

Universität Ulm  
Klinik für Innere Medizin II  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Rottbauer

**Diagnostik zirkulierender Tumorzellen beim**  
**Lungenkarzinom**

**Eine neue In-vivo-Methode**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**  
**der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

Thomas Michael Schalk

Ansbach

2015

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth**

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Schumann**

**2. Berichterstatter: PD Dr. med. C. Langer**

**Tag der Promotion: 09.02.2017**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Einführung zum Lungenkarzinom .....	1
1.2 Geschichte zirkulierender Tumorzellen.....	2
1.3 Entstehung zirkulierender Tumorzellen.....	2
1.4 Metastasierung beim Bronchialkarzinom .....	3
1.5 Bedeutung zirkulierender Tumorzellen in der Onkologie .....	4
1.6 Fragestellung der klinischen Studie .....	7
2 Material und Methoden .....	9
2.1 Studiendesign.....	9
2.2 CellSearch®.....	12
2.2.1 Funktionsweise von CellSearch® .....	12
2.2.2 Anwendung von CellSearch®.....	12
2.2.3 Auswertung CellSearch® .....	13
2.3 CellCollector™ .....	14
2.3.1 Funktionsweise des CellCollectors™ .....	14
2.3.2 Anwendung und Arbeitsweise des CellCollectors™ .....	14
2.3.3 Auswertung des CellCollectors™.....	15
2.4 Auswertung und Datengewinn.....	18
2.5 Ethikantrag .....	18
2.6 Datenbank.....	19
2.7 Statistik .....	19
3 Ergebnisteil.....	22
3.1 Doppelanwendung des CellCollectors™ .....	22
3.1.1 Sensitivität des CellCollectors™ .....	23
3.1.2 Darstellung der Ergebnisse des CellCollectors™ in Boxplots.....	24
3.1.3 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 mit Regressionsanalyse.....	25
3.1.4 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 unter Einbeziehung des Tumorstadiums.....	26
3.1.5 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 unter Einbeziehung von Metastasierungsgrad und der Regressionsgeraden.....	27
3.1.6 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 unter Einbeziehung der Tumorgroße .....	29
3.1.7 Bland-Altman Plot zum Vergleich von Draht-1 und Draht-2.....	30
3.2 Vergleich CellCollector™ mit der Referenzmethode CellSearch® .....	32
3.2.1 Sensitivität von CellSearch® im Vergleich zum CellCollector™.....	33

3.2.2	Gegenüberstellung der Ergebnisse von CellCollector™ und CellSearch® durch Boxplots.....	34
3.2.3	Scatterplot aus CellCollector™ - Draht-1 und CellSearch® mit Regressionsanalyse ...	35
3.2.4	Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung der CellSearch®-Ergebnisse .....	36
3.2.5	Scatterplot aus CellCollector™ - Draht-1 und CellSearch® unter Einbeziehung des Tumorstadiums .....	37
3.2.6	Scatterplot aus CellCollector™ - Draht-1 und CellSearch® unter Einbeziehung der Tumorgröße.....	38
3.2.7	Bland-Altman Plot zum Vergleich CellCollector™ und CellSearch® .....	39
4	Diskussion .....	41
4.1	Diskussion der Ergebnisse des CellCollectors™ .....	41
4.1.1	Sensitivität des CellCollectors™ .....	41
4.1.2	Darstellung der Ergebnisse des CellCollectors™ durch Boxplots .....	42
4.1.3	Scatterplot aus Draht-1 und -2 mit Regressionsanalyse.....	42
4.1.4	Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung des Tumorstadiums.....	43
4.1.5	Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung des Metastasierungsgrades und Regressionsgeraden .....	43
4.1.6	Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung der Tumorgröße .....	44
4.1.7	Bland-Altman Plot zum Vergleich von Draht-1 und -2.....	45
4.1.8	Fehleranalyse und –diskussion der Ergebnisse des CellCollectors™ .....	45
4.2	Vergleich zwischen CellCollector™ und CellSearch® .....	48
4.2.1	Sensitivität von CellSearch® im Vergleich zum CellCollector™.....	48
4.2.2	Gegenüberstellung der Ergebnisse des CellCollectors™ und CellSearch® durch Boxplots.....	50
4.2.3	Scatterplot aus den Ergebnissen des CellCollectors™ und CellSearch® mit Regressionsanalyse.....	50
4.2.4	Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung der CellSearch®-Ergebnisse .....	51
4.2.5	Scatterplot aus den Ergebnissen des CellCollectors™ und CellSearch® unter Einbeziehung des Tumorstadiums .....	51
4.2.6	Scatterplot aus den Ergebnissen des CellCollectors™ und CellSearch® unter Einbeziehung der Tumorgröße .....	52
4.2.7	Bland-Altman Plot zum Vergleich der Ergebnisse des CellCollectors™ und CellSearch® .....	52
4.3	Bewertung beider Methoden.....	53
4.4	Ausblick in die Zukunft der CTC-Forschung .....	54
5	Zusammenfassung .....	55
6	Literaturverzeichnis .....	VI
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	IX

# Abkürzungsverzeichnis

Ck	Cytokeratin (Keratin-haltiges Intermediärfilament)
Ck-PE	Cytokeratin-Phycoerythrin (Phycoerythrin – bei Algen vorkommendes Pigment, welches Licht unterschiedlicher Absorbptionsmaxima resorbiert)
CTC	Circulating tumor cell
Cy3	Indocarbocyanin Fluoreszenzfarbstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA besonders AT-Bereiche)
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FSMW	Functionalized and structured medical wire
GFP-Filter	Green fluorescent protein (Fluoreszierendes Protein mit der Eigenschaft an DNA zu binden)
HER2	Human epidermal growth factor 2
MOT	Medizinisch-onkologische Tagesklinik
Na <sub>2</sub> EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Komplexbildner mit der Fähigkeit Calcium zu binden)
PCR	Polymerase chain reaction (in-vitro Methode zur Vervielfältigung von DNA)
TNM	TNM - Classification of malignant tumors (tumor, node, metastasis)
UICC	Union internationale contre le cancer

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung zum Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom gehört heute zu den häufigsten Tumorerkrankungen in der westlichen Welt. In den vergangenen Jahren galt es in der europäischen Union als dritthäufigstes Karzinom, führte jedoch die Mortalitätsstatistiken mit deutlichem Vorsprung an. (Matthys u. Seeger 2008) Besonders beim Lungenkarzinom ist der Krankheitsverlauf ganz entscheidend davon beeinflusst, wie frühzeitig dieses erkannt wird. In den meisten Fällen befinden sich Patienten mit Lungenkarzinomen zum Zeitpunkt der Diagnose in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium. In der Tumordiagnostik gewann die pathologische Analyse des Tumorgewebes in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung, um die Therapie möglichst individuell jedem Patienten anzupassen. Hierbei spielt vor allem die genaue Histologie des Tumors eine entscheidende Rolle für die weitere Behandlung. Zusätzlich werden anhand der entnommenen Biopsie des Tumorgewebes molekulare Analysen durchgeführt, welche auf spezielle Marker wie beispielsweise EGFR testen, um einerseits die Behandlung daran anpassen zu können, andererseits Rückschlüsse auf die Entstehung und Aggressivität des Tumors treffen zu können. Die Biopsien werden in erste Linie durch bronchoskopische Eingriffe gewonnen. Hieraus können sich für den Patienten Probleme und Komplikationen ergeben. Zum einen besteht bei jedem Eingriff einer Biopsie-Entnahme, ob bronchoskopisch oder per Feinnadelpunktion, die Gefahr eines Pneumothorax, zum anderen kann durch Nachblutungen etc. die Lungenfunktion erheblich beeinträchtigt sein. In einigen Fällen sind wiederholte Eingriffe erforderlich, um ausreichend viel verwertbare Biopsie zu erhalten, insbesondere bei peripheren Tumoren in der Lunge. Da zum Zweck ausführlicher molekularer Analysen teils deutlich mehr Probenmaterial benötigt wird als zum einfachen Tumornachweis, kann auch dies Grund für eine weitere Biopsie sein.

Infolge dessen sind neue Möglichkeiten der Zellgewinnung durch „Liquid Biopsy“ zu analysezwecken als für die Patienten wenig invasive und damit besonders schonende Methode in den letzten Jahren zunehmend in den Focus der Wissenschaft gerückt. Unter „Liquid Biopsy“ ist die nicht-invasive Gewinnung von Tumorzellen bzw. Tumor-DNA aus dem Blutkreislauf zu verstehen. Besonders die molekulare Analyse der so gewonnen Tumorzellen könnte als großer Gewinn für die Onkologie angesehen werden. Schwierigkeiten ergeben sich jedoch die im Blut zirkulierenden Tumorzellen möglichst

unversehrt in vivo zu entnehmen und anschließend molekular zu analysieren. Diesem Ziel versucht man mit dem von der Firma Gilupi entwickelten CellCollector™ ein Stückchen näher zu kommen. Mit der klinischen Anwendung dieses CellCollectors™ an Lungenkrebs-Patienten befasst sich die im Folgenden vorgestellte Studie.

