Überlebenszeit von 15 Monaten.

In der Gruppe mit schwach positivem HER2-Nachweis (n=16) wurden 2 Patienten mit früher Letalität innerhalb der ersten 4 Wochen registriert. Ein Patient mit einer Überlebenszeit von 6 Monaten war in die Gruppe der palliativ Operierten einzuordnen, da er ein lokal inoperables Pankreaskarzinom ohne Metastasennachweis hatte. Die Überlebenszeiten in dieser Gruppe rangierten zwischen 4 und 27 Monaten. Die mediane Überlebenszeit der HER2-positiven Patienten lag bei 12 Monaten gegenüber einer medianen Überlebenszeit der HER2-negativen Patienten von 11 Monaten. Statistisch ließ sich daraus eine mediane Überlebenszeit für das Gesamtkollektiv (n=113) von 11 Monaten ermitteln. Nachfolgende Abbildung 17 zeigt die Überlebenskurven der Patienten mit positivem und negativem HER2-Status.

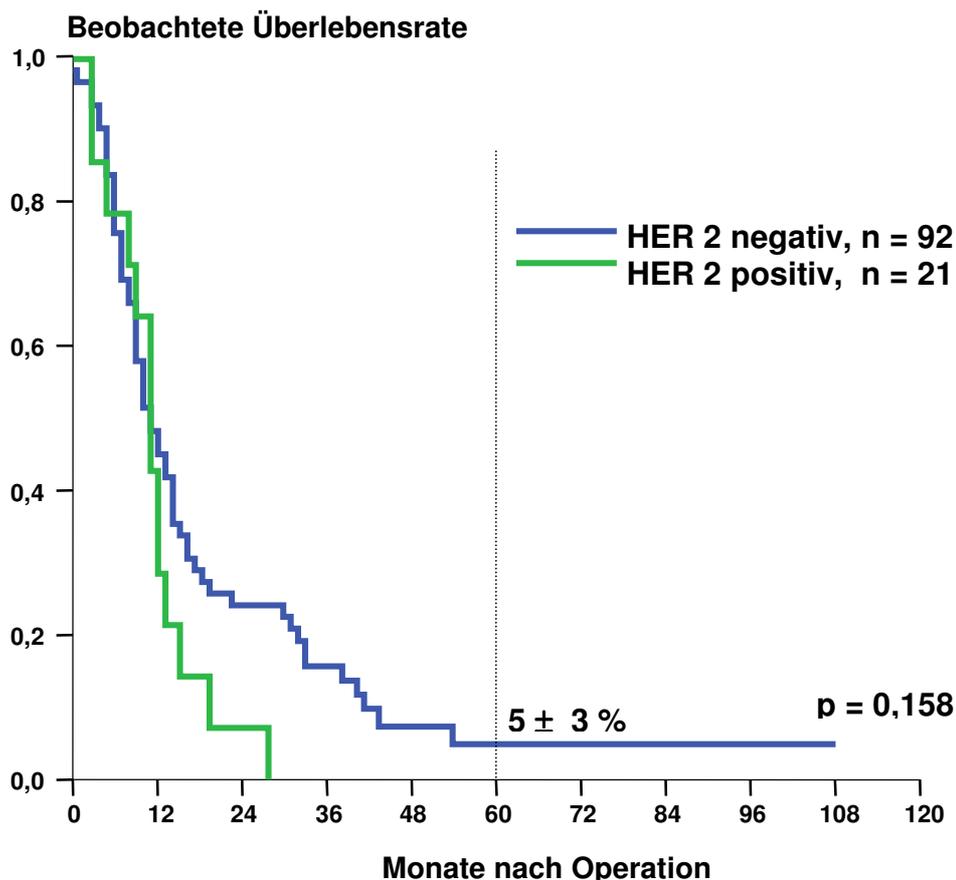
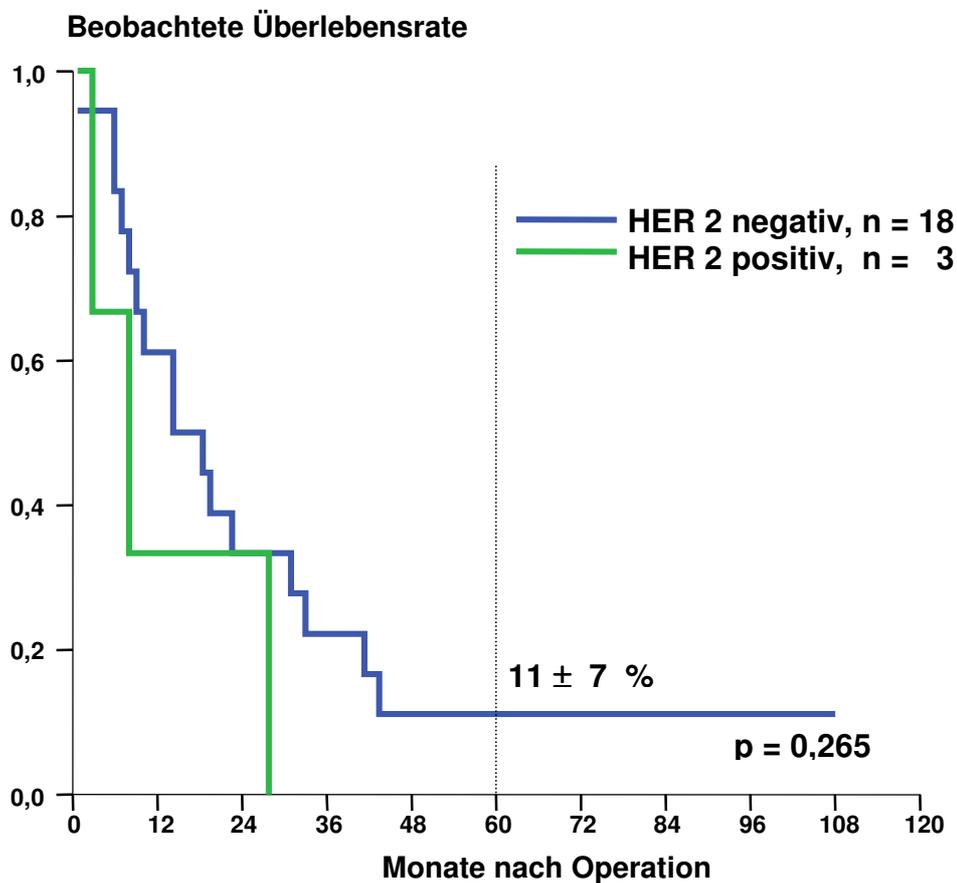


Abbildung 17: Vergleichende Darstellung des Überlebens bei Patienten mit HER2-positivem und HER2-negativem Rezeptorstatus (p=0,07).

In der Betrachtung der Überlebenszeiten der Patienten mit ductalem Pankreaskarzinom und positivem und negativem HER2-Rezeptorstatus ohne Patienten mit früher Letalität ergab sich ein medianes Überleben von 12 Monaten. Für die HER2-positiven Patienten konnte eine mediane Überlebenszeit von 13 Monaten, für die Patienten mit negativem HER2-Rezeptorstatus eine mediane Überlebenszeit von 11 Monaten ermittelt werden. Abbildung 18 gibt die Überlebenszeiten dieser Patienten wieder.



**Abbildung 18:** Vergleichende Darstellung des Überlebens bei Patienten mit HER2-positivem und HER2-negativem Rezeptorstatus des ductalen, R0-resezierten Pankreaskarzinoms, pN 0, unter Ausschluss der postoperativen Letalität.

Bei vergleichender Darstellung der rezidiv-/metastasenfreien Zeit von HER2-positiven und HER2-negativen Patienten konnten 110 Patienten berücksichtigt werden. Bei 3 Patienten gab es keinerlei Angaben zu Metastasen oder zu einem Rezidiv. Diese Patienten waren zum Erhebungszeitpunkt im November 2004 verstorben. Weiterhin wurden die 11 Patienten mit früher Letalität nicht berücksichtigt.

Für die HER2-positiven Patienten konnten in der medianen Berechnung Rezidive oder Metastasen nach 12 Monaten, bei den HER2-negativen Patienten nach 8 Monaten festgestellt werden. Das mediane Auftreten von Metastasen oder Rezidiven konnte bei 8 Monaten für das gesamte Patientenkollektiv ohne Patienten mit früher Letalität ermittelt werden. Abbildung 19 zeigt die rezidiv- und metastasenfreie Zeit für Patienten mit R0-Resektion des duktaalen Pankreaskarzinoms mit Ausschluß der postoperativen Letalität und unter Berücksichtigung des HER2-Status.

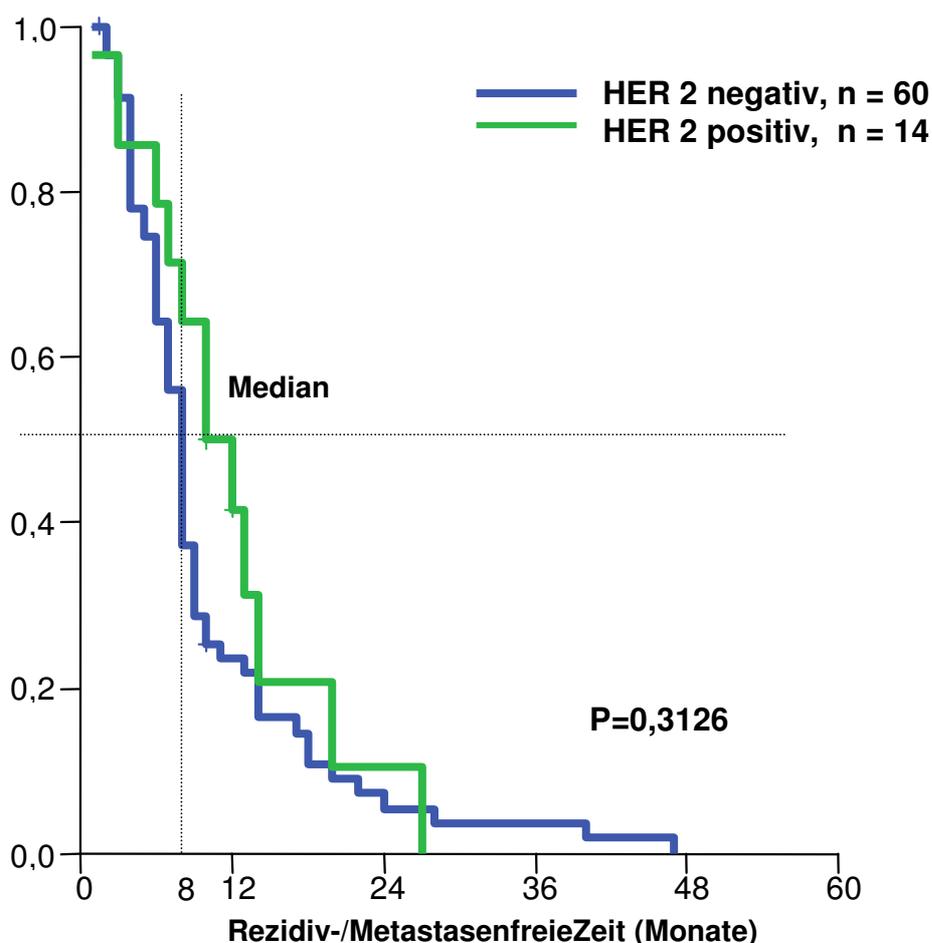


Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfreien Zeit bei HER2-positivem und HER2-negativem Rezeptorstatus des duktaalen, R0-resezierten Pankreaskarzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität .

Bei Berücksichtigung der Patienten mit früher Letalität ergaben sich statistisch keine Veränderungen an den medianen Zeiten des Auftretens von Metastasen und Rezidiven mit 12 Monaten für die HER2-positiven und 8 Monaten bei den HER2-negativen Patienten.

## 5. Diskussion

Ausgangspunkt für unsere Arbeit waren die wissenschaftlichen Erkenntnisse und Fortschritte zur Behandlung des Mammakarzinoms mit Herceptin® bei Patienten mit positivem HER2-Status. Herceptin®, als ein Ligand für den HER2-Rezeptor, hat eine positive Auswirkung auf den klinischen Verlauf bei der Mammakarzinombehandlung genommen und ist inzwischen ein fester Bestandteil der Therapie des Mammakarzinoms geworden. Der Nachweis von HER2 in anderen Karzinomgeweben führte zur Hoffnung, dass dieser therapeutische Erfolg auch auf mehrerer andere Karzinomtypen anzuwenden ist.

Bei der Behandlung des Mammakarzinoms hat sich in der Vergangenheit der immunhistochemische Nachweis des HER2-Rezeptors zum Standardvorgehen bei der Entscheidung zu einer weiterführenden Therapie entwickelt (38). Bei 30 % der Patienten kann im Karzinomgewebe eine HER2-Überexpression nachgewiesen werden, die zu 90 % mit einer erhöhten Genamplifikation einhergeht (74). Der HercepTest™ der Firma „Dako“ wird dabei wegen seiner generellen Verfügbarkeit als einziges standardisiertes Nachweisverfahren verwendet (84).

Seit 1998 liegt für die Behandlung des Mammakarzinoms mit der Substanz Trastuzumab ein humanisierter Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors als ein potentiell Therapeutikum bei HER2-überexprimierendem Tumorgewebe vor.

Nach Bindung an den HER2-Rezeptor können HER2-vermittelte Proliferationsreize in der Tumorzelle blockiert werden (76).

Aus dem Nachweis der Überexpression des HER2-Rezeptors konnte beim Mammakarzinom einerseits auf die Wirksamkeit der Chemotherapie mit Trastuzumab, andererseits auf eine schlechtere klinische Prognose und frühe Metastasierung gefolgert werden (2,74,88).

Auch in anderen Karzinomgeweben konnte in mehreren Studien eine HER2-Überexpression nachgewiesen werden, wie z.B. beim Ovarialkarzinom, bei Karzinomen des Gastrointestinaltraktes, dem Bronchialkarzinom und Adenokarzinom des Pankreas (16,27,41,75).

Mehrere Arbeiten stützten sich auf die These, neben dem Mammakarzinom auch andere maligne Tumoren bei nachweislicher Überexpression von HER2 mit einem Chemotherapeutikum erfolgreich behandeln zu können und schlugen vor, eine

prognostische Einschätzung des klinischen Verlaufes (Überlebenszeit, Metastasierung) vorzunehmen und den immunhistologischen HER2-Nachweis als Routineuntersuchung, unter anderem auch beim Pankreaskarzinom, zu etablieren (15,28,71,89).

In vielen Arbeiten der letzten Jahre wurden nur kleine Patientenkollektive ausgewertet (10,46) oder Studien an Tumorzelllinien (87) des Pankreaskarzinoms vorgenommen.

1989 beschreibt Cohen eine Überexpression des HER2-Proteins mittels Radioimmunpräzipitation bei 3 von 6 Pankreaskarzinomzelllinien (8).

Magiure und Mitarbeiter untersuchten 120 Karzinomzelllinien auf Überexpression von HER2 und fanden dabei Überexpressionen in Adenokarzinomen der Mamma (7 von 15), des Kolons (3 von 10) und des Pankreas (3 von 6) (50). Mittels Immunpräzipitation und Immunperoxidasereaktion untersuchte die Arbeitsgruppe um Williams Zelllinien des Adenokarzinoms des Pankreas auf eine Expression von HER2. 3 von 6 Zelllinien zeigten eine Überexpression des Proteins (87). In 2 der Zelllinien konnte eine Genamplifikation mittels Southern Blot bestätigt werden.

Bei der Aufarbeitung von 23 paraffineingebetteten Pankreaskarzinompräparaten (Adenokarzinome) zeigten 15 signifikant erhöhte Expressionsraten des HER2-Proteins mittels immunhistochemischen Verfahrens (verwendete Antikörper: monoclonal antibody OM-11-952, c-neu Ab-3 monoclonal antibody) (87). Die Autoren schlossen daraus, dass bei nachweisbarer Überexpression des HER2-Proteins an bestimmten Pankreaskarzinomzellen alle Tumorzellen betroffen sind und dies ein uniformer Marker für das gesamte Karzinomgewebe einer Probe eines Patienten sein könnte. Es bestünde die Möglichkeit, dies als Ansatz zur Immundiagnostik oder zu immuntherapeutischen Strategien beim Pankreaskarzinom zu nutzen.

Um diese Aussagen fundiert zu betrachten, wäre ein einheitliches und standardisiertes Verfahren notwendig. Deshalb ist ein Vergleich der Ergebnisse schlecht möglich. Aufgrund der geringen Anzahl von Zelllinien (jeweils n=6) und der immunhistochemischen Aufarbeitung von nur 23 Gewebeproben sind diese Ergebnisse nicht repräsentativ und bedürfen weiterer Untersuchungen (87). In der von uns durchgeführten Untersuchung mit Pankreaskarzinomgewebe von 113 Patienten konnten die hohen Expressionsraten von 50 % und mehr wie von Williams (87) nicht bestätigt werden.

Lemoine und Hall beschrieben eine Überexpressionsrate des HER2 von 19 % beim Pankreaskarzinom in Verbindung mit einer Genamplifikation in einer Übersichtsarbeit (23,47). Grundlage dafür bildete die Arbeit von Hall, in der retrospektiv formalinfixierte und paraffineingebettete Proben von Adenokarzinomen des Pankreas (n=87) untersucht wurden. Davon waren 10 Proben von metastatischem Gewebe, 14 mit chronischer Pankreatitis, 4 mit normalem Pankreasgewebe Erwachsener und 2 Proben mit fetalem Pankreasgewebe. Als Nachweismethoden kamen immunhistochemische Verfahren (verwendete Antikörper: polyclonal antibody 21 N, secondary antibody (peroxidase-conjugated swine anti-rabbit anti-serum)) und Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Anwendung (23). In 19 % wurden erhöhte HER-2-Expressionsraten mittels Immunhistochemie beschrieben. Nur 2 der 87 Adenokarzinomproben zeigten eine kräftige Membranfärbung als Zeichen der Überexpression, die in der Regel mit einer Genamplifikation einhergeht. Einen Nachweis von HER2-Immunreaktivität im Zytoplasma zeigten 21 % der Proben bei chronischer Pankreatitis und 19 % beim Adenokarzinom des Pankreas. Dies wurde auf einen Einfluss des Protoonkogens im Zellproliferationsprozess des exokrinen Pankreas zurückgeführt.

Bei einer repräsentativen Anzahl an Pankreaskarzinomproben (n=87) erscheint die Anzahl an „abnormalen“ HER2-Expressionsraten mit 19 % aus unserer Sicht hoch, bei aber nur zwei Proben mit immunhistochemischen Zeichen der Überexpression doch realistisch. Ein Vergleich mit unseren Zahlen ist aber wegen des nicht standardisierten Nachweises und der fehlenden Standardisierung zur Beurteilung sowohl der Membranfärbung als auch des Zytoplasmas nicht möglich.

Yamanaka untersuchte Pankreaskarzinomgewebe von 76 resezierten Patienten. Als Kontrollgruppe dienten 12 normale Pankreasgewebeproben (89). Zur Charakterisierung dieser Gewebeproben kamen die Immunhistochemie, Northern-Blot-Analyse zum RNA-Nachweis, In-situ-Hybridisierung und Southern Blot zum DNA-Nachweis zur Anwendung. Immunhistochemisch (verwendete Antikörper: c-neu Ab-3 monoclonal antibody, biotinylated secondary antibody) konnte das HER2-Protein an der Zelloberfläche und im Zytoplasma der Tumorzellen in 45 % (34 von 76) nachgewiesen werden. Überexpression von HER2-mRNA konnte mittels Northern Blot in 52 % (13 von 25), bei In-situ-Hybridisierung in 47 % (14 von 30) ermittelt werden. Das Vorkommen von HER2 wurde sowohl in duktalem als auch azinärem Gewebe des normalen Pankreas nachgewiesen. In dieser Studie wurde

erstmals gezeigt, dass bei erhöhten mRNA-Spiegeln und einem erhöhten immunhistochemischen Nachweis von HER2 in Pankreaskarzinomen eine gesteigerte Syntheseleistung für HER2 vorliegen muß. Keine Korrelation wurde zwischen dem HER2-Nachweis und der klinischen Verlaufsform und Überlebenszeit bei Pankreaskarzinom gefunden. Im Gegensatz zu den Mammakarzinomen fand sich in der Southern Blot-Analyse kein Nachweis für eine Genamplifikation in Pankreastumorgewebe.

Im Vergleich zu unseren Untersuchungen wurde immunhistochemisch nur der allgemeine HER2-Nachweis an der Zelloberfläche geführt. Eine Aussage zur Überexpression wurde mit Bestimmung der HER2-mRNA und der In-situ-Hybridisierung zum Nachweis einer vermehrten Genamplifikation vorgenommen. Für die aufgeführten Zahlen ist es jeweils schwierig zu verfolgen, welche der Pankreaskarzinomproben der jeweiligen Untersuchungsmethode zugeführt wurde, da scheinbar eine spezielle Auswahl zur Untersuchung mittels Northern Blot und in-situ-Hybridisierung vorlag. Ein Vergleich mit unserem immunhistochemischen Test zum Nachweis des HER2-Expressionsgrades ist daher nicht möglich. Eine Aussage aus der Southern-Blot-Analyse mit fehlender Genamplifikation lässt die Überexpression von HER2-mRNA mit Rückschluss auf eine HER2-Überexpression differenziert erscheinen. Yamanaka bestätigt unsere Aussagen zum klinischen Verlauf des Pankreaskarzinoms nach Resektion, dass eine HER2-Überexpression keinen Einfluss auf die Überlebenszeit hat.

Yamao und Mitarbeiter untersuchten im selben Jahr 44 Pankreasproben immunhistochemisch (verwendeter Antikörper: HER-2 polyclonal antibody) auf die Expression von HER2 (90). Dabei konnten 3 Proben von Hyperplasien, 10 Adenome, 2 nichtinvasive intraduktale papilläre Adenome (NIDPT) und 12 invasive duktale Karzinome ausgewertet werden. Eine positive Anfärbung bei wenigstens 3 % der Zellen zeigte sich in 33 % der Hyperplasien, 10 % der Adenome, 0 % der NIDPT und 58 % der invasiven Karzinome. Keine der Proben zeigte eine Anfärbung von über 50 % der Zellen entsprechend dem höchsten Expressionsgrad +3. Insgesamt fand sich bei den Hyperplasien eine Anfärbung +1, bei den Adenomen einmal +1, bei den invasiven Karzinomen fünfmal +1 und zweimal +2. Daraus ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen dem HER2-Nachweis und histologischer Typisierung des Gewebes bzw. dem Grad der Zellatypie herstellen. Es bestand kein Zusammenhang

zwischen einem HER2-Nachweis und einer früheren Metastasierung oder einem schlechteren klinischen Verlauf.

Bei den untersuchten Materialien handelt es sich um vier verschiedene histologische Gewebearten, an denen der HER2-Expressionsgrad ermittelt wurde. Bei nur zweimaligem Nachweis eines Expressionsgrades von +2 bei 12 Karzinomproben (16,6 %) erscheint diese geringe Zahl statistisch schlecht verwertbar und mit den 113 Patienten unserer Untersuchung nicht vergleichbar. Die Aussage kann man jedoch im Verhältnis des geringgradigen Nachweises an Überexpression als ähnlich ansehen. Übereinstimmend zu unserer Arbeit ist die Aussage, dass die HER2-Expression keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf beim Pankreaskarzinom hat.

Bei Friess und Mitarbeitern (19) wurden 26 Patienten mit chronischer Pankreatitis nach Pankreaskopfresektion untersucht. Mittels Computertomographie wurden bei 14 Patienten ein vergrößerter Pankreaskopf (Durchmesser über 4 cm) festgestellt. Gesundes Pankreasgewebe von 15 Patienten diente als Kontrollgruppe.

In der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung (verwendeter Antikörper: c-neu Ab-3 monoclonal antibody) fand sich eine leichte Reaktivität von HER2 bei allen Geweben, eine starke Immunreaktivität aber bei allen Patienten mit Pankreaskopfvergrößerung. Durch In-situ-Hybridisierung konnte HER2-mRNA mit hoher Expressionsrate bei Patienten mit Pankreatitis und Pankreaskopfvergrößerung festgestellt werden. In der Northern-Blot-Analyse konnte die 4,5-fache Erhöhung der HER2-mRNA gegenüber der Kontrollgruppe belegt werden. Da die chronische Pankreatitis als eine Präkanzerose des Pankreaskarzinoms angesehen wird, sollte aus der vorliegenden Untersuchung mit dem Nachweis eines erhöhten HER2 eine Prognostik zur malignen Transformation getroffen werden.