## **1.2 Geschichte zirkulierender Tumorzellen**

Im Jahr 1869 entdeckte der australische Physiker und Naturwissenschaftler Thomas Ashworth im Blut eines an einem metastasierenden Tumorleiden erkrankten Patienten, Zellen, die wie er selbst schrieb, lichtmikroskopisch ein ähnliches Erscheinungsbild wie die Zellen des Primärtumors besaßen. Diese Zellen könnten seiner Ansicht nach eine Erklärung bieten, wie es im Rest des Körpers zu Tochtergeschwülsten kommen kann. Jedoch war ihm nicht klar, wie Zellen vom Tumor an andere Stellen des Körpers gelangen können. Ashworth schloss daraus, dass Zellen aus dem Primärtumor auf irgendeine Weise den Weg in die Blutbahn finden müssten und so sich schließlich im Körper verbreiten könnten. Dies war die Geburtsstunde der zirkulierenden Tumorzellen, kurz CTCs. (Ashworth 1869)

## **1.3 Entstehung zirkulierender Tumorzellen**

Zirkulierende Tumorzellen sind Zellen, die sich im Laufe des Wachstums eines Tumors ablösen und den Weg in den Blutkreislauf finden. Im Verlauf der Zellteilung lösen sich beim Wiederanheften der Tochterzellen an der Tumorzellverband einzelne Zellen ab und können sich weiter verbreiten. (Pachmann 2012) Die Tumorzellen, welche sich vom Tumor gelöst haben, können entweder direkt über die in den Tumor einsprossenden Gefäße in den Blutkreislauf gelangen oder einen Umweg über dem Tumor benachbarte Lymphknoten machen, um aus diesen ins Blut filtriert zu werden. Bereits 1988 stellte der Onkologe D. Glaves fest, dass ein Tumor von etwa 10 cm Größe pro Tag ca. 30 Millionen Zellen freisetzt. Jedoch vermutet man, dass ein Großteil dieser CTCs schnell wieder aus dem Blut eliminiert wird. Hier kommen unter anderem Mechanismen der zellulären Abwehr (z.B. CD8-positive zytotoxische T-Zellen) zum Einsatz. Die humorale Abwehr (z.B. durch Antikörper) benötigt auf den Tumorzellen befindliche Signale bzw. Antigene,

welche signalisieren, dass es sich um eine körperfremde Zelle handelt, was bei CTCs oft nicht der Fall ist. Da man davon ausgeht, dass zirkulierende Tumorzellen im Blut eine Halbwertszeit von 2,4 Stunden besitzen, würden nach der oben genannten Größenordnung noch etwa 60.000 Tumorzellen pro Tag sich weiter im Körper verbreiten. (Pachmann 2012)

## **1.4 Metastasierung beim Bronchialkarzinom**

Die Fähigkeit in Gewebe einzudringen ist eines der wesentlichen Kennzeichen von Malignität und läuft in fünf wesentlichen Schritten ab. Zuerst lösen sich die Zell-Zell-Kontakte, welche die Tumorzellen im Zellverband zusammen halten. Hierbei handelt es sich um Calcium abhängige Celladhäsionsmoleküle (CAMs) oder transmembrane Glykoproteine, die auch Cadherine genannt werden. Eine Schlüsselrolle in der Ablösung von Tumorzellen spielt hierbei das Molekül E-Cadherin mit seiner Zytoplasma-Komponente  $\beta$ -Catenin. Bei fast allen Tumoren epithelialen Ursprungs, wie auch beim Lungenkarzinom, kommt es im Zuge der Metastasierung zum Funktionsverlust der E-Cadherine. Entweder wird dies verursacht durch Mutationsbedingte Inaktivierung von E-Cadherin-Genen und Aktivierung von  $\beta$ -Catenin-Genen oder aber durch die unangemessene Expression von SNAIL- und TWIST-Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von E-Cadherin supprimieren. Nach dem Lösen der Zell-Zell-Kontakte kommt es zu einer Degradierung der Extrazellulär-Matrix durch proteolytische Enzyme wie Cathepsine und Matrix-Metalloproteasen, die von Tumorzellen und Stromazellen (Fibroblasten oder Entzündungszellen) sezerniert werden. Zeitgleich stimulieren diese Enzyme die Bildung von Wachstumsfaktoren für Gefäßneubildungen und neue Extrazellulär-Matrix. Im Weiteren heften sich die losgelösten Tumorzellen anderorts im Körper über Integrine auf ihrer Oberfläche an Extrazellulär-Matrix-Komponenten wie Laminin und Kollagen IV. Dabei entstehen durch die Spaltung von Basalmembran-Komponenten durch Matrix-Metallo-Proteasen neue Anheftungsstellen, an die die Rezeptoren der Tumorzellen binden können. Als letzter Schritt der Metastasierung folgt die Invasion von Tumorzellen durch die degradierte Basalmembran und durch die Zonen von Matrix-Proteolyse. (vgl. Robbins et al. 2007 (bezieht sich auf gesamte S. 3))



Die Invasion ist ein mehrstufiger Prozess aus dem komplexen Zusammenspiel von Rezeptoren und Signalproteinen. Zum einen spielen hierbei Cytokine, wie die Autocrine Motility Factors, zum anderen Matrix-Komponenten (z.B. Kollagen und Laminin) sowie Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin-like growth factor I und II) eine Rolle. Tumorzellen leben in einem komplexen und sich wandelnden Milieu hergestellt von der Extrazellulär-Matrix, von Wachstumsfaktoren, Fibroblasten und Immunzellen. Die erfolgreichsten Tumoren sind diejenigen, die sich am besten an die jeweiligen Bedingungen anpassen können. (vgl. Robbins et al. 2007)

Der Ort an dem Tumore Metastasen bilden können, lässt sich durch die Lage des Primärtumors vorhersagen. (vgl. Robbins et al. 2007) Häufig bilden sich Metastasen in Organen die dem Blut- bzw. Lymphabfluss des Tumors direkt nachgeschaltet sind. Bei der Lunge sind dies vor allem die Leber und die Nebennieren, aber auch der hohen Durchblutungsrate geschuldet, Knochenmark und Gehirn, und nicht zuletzt aufgrund der anatomischen Nähe, die Pleura.

## **1.5 Bedeutung zirkulierender Tumorzellen in der Onkologie**

Werden im Blut zirkulierenden Tumorzellen detektiert, ist das noch kein Nachweis einer vorliegenden Metastasierung des Tumors. Jedoch können im Blut gefundene Tumorzellen Aufschluss über Tumorlast oder das Ansprechen einer chemotherapeutischen Systembehandlung geben und sind ein prognostischer Parameter für Metastasierung. Eine Krebsfrühdagnostik auf der Grundlage von zirkulierenden Tumorzellen ist zurzeit noch nicht möglich. Zum einen aufgrund der geringen Sensitivität der bisher zugelassenen Methoden und zum anderen aufgrund der Tatsache, dass nicht jede Tumorzelle, die von einem Tumor ins Blut übergeht, die gleichen Eigenschaften (z.B. Oberflächenantigene) aufweist. Zudem ist davon auszugehen, dass sich die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen bei frühen Tumorstadien wegen der geringen Größe des Primärtumors und des geringen Zellumsatzes schwieriger darstellt als bei weiter vorgeschrittenen Stadien, wo tendenziell höhere Zahlen von CTCs gemessen werden. (Tanaka et al. 2010)

In Abbildung 1 zeigt eine Übersicht die bisher eingesetzten Methoden zur Gewinnung zirkulierender Tumorzellen. Dabei wird zunächst unterschieden zwischen Methoden, die eine Differenzierung der Tumorzellen von normalen Blutzellen aufgrund deren

physikalischen und biologischen Eigenschaften ermöglichen. Zu den physikalischen Eigenschaften der Tumorzellen zählen Größe, Dichte oder deren Verhalten im elektrischen Feld. Die Unterscheidung anhand der Größe der Zellen erfolgt über spezielle Filter, z.B. den ISET (isolation of epithelial tumor cells) oder über dreidimensionale Mikrofilter. Die Unterscheidung auf Basis der Dichte der Zellen erfolgt mittels spezieller Zentrifugation und die Trennung der Blutzellen im elektrischen Feld erfolgt mittels Dielektrophorese. (Alix-Panabières u. Pantel 2013)