Bei den untersuchten Geweben von Friess handelt es sich nicht um Pankreaskarzinomgewebe wie in unserer Arbeit. Daher sind die Ergebnisse nicht vergleichbar. Ebenso ist die Patientenzahl mit 26 gering. Die immunhistochemische Untersuchung wurde nach keinem standardisierten Verfahren durchgeführt und wies keine Aussage zur Überexpression von HER2 auf. Die Untersuchungen wurden mit in-situ-Hybridisierung und Northern Blot über den vermehrten Expressionsgrad der HER2-mRNA geführt.

In einer Studie von Lei (46) wurde der Nachweis von HER2 als Prognoseparameter für die Überlebenszeit bei Patienten mit Pankreaskarzinom angesehen. Lei und

Mitarbeiter versuchten über ein wichtiges klinisches Merkmal eine Relevanz für den Patienten anhand der HER2-Messung zu ergründen.

Immunhistochemisch (verwendete Antikörper: Mab monoclonal antibody CB11, secondary antibody-Vectastain ABC-kit) wurden Präparate von 21 Pankreaskarzinompatienten und 6 Patienten mit einem Karzinom der Ampulla Vateri untersucht. Moderate bis starke HER2-Expression wurden bei 10 Pankreaskarzinompräparaten (47,6 %) und 2 der Ampulla-Vateri-Karzinome (33,3 %) festgestellt. 11 Patienten konnten pankreasreseziert werden. Zur Überlebenszeit konnten bei 4 Patienten mit HER2-Überexpression durchschnittlich 10,5 +/- 3,6 Monate angegeben werden. 7 Patienten mit nicht nachweisbarer Überexpression erreichten eine durchschnittliche Überlebenszeit 19,1 +/- 11,7 Monate. Bei den nicht pankreasresezierten Patienten fand sich bei 6 Patienten mit nicht nachweisbarer HER2-Überexpression eine Überlebenszeit von 15 +/- 3,8 Monaten. Bei den 4 Patienten mit Überexpression von HER2 konnten Überlebenszeiten von 5,2 +/- 2,1 Monaten festgestellt werden. Als zusammenfassende Erkenntnis aus dieser Beobachtung könnte bei Nachweis einer HER2-Überexpression dies als prognostischer Biomarker bei duktalem Pankreaskarzinom eingesetzt werden.

Für eine Betrachtung der HER2-Überexpression und einer Aussage über den klinischen Verlauf ist die in der Arbeit untersuchte Zahl von 21 Pankreaskarzinompatienten zu gering, um repräsentativ zu erscheinen. Ebenfalls wurde in der Arbeit ein nicht standardisiertes immunhistochemisches Verfahren zur Beurteilung der HER2-Expression verwendet. Eine Überexpression von 47,3 % (10 von 21 Patienten) erscheint sehr hoch, in unserer Arbeit war ein positiver HER2-Status (Grad +2 und +3 in der Anfärbung) bei 5 von 113 Pankreasresektaten (4 %) nachzuweisen. Auch die Aussagen zur Überlebenszeit haben bei der Betrachtung von niedrigen Patientenzahlen (n=4, n=6 und n=7) keine statistische Aussagekraft. In unserer Betrachtung von 113 Patienten konnten 5 Patienten mit positivem HER2-Status keine repräsentative Aussage zum klinischen Verlauf bzw. zum Überleben erarbeiten lassen. Der positive HER2-Status scheint aus unserer Sicht keine Wertigkeit als prognostischer Marker für das Pankreaskarzinom zu haben. Für die statistischen Berechnungen bezogen wir alle Patienten mit positivem Rezeptorstatus, auch die schwach positiv +1 getesteten Patienten (n=16), mit ein und konnten gegenüber den HER2-negativen Patienten eine höhere mediane Überlebenszeit ermitteln (12 Monate gegenüber 11 Monaten).

Bei 10 Pankreasresektaten von Patienten mit tubulärem Adenokarzinom des Pankreas Stadium I (3 Patienten) und II (7 Patienten) fanden Matsukuma und Mitarbeiter immunhistochemisch (verwendeter Antikörper: anti-HER-2 polyclonal antibody) in 4 Fällen (40 %) eine Überexpression von HER2/neu (53). Hier wurde versucht, trotz der niedrigen nichtrepräsentativen Patientenzahlen Rückschlüsse auf die Prognose und Überlebenszeit vorzunehmen. Eine Korrelation zwischen HER2-positivem Karzinom und verkürzter Überlebenszeit bestätigte sich nicht.

Diese Aussage zum klinischen Verlauf stimmt mit den Erkenntnissen aus unserer Arbeit im Gegensatz zu den Arbeiten von Yamao und Lei überein (46,90).

Satoh und Mitarbeiter (72) untersuchten immunhistochemisch (verwendete Antikörper: polyclonal antibody against c-erbB-2, monoclonal antibody NCL-CB11) den HER2-Expressionsgrad an 17 paraffineingebetteten Proben des intraduktalen Pankreaskarzinoms (intraductal mucin-hypersecreting neoplasm of the pancreas-IMHN) und 14 Fällen des duktales Pankreaskarzinoms, davon 8 Fällen mit Lymphknotenmetastasierungen. Dabei wurden in 13 der 17 Fälle des IMHN Überexpressionen von HER2, in nur einem der 14 Fälle des duktales Pankreaskarzinoms eine Überexpression von HER2 festgestellt. Diese Beobachtung ließ bei den Autoren den Schluss zu, die Überexpression von HER2 mit der Pathogenese des IMHN in Verbindung zu bringen. Eine Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit den oben genannten ist bei den unterschiedlichen verwendeten Antikörpern und wegen der Gewebespezifikation nicht möglich.

Terada (78) untersuchte immunhistochemisch (verwendete Antikörper: c-erbB-2 gene product primary monoclonal antibody, biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody) an 9 Fällen des intraduktalen Pankreaskarzinoms (intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas-IPN). Immunhistochemische Kontrolluntersuchungen wurden an 5 Fällen mit normalem Pankreasgewebe und 7 Fällen mit invasiv-duktales Adenokarzinom des Pankreas durchgeführt. Im normalen Pankreasgewebe (n=5) wurde keine Expression von HER2 nachgewiesen. Bei den 9 Fällen von IPN fanden sich in 7 Fällen (78%) Expressionen von HER2, bei den 7 invasiv-duktales Adenokarzinomen ließen sich in 6 Fällen HER2-Expressionen bestätigen. Insgesamt erscheinen die Expressionsgrade von 78% und 86 % sehr hoch, zum Einen wegen der niedrigen Anzahl der Gewebeprobe, zum Anderen fehlt eine standardisierte Nachweis- und Auswertungsmethode zum Expressionsgrad und der Verwendung der Antikörper.

Ein hoher Grad an Expression wird von Day (10) mit ebenfalls immunhistochemischem Nachweis (verwendete Antikörper: rmn 4D5 murine monoclonal antibody, anti-mouse secondary antibody) beschrieben. 19 pankreasresezierte Patienten mit Adenokarzinom des Pankreasganges wurden auf das Expressionsverhalten von HER2 untersucht. Dabei fand sich eine Expressionsrate des HER2-Proteins von 82 % bei Pankreasgängen mit flacher muzinöser Hyperplasie, 86 % bei papillärer muzinöser Hyperplasie ohne Atypie, 92 % bei Pankreasgängen mit atypischer Hyperplasie und 100 % Expression beim Carcinoma in situ. Eine Expression von 69 % zeigte sich beim mäßig differenzierten infiltrierenden Karzinom, kein Expressionsnachweis zeigte sich beim schlecht differenzierten infiltrierenden Karzinom. Es wurde ebenfalls auf eine Möglichkeit geschlossen, HER2 als potentiellen Mediator für die von Wachstumsfaktoren abhängige Signaltransduktion in Pankreasgangläsionen anzusehen und davon mögliche Entwicklungen für ein Potential zur invasiven Tumorentwicklung und Metastasierung abzuleiten.

Day beschreibt in seiner Arbeit ausschließlich den Nachweis einer HER2-Expression und nicht die HER2-Überexpression. Weiterhin liegt mit 19 Patienten ein sehr kleines Patientenkollektiv vor, das in der Aussage statistisch nicht repräsentativ erscheint. Eine Aussage über den Wert von HER2 bei der Beurteilung für ein malignes Entwicklungspotential konnte von uns nicht getroffen werden. Bei einem positiven HER2-Status in nur 4 % bei 113 Patienten ist auch eine Betrachtung unter Berücksichtigung des histologischen Differenzierungsgrades beim Pankreaskarzinom nicht sinnvoll.

Dugan und Mitarbeiter (15) untersuchten immunhistochemisch (verwendeter Antikörper: monoklonaler Maus-IgG-Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des HER2/neu) die HER2-Expression bei 79 Patienten mit Pankreaskarzinom. Besonderer Bezug wurde zu den Differenzierungsgraden des Tumorgewebes genommen. Eine signifikant niedrigere Expressionsrate von HER2 fand sich in Geweben mit schlecht differenziertem Tumorgewebe, starke Expressionsraten fanden sich dagegen bei Tumorgewebe mit mäßigem oder deutlichem Differenzierungsgrad.

Insgesamt konnten moderate und starke Expressionen von HER2 bei 46 Patienten (58 %) festgestellt werden, in 63 von 79 Fällen gelang ein positiver HER2-Nachweis

im Gewebe. Ein Zusammenhang zwischen HER2/neu-Expression und Prognose der Tumorerkrankung bzw. Überlebenszeit konnte nicht hergestellt werden.

Im Gegensatz zu vorher betrachteten Studien erlaubt diese Studie eine deutlichere Aussage. Wir können wiederum den sehr hohen Überexpressionsgrad von HER2 mittels Immunhistochemie mit unseren 4 % bei 113 Patienten nicht bestätigen. Es wurde zum Nachweis der HER2-Expression kein standardisiertes immunhistochemisches Nachweisverfahren angewendet. Einen Rückschluss auf den Differenzierungsgrad des Karzinomgewebes anhand des HER2-Status können wir bei den von uns gewonnenen geringen Daten der Überexpression nicht ziehen. In der von uns untersuchten repräsentativen Patientengruppe lag in 91 % (n=103) ein Adenokarzinom mit überwiegend mittelgradig (n= 50) und schlecht differenziertem (n=44) Gewebe vor. Es scheint unwahrscheinlich, dass bei höherem Anteil an gut differenziertem Pankreaskarzinomgewebe im Patientengut ein höherer Nachweis an HER2-Überexpression gelungen wäre. Übereinstimmend zu Dugan (15), wie auch schon zu Yamanaka (89) und Matsukuma (53), kommen auch wir zu der Aussage, dass sich über die HER2-Expression im Pankreaskarzinomgewebe keinerlei Zusammenhang zum klinischen Verlauf und zur Überlebenszeit herstellen lässt. Im Gegensatz dazu belegen unsere Ergebnisse ein medianes Überleben von 11 Monaten bei einem negativen HER2-Status und ein medianes Überleben von 12 Monaten für Patienten mit einem positiven HER2-Status.

Ebenso wurde die Überexpression von HER2/neu als diagnostischer Parameter bei zytologischer Beurteilung des Dysplasiegrades von Pankreasgangepithelien untersucht. Tomaszewska und Mitarbeiter (81) fanden immunhistochemisch (verwendete Antikörper: primary monoclonal antibody 4D5, secondary antibody-DAKO CSA Complex) keine Überexpression bei normalem Pankreasgangepithel, leichte Expression bei flacher Hyperplasie und moderate bis starke Überexpression bei atypischer papillärer Hyperplasie und beim Carcinoma in situ. Die Gewebe wurden bei 35 Patienten mit partieller oder totaler Pankreasresektion bei Pankreaskarzinom, chronischer Pankreatitis und anderen Tumorerkrankungen (Magenkarzinom, Karzinom der Papilla Vateri) gewonnen. In der Studie wurden keine Karzinomgewebe untersucht, lediglich HER2 als möglicher Marker für den Dysplasiegrad im Pankreasganggewebe angenommen.

Höhere Expressionsgrade bei atypischer Hyperplasie und beim Carcinoma in situ erscheinen uns unwahrscheinlich, da wir bei reinem Karzinomgewebe eine nur sehr geringe Expressionsrate von HER2 nachweisen konnten.

In der Aufarbeitung von 38 Pankreaspräparaten von 28 Patienten mit normalem Pankreasgewebe, intraduktalen papillären Hyperplasien, intraduktalen Adenomen, intraduktalen Karzinomen zeigte sich bei Islam und Mitarbeitern (31) in keiner der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung (verwendeter Antikörper: Anti-c-erbB-2 polyclonal antibody) eine Expression oder Überexpression von HER2.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fand Islam keine oder nur eine geringe HER-2-Überexpression.

Apple und Mitarbeiter (1) beschreiben die immunhistochemische Untersuchung (verwendeter Antikörper: polyclonal antibody HER2) von 15 Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas und 15 Kontrollpatienten ohne Adenokarzinom. Beide Gruppen waren pankreasreseziert. Von beiden Untersuchungsgruppen wurden paraffineingebettete Präparate verwendet und einer immunhistochemischen Untersuchung unterzogen. Bei den Karzinompatienten wurden zusätzlich von verschiedenen Pankreasbereichen Gewebe untersucht - so von normalem Pankreasganggewebe, Hyperplasie- und Dysplasiegewebe und invasivem Karzinom. Eine Anfärbung im Sinne einer Überexpression von HER2 bei normalem Ganggewebe wurde nicht beobachtet, jedoch zeigte Hyperplasiegewebe in 53 % eine Anfärbung mit der Intensität von 2-fach positiv. Dysplastisches Gewebe wurde in 82 % mit einer durchschnittlichen Intensität von 2,4-fach positiv beschrieben. Bei den invasiven Karzinomproben fand sich bei 80 % (12 von 15) eine positive HER2-Färbung mit durchschnittlich 2,6-fach positiv. Somit wurde bei steigender Gewebeveränderung von der Hyperplasie bis zum Karzinom eine verstärkte Anfärbung der untersuchten Gewebe im Sinne der vermehrten Proteinexpression angenommen. Unter den 15 Pankreasresezierten ohne Malignom befanden sich hauptsächlich Patienten mit chronischer Pankreatitis. Bei den nachgewiesenen hyperplastischen Pankreasgangveränderungen (5 von 15) zeigten 3 (60 %) einen positiven HER2-Nachweis mit einer Färbungsintensität von 2-fach positiv (+2). Ein Patient von 4 mit nachgewiesener Gewebedysplasie (25 %) zeigte sich ebenfalls mit einer Färbungsintensität 2-fach HER2-positiv (+2).

Apple et al. haben in der Aufarbeitung von 15 Pankreaskarzinomresektaten und einer Kontrollgruppe nur ein kleines Patientenkollektiv betrachtet. Ähnlich den Arbeiten von

Day (10) und Tomaszewska (81) wurde anhand des steigenden Expressionsgrades von HER2 auf die zunehmende maligne Veränderung von Pankreasgewebe von der Hyperplasie bis zum Karzinom geschlossen.

In der 2000 veröffentlichten Studie von Kawesha (39) wurden mehrere potentielle molekulare Marker und ihre Beziehung zur klinischen Prognose betrachtet. Vorgenommen wurden die Untersuchungen an 157 formalinfixierten Präparaten von Pankreaskarzinompatienten, die eine Pankreasresektion erhalten hatten. Als potentielle molekulare Marker wurden neben HER2 auch p53, p16, p21, cyclin D1 und erbB-3 in den Geweben nachgewiesen. Als Nachweismethoden dienten die Immunhistochemie (verwendeter Antikörper: HER2 monoclonal antibody) und DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).

In 33 % der vorliegenden Pankreaspräparate gelang der Nachweis der HER2-Expression. In Zuordnung zu den klinischen Verläufen der resezierten Patienten (HER2-positiv gegenüber HER2-negativ) fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Überlebenszeit. Auch kein anderer der nachgewiesenen Marker konnte zu einer Aussage in Zuordnung zur Überlebenszeit herangezogen werden.

Die in der Studie verwendeten 157 Panreaskarzinomproben haben aber in der Nachweisform des HER2 nur die „Klassifizierung“ positiv oder negativ erfahren. Den Grad der Überexpression (0,+1,+2,+3) hat man dabei nicht berücksichtigt. Eine Vergleichbarkeit zu unseren Ergebnissen ist nicht möglich, da für unsere Untersuchung ein positiver HER2-Status nach den Kriterien des standardisierten HercepTestes™ nur bei einem Überexpressionsgrad +2 und +3 vorliegt. So ist anzunehmen, dass die HER2-positiven Fälle auch den Färbegrad +1 in den 33 % der Überexpression des HER2-Proteins mit beinhalten, die ja bei unserer Betrachtung entfallen und nur für die statistischen Berechnungen der Überlebensraten und vergleichenden Darstellungen der Überlebensfunktionen einbezogen wurden. Ebenfalls bestätigt sich die Annahme bei dieser großen Patientengruppe, dass durch die HER2-Überexpression, wie schon in den Arbeitsgruppen von Yamanaka, Matsukuma und Dugan (15,53,89), keine Aussage zur verminderten Überlebenszeit beim Pankreaskarzinom getroffen werden kann.

Safran und Mitarbeiter (70) wiesen immunhistochemisch (verwendete Antikörper: HercepTest™ DAKO, rabbit polyclonal antibody) bei 154 Patienten mit einem Adenokarzinom des Pankreas eine HER-2-Überexpressionsrate von 21 % (32 von 154) nach und schlossen damit auf eine mögliche Wirksamkeit einer

Chemotherapiekombination von Gemcitabin und Herceptin. Um einen Rückschluss auf mögliche therapeutische Konsequenzen zu ziehen, sollte das immunhistochemische Ergebnis unbedingt durch den Nachweis einer erhöhten Genamplifikation mittels FISH gestützt werden. Das mediane Überleben der HER2-positiven Patienten betrug 5 Monate, das mediane Überleben der Patienten mit negativem HER2-Status 8 Monate. In der Studie wurden Patienten mit resektablem (n=32), lokal inoperablem (n=48) und metastasiertem Pankreaskarzinom (n=74) betrachtet. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass eine signifikante HER2-Überexpression mit einem standardisierten immunhistochemischen Verfahren nachgewiesen werden kann. Die Option des Chemotherapeutikums Herceptin® zur Behandlung des Pankreaskarzinoms wurde eingeräumt.

Die Arbeit von Safran und Mitarbeitern ist mit der hohen Anzahl an Patienten (n=154) repräsentativ. Im Vergleich zu unserer Arbeit sind jedoch nur 32 Patienten pankreasreseziert worden. 122 Patienten hatten ein lokal inoperables oder bereits metastasiertes Pankreaskarzinom. Somit lagen bei den untersuchten Materialien bereits in der Mehrzahl der Fälle nur palliativ zu behandelnde Pankreaskarzinome der Stadien IV vor. Die höchste Anzahl an HER2-positiven Patienten war in der Gruppe der metastasierten Pankreaskarzinome mit 26% gegenüber 16% bei den resektablen Karzinomen nachzuweisen.

Nowotny (58) untersuchte 51 Adenokarzinome des Pankreas, 5 neuroendokrine Tumoren des Pankreas und ein Karzinom der Ampulla Vateri immunhistochemisch (verwendeter Antikörper: monoklonal antibody against c-erbB-2 DAKO) und fand eine Überexpressionsrate von 19,2 %. In der statistischen Aufarbeitung zeigte sich keine Korrelation zwischen dem positiven HER2-Status und einer geringeren Überlebenszeit bzw. einem schlechteren klinischen Verlauf. Insgesamt wurde das HER2-Onkogen als prognostischer Faktor in Frage gestellt.

Übereinstimmend mit Nowotny kommen auch wir zu der Aussage, dass das HER2-Onkogen keinen prognostischen Faktor für das Pankreaskarzinom darstellt.

Die bisher umfassendste Studie an 575 Präparaten führten Koeppen und Mitarbeiter (41) durch. Im Gegensatz zu vielen der vorher aufgeführten Studien stellt Koeppen in seinen Untersuchungen mittels Immunhistochemie (verwendete Antikörper: HercepTest™ DAKO, rabbit polyconal antibody) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an 575 Präparaten verschiedener Neoplasien (Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Adenokarzinom des Magens, kolorektalen

Karzinomen, Prostatakarzinom und Pankreaskarzinom (n=99) fest, dass die Überexpressionen von HER2 über dem Zweifachen (+2) nur beim Mammakarzinom mit 22 %, Lungenkarzinom mit 28 %, kolorektalen Karzinomen mit 17 %, kleinzelligem Bronchialkarzinom mit 11 % und Adenokarzinom des Magens mit ebenfalls 11 % nachweisbar waren. Eine Überexpression bis zum Dreifachen (+3) wurde ausschließlich in den Aufarbeitungen des Mammakarzinoms festgestellt.

Im Gegensatz zu anderen Autoren (1,10,15,39,46,70,81,89,90) beschreibt Koeppen eine sehr schlechte Inzidenz der HER2-Überexpressionsraten bei Prostata- und Pankreaskarzinom und führt in seiner Auswertung wegen des geringen Auftretens bei diesen Karzinomen keine prozentualen Angaben auf. Ein positiver HER2-Nachweis beim Pankreaskarzinom sei nur ein seltener Fall. Gründe für die hohen Expressionsraten in anderen Studien liegen nach seiner Meinung in der Verwendung des monoklonalen 4D5-anti-HER2-Antikörpers, wie in der Studie von Day und Mitarbeitern (10), der ein extrazellulär gelegenes Epitop des HER2-Proteins erkennt. Somit würde ein extrazellulär gelegenes Epitop des HER2 angefärbt werden, aber nicht das HER2-Protein selbst. Als weitere Fehlerquelle für einen erhöhten Expressionsnachweis führt Koeppen einen nicht einheitlichen Wertungsscore zur Betrachtung der Präparatefärbungen an.

Koeppen hat aus unserer Sicht erstmals einen standardisierten Test zum immunhistochemischen Nachweis der HER2-Überexpression angewendet (HercepTest™ der Firma DAKO). Daher sind seine Ergebnisse mit unseren vergleichbar. Die Aussage der „nicht erwähnenswerten Überexpression“ beim Pankreaskarzinom bestätigt unsere Ergebnisse vom immunhistochemischen Nachweis des HER2-Proteins von nur 4 % bei 113 Patienten. Die HER2-Überexpression konnte Koeppen bei anderen Karzinomgeweben (z.B. Mammakarzinom) vergleichend nachweisen und die immunhistochemische Aussage mit FISH durch den Nachweis einer vermehrten Genamplifikation untermauern. Bei Koeppen wurde keine Aussage über die klinische Relevanz des HER2-Proteins und dessen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf getroffen.

Auch Koka und Mitarbeiter (42) untersuchten 308 Pankreaskarzinomproben aus den Jahren 1986 bis 2001 immunhistochemisch mit dem HercepTest™ der Firma DAKO. 48 Patienten (16 %) wiesen einen positiven HER2-Status auf. Die durchschnittliche Überlebenszeit bei HER2-positiven Patienten betrug 11 Monate, bei negativem HER2-Status 7 Monate. Koka widerlegt damit den Zusammenhang zwischen

positivem HER2-Status und schlechter Prognose und Überlebenszeit. Wegen fehlender oder geringer Expressionsrate des HER2-Rezeptorproteins sollte nach seiner Meinung HER2 als therapeutischer Angriffspunkt ausscheiden.

Damit wurde erneut an einer repräsentativen Patientengruppe mit einem standardisierten immunhistochemischen Test der HER2-Nachweis geführt. Der prozentuale Anteil von 16 % der Patienten mit positivem HER2-Status ist aber durch die identischen Nachweisverfahren mit unseren Ergebnissen vergleichbar. Die Überlebenszeiten erlauben aber keinen Rückschluss auf den klinischen Verlauf bei positivem HER2-Status. Unsere medianen Überlebensraten bei 21 Patienten mit positivem HER2-Status des Färbegrades +1, +2 und +3 liegen mit 12 Monaten ähnlich den Überlebensraten von Koka. Aufgrund der geringen Anzahl der stark positiven Anfärbungen (+2 und +3) mussten in unseren Erhebungen auch die schwach positiven Nachweise von +1 Berücksichtigung finden. Insgesamt sind damit unsere Daten im Vergleich zu anderen Studien nicht repräsentativ.