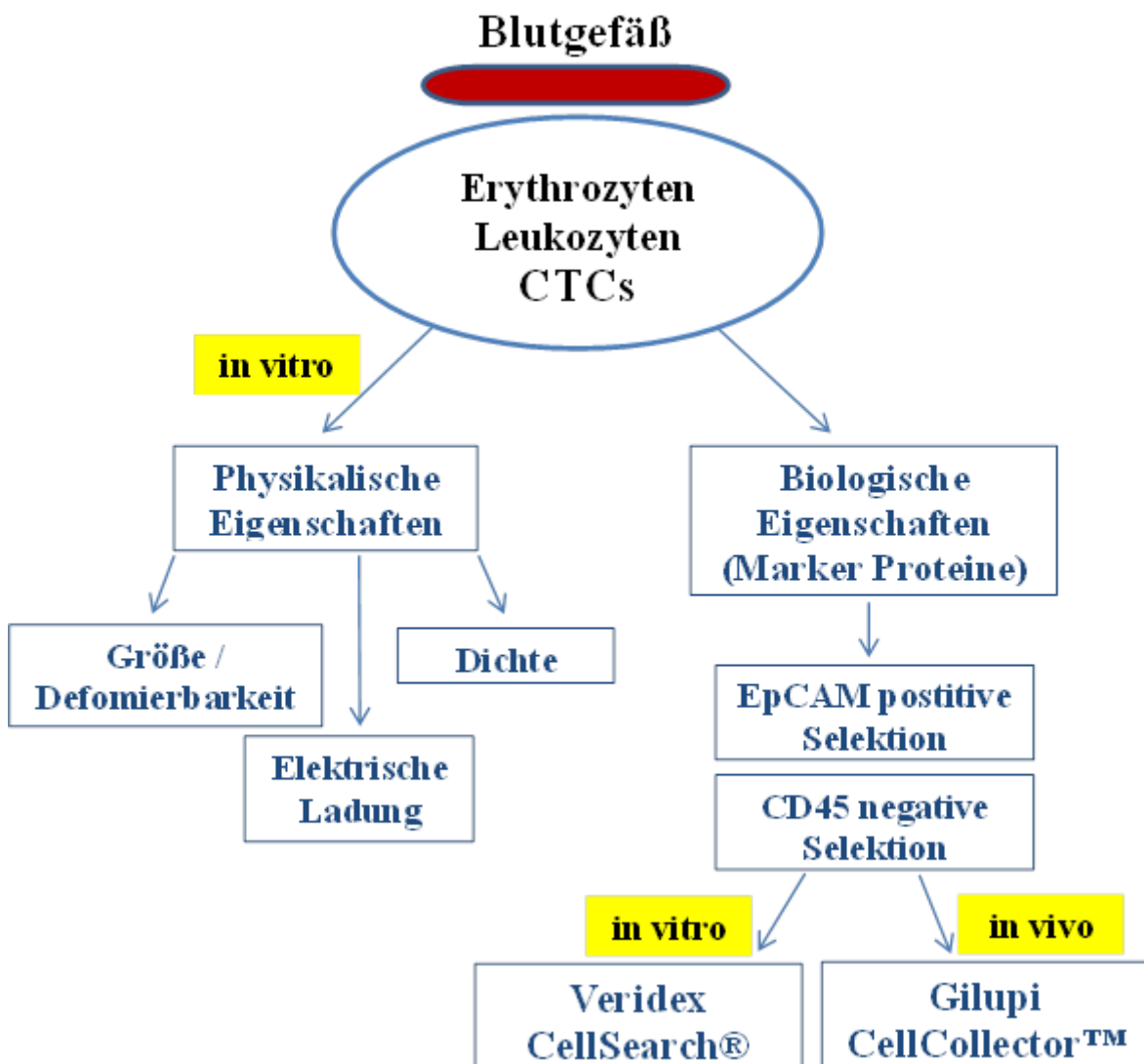


Abbildung 1: Übersicht bisheriger Methoden zur Gewinnung zirkulierender Tumorzellen mit der Unterscheidung zwischen in vitro (Vorgänge außerhalb des lebenden Organismus) und in vivo (Vorgänge im lebenden Organismus). Links in der Abbildung sind Methoden abgebildet, wie anhand der physikalischen Eigenschaften nach Größe und Deformierbarkeit der Tumorzellen, nach spezifischem Gewicht oder nach Verhalten im elektrischen Feld eine In-Vitro-Detektion möglich ist. Rechts in der Abbildung sind Möglichkeiten zur Detektion von Tumorzellen anhand ihrer biologischen Eigenschaften dargestellt, welche anhand von molekularen Proteinen wie EpCAM (Epitheliales Zelladhäsionsmolekül) oder CD-45 (Clutser of Differentiation/Oberflächenantigen humaner Zellen) gelingen. (Nach Alix-Panabières C, Pantel K: Circulating Tumor Cells - Liquid Biopsy of Cancer. American Association for Clinical Chemistry Ausgabe 59: 112 (2013))

Methoden zur Detektion zirkulierender Tumorzellen, welche auf biologischen Eigenschaften beruhen, gehören Immunobead Assays und Microdevices. Die Immunobead Assays basieren auf dem Nachweis von Tumorzellen durch Antikörper zum einen gegen tumorassoziierte Antigene wie EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) oder Antikörper gegen Intermediärfilamente von Epithelzellen, was man als positive Selektion bezeichnet und gegen Leukozyten Antigene wie CD-45, was man als negative Selektion bezeichnet. Die Antigen-Antikörper-Komplexe können dann im magnetischen Feld detektiert werden. Hierauf basiert unter anderem das CellSearch®-Verfahren. Microdevices bezeichnet Mikrochips, welche Anti-EpCAM Antikörper beschichtete Mikrosports aufweisen und in der Lage sind Tumorzellen aus einem sehr kleinen Blutvolumen zu detektieren. Ebenso werden Versuche unternommen Mikrochips mit Antikörpern gegen andere häufige Tumorantigene zu bestücken, wie z.B. gegen den *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) oder den *epidermal growth factor receptor* (EGFR). (Alix-Panabières u. Pantel 2013)

Eine weitere Unterteilung stellen die Protein-basierten Methoden dar, zu denen auch das bereits erwähnte CellSearch®-Verfahren gehört. Dieses basiert auf dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Cytokeratin, dem Leukozyten-Antigen CD-45 und dem Kernfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI): CTCs → CK+/CD-45-/DAPI+. Das CellSearch®-Verfahren gilt nach wie vor als Goldstandard bei der Gewinnung zirkulierender Tumorzellen, weshalb es in dieser Arbeit als Vergleichsmethode herangezogen wurde. Allerdings weist dieses Verfahren gewisse Schwächen auf, welche im Weiteren beleuchtet werden und eine Weiterentwicklung bisheriger Methoden nötig machen. Zu den Protein-basierten Methoden gehört auch der EPISPOT Assay, welcher die Eigenschaft von epithelialen Tumorzellen nutzt spezielle Proteine freizusetzen. Die Blutprobe wird auf eine mit Antikörpern gegen Tumorproteine beschichtete Membran aufgetragen und in 24-48 h kultiviert. Im Folgenden wird diese mit fluoreszierenden Antikörpern behandelt, die dann die Detektion zirkulierender Tumorzellen ermöglichen. Vorteil dieser Methode ist, dass nur lebende Zellen aufgrund ihrer Eigenschaft zu sezernieren detektiert werden. (Alix-Panabières u. Pantel 2013)

Ein besonders weites Feld in der Diagnostik von Tumorzellen stellen die mRNA basierten Methoden dar. Diese codieren für bestimmte Tumorproteine, wie z.B. CK-19 beim Mamma-Karzinom. Da mRNAs zu kleinen Anteilen auch in normalen Blut- oder Knochenmarkzellen vorkommen, mussten bestimmte Cut-Off-Werte festgelegt werden und

die Auswertung durch quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) erfolgen. Der Adna-Test™ basiert auf einer nicht-quantitativen RT-PCR, welche Zellen detektiert die Transkripte von tumor-spezifischen Genen nach immuno-magnetischer Erfassung von MUC1+/HER2+/EpCAM+ Zellen identifiziert. Limitiert wird diese Methode dadurch, dass MUC1 auch auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. (Alix-Panabières u. Pantel 2013)

Die eben genannten Methoden haben allerdings allesamt die Einschränkung mit nur sehr kleinen Mengen Blut zu arbeiten, was die Wahrscheinlichkeit CTCs in der entsprechenden Probe zu finden gering hält. Zu diesem Zweck wurde von der Firma Gilupi ein CellCollector™ entwickelt, welcher ermöglicht ein deutlich größeres Blutvolumen als bei den bisher gängigen Methoden zu untersuchen. (Alix-Panabières u. Pantel 2012) Beim CellCollector™ handelt es sich im Gegensatz zu Verfahren wie CellSearch® um eine In-vivo-Methode zur Gewinnung zirkulierender Tumorzellen. Der CellCollector™ wurde bisher vor allem zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Mamma-, Prostata- und Kolonkarzinomen verwendet, wohingegen zur Anwendung dieses Verfahrens bei Lungenkarzinom-Patienten bisher nur wenige Ergebnisse vorliegen. In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie wurde die beiden Methoden - CellSearch® und CellCollector™ - miteinander verglichen. Eine genauere Beschreibung der untersuchten Methoden erfolgt im Material- und Methodenteil unter Punkt 4.

## **1.6 Fragestellung der klinischen Studie**

Aufgrund der geringen Sensitivität aktueller auf dem Markt befindlicher Methoden zum Nachweis im Blut zirkulierender Tumorzellen, wie beispielsweise CellSearch®, sucht die Wissenschaft nach einer Methode mit der nicht nur zuverlässig CTCs detektiert werden können, sondern auch entsprechende Tumorzellen für weitere molekulare Diagnostik gewonnen werden können. Zu diesem Zweck wurde der CellCollector™ von der Firma Gilupi entwickelt. Die von uns durchgeführte Studie ist im Wesentlichen eine Anwendungs-beobachtung, die den klinischen Nutzen des CellCollector™ bei der Detektion von CTCs zeigen soll. Nachdem dieses Verfahren bei Mamma-, Prostata- und Colonkarzinomen bereits ausgiebig getestet wurden, gibt es beim Lungenkarzinom bisher nur wenige klinische Daten. Ziel der hier durchgeführten Studie war zum einen die

Ermittlung der Sensitivität des CellCollectors™ hinsichtlich der Isolierung von EpCAM-positiven Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten und zum anderen die Gewinnung von CTCs für molekulare Analysen. Außerdem wurde untersucht, ob sich zirkulierende Tumorzellen beim Lungenkarzinom mit dem CellCollector™ zuverlässiger detektieren lassen als mit herkömmlichen Methoden. Als Referenzmethode wurde CellSearch® der Firma Veridex, als derzeit am besten akzeptiertes Verfahren zur Detektion von CTCs.