In unserer Arbeit wurden von 113 zwischen 1994 und 2000 operierten Patienten mit Pankreaskarzinom die Gewebeproben auf den HER2-Rezeptorstatus untersucht und die Verläufe einschließlich Überlebenszeiten, Metastasierung und Auftreten von Rezidiven und Metastasen in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus recherchiert. Die untersuchten Pankreasresektate wiesen mit ihrem Anteil von über 91 % an Adenokarzinomen eine homogene Untersuchungsgruppe auf. Ebenso liegt die Altersverteilung der Patienten zwischen 35 und 81 Jahren und mit einem Durchschnittsalter von 61 Jahren in dem von der Literatur beschriebenen Rahmen (10,24,53,89) mit einem Häufigkeitgipfel in der 7. Lebensdekade. Anamnestische Erhebungen bei den operierten Patienten ergaben eine negative Familienanamnese für Malignomerkrankungen.

Die Tumorstadienverteilung zum Operationszeitpunkt war Ausdruck der schwierigen Situation, das Pankreaskarzinom rechtzeitig zu diagnostizieren und der kurativen Behandlung zuzuführen. Mit einer Größe unter 2 cm Durchmesser und ohne Infiltration der regionären Lymphknoten wird das Pankreaskarzinom als Frühkarzinom nur in geringer Anzahl vorgefunden. In unserer Statistik wurde das Stadium I und II nur zu ca. 30 % als Ausgangsstadium diagnostiziert. Dies zeigt die Schwierigkeit in der Primärdiagnostik, frühzeitig die klinischen Symptome der Tumorerkrankung richtig einzuordnen und die Sicherung durch bildgebende

Verfahren vorzunehmen. Heinemann beschreibt die Resektionsrate beim Pankreaskarzinom mit etwa 30 % und macht damit die Schwierigkeit deutlich, das Pankreaskarzinom in einem frühen und resektablen Stadium der chirurgischen Therapie zuzuführen (24).

Die in der Pankreaschirurgie bei Karzinom häufig angewendeten Verfahren sind die Operation nach Whipple als klassisches Resektionsverfahren und die pyloruserhaltende Pankreasresektion beim Pankreaskopfkarzinom, die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie beim Pankreasschwanzkarzinom (24).

Die in Heinemanns Ausführungen beschriebenen Zahlen zur perioperativen Letalität von 0% bis 5 % in erfahrenen Zentren wird von uns überschritten. Da es sich bei den untersuchten Patienten nicht um die chronologische Aufarbeitung der im Waldklinikum Gera operierten Patienten mit Pankreaskarzinom handelt, sondern um eine willkürliche Auswahl aus den oben genannten Jahren, ist die Einordnung der perioperativen Letalität kritisch zu betrachten und zu relativieren (24).

Von den insgesamt 113 Patienten lebten zum Erhebungszeitpunkt im November 2004 noch 8 Patienten. 11 Patienten verstarben innerhalb der ersten 4 Wochen post operationem. Die postoperativ betrachteten Patienten (duktal, R0-reseziert) zeigten eine mediane Überlebenszeit von 12 Monaten. Heinemann beschreibt eine durchschnittliche Überlebenszeit von 10 bis 20 Monaten beim duktalem Pankreaskarzinom (24).

Bei der Erhebung fanden wir eine 1-Jahres-Überlebensrate von 49 %, einer 2-Jahres-Überlebensrate von 24 % und eine 3-Jahres-Überlebensrate von 13 % . So gibt Matsukuma (53) eine 3-Jahres-Überlebensrate von 50 %, und eine 5-Jahresüberlebensrate von 14,8 % an. Engel und Mitarbeiter (17) gaben aus den statistischen Daten der letzten Jahre in Deutschland eine Schwankungsbreite zwischen 5 und 15 % bei der 5-Jahres-Überlebensrate an.

Die Zeitpunkte bis zum Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Metastasierung lagen weit gefächert zwischen 2 und 31 Monaten, in der medianen Berechnung traten sie nach 8 Monaten auf.

Bei Betrachtung der Überlebenszeiten der palliativ behandelten Patienten gab es eine Streuung zwischen 1 und 15 Monaten. Die mediane Überlebenszeit lag bei 7 Monaten. Die nachgewiesenen Tumorstadien waren zum überwiegenden Anteil dem Stadium IV B zuzuordnen. Bei dieser geringen Patientenzahl ist die Überlebenszeit von 7 Monaten für palliativ behandelte Patienten jedoch nicht repräsentativ.

Hinsichtlich des immunhistochemischen Nachweisverfahrens für den HER2-Rezeptor in der Zellmembran der Pankreaskarzinomzellen verwendeten wir gegenüber anderen Studien mit dem HercepTest™ der Firma DAKO ein bereits etabliertes Verfahren, das bei der Diagnostik des HER2-Status beim Mammakarzinom als Standardmethode eingesetzt wird (80). Dabei haben sich in mehreren Studien die Spezifität und Sensitivität des Verfahrens bewährt (13) .

Trotz der in der Arbeit von Press (66) geäußerten Zweifel an der Genauigkeit der Aussage des immunhistochemischen HercepTests™ der Firma DAKO im Vergleich zu gleichzeitig angewandten FISH-Nachweisverfahren halten wir diese Bestimmungsmethode für ausreichend aussagekräftig. Die Firma DAKO selbst führt bei der Sicherheit ihres angebotenen HecepTests™ nach Vergleichsstudien die Korrelation zwischen der Menge der HER2-mRNA und der immunhistochemischen Färbung an. Weitere Studien werden zur Färbeeigenschaft des HER2-Antikörpers der Firma DAKO gegenüber anderen kommerziellen Antikörpern angegeben (3,7,65). Außerdem stellt die FISH eine aufwendige Methode an Logistik und Kosten dar.

In der von uns angewandten immunhistologischen Nachweismethode für die HER2-Expression fanden wir bei unserem großen Patientenkollektiv (n=113) nur einen sehr geringen Anteil einer Überexpression (4 %) beim Pankreaskarzinom. Dies bestätigt die schon von Koeppen (41) erhobene Datensammlung zur HER2-Expression zum Pankreaskarzinom an einem ebenfalls großen Patientenkollektiv (n=99) im Vergleich zu anderen malignen Tumorerkrankungen. Die bisher veröffentlichten Daten zum HER2-Status sind nur in wenigen Fällen an größeren Patientengruppen untersucht (Hall et al. 107 Patienten (23), Yamanaka et al. 76 Patienten (89), Matsukuma et al. 141 Patienten (53), Kawesha et al. 157 Patienten (39), Safran et al. 154 Patienten (70), Koka et al. 308 Patienten (42)). In unseren Untersuchungen wurden 92 Patienten immunhistochemisch als HER2-negativ erfasst (81 %). 16 Pankreasresektate wurden in der Färbung als schwach positiv (+1) eingestuft. Damit sind für die klinische Aussage und für die möglichen therapeutischen Konsequenzen bereits 96 % nach dem Bewertungsmaßstab des Hercep Tests™ als HER2-negativ einzuordnen. Lediglich 5 Pankreasresektate wiesen eine Färbung von +2 (n=4) und +3 (n=1) auf. Mit 4 % positivem HER2-Rezeptorstatus lässt sich in ähnlicher Form die Aussage der Arbeit Koeppens bestätigen, dass die routinemäßige Bestimmung

des HER2-Rezeptorproteins beim Pankreaskarzinom nicht relevant und nur kostenintensiv wäre.

Um statistische Vergleiche zwischen positivem und negativem HER2-Status zu Überlebenszeit, Metastasierung/Lokalrezidiv durchführen zu können, wurden auch die Patienten mit schwach positivem Rezeptorstatus (+1) in die Betrachtungen einbezogen. Bei dem einzigen Patienten mit positivem Rezeptorstatus (+3) wurde eine metastasenfremie Zeit von 12 Monaten ermittelt. Die 4 Patienten mit positivem Rezeptorstatus (+2) entwickelten im Durchschnitt nach 7,3 Monaten ein Rezidiv oder Metastasen. Die Patienten mit Rezeptorstatus (+1) zeigten eine metastasen- und rezidivfreie Zeit von durchschnittlich 12 Monaten. Die mediane Zeit bis zum Auftreten von Rezidiv oder Metastasen betrug für die HER2-positiven Patienten (+1,+2,+3) 12 Monate, für die HER2-negativen Patienten jedoch nur 8 Monate. Danach ist eine schlechte Prognose bei positivem HER2-Status nicht zu bestätigen.

In der uns vorliegenden Literatur zum HER2-Status beim Pankreaskarzinom gab es keine Angaben zum rezidiv- oder metastasenfremien Intervall in der Gegenüberstellung von HER2-positiven und HER2-negativen Patienten.

Die Überlebenszeit unseres positiv getesteten Patienten +3 lag bei 15 Monaten. Zwei Patienten mit HER2-Rezeptorstatus +2 lebten zum Erhebungszeitpunkt noch. In der Gruppe der Patienten mit Status +1 lag das mediane Überleben bei 12 Monaten. Im Vergleich betrug das mediane Überleben für die Gesamtzahl der HER2-positiven Patienten 12 Monate und die HER2-negativ getesteten Patienten 11 Monate.

Lei beschreibt in seiner Arbeit (46) ein mittleres Überleben von 13,5 Monaten. Bei HER2-Überexpression lag die Überlebenszeit bei 10,6 +/- 3,6 Monaten, ohne HER2-Überexpression bei 21,4 +/- 14,3 Monaten. Yamanaka (89) beschreibt eine mittlere Überlebenszeit bei HER2-Überexpression von 10,8 +/- 1,5 Monaten, bei negativem HER2-Status von 12,1 +/- 0,8 Monaten. In den bisherigen Untersuchungen zum HER2-Status beim Pankreaskarzinom liegen keine Daten von größeren Patientengruppen vor, die den klinischen Verlauf mit rezidiv-/metastasenfremiem Intervall und der Überlebensrate betrachten.

Anhand unseres Vergleiches zwischen den Patienten mit positivem und negativem HER2/neu-Rezeptorstatus lassen sich wegen der statistisch nur geringen Anzahl an HER2-positiven (+2,+3) Patienten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der rezidiv-/metastasenfremien Zeit und des Gesamtüberlebens ablesen. Unter

Einbeziehung der 16 Patienten mit schwach positivem HER2-Status (+1) zeigte sich aber ein medianer Überlebensvorteil für Patienten mit positivem HER2-Status.

Bei der Auswertung der Literatur zeigte sich nicht nur eine große Palette an Nachweisverfahren, verwendeten Chemikalien, mono-/polyklonalen Antikörpern und Beurteilungsmodi, sondern eine ebenso große Variationsbreite prozentualer HER2-Expressionen in Pankreaskarzinomproben.

Wie kommt es zu diesen Diskrepanzen in den Rezeptorexpressionsraten?

Die Datenlage bei der HER2-Rezeptor-Expression und HER2-Genamplifikation ist nach unseren Literaturstudien besonders beim Pankreaskarzinom sehr unterschiedlich erstellt und interpretiert worden. Dabei reichen die beschriebenen Überexpressionsraten von 45% bei Yamanaka und Friess (89) bis zu 1% bei Koeppen (41).

Um die Ursache für die differenten Ergebnisse bemühten sich Koeppen und Mitarbeiter bisher als einzige Arbeitsgruppe. Sie zeigten einen Vergleich von HER2-Expressionsraten verschiedener Tumorgewebe. Koeppen (41) weist in seiner Arbeit auf die verschiedenen Bindungsaffinitäten monoklonaler Antikörper (hier 4D5) hin, die an ein Epitop an der extrazellulären Domäne des HER2-Proteins binden. So bindet das polyklonale Antiserum des Hercep Tests® mit einem intrazellulären Epitop des Rezeptors. Eine strenge Beurteilung nur der Membranfärbung wurde von Koeppen deshalb empfohlen, da bei Zytoplasmaanfärbungen beim Hercep Test™ falsch positive Ergebnisse auftreten könnten.

Bei den möglichen Fehlerquellen des von uns verwendeten Testverfahrens spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Erste Fehler können bei der Hitzevorbehandlung des Gewebes im Wasserbad bei ungenügender Temperaturkontrolle auftreten. Weiterhin waren die Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und das Einhalten der Waschschriffe laut vorliegender Gebrauchsanleitung des HercepTests™ genau einzuhalten. Um ein Austrocknen der Proben zu verhindern, musste während der Inkubationsschritte eine „feuchte Kammer“ benutzt werden.