Im Weiteren werden im Material- und Methodenteil das Studiendesign sowie die beiden Methoden zur Zell-Detektion genauer vorgestellt. Im Ergebnisteil werden die in der Studie erhobenen Daten ausgewertet und schließlich im Diskussionsteil genauer betrachtet und bewertet. Zum Ende des Diskussionsteils soll noch ein Ausblick auf die Zukunft von CTCs in der Onkologie gegeben werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Im Rahmen einer klinischen Studie sollte zum einen die Sensitivität des CellCollectors™ hinsichtlich der Isolierung von EpCAM-positiven CTCs bei Lungenkarzinom-Patienten ermittelt werden. Zum anderen sollte der CellCollector™ in Anwendbarkeit, Reproduzierbarkeit und im Verlauf unter Therapie mit dem Referenzsystem CellSearch®, als bisher etablierte Methode, verglichen werden.

Studienkollektiv waren 50 ausgewählte Patienten mit histologisch und klinisch gesicherter Diagnose eines Lungenkarzinoms im Stadium III und IV nach UICC, die im Zeitraum vom 13.12.2012 bis 20.03.2014 in der Medizinisch-Onkologische Tagesklinik (MOT) der Universitätsklinik Ulm behandelt wurden. Bei der Auswahl geeigneter Patienten für diese Studie sollte ein möglichst einheitliches Studienkollektiv ausgewählt werden, welches allerdings eine gewisse Bandbreite von Patienten mit Lungenkarzinom repräsentiert. Die Studienteilnehmer waren bei Aufnahme in die Studie am Primarius in der Lunge weder voroperiert noch vorbestrahlt worden, außerdem wurde versucht, die ersten Proben vor Beginn der Systemtherapie zu erhalten, um bei Visite 1 ein möglichst unverfälschtes Bild des Lungenkarzinoms und der im Blut zirkulierenden Zellen zu erhalten. Dabei wurde Visite 1 so geplant, dass sich für die Probanden keine Verzögerung im Beginn der Systemtherapie ergab. Unter diesen Bedingungen eine ausreichende große Patientenzahl für statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu rekrutieren gestaltete sich schwerer als zunächst angenommen. Und dennoch stellte sich trotz der strengen Einschlusskriterien heraus, dass die Studienteilnehmer eine sehr indifferente Kohorte sind, wenn es z.B. um das Verhältnis zwischen Stadium III und IV geht, oder um die Entität der Tumoren, welche sich hinsichtlich ihrer Metastasierungstendenz deutlich unterscheiden. Welchen Stadien die UICC-Einteilung in der TNM-Klassifikation entspricht, soll die nachfolgende Tabelle veranschaulichen:

**Tabelle 1: Klassifikation der Tumorstadien des Lungenkarzinoms (T: Tumorgröße, N: Lymphknotenstatus, M: Metastasierung). T1: Tumorgröße < 3 cm ohne Hauptbronchusbefall (T1a: <2 cm. T1b: >2 cm, aber <3 cm.) T2: Tumorgröße >3 cm, aber <7 cm und/oder Infiltration des Hauptbronchus >2 cm distal der Carina und/oder Befall Pleura viszeralis (T2a: >3 cm, aber <5 cm. T2b: >5 cm, aber <7 cm.) T3: Tumorgröße >7 cm und/oder Infiltration des Hauptbronchus <2cm distal der Carina und/oder Befall von Brustwand/Pleura parietalis/Zwerchfell/parietales Perikard/N. phrenicus und/oder Totalatelektase einer Lunge und/oder Satelliten im gleichen Lappen, T4:Tumor beliebiger Größe mit Infiltration von Herz/Mediastinum/großen Gefäßen/Ösophagus/N. Recurrens/Karina/Trachea, Tumor ipsilaterale Lunge (nicht im selben Lappen). N0: Kein Lymphknotenbefall. N1: Ipsilateraler hilärer und/oder peribronchialer Lymphknotenbefall. N2: Ipsilateraler mediastinaler und/oder subcarinaler Lymphknotenbefall. N3: Kontralateraler mediastinaler/hilärer oder ipsilateraler/kontralateraler skalenärer/supraklavikulärer Lymphknotenbefall. M0: Keine Fernmetastasen. M1: Fernmetastasen nachweisbar (M1a: Lungenmetastasen im kontralateralen Lungenlobus, Pleurakarzinose, maligner Pleura- oder Perikarderguss. M1b: Fernmetastasen in extrapulmonalen Organen.) (Quelle: <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/lungen-bronchialkarzinom.html> (31.05.2016))**

IIIA	T1a/b	N2	M0
	T2 a/b	N2	M0
	T3	N1/2	M0
	T4	N0/1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	jedes T	N3	M0
IV	jedes T	jedes N	M1a
	jedes T	jedes N	M1b

Weitere Voraussetzungen für eine Studienteilnahme waren, dass ein schriftliches Einverständnis der Patienten nach vorheriger Aufklärung durch den behandelnden Arzt vorlag und dass die Patienten geschäftsfähig und mental in der Lage waren die Anweisungen des Studienpersonals zu verstehen und ihnen Folge zu leisten. Besonders zu erwähnen ist, dass die CTC-Sammlung in der Visite 1 des CellCollectors™, als Doppelmessung in vivo, sowie in der Referenzmethode CellSearch® durch eine Blutentnahme in vitro bei allen Patienten vor Therapiebeginn durchgeführt wurde. Die Patienten sollten zuvor weder Chemotherapie noch Bestrahlung oder eine operative Tumorsektion erhalten haben. Da es sich beim Studienkollektiv meist um palliative Situationen handelt (Stadium IIIB und IV), wurde der Tumor nicht reseziert und alle Patienten der Studie einer Chemotherapie zugeführt.

Die Patienten-Rekrutierung über die MOT der Universitätsklinik Ulm hat sich als Vorteil erwiesen, da die Patienten genau festgelegte Termine erhielten, zu welchen sie zur Chemotherapie bzw. Therapiebesprechungen erscheinen sollten. Somit bestand eine gute Planbarkeit und Praktikabilität und es konnte jeweils direkt im Anschluss an Visite 1 der Studie eine Therapie eingeleitet werden, wodurch sich die Behandlung nur unwesentlich verzögerte. In weiteren Visiten wurde dann der Verlauf unter Therapie beobachtet, was allerdings in dieser Arbeit keine Rolle spielen soll.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Ergebnisse der ersten Visite, d.h. die bei Einschluss in die Studie erfolgte Doppelmessung mittels CellCollector™, mit der zusätzlich bei Studieneinschluss entnommene Blutprobe und Auswertung mittels CellSearch® zu vergleichen. Als Null-Hypothese soll angenommen werden, dass kein Unterschied in Bezug auf klinischen Nutzen und Anzahl der gewonnenen Zellen zwischen den beiden Analysesystemen besteht. Würde man beweisen können, dass eine in vivo Gewinnung von CTCs mittels CellCollector™ einer in vitro Methode wie CellSearch® überlegen ist, wäre die Alternativhypothese bestätigt. Im Weiteren sollen die beiden Methoden genauer vorgestellt werden.



## **2.2 CellSearch®**

### **2.2.1 Funktionsweise von CellSearch®**

CellSearch® ist ein in vitro Verfahren zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus einer 7,5 ml Blutprobe. „Der CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit enthält ein Capture-Reagenz auf Ferrofluidbasis und Immunofluoreszenz-Reagenzien. Das Ferrofluidreagenz besteht aus Partikeln mit einem magnetischen Kern, der von einer polymeren Schicht von Antikörpern mit Bindungsspezifität für das EpCAM-Antigen umgeben ist für die Bindung der CTC. Zur Bestimmung und Zählung der CTC werden nach der Immunomagnet-Bindung und Anreicherung fluoreszente Reagenzien zugegeben. Folgende Fluoreszenzreagenzien werden verwendet: Anti-CK-Phykoerythrin (PE) spezifisch für das intrazelluläre Protein Zytokeratin (charakteristisch für Epithelzellen), DAPI, das den Zellkern färbt und Anti-CD45-Allophycocyanin (APC), spezifisch für Leukozyten.“ (Janssen Diagnostics 2013)

### **2.2.2 Anwendung von CellSearch®**

„CellSave™-Röhrchen sind Vakuum-Blutentnahmeröhrchen, die in Verbindung mit einer Standard-Ausrüstung zur Blutentnahme aus der Vene verwendet werden. Ein Röhrchen enthält ungefähr 300 µl einer Lösung mit Na<sub>2</sub>EDTA und einem Zellkonservierungsmittel. Das EDTA absorbiert Kalziumionen und verhindert so die Blutgerinnung. Durch das Konservierungsmittel bleiben die Morphologie und die Oberflächenantigenexpression der Epithelzellen intakt. In jedem Röhrchen herrscht ein Vakuum, das bei Anwendung der Standard-Phlebotomieverfahren 10,0 ml venöses Vollblut aufnehmen kann.“ (CellSearch® Veridex LCC 2010) Die in den Röhrchen enthaltene Flüssigkeit besteht aus folgenden Komponenten: „300µl 4,6 % Na<sub>2</sub>EDTA und 36% Zellkonservierungsmittel, 0,36% Polyethylenglykol, 0,46% inerte Inhaltsstoffe“ (CellSearch® Veridex LCC 2010) Die CellSearch®-Proben sollen innerhalb von 96h verarbeitet und zwischen 15-30° Celsius gelagert und transportiert werden.