Für die Auswertung lagen uns die Referenzfärbepreparate, der HercepTest™ Staining-Atlas (Nr.20210) und das HercepTest™-A „Manual for Interpretation“ (Nr.00119) vor. Eine zusätzliche Sicherheit in der Beurteilung der Membranfärbung war durch zwei unabhängig tätige Pathologen gewährleistet. Die das Färbeergebnis beeinflussenden Parameter wurden durch das standardisierte Protokoll, die standardisierten Reagenzien und die einzuhaltenden Inkubationszeiten

konstant gehalten. Zusätzlich wird dadurch ein Zeitbedarf von nur ca. 3 Stunden aufgewendet. Eine mögliche Diskrepanz unserer Ergebnisse zu vielen anderen Arbeiten kann sich schon aus den verschiedenen angewandten Antikörpern ergeben. Es fanden sich in 19 Arbeiten 16 verschiedene Antikörper von unterschiedlichen Firmen und Herstellern. Nur in 3 Fällen wurde der von uns angewendete Hercep Test™ der Firma DAKO verwendet (41,42,70).

In einer Liste verwandter Antikörper stellten wir verschiedene monoklonale und polyklonale Antikörper zusammen, die zur Anwendung kamen: polyclonal antibody 21 N, polyclonal antibody c-erbB-2, rmn 4D5 murine monoclonal antibody, c-neu Ab-3 monoclonal antibody, Mab monoclonal antibody CB11, primary monoclonal antibody 4D5 monoclonal mouse-IgG-antibody etc. Die Zuordnungen der verschiedenen Autoren zu Jahr, Patientenzahl, verwendeten Antikörpern und deren Herstellern können der Übersicht 9 entnommen werden.

#### **Übersicht 2: Verwendete Antikörper zur Immunhistochemie**

<b>Autor / Jahr / Anzahl der untersuchten Gewebe</b>	<b>Antikörper / Hersteller</b>
Apple et al. 1999 n=30	polyclonal antibody c-erbB-2 DAKO, Carpenteria, CA, USA
Day et al. 1996 n=19	rmn 4D5 murine monoclonal antibody Gentech inc., San Francisco, CA, USA anti-mouse secondary antibody Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Dugan et al. 1997 n=79	monoclonal mouse-IgG-antibody Triton Diagnostics, Alameda, CA, USA
Friess et al. 1994 n=26	c-neu Ab-3 monoclonal antibody Oncogene Science Inc., Uniondale, NY, USA
Hall et al. 1990 n=117	primary polyclonal antibody 21 N secondary antibody 20 N Dakopatts, UK
Islam et al. 1999 n=38	Anti-c-erbB-2 polyclonal antibody Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan
Kawesha et al. 2000 n=157	c-erbB-2 monoclonal antibody Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK
Koepfen et al. 2000 n=575	HercepTest™ DAKO, Carpenteria, CA, USA
Koka et al. 2002 n=308	HercepTest™ DAKO, Carpinteria, CA, USA
Lei et al. 1995 n=27	Mab monoclonal antibody CB11 Biogenex, San Ramon, CA, USA Secondary antibody Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Matsukuma et al. 1996 n=10	anti-c-erbB-2 polyclonal antibody DAKO, Copenhagen, Denmark
Novotny et al. 2001 n=57	monoclonal antibody against c-erbB-2 DAKO, Copenhagen, Denmark

Safran et al. 2001 n=151	HercepTest™ DAKO, Carpinteria, CA, USA
Satoh et al. 1993 n=31	polyclonal antibody against c-erbB-2 monoclonal antibody NCL-CB11 Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan
Terada et al. 1996 n=9	c-erbB-2 gene product (primary monoclonal antibody) Oncogene Science, Manhasset, NY, USA biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Tomashevska et al. 1998 n=35	primary monoclonal antibody 4D5 Gentech Inc., San Francisco, CA, USA secondary antibody DAKO CSA Complex, DAKO, Copenhagen, Denmark
Williams et al. 1991 n=23	monoclonal antibody OM-11-952 Cambridge Research Biochem., Valley Stream, NY, USA c-neu Ab-3 monoclonal antibody Oncogene Science Inc., Manhasset, NY, USA
Yamanaka et al. 1993 n=76	c-neu Ab-3 monoclonal antibody Oncogene Science Inc., Manhasset, NY, USA Biotinylated sekundary antibody Kirkegaard & Perry Lab. Inc., Gaithersburg, MD, USA
Yamao et al. 1993 n=44	c-erbB-2 polyclonal antibody Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan

Bei der Zulassung von Herceptin® zur Therapie des Mammakarzinoms in den USA wurde ein spezieller Test zum Nachweis des HER2-Status verwendet (CTA - clinical trial assay), der ein Gemisch aus den monoklonalen Antikörpern 4D5 und CB11 kombinierte. In Folge der Entwicklung des HercepTests™ konnte von Seiten der Firma DAKO eine Konkordanz zu den Ergebnissen vom CTA mit 79 % angegeben werden. Hoch abweichende Ergebnisse bei Verwendung des Hercep Tests™ bis zu 58 % Überexpression beim Mammakarzinom (33,69) waren am ehesten dem Abweichen von der standardisierten Arbeitsanleitung und der Verwendung von alkoholhaltigen Medien zum Fixieren anzulasten.

In einer aktuellen Arbeit von Press (66) wurden für den Nachweis von HER-2/neu mehrere gebräuchliche Antikörper bei der Immunhistochemie auf ihre Sensitivität und Sicherheit im Vergleich zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit verschiedenen FISH-Assays getestet. Dabei wurden an Antikörpern:

- der R 60 polyclonale Antikörper
- der 10H8 monoclonaler Antikörper
- der Ventana CB11 monoclonaler Antikörper
- der DAKO HercepTest™

in die Untersuchungen einbezogen. Bei der Auswertung konnten der R60 und Ventana CB11 mit 96,6% Sicherheit überzeugen. Der DAKO HercepTest™ konnte

nur eine Sicherheit von 88,9% erreichen und landete damit nur auf Platz 4 der verwendeten Antikörper. In den Ausführungen von Press (65) wurde der HercepTest™ aber als eine der sichersten Nachweismethoden des HER2-Rezeptors dargestellt, der eine genaue Membranfärbung für das Scoring der HER2-Konzentration zulässt.

In den von uns recherchierten Arbeiten zum HER2-Rezeptorstatus beim Pankreaskarzinom wurden jedoch nicht die von Press dem Hercep Test™ „überlegenen“ Antikörper verwendet.

Thor und Mitarbeiter (79) zeigten in der CALGB 8541 Studie bei Verwendung des CB11-monoklonalen Antikörpers (Biogenex) in 27 % eine Proteinüberexpression beim nodal-positiven Mammakarzinom. Paik (61) zeigte in der NSABP-B11-Studie unter Verwendung eines Antikörpergemisches aus TAB 250 und pAb1 (Zymed) eine Überexpressionsrate von 37,5 %.

In einer Studie von Lebeau (45) wurden 85 nodal-positive Mammakarzinome mit 5 monoklonalen, 2 polyklonalen Antikörpern und dem Hercep Test™ untersucht (monoklonale Antikörper: Ab-2, Ab-3 (Onkogene); CB11 (Novocastra); TAB 250 (Zymed); HER2 (GSF München), polyklonale Antikörper: A8010 (Oncor), A0485 (DAKO)). Die höchste Reaktivität zeigte der A 0485/Hercep Test™ mit 42 % und einer Genamplifikation von 28 %. Alle immunhistochemisch stark positiven Fälle zeigten eine hohe Genamplifikation. Dagegen zeigten die schwach positiven Nachweise (2+) nur in 25 % eine Genamplifikation.

Insgesamt belegen diese Studien die Zuverlässigkeit des HercepTests™ im Nachweis des HER2-Expressionsstatus, jedoch sollten die neueren Ergebnisse von Press aus dem Jahre 2002 (66) in weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt werden.

In Anlehnung an die Studie von Mass und Mitarbeitern (52) beim Mammakarzinom stellt ein positiver HER2-Status noch nicht die positive Beziehung zur Wirksamkeit des Therapeutikums Trastuzumab her. Mass zeigte in seiner Studie, dass die Patientinnen mit negativer HER2-Genamplifikation im FISH-Nachweis trotz positivem HER2-Status im immunhistochemischen Test nicht von einer Chemotherapie mit dem HER2-Antikörper profitieren. Weiterhin wies Mass nach (51), dass eine gleiche Ansprechrate der Therapie bei Mammakarzinompatienten mit schwach positivem HER2-Status (2+) und nachgewiesener Genamplifikation wie bei stark positivem HER2-Status (3+) vorliegt.

Um also eine therapeutische Konsequenz für das Pankreaskarzinom zu erfahren, müsste zusätzlich der sehr geringe Anteil an HER2-schwach-positiven Befunden auf Genamplifikation mittels FISH geprüft werden.

Für Patienten mit einer kurativen Resektion des Pankreaskarzinoms gibt es für die adjuvante Therapie noch kein favorisiertes Konzept. Nach kurativen Resektionen traten nur unbefriedigende Langzeitergebnisse mit 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 5 und 15 % auf. Bei multimodalen Therapiekonzepten liegen bis heute erste Ergebnisse aus größeren Studien für entsprechende Therapien vor. Nach den Ergebnissen der „European Study Group for Pancreatic Cancer“ und der EORTC wurde die Überlegenheit der adjuvanten Chemotherapie gegenüber der Radiochemotherapie herausgearbeitet (54-56). Weitere Phase III-Studien sind derzeit im Gange, um andere Möglichkeiten der Substanzkombinationen zu untersuchen.

Beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom stehen mit Gemcitabin, 5-Fluorouracil/Folinsäure und Cisplatin Substanzen sowohl zur Mono- als auch zur Kombinationstherapie zur Verfügung.

Zum positiven HER2-Status beim Pankreaskarzinom und ableitend zu einer möglichen Therapie mit einem HER2-Rezeptor-Antikörper kann aus unseren Daten gefolgert werden:

- Ein positiver HER2-Status liegt nur in einem sehr geringen Anteil am Gesamtkollektiv vor.
- Für den Status 2+ müsste parallel zu den Erfahrungen in der Behandlung des Mammakarzinoms eine FISH zur Verifizierung der Genamplifikation durchgeführt werden.
- Eine Aussage über eine klinisch schlechtere Prognose mit früherer Metastasierung und Rezidivbildung bei einem positiven HER2-Status kann für das Pankreaskarzinom entgegen den Daten beim Mammakarzinom nicht getroffen werden.

Insgesamt kann der HER2-Status für das Pankreaskarzinom nicht als prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf angesehen werden und bietet bei zu geringem Nachweis in Überexpression keinen Ansatz für eine suffiziente Antikörpertherapie.

## **6. Zusammenfassung**

Aus der bisherigen Literatur zur Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms ergaben sich mit der Entdeckung des HER2-Rezeptors und -Gens sowohl neue Ansätze für die Chemotherapie mit der Substanz Trastuzumab (Herceptin®) als auch Aussagemöglichkeiten zum klinischen Verlauf. Für weitere Karzinome, unter anderem auch das Pankreaskarzinom, wurde daraufhin eine Nachweishäufigkeit des HER2-Rezeptors mit einem möglichen kurativen Therapieansatz und Prognoseparameter angenommen. In mehreren Publikationen wurden bei Pankreaskarzinomzelllinien, Pankreaskarzinomresektaten und normalem Pankreasgewebe das Vorhandensein des HER2-Rezeptors untersucht. Hierbei zeigten sich inhomogene Patientengruppen, geringe Anzahl an Präparaten oder Proben und nicht standardisierte immunhistochemische Verfahren, die die Aussage von HER2 als Prognoseparameter und Therapieansatz anzweifeln lassen.

Mit einer repräsentativen Anzahl von 113 Pankreaskarzinomresektaten konnten wir wie auch schon Untersuchungen von Koeppen und Koka mit einem standardisierten immunhistochemischen Verfahren die Bedeutung von HER2 als therapeutischem Ansatz und Prognoseparameter widerlegen.

In unserem homogenem Patientenkollektiv wiesen wir einen Anteil von 91 % Adenokarzinomen mit mäßiger bis schlechter Differenzierung, überwiegend im klinischen Stadium III, nach. Es gab keine anamnestischen Daten zu malignen Zweiterkrankungen oder zu einer positiven Familienanamnese bezüglich maligner Neoplasien. Das Durchschnittsalter unserer Patienten betrug 61 Jahre.

An allen 113 Pankreaskarzinomresektaten fand mit dem HercepTest™ (DAKO) ein standardisiertes immunhistochemisches Verfahren zum Nachweis der HER2-Expression Anwendung. Der Färbescore wurde unabhängig von zwei Pathologen begutachtet.