Die Probe wird im Rahmen einer Blutentnahme an einer peripheren Vene über eine Nadel (z.B. Vacutainer®-System) bzw. über Venenverweilkanüle mit entsprechendem Adapter für Vakuum-Blutentnahme-Systeme abgenommen. Im Anschluss wurde die Probe mittels

Spezial-Transport bei Raumtemperatur innerhalb von 96 h nach Hamburg-Eppendorf zur Auswertung im dortigen Speziallabor gebracht.

### **2.2.3 Auswertung CellSearch®**

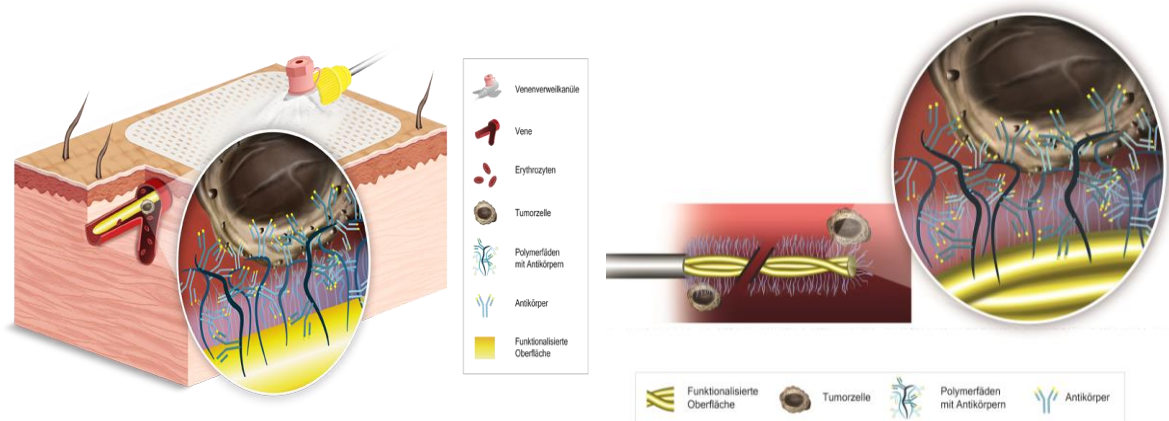
„Die Mischung aus Reagenz und Probe wird mit dem CELLTRACKS® AUTOPREP® System in eine Kartusche dispensiert, die dann in eine MAGNEST® Kartuschenhalterung eingesetzt wird. Das starke magnetische Feld der MAGNEST® Kartuschenhalterung zieht die magnetisch markierten Epithelzellen an die Oberfläche der Kartusche. Der CELLTRACKS ANALYZER II® scannt die gesamte Oberfläche der Kartusche automatisch, erstellt Bildaufnahmen und zeigt dem Benutzer jede Zelle mit CK-PE- und DAPI-Fluoreszenz an. Bilder werden dem Benutzer zur endgültigen Klassifizierung in einer Galerie angezeigt. Eine Zelle wird als Tumorzelle klassifiziert, wenn die morphologischen Merkmale mit denen einer Tumorzelle übereinstimmen und der Phänotyp EpCAM+, CK+, DAPI+ und CD45- vorliegt.“ (Janssen Diagnostics 2013)

Allerdings erkennt das Verfahren CTCs nicht als solche, wenn sie EpCAM nicht exprimieren bzw. EpCAM exprimieren, jedoch negativ für Cytokeratin 8,18 und 19 sind. Die Integrität der Leukozyten ist ein Indikator für die Qualität der Probe, wenn eine Analyse zirkulierender Tumorzellen durchgeführt wird.

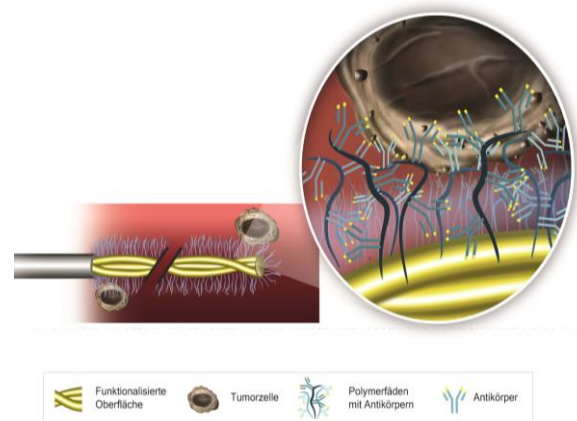
## 2.3 CellCollector™

### 2.3.1 Funktionsweise des CellCollectors™

Der CellCollector™ ist ein in vivo Verfahren zu Detektion von zirkulierenden Tumorzellen auf dem Blutkreislauf. Die dabei gewonnenen Zellen werden über ein spezielles Verfahren fixiert und können so später für molekulare Zellanalysen verwendet werden. Der CellCollector™ ist ein 16 cm langer und 0,5 mm dicker medizinischer Edelstahldraht, der an einem Ende eine abgerundete Spitze mit einer 2 cm langen und 2 µm dicken Goldbeschichtung. In diesem Bereich ist die Drahtoberfläche eine funktionalisierte Polymeroberfläche mit einem die Antikörper enthaltenden Hydrogel. Dabei werden im Blut zirkulierende Tumorzellen aufgrund einer Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen dem EpCAM-Antigen auf den Tumorzellen und dem kovalente Antikörper gegen EpCAM auf dem Draht gebunden.



**Abbildung 2: Korrekte Position des Cellcollectors™ in peripherer Vene. Gelber Aufsatz wird mit der Venenverweilkanüle (rosa) verschraubt und somit daran fixiert, bevor die 2 cm lange funktionalisierte Oberfläche des funktionalisierten Drahtes in die Vene vorgeschoben wird (Abdruck der Grafik mit freundlicher Genehmigung der Firma Gilupi GmbH, Potsdam)**



**Abbildung 3: Vergrößertes Schema der funktionalisierten Drahtoberfläche bestehend aus Hydrogel mit Antikörpern gegen EpCam (Epitheliales Zelladhäsionsmolekül) auf der Oberfläche der Tumorzelle (Zielzelle) (Abdruck der Grafik mit freundlicher Genehmigung der Firma Gilupi GmbH, Potsdam)**

### 2.3.2 Anwendung und Arbeitsweise des CellCollectors™

Der CellCollector™ wird in eine in der Armvene liegende Venenverweilkanüle eingebracht und nach einer Verweildauer von 30 Minuten entfernt. Als Kanülen werden hierbei die Vasofix® Kanüle von Braun empfohlen. Von der Herstellerfirma des Drahtes aus ist die Anwendung in der Cubitalvene zu bevorzugen, weil diese Vene

erfahrungsgemäß am wenigsten zu Kollabierung neigt und das umfließende Blutvolumen konstant gehalten wird.

Zunächst wird bei dem Patienten eine 20G (rosa-farben) Kanüle in die Cubitalvene gelegt. Im Anschluss kann das für die CellSearch®-Probe als Referenzmethode benötigte Blut abgenommen werden, worauf man den Draht durch den gelben Stopfen an der Venenkanüle fixiert. Der CellCollector™ wird gemäß der Seldinger-Technik durch die Kanüle in die Vene eingeführt. Nach einer Verweildauer von 30 Minuten soll der Draht möglichst gerade und vorsichtig aus der Kanüle entfernt und sogleich mit dem antikörperbeschichteten Goldabschnitt in die Waschlösung Nr. 1 für bis zu maximal zwei Minuten gestellt werden. Dabei wird der Draht immer wieder zwischen den Finger gedreht, um Blutreste vom Draht abzuwaschen, da diese die Auswertung unnötig erschweren. Am Draht befindliche Blutreste oder Fibrinfäden sollten mittels Wattestäbchen oder einer Pinzette möglichst ohne das antikörperbesetzte Ende des Drahtes zu berühren, sorgsam entfernt werden. Danach wird der Draht auf dieselbe Weise bis zu maximal zwei Minuten in Waschlösung Nr. 2 behandelt, um im Anschluss fünf Sekunden in Waschlösung Nr. 3 und schließlich für zehn Minuten in einem weiteren Gefäß mit einem Fixierungsmittel behandelt zu werden, um die am Draht haftenden Zellen für den Transport haltbar zu machen. Als Fixierungsmittel wird von der Herstellerfirma PFA empfohlen. Nach der 10-minütigen Fixierung der Zellen lässt man den Draht fünf Minuten trocknen und lagert diesen bis zum Transport an das Labor der Herstellerfirma in trockenem Zustand bei -20 Grad Celsius. Der Versand erfolgt ebenso bei -20 Grad Celsius. Findet der Transport des Drahtes noch am Tag der Anwendung statt, wird die hierfür mitgelieferte Laborlösung zusammen mit dem Draht in das Glasaufbewahrungsröhrchen gefüllt und bei Raumtemperatur aufrecht versendet. Da in unserem Fall das Labor für die Drahtauswertung zu weit entfernt ist, um einen Transport noch am Tag der Anwendung zu gewährleisten, haben wir uns für den Versand in trockenem Zustand bei -20 Grad Celsius entschieden. (Saucedo-Zeni et al. 2012)

### **2.3.3 Auswertung des CellCollectors™**

Im Labor der Herstellerfirma wird der eingesendete Draht zunächst mit einer Pinzette aus den Transportröhrchen entnommen. Bei Raumtemperatur lässt man den Draht nun liegend auftauen (max. 3 min RT), um ihn anschließend für 10 min. in Permeabilisierungslösung

(Triton X-100, Fluka) zu tauchen. Ist der Draht permeabilisiert, folgt die Weiterbehandlung in einer Blocking-Lösung (BSA, Fisher Scientific) für 30 min. Im Anschluss wird der Draht für weitere 30 min in ein Antikörperblutgemisch aus von der Maus stammenden CD16 und CD45 positiven Antikörpern getaucht. Nach einer Waschung des Drahtes wird dieser in blutnachweisende Antikörper rabbit-a-mouse A594 für 30 min unter Dunkelheit eingetaucht und anschließend wieder gewaschen. Nachdem der Detektor weiterhin unter Dunkelheit für 5 min. in Hoechst 33342 getaucht und anschließend gewaschen wurde, erfolgt die EpCAM und Cytokeratin spezifische Färbung in einem Antikörper-Mix entsprechend der im Laboranforderungsschein gestellten Anforderung:

**Tabelle 2: Marker-Nachweismöglichkeiten durch CellCollector™ (EpCAM: Epitheliales Zelladhäsionsmolekül; CK (Cytokeratin): Keratin-haltiges Intermediärfilament; panCytokeratin: Antikörper-Cocktail, welcher Epitope erkennt, die den meisten Cytokeratinen gemein sind) (Quelle: Gilupi)**

Nachweis von:	EpCAM	CK	EpCAM+CK
herzustellende/ einzusetzende Lösung	mit EpCAM	Mix aus CK7+ CK19+panCK	Mix aus EpCAM- CK7+CK19+panCK

In der von uns durchgeführten Studie wurde sowohl der Nachweis von EpCAM als auch von Cytokeratin (CK) vom Labor der Herstellerfirma angefordert.

Nach einer weiteren Waschung wird der gefärbte Draht in PBS (phosphat buffered saline) bei Raumtemperatur für max. 60 Min. oder falls eine längere Aufbewahrung vorgesehen ist, bis max. 6 Std. bei 2-8 Grad Celsius bis zur Auswertung am Mikroskop gelagert (alternativ können gefärbte Detektoren trocken bei -20°C für bis zu 7 Tagen gelagert werden).

Im Rahmen der endgültigen Auswertung am Mikroskop wird der CellCollector™ zunächst in einen speziellen Drahthalter eingespannt, die Spitze des Detektors in der Kerbe fixiert und anschließend das Drehrad auf 0° gestellt. Der Draht wird nun im Drahthalter am Objektivtisch befestigt und mittig ausgerichtet. (Saucedo-Zeni et al. 2012)

Abbildung 4 musste aufgrund einer nicht erteilten Abdruckerlaubnis in der veröffentlichten Fassung der Dissertation gelöscht werden.

**Abbildung 4: Auswertungsvorrichtung für CellCollector™ zur Vereinfachung der Tumorzell-Zählung (Quelle: Gilupi)**

Es kann sowohl ein 10er wie auch ein 20er Objektiv verwendet werden. Die Drahtspitze wird nun im GFP-Filter eingestellt und im Sichtfeld detektierbare grüne zellartige Objekte gesucht. Diese müssen dann im DAPI-Kanal verifiziert und auf Vorhandensein eines Zellkerns überprüft werden. Falls ein Zellkern detektierbar ist, prüft man das Objekt als nächstes im Cy3-Kanal, wobei ein rotes Signal bei positiven Zellen erscheint. Das Objekt sollte ggf. in höherer Vergrößerung begutachtet und dokumentiert werden, und auf folgende Akzeptanzkriterien überprüft werden:

- Die Zellen müssen eine möglichst intakte Morphologie besitzen
- Die Zellen können vielgestaltig sein
- Kernfärbung muss positiv (Hoechst-positiv) sein
- Die Zellen müssen CD45/CD16 negativ sein
- Die Zellen müssen Cytokeratin und/oder EpCAM positiv sein
- Der Zelldurchmesser sollte  $\geq 4\mu\text{m}$  sein. Zellfragmente werden jedoch ebenfalls dokumentiert.
- Die Kernfärbung sollte eindeutig von der Cytokeratin-/EpCAM- Färbung unterscheidbar sein (der Katalog zur Bewertung (WI-DN-03) ist zu beachten)

Unklare Funde liegen u.a. vor, bei:

- einer auffälligen Zellmorphologie mit großem Zellkern (typisch für CTCs), aber gänzlich ohne Fluoreszenzsignal für CK/EpCAM, CD45 bzw. mehrfach positiv sind (CK/EpCAM und CD45 positiv)
- Objekte mit der Größe einer Zelle, die direkt in oder an einem großen Artefakt/ Blutklumpen liegen.

Zellen, welche die Voraussetzungen eines unklaren Fundes erfüllen werden nicht als CTC gezählt. Ggf. ist eine erneute Begutachtung erforderlich. Nicht auswertbar ist ein Detektor, dessen Oberfläche zu 100% mit Blutzellen, Farbstoffklumpen oder anderen Artefakten bedeckt ist. Sollten noch einzelnen Bereiche frei liegen (z.B. nur 1/3) dann ist die Möglichkeit einer Auswertung zwar eingeschränkt aber nicht unmöglich.

Im Weiteren muss der Detektor langsam in Richtung Spitze unter dem Mikroskop vorangeschoben werden. Es werden jeweils nur die im Blickfeld sichtbaren Zellen gezählt um Dopplungen zu vermeiden. Ist die Spitze des Detektors nicht erreicht wird der Detektor im Drahtalter gedreht. Als nächstes wird am Drehrad 90° eingestellt (3 Einheiten vordrehen) solange bis alle vier Seiten des Detektors im Blickfeld ausgewertet wurden. (Saucedo-Zeni et al. 2012 (bezieht sich auch auf S. 17 der Arbeit))

## **2.4 Auswertung und Datengewinn**

Eine Bewertung der Daten wird anhand der auf den CellCollectoren™ befindlichen CTCs (ermittelt über Immunzytochemie), aber auch durch den Methodenvergleich mit dem Referenzsystem CellSearch® vorgenommen. Eine eher nachrangige Rolle in dieser Arbeit +soll die Markeranalyse der CTCs spielen. Diese, ermittelt über Immunzytochemie und PCR, ist während der Anfertigung dieser Arbeit noch in der Auswertung bei der Herstellerfirma des CellCollectors™, jedoch wird unter Punkt 6.4 exemplarisch eine Auswertung als Ausblick auf die Zukunft von CTCs in der Onkologie kurz dargestellt.

## **2.5 Ethikantrag**

Am 30.07.2012 wurde Antrag bei der Ethikkommission der Universität Ulm zu der dieser Arbeit zugrunde liegenden Anwendungsbeobachtung verhandelt. Dabei wurden kleinere Korrekturen bezüglich formalen Gesichtspunkten gefordert, welche nachgereicht und so zum 29.10.2012 die Zustimmung der Ethikkommission zum Antrag Nr. 208/12 – „Isolierung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Blut von Lungenkarzinom-Patienten mittels eines Antikörperbeschichteten CellCollectors™ (FSMW)“ mit der Studiennummer:

FSMW EpCAM-LuCa-ULM erteilt wurde. Die Ethikkommission sah damit keine ethischen Bedenken an der Durchführung dieses Projekts.

## **2.6 Datenbank**

Die erhobenen Daten wurden von den Studienbetreuern (N. Penkalla und dem Autor) in einer Microsoft® Office® Excel® Datei erfasst. Während und nach der Erhebung der Daten wurde diese auf einem Laptop der Sektion Pneumologie der Inneren Medizin II der Uniklinik Ulm anonymisiert und verschlüsselt gespeichert.

## **2.7 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm SPSS® der Firma IBM® und durch Unterstützung des Instituts für Epidemiologie und Medizinische Biometrie der Universität Ulm.

Die Anzahl der in beiden Systemen detektierten CTCs wird mittels Kontingenztafeln dargestellt.

Die statistische Auswertung besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil werden die in der Doppelmessung des CellCollectors™ ermittelten Daten ausgewertet. Dabei wird zunächst die Sensitivität der Methode ermittelt.

Im Weiteren werden die Ergebnisse des CellCollectors™ in Boxplots, welche ausschließlich y-Skaliert sind, dargestellt, um so einen ersten Überblick über die Werteverteilung (Median, 25%- und 75%-Quantil) zu erhalten. Zu diesem Zweck gibt es in anderen Statistikprogrammen die Möglichkeit alle Ergebnisse einer Messreihe als Punkte in einem y-Skalierten Diagramm darzustellen, was leider in dem hier verwendeten Programm SPSS® nicht möglich ist, weshalb auf Boxplots ausgewichen wurde.

In Scatterplots, auch Streudiagramme genannt, werden die Ergebnisse der Doppelmessung gegeneinander in ein Koordinatensystem als Punkte aufgetragen, um eine eventuelle Übereinstimmung der Werte aufzuzeigen. Außerdem wird mittels linearer Regression eine



Regressionsanalyse der Doppelmessung durchgeführt. In einigen Scatterplots werden zusätzlich noch Variablen wie beispielsweise Tumorstadium gemäß *Union internationale contre le cancer* (UICC) oder Tumorgröße mit einbezogen, um Zusammenhänge, falls vorhanden, zu verdeutlichen.

Zum Ende des ersten Teils der Ergebnisauswertung wird ein Bland-Altman Plot (genaue Erklärung - siehe unten), eigentlich eine Methode zum Vergleich zweier Messmethoden, zum Vergleich der Doppelmessung verwendet.