Von der Gesamtzahl der 113 Pankreasresektate konnte nur in fünf Fällen (4 %) eine Überexpression der HER2-Rezeptors mit dem Färbescore +2 und +3 nachgewiesen werden. Bei 16 Resektaten wurde der Färbescore +1 festgestellt.

Das mediane Überleben ließ sich für das Gesamtkollektiv mit 11 Monaten berechnen. Die statistischen Berechnungen zur medianen Überlebenszeit ergaben für die HER2-positiven Patienten 12 Monate und die HER2-negativen Patienten 11 Monate. Für die mediane Zeit bis zum Auftreten von Metastasen und Lokalrezidiven

wurden für die HER2-positiven Patienten 12 Monate, für die HER2-negativen Patienten 8 Monate ermittelt.

Insgesamt kann aus unseren Zahlen geschlussfolgert werden, dass für das Pankreaskarzinom im Vergleich zum Mammakarzinom hinsichtlich des immunhistochemischen Nachweises der HER2-Expression keine Analogien vorliegen und eine schlechte Prognose für den Verlauf der Pankreaskarzinomerkrankung nicht bestätigt werden kann.

Aus der Erfahrung beim Mammakarzinom liegt bei einem stark positiven HER2-Status (+3) eine Genamplifikation in bis zu 100% der Fälle, bei einem positiven HER2-Status (+2) in 25 % eine Genamplifikation des HER2-Rezeptors vor (45). Da die Wirksamkeit einer Chemotherapie mit einem HER2-Antikörper eine Genamplifikation voraussetzt, müsste zusätzlich eine FISH-Analyse durchgeführt werden. Bei einer Anzahl von nur 4 von 113 Resektaten mit HER2-Status +2 wäre der Aufwand einer FISH nicht gerechtfertigt.

Unsere Ergebnisse dokumentieren, dass ein möglicher positiver Therapieansatz einer HER2-Antikörpertherapie für das Pankreaskarzinom nicht gegeben und die routinemäßige Erhebung des HER2-Status nicht gerechtfertigt ist. Eine Aussage zur Prognose der Pankreaskarzinomerkrankung lässt sich nach unseren Daten aus dem HER2-Status nicht ableiten.

Eine Ergänzung der Diagnostik durch die FISH zum Nachweis einer Genamplifikation bei positivem HER2-Status erübrigt sich wegen der geringen Anzahl an Patienten mit positivem HER2-Status und den hohen Kosten einer FISH-Analyse.

Ein Ausschöpfen der bisher eingesetzten Chemotherapeutika und die Verbesserung der Primärdiagnostik - nicht nur unter der Prämisse der gerätetechnischen Weiterentwicklung - und die Propagierung präventiver Maßnahmen in der Bevölkerung zum Erreichen eines besseren Gesundheitsbewußtseins, wie zum Beispiel Reduktion der allgemeinen Risikofaktoren (Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Adipositas) und bessere Auslastung der Gesundheits- und Vorsorgeuntersuchungen in den entsprechenden Altersgruppen, erscheinen in Hinblick auf die immer knapper werdenden Finanzmittel im Gesundheitssektor wünschenswert.

## **7. Inhaltsverzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Übersichten** Seite

### **Abbildungen:**

Abbildung 1: Überexpression von HER2 auf der Tumorzelle im Vergleich zur normalen Zelle (aus Produktinformation Herceptin, „Diagnostik von HER2“, Hoffmann-La Roche AG, 2000)	17
Abbildung 2: Übersicht zur Färbemusterbeurteilung von HER2 (aus Produkt-Information HercepTest™, Hoffmann-La Roche AG, 2000)	28
Abbildung 3: Altersgruppenverteilung im Patientenkollektiv	31
Abbildung 4: Darstellung der Überlebenszeit des gesamten Patientenkollektivs (n=113)	36
Abbildung 5: Überlebensraten der Patienten mit duktalem und nicht duktalem Pankreaskarzinom.	37
Abbildung 6: Überlebensraten der Patienten mit duktalem und nicht duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der Operationsletalität.	38
Abbildung 7: Überlebensraten der Patienten mit duktalem und nicht duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach R-Klassifikation.	39
Abbildung 8: Überlebensraten der Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach R-Klassifikation.	40
Abbildung 9: Überlebensraten der Patienten mit duktalem R0-reseziertem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach pT-Kategorie .	41
Abbildung 10: Überlebensraten der Patienten mit duktalem R0-reseziertem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach pN-Kategorie.	42
Abbildung 11: Überlebensraten der Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach M-Kategorie.	43
Abbildung 12: Überlebensraten der Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom unter Ausschluß der postoperativ verstorbenen Patienten nach Malignitätsgrad.	44
Abbildung 13: Rezidiv-/Metastasenfreie Zeit für alle Patienten mit R0-reseziertem duktalem Pankreaskarzinom (n=74).	46

Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfremen Zeit in Abhängigkeit von der pT-Kategorie des duktafen, R0-resezierten Pankreaskarzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität.	48
Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfremen Zeit in Abhängigkeit von der pN-Kategorie des duktafen, R0-resezierten Pankreaskarzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität.	49
Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfremen Zeit in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad des duktafen, R0-resezierten Pankreaskarzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität.	50
Abbildung 17: Vergleichende Darstellung des Überlebens bei Patienten mit HER2-positivem und HER2-negativem Rezeptorstatus (p=0,07).	52
Abbildung 18: Vergleichende Darstellung des Überlebens bei Patienten mit HER2-positivem und HER2-negativem Rezeptorstatus des duktafen, R0-resezierten Pankreaskarzinoms, pN0, unter Ausschluss der postoperativen Letalität.	53
Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der rezidiv- und metastasenfremen Zeit bei HER2-positivem und HER2-negativem Rezeptorstatus des duktafen, R0-resezierten Pankreaskarzinoms unter Ausschluss der postoperativen Letalität.	54

### **Tabellen:**

Tabelle 1: Histologische Aufarbeitung der Pankreasresektate (n=113)	33
Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung nach dem Grading des Tumorgewebes	33
Tabelle 3: Einteilung der operierten Patienten mit Pankreaskarzinom (n=113) in TNM-Stadien nach UICC (2002)	34
Tabelle 4: Häufigkeitsverteilung der erfassten Metastasierungen im Follow up	47
Tabelle 5: Verteilung von Rezidiv und Metastasen bei Patienten mit positivem HER2-Status	47
Tabelle 6: Verteilung der HER2-Protein-Expression aus den Pankreaskarzinomresektaten mittels Immunhistochemie (Hercep-Test™) (n=113)	51

**Übersichten:**

Übersicht 1: Einteilung der Pankreaskarzinome nach UICC (2002)	11
Übersicht 2: Verwendete Antikörper zur Immunhistochemie	74

## **8. Literatur**

- 1. Apple S K, Hecht JR, et al.:** Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53 and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis  
Human Pathology 1999, 30(2): 123-129
- 2. Berger MS, Locher GW, et al.:** Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading  
Cancer Res 1988, 48: 1238-1243
- 3. Bobrow LG, Lee AH:** Relationship of histologic grade, c-erbB-2 expression, and inflammatory infiltrate to prognosis in carcinoma of the breast  
J Clin Oncol 1996 Jan, 14(1): 85-94
- 4. Bramhall SA, Schulz J, Nemunaitis J, et al.:** A double-blind placebo controlled, randomised study comparing gemcitabine (GEM) and marimastat and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer  
Br J Surg 2002, 87: 161-167
- 5. Brandt-Rauf P W :** The c-erbB transmembrane growth factor receptors as serum markers in human cancer studies  
Mutat Res 1995, 333(1-2): 203-208
- 6. Burris HA, Moore MJ, et al.:** Improvements in Survival and Clinical Benefit With Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients with Advanced Pancreatic Cancer  
J Clin Oncol 1997, 15(6): 2403-2413
- 7. Busmanis I, Feleppa F et al.:** Analysis of cerbBs expression usin a panel of 6 commercially available antibodies  
Pathology 1994, 26(3): 261-267
- 8. Cohen JA, Weiner DB, et al. :** Expression pattern of the neu (NGL) gene-encoded growth factor receptor protein (p185neu) in normal transformed epithelial tissues of the digestive tract  
Oncogene. 1989, 4(1): 81-88
- 9. Colucci G, Giuliani F, Gebbia V, et al.:** Gemcitabine alone or with Cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma, randomised phase III study of the Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale  
Cancer 2002, 94: 902-910
- 10. Day J D, Digiuseppe JA, et al.:** Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms  
Human Pathology 1996, 27(2): 119-124
- 11. Dergham S T, Dugan MC, et al. :** Relationship of family cancer history to the expression of p53, p21WAF-1, HER-2/neu, and K-ras mutation in pancreatic adenocarcinoma  
Int J Pancreatol 1997, 21(3): 225-234

- 12. Dougall WC, Qian X, et al. :** Interaction of the neu/p185 and EGF receptor tyrosine kinases : implications for cellular transformation and tumor therapy  
J Cell Biochem. 1993, 53(1): 61-73
- 13. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, et al.:** Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how?  
Eur J Cancer 2000, 36: 170-176
- 14. Dowsett M, Bartlett J, Ellis I, et al.:** Correlation between immunohistochemistry (Hercep Test) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres  
J Pathol 2003, 199(4): 418-423
- 15. Dugan M C, Dergham ST, et al. :** HER -2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma : relation to tumor differentiation and survival  
Pancreas. 1997, 14(3): 229-236
- 16. Evers BM, Rady PL, et al. :** Gastrinomas demonstrate amplification of the HER-2/neu proto-oncogene  
Ann Surg 1994, 219(6): 596-601; discussion 602-604
- 17. Engel J, et al.:** Epidemiologie gastrointestinaler Tumoren  
aus Manual Gastrointestinale Tumoren, 2001, Tumorzentrum München: 3-6
- 18. Fink C, Grenacher L, et al. :** Prospective study to compare high resolution computed tomography and magnetic resonance imaging for the detection of pancreatic neoplasms : Use of intravenous and oral contrast media  
Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren 2000, 173(8): 724-730
- 19. Friess H, Yamanaka Y, et al.:** A subgroup of patients with chronic pancreatitis overexpress c-erb-B2 protooncogene  
Ann Surg 1994, 220(2): 183-192
- 20. Friess H, et al. :** Growth factor receptors are differentially expressed in cancers of the papilla of vater and pancreas  
Ann Surg 1999, 230 (6): 767-774; dicussion 774-775
- 21. Gastrointestinal Tumor Study Group:** Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer  
Cancer 1997, 59 (12): 2006-10
- 22. Guerin M, Barrois M, Terrier MJ, et al. :** Overexpression of either c-myc or erbB-2/neu proto-oncogenes in human breast carcinomas: correlation with poor prognosis  
Oncogene Res 1988, 3: 21-31
- 23. Hall PA, Hughes CM, et al.:** The c-erbB-2 proto-oncogene in human pancreatic cancer  
J Pathol 1990, 161: 195-200

- 24. Heinemann V** : Gemcitabine: Progress in the Treatment of Pancreatic Cancer  
Oncology 2001, 60: 8-18
- 25. Heinemann V, Quitzsch D, et al.**: A phase III trial comparing gemcitabine plus cisplatin versus gemcitabine alone in advanced pancreatic carcinoma  
Proc Am Soc Clin Oncol 2003, 22: 250 (Abstr 1003)
- 26. Hoffman JP, Lipsitz S, et al.** : Phase II trial of preoperative radiation therapy and chemotherapy for patients with localized, resectable adenocarcinoma of the pancreas: Eastern Cooperative Oncology Group Study  
J Clin Oncol 1998, 16 (1): 317-323
- 27. Holzmann K, Welter C, et al.**: Tumor-Specific Methylation Patterns of erbB2 (HER2/neu) Sequences in Gastro-Intestinal Cancer  
Anticancer Research 1992, 12: 1013-1018
- 28. Hruban RH, Wilentz RE et al.** : Genetic progression in the pancreatic ducts  
Am J Pathol. 2000, 156 (6): 1821-1825
- 29. Hruban RH, Canto MI, Yeo CJ**: Prevention of pancreatic cancer and strategies for management of familial pancreatic cancer  
Dig Dis 2001, 19: 76-84
- 30. Ihse I, Andersson R, et al.**: Kombinationstherapie in der Onkologie (multimodale Behandlung) bei Pankreastumoren  
Chirurg 1998, 69 (4): 366-370
- 31. Islam H K, Fujioka Y, et al.**: Immunohistochemical analysis of expression of molecular biologic factors in intraductal papillary-mucinous tumors of pancreas – diagnostic and biologic significance  
Hepatogastroenterology 1999, 46(28): 2599-2605
- 32. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al.**: Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system  
J Clin Oncol 1999a, 17:1983-1987
- 33. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al.**: Comparison of fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer  
J Clin Oncol 1999b, 17:1974-1982
- 34. Jimenez R E, Wallis T, et al.**: Determination of Her-2/Neu Status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridisation  
Modern Pathology 2000, 13: 37-45
- 35. Kalsner MH, Ellenberger SS**: Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection  
Arch Surg 1985, 120(8): 899-903

- 36. Kasperk R, Klever P, et al.:** Intraoperative radiotherapy for pancreatic carcinoma  
Br J Surg 1995, 82: 1259-1261
- 37. Kastl S, Brunner T, et al.:** Neoadjuvant radio-chemotherapy in advanced primarily non-resectable carcinomas of the pancreas  
Eur J Surg Oncol 2000, 26 (6): 578-582
- 38. Kaufmann M, Kanz L:** Immuntherapie der Mammakarzinome mit Herceptin  
Deutsches Ärzteblatt 2000, 97(13): 844-7
- 39. Kawesha A, Ghaneh P, et al.:** K-ras oncogene subtype mutations are associated with survival but not expression of p53, p16 (INK4A), p21 (WAF-1), cyclin D1, erbB-2 and erbB-3 in resected pancreatic ductal adenocarcinoma  
Int J Cancer 2000, 89(6): 469-474
- 40. Klinkenbijn JH, Jeekel J, et al.:** Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and the periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group  
Ann Surg 1999, 230 (6): 776-784
- 41. Koeppen HK, Wright BD, et al.:** Overexpression of HER2/neu in solid tumors: an immunohistochemical survey  
Histopathology 2001, 38(2): 96-104
- 42. Koka V, Potti A, et al.:** Role of immunohistochemical identification of HER-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma  
Anticancer Res 2002, 22(3): 1593-1597
- 43. Kolb G, Safi F, et al.:** Klinische Aussagekraft des Tumormarkers CA 19-9 unter besonderer Berücksichtigung des Lewis-Phänotyps  
Tumordiagnostik und Therapie 1996, 17: 177-181
- 44. Lamerz R :** Role of tumor markers  
Ann Oncol 1999, 10(4): 145-149
- 45. Lebeau A, Deimling D, et al.:** HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: Comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridisation  
J Clin Oncol 2001, 19: 354-363
- 46. Lei S, Appert HE, et al.:** Overexpression of HER2/neu oncogene in pancreatic cancer correlates with shortened survival  
International Journal of Pancreatology 1995, 17(1): 15-21
- 47. Lemoine NR, Hall PA :** Growth factors and oncogenes in pancreatic cancer  
Bailliere`s Clin Gastroenterol 1990, 4: 815-832
- 48. Lionetto R, Pugliese V, et al.:** No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer  
Eur J Cancer 1995, 31(6): 882-887

- 49. Magee CJ, Ghaneh P, et al. :** The role of adjuvant therapy for pancreatic cancer  
Expert Opin Invest Drugs 2001, 11 (1)
- 50. Maguire H C Jr, Greene M I:** The neu (c-erbB-2) oncogene  
Semin Oncol 1989, 16 (2): 148-155
- 51. Mass R, Sanders C, Kasian C, et al.:** The concordance between the clinical trial assay (CTA) and fluorescence in situ hybridisation in the Herceptin pivotal trials  
Proc Am Soc Clin Oncol 2000, 19: 75
- 52. Mass R, Press M, Anderson S, et al.:** Improved survival benefit from Herceptin (Trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridisation (FISH)  
Proc Am Soc Clin Oncol 2001, 20: 85
- 53. Matsukuma S, Suda K:** Small pancreatic tubular adenocarcinomas : clinicopathological analysis with immunohistochemical and histochemical evaluation  
Pathology international 1996, 46(8): 581-588
- 54. Neoptolemos JP, Dunn JA, et al.:** Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer  
Lancet 2001, 358: 1576-1585
- 55. Neoptolemos JP, Ghaneh P, et al.:** The role of adjuvant therapy for pancreatic cancer  
Expert Opin Investig Drugs 2002, 11(1): 87-107
- 56. Neoptolemos JP, Stocken DD, et al.:** Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by chemoradiation and /or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial  
Ann Surg 2001, 234 (6): 758-768
- 57. Nishimura Y, Hosotani R, et al.:** External and intraoperative radiotherapy for respectable and unresectable pancreatic cancer: analysis of survival rates and complications  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997, 39: 39-49
- 58. Novotny J, Petruzelka L, et al.:** Prognostic significance of c-erbB-2 gene expression in pancreatic cancer patients  
Neoplasma 2001, 48 (3): 188-191
- 59. Oettle H, et al.:** The role of gemcitabine alone and in combination in the treatment of pancreatic cancer  
Anticancer Drugs 2000, 11(10): 771-786
- 60. Oettle H, Arnold D, et al.:** Aspekte in der adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms  
Praxis 2000, 89: 2017-2025
- 61. Paik S, Bryant J, et al.:** erbB-2 and response to doxyrubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer  
J Natl Cancer Inst 1998 Sep 16, 90(18):1320-1

- 62. Pauletti G, Godolphin W, et al.:** Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridisation  
Oncogene 1996, 13: 63-72
- 63. Peiper M, Goedegebuure PS, et al.:** Pancreatic Cancer Associated Ascites-Derived CTL Recognize a Nine-Amino-Acid Peptide GP2 Derived from HER2/neu  
Anticancer Research 1999, 19: 2471-2476
- 64. Plath T, Peters M, et al.:** Overexpression of pRB in human pancreatic carcinoma cells: function in chemotherapy-induced apoptosis  
J Natl Cancer Inst 2002, 94: 129-42
- 65. Press MF, Bernstein L, et al.:** HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridisation: poor prognosis in node-negative breast carcinomas  
J Clin Oncol 1997, 15(8):2894-2904
- 66. Press MF, Slamon DJ, et al.:** Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens  
J Clin Oncol 2002, 20(14): 3095-3105
- 67. Ridwelski K, Meyer F:** Current options for palliative treatment in patients with pancreatic cancer  
Dig Dis 2001, 19 (1): 63-75
- 68. Roche PC, Ingle JN:** Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody  
J Clin Oncol 1999, 17:434
- 69. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, et al.:** Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831  
J Natl Cancer Inst 2002, 94 (11): 855-857
- 70. Safran H, Steinhoff M, et al.:** Overexpression of the HER-2/neu Oncogene in Pancreatic Adenocarcinoma  
Am J Clin Oncol 2001, 24: 496-499
- 71. Sakorafas GH, Tsiotou AG, et al.:** Genetic basis of cancer of the pancreas: diagnostics and therapeutic applications  
Eur J Surg 1994, 160 (10): 529-534
- 72. Satoh K, Sasano H:** An Immunohistochemical Study of the c-erbB-2 Oncogene Product in Intraductal Mucin-Hypersecreting Neoplasms and in Ductal Cell Carcinomas of the Pancreas  
Cancer 1993, 72: 51-56
- 73. Schramm H, Urban H, et al.:** Intrasurgical pancreas cytology  
Pancreas 2002, 24(2): 210-14

- 74. Slamon DJ, Clark GM, et al.:** Correlation of relapse and survival with amplification of the erbB-2/neu oncogene  
Science 1987, 235: 177-182
- 75. Slamon DJ, Godolphin W, et al.:** Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer  
Science 1989, 244: 707-712
- 76. Sliwkowski MX, Lofgren JA, et al.:** Nonclinical Studies Addressing the Mechanism of Action of Trastuzumab (Herceptin)  
Seminars in Oncology 1999, 26 (4): 60-70
- 77. Taylor AM, Roberts SA, et al.:** Experience with laparoscopic ultrasonography for defining tumor resectability in carcinoma of the pancreatic head and periampullary region  
British Journal of Surgery 2001, 88(8): 1077-1083
- 78. Terada T, Ohta T, Nakanuma Y:** Expression of oncogene products, anti-oncogene products and oncofetal antigens in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas  
Histopathology 1996 Oct, 29(4): 355-361
- 79. Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al.:** erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer  
H Natl Cancer Inst 1998, 90: 1346-1360
- 80. Toth J, Szentkuti A:** Expression of HER-2 in breast cancer  
Magy Onkol 2000, 44(1):33-51
- 81. Tomaszewska R, Okon K, et al.:** HER-2/neu expression as a progression marker in pancreatic intraepithelial neoplasia  
Polish Journal of Pathology 1998, 49(2): 83-92
- 82. Tsioulis GJ, Wood TF, et al.:** Diagnostic laparoscopy and laparoscopic ultrasonography optimize the staging and resectability of intraabdominal neoplasms  
Surgical Endoscopy-Ultrasound and Interventional Technics 2001, 15(9): 1016-1019
- 83. Ulrich A, Schlesinger J et al.:** Signal transduction by receptors with tyrosin kinase activity  
Cell 1990, 61: 203-12
- 84. van de Vijver M:** Assessment of the need and appropriate method for testing for the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)  
European Journal of Cancer 2001, 37(1): 11-17
- 85. Van Cutsem E, Karasek P et al.:** Phase III trial comparing gemcitabine + R115777 (Zarnestra) versus gemcitabine and placebo in advanced pancreatic cancer (PC)  
Proc Am Soc clin Oncol 2002, 21: 130a (Abstr 517)

- 86. Willet CG, Lewandrowski K, Warshaw AL, et al.:** Resection margins in carcinoma of the head of the pancreas. Implications for radiation therapy  
Ann Surg 1993, 217(2): 144-8
- 87. Williams TM, Weiner DB, et al.:** Expression of c-erbB-2 in human pancreatic adenocarcinomas  
Pathobiology 1991, 59: 46-52
- 88. Wright C, Angus B, et al.:** Expression of c-erbB-2 oncoprotein . A prognostic indicator in human breast cancer  
Cancer Res 1989, 49: 2087-2090
- 89. Yamanaka Y, Friess H, et al.:** Overexpression of HER2/neu Oncogene in Human Pancreatic Carcinoma  
Human Pathology 1993, 24: 1127-1134
- 90. Yamao K, Nakazawa S, et al.:** A mucous histochemical and immunohistochemical study of precancerous and neoplastic lesions in the human pancreas  
Int J Pancreatol. 1993, 14(1): 37-44
- 91. Yeo CJ, Abrahams RA, et al.:** Pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: postoperative adjuvant chemoradiation improves survival  
Ann Surg 1997, 225: 621-633

## 9. Tabellarischer Lebenslauf

<b>Name</b>	:	Jan Alexander Winkler
<b>geboren</b>	:	08.03.1970 in Jena
<b>Staatsangehörigkeit</b>	:	deutsch
<b>Wohnanschrift</b>	:	August-Bebel-Strasse 13 07743 Jena
<b>Familienstand</b>	:	verheiratet/ 1 Kind
<b>Schulbildung</b>	:	- 1976 - 1986 Polytechnische Oberschule „Bertolt Brecht“ Jena - 1986 - 1988 Erweiterte Oberschule „Johannes R.Becher“ Jena - August 1988 Abitur
<b>Wehrdienst</b>	:	September 1988 - Mai 1990 Unteroffizier auf Zeit in der NVA
<b>Tätigkeit vor dem Studium</b>	:	Juni - August 1990 Hilfspfleger im Städtischen Krankenhaus Jena
<b>Studium</b>	:	- September 1990 - 1996 Studium der Humanmedizin an der Friedrich- Schiller-Universität Jena, Abschluß mit Staatsexamen
<b>Berufstätigkeit</b>	:	- Oktober 1996 - März 1998 Arzt im Praktikum im KKH Ebersdorf Chirurgische Abteilung - April - August 1998 Assistenzarzt für Chirurgie im KKH Ebersdorf - September 1998 - September 2004 Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin am Waldklinikum Gera gGmbH - 30.11.2004 Facharzt für Innere Medizin - arbeitssuchend vom 01.10.2004 bis 31.12.2004 - Praxisvertretung in einer Hausarzt- praxis vom 02.01.2005 bis 31.03.2005 - Niederlassung in eigener Praxis als hausärztlicher Internist seit 01.04.2005

## **10. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Charité bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir genutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Alexander Winkler

Jena, 25.05.2006