Den Hauptteil der statistischen Auswertung soll der Vergleich zwischen dem CellCollector™, als neue Methode zur Detektion zirkulierender Tumorzellen, und dem Referenzsystem CellSearch® ausmachen. Hierbei werden die Messergebnisse aus dem CellSearch®-Verfahren tabellarisch zunächst einzeln und dann in Gegenüberstellung zu den Ergebnissen der CellCollectors™ dargestellt. Nach der Berechnung der Sensitivität werden die Ergebnisse von CellSearch® denen des CellCollectors™ in Boxplots gegenübergestellt, um Median, 25%- und 75%-Quantil sowie etwaige Ausreißer beider Methoden sichtbar zu machen.

In einem Scatterplot werden dann beide Methoden auf ihre Übereinstimmung hin geprüft, indem eine Regressionsanalyse angefertigt wird. Die in der Studienbeschreibung geforderte Regression mittels Passing-Bablok wurde angedacht, da sich diese Methode aufgrund von stabileren Ergebnissen bei einem Methodenvergleich anbietet. Passing und Bablok liefern eine Methode, welche Ausreißern gegenüber sich als deutlich stabiler erweist als die normale lineare Regression und nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgeht. In weiteren Scatterplots werden dann Variablen wie Tumorstadium und Tumorgröße mit einbezogen, um etwaige Auswirkungen auf die Ergebnisse zu erkennen.

Außerdem kommt ein Bland-Altman Plot zum Vergleich beider Methoden zur Anwendung. Die Bland-Altman-Methode ist ein Scatterplot, welches besonders zum Vergleich zweier Messmethoden eingesetzt wird. Hierbei wird die Differenz der durch den CellCollector™ und CellSearch® ermittelten CTC-Zahlen für jeden Patienten berechnet  $(a_1 - a_2)$  und gegen den Mittelwert der beiden Methoden aufgetragen  $(a_1 + a_2)/2$ . „Anhand dieses Plots lassen sich Größenordnungen und Muster der individuellen Abweichungen zwischen den Messmethoden deutlich besser ablesen als bei einer einfachen Punktwolke der Messwerte gegeneinander“ (Grouven 2007). Zur Vereinfachung der graphischen Darstellung werden der Mittelwert der Differenzen sowie die

Übereinstimmungsgrenzen  $d \pm 2 \times s$ , wobei  $s$  die Standardabweichung der Differenzen darstellt, als horizontale Linie eingetragen. In dem Bereich zwischen den Übereinstimmungsgrenzen sollen 95% der Ergebnisse liegen. (Grouven 2007)

### 3 Ergebnisteil

Im Ergebnisteil sollen die in der Studie ermittelten Daten statistisch ausgewertet und grafisch aufbereitet präsentiert werden. Im Zeitraum zwischen 13.12.2012 bis 20.03.2014 wurden in der Medizinisch-Onkologischen Tagesklinik der Universitätsklinik Ulm 50 Patienten, welche alle an einem Lungenkarzinom im UICC-Stadium III bzw. IV erkrankt waren, in die FSMW-Anwendungsbeobachtung mit einbezogen.

#### 3.1 Doppelanwendung des CellCollectors™

Zunächst soll in der statistischen Auswertung der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Ergebnisse der Doppelanwendung des Drahtes bei der ersten Visite übereinstimmen oder sich unterscheiden. Im Folgenden werden in einer Kontingenztafel die Ergebnisse der Doppelanwendung gesammelt dargestellt:

**Tabelle 3: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes (Functionalized and structured medical wire) in einer Kontingenztafel nach „negativem“ (= 0) und „positivem“ (> 0) Tumorzellnachweis kategorisiert.**

	FSMW-1-Zellzahl = 0	FSMW-1-Zellzahl > 0	Gesamt
FSMW-2-Zellzahl = 0	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>20</b>
FSMW-2-Zellzahl > 0	<b>9</b>	<b>21</b>	<b>30</b>
Gesamt	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>50</b>

Von den 50 Patienten der Studie wurden sowohl bei FSMW-1 als auch bei FSMW-2 gleich viele Proben mit negativem ( $n = 20$  Proben von FSMW-1/2 = 0) wie positivem ( $n = 30$  Proben von FSMW-1/2 > 0) Ergebnis detektiert. Bei  $n = 21$  Patienten ergaben die Auswertung der FSMWs auf beiden Drähten ein positives Ergebnis ( $\geq 1$ ). Bei weiteren elf Patienten waren auf beiden Drähten keine zirkulierenden Tumorzellen nachzuweisen. Ob dieses Ergebnis durch methodische Fehler bei der Anwendung oder dem Transport bedingt sein kann, wird in der Fehlerdiskussion noch umfassend erörtert.

### 3.1.1 Sensitivität des CellCollectors™

Wenn man annimmt, dass ein Draht den Probanden als krank erkennt, falls CTCs detektiert werden, so beträgt in der Studie ermittelte Sensitivität des FSMW:

→ Richtig als krank Erkannte / Alle Erkrankten = Sensitivität

→  $39 / 50 = \underline{0,78}$

### 3.1.2 Darstellung der Ergebnisse des CellCollectors™ in Boxplots

Der in Abbildung 5 dargestellte Boxplot zeigt die Ergebnisse von Draht-1 (links) und Draht-2 (rechts) fasst im Kasten Werte zwischen dem 25%- und 75%-Quantil zusammen. Alle als Kreise gekennzeichneten Werte beschreiben die Ausreißer. Der Median liegt bei den Messungen von FSMW-1 bei  $\tilde{x} = 1$  und bei den Messungen von FSMW-2 bei  $\tilde{x} = 2$ . Die Antennen des Boxplots umfassen gemäß der Definition von J.W. Turkey das 1,5-fache des Interquartilsabstandes. Wie bereits aus dem Scatterplot oben ermittelt liegt der Großteil der gemessenen CTC-Zahlen bei Werten knapp über Null und nur selten über zehn. Diese Tatsache wurde im obigen Boxplot nochmal anhand der Median-Werte visualisiert.

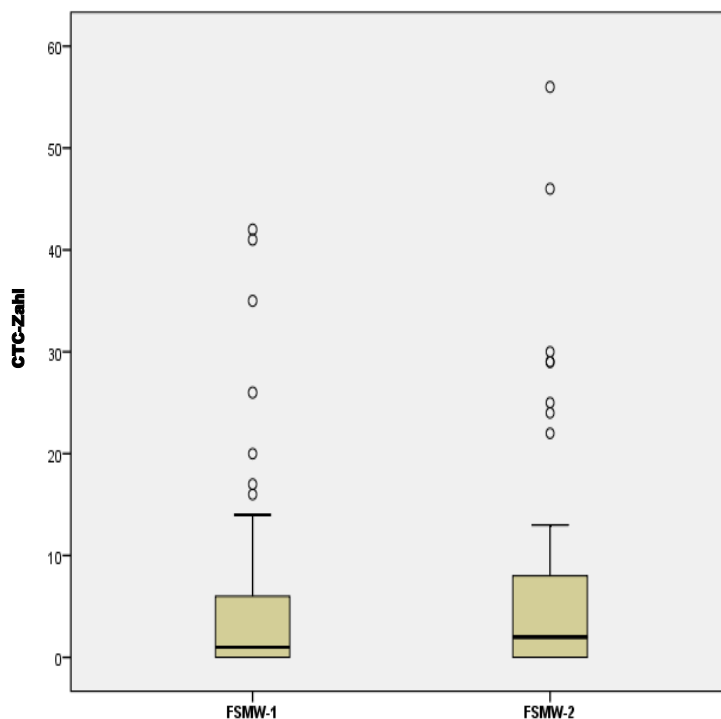
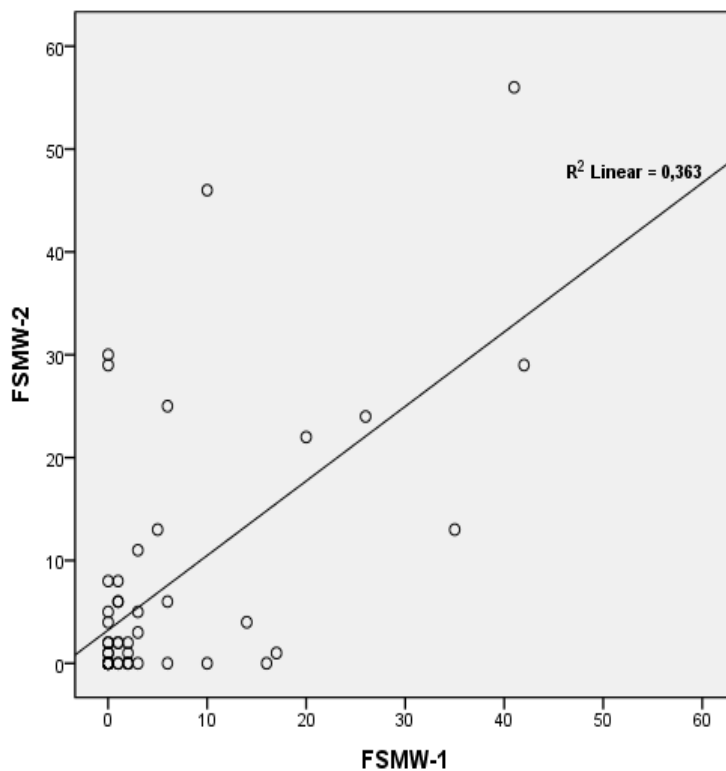


Abbildung 5: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen beider Messreihen FSMW-1 und FSMW-2 (Functionalized and structured medical wire) mittels eines Boxplots grafisch dargestellt. Median FSMW-1 = 1 und FMSW-2 = 2. 75%-Perzentile von FSMW-1 = 6 und FSMW-2 = 8.

### 3.1.3 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 mit Regressionsanalyse

Um die Ergebnisse der Doppelanwendung grafisch übersichtlich darzustellen wurde ein Scatterplot oder Streudiagramm angefertigt. In diesem Scatterplot wurden die Werte von FSMW-1 auf der X-Achse gegen FSMW-2 auf der Y-Achse aufgetragen, wobei ein Punkt sich immer aus den Ergebnissen der Doppelanwendung eines Patienten ergibt. Ein Großteil der Werte liegt in dem Bereich Null bis zehn Zellen und nur bei wenigen Patienten ( $n = 15$ ) wurden Zellzahlen  $> 8$  detektiert. Die höchste in dieser Studie gemessene CTC-Zahl auf einem Draht beträgt  $CTC = 56$  (auf FSMW-2 bzw. 41 CTCs auf dem entsprechenden FSMW-1). Zu diesem Patienten ist zu sagen, dass es sich um einen metastasierten, im Endstadium seiner Erkrankung befindlichen Patienten handelt, der bereits einen Monat nach Einschluss in die Studie verstarb. Unter anderem dieser Fall soll im Diskussionsteil noch einmal aufgegriffen werden.



**Abbildung 6:** Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes (Functionalized and structured medical wire) in einem Scatterplot mit Regression dargestellt.  $R^2 = 0,363$  gibt das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden an.

In Abbildung 6 wurde außerdem eine Regressionsgerade mit eingefügt um einen Zusammenhang zwischen Draht-1 und Draht-2 besser darstellen zu können. Aus der ermittelten Regressionsgeraden lässt sich wie im Diagramm vermerkt ein Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,363$  nach Pearson und somit ein Korrelationskoeffizient  $R = 0,60$  gemäß einer linearen Regression berechnen. Diese Korrelation weist auf einen deutlichen positiven linearen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen von FSMW-1 und FSMW-2 hin. In tabellarischer Form werden die Daten der Regressionsgeraden dargestellt, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,0001$  beinhalten, was einen gleichsinnigen Zusammenhang der Ergebnisse von FSMW-1 und -2 annehmen lässt. Gemäß den Empfehlungen der Herstellerfirma zur Auswertung der Daten war eine Regressionsanalyse nach Passing-Bablok vorgesehen, welche sich allerdings bei der Auswertung der Ergebnisse als nicht geeignet erwies. Nach eingehenden Beratungen mit den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Ulm kamen wir zu dem Schluss, dass eine Regression mit Passing-Bablok aufgrund eines 95%-Konfidenzintervalls des Intercepts (y-Achsen-abschnitt) von 0 bis 0, und zwar beim Vergleich FSMW-1 und -2 als auch beim Vergleich CellCollector™ und CellSearch®, nicht sinnig ist. Deshalb wurde bei der Regressionsanalyse auf normale lineare Regression zurückgegriffen, was in Anbetracht der wenigen Ausreißer eine Verzerrung der Auswertung unwahrscheinlich macht.

### **3.1.4 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 unter Einbeziehung des Tumorstadiums**

Im Weiteren wird auf der Grundlage des oben erläuterten Scatterplots das Tumorstadium gemäß UICC (Union internationale contre le cancer) mit einbezogen. Dies soll helfen eine bessere Übersicht darüber zu erlangen, warum viele Werte sich im Bereich Null bis zehn befinden und dabei helfen Ausreißer zu beschreiben. Das Tumorstadium beim Lungenkarzinom geht im Stadium IV nach UICC definitionsgemäß mit einer Metastasierung einher, wohingegen im Stadium III noch keine Metastasierung vorliegt. Demzufolge gleichen sich die Scatterplots, welche Tumorstadium (Abbildung 7) und Metastasierung (Abbildung 8) mit einbeziehen.

### 3.1.5 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 unter Einbeziehung von Metastasierungsgrad und der Regressionsgeraden

Bei Abbildung 8 wurde deshalb zusätzlich anstatt den Punkten die jeweiligen Regressionsgeraden für Stadium III (= 3) bzw. nicht metastasiert (= 0) und für Stadium IV (= 4) bzw. metastasiert (= 1) eingetragen. Tumorstadium und Tumorgröße wurden auch deshalb als Variablen mit einbezogen, um festzustellen inwiefern die Anzahl detektierter CTCs mit der Tumorlast korreliert.

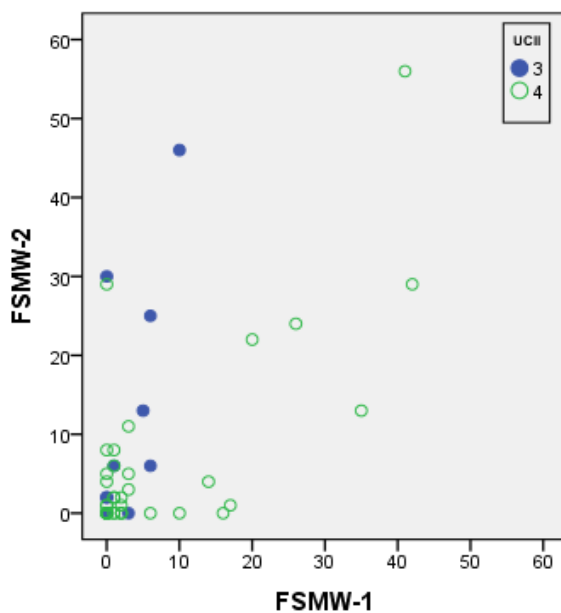


Abbildung 7: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes (Functionalized and structured medical wire) in einem Scatterplot unter Einbeziehung des Tumorstadiums nach UICC dargestellt. Hierbei entspricht 3 = III und 4 = IV, Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10.

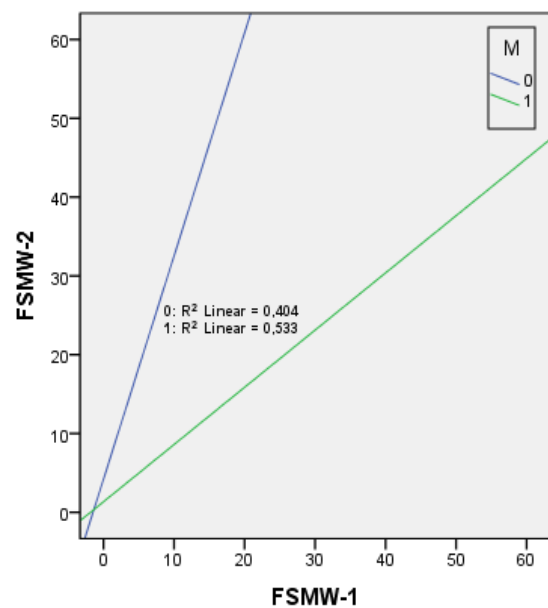


Abbildung 8: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes (Functionalized and structured medical wire) in einem Scatterplot unter Einbeziehung des Metastasierungsgrades (0 = nicht metastasiert (blau), 1 = metastasiert (grün)) mit Regression (0:  $R^2$  Linear = 0,404 bezieht sich auf M0, 1:  $R^2$  Linear = 0,533 bezieht sich auf M1) dargestellt.

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse unter Einbeziehung des Tumorstadiums fällt auf, dass in Stadium III die Punkteverteilung deutlich mehr von einer gedachten Winkelhalbierenden abweicht als dies bei Stadium IV der Fall ist. Außerdem werden tendenziell auf dem zweiten Draht häufiger CTCs detektiert als auf dem ersten, was in



genauen Zahlen bei Tabelle 4 nochmals aufgezeigt wird. Die Ergebnisse mit Tumorstadium IV weisen mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,533$  und einem Korrelationskoeffizienten  $R = 0,73$  eine höhere Korrelation zwischen beiden Drähten auf als die Ergebnisse in Tumorstadium III, die nur einen Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,404$  und einen Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,64$  aufweisen. Demzufolge ist liegt eine höhere Übereinstimmung der Doppelmessung bei Stadium IV vor. Was der Grund hierfür sein könnte wird im Diskussionsteil erörtert.

**Tabelle 4: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer). In dieser Abbildung werden die detektierten Tumorzellzahlen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes (Functionalized and structured medical wire) in einer Kontingenztafel unter Einbeziehung des Tumorstadiums nach UICC Stadium III und IV (Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10) kategorisiert.**

	FSMW-1 > FSMW-2	FSMW-2 > FSMW-1
UICC-Stadium III	<b>1</b>	<b>7</b>
UICC-Stadium IV	<b>13</b>	<b>14</b>
Gesamt	<b>14</b>	<b>21</b>

Wie sich bereits aus Abbildung 7 und Abbildung 8 erahnen lässt, werden in FSMW-2 tendenziell höhere CTC-Ergebnisse gemessen als bei FSMW-1. Auch ist hierbei ersichtlich wie sich das Studienkollektiv auf die UICC-Stadien aufteilt. Ebenso die Tatsache, dass auf dem zweiten Draht häufiger CTCs detektiert werden als auf dem ersten Draht wird hier veranschaulicht.

### 3.1.6 Scatterplot aus Draht-1 und Draht-2 unter Einbeziehung der Tumorgroße

In Abbildung 9 wird die Tumorgroße nach der TNM-Klassifikation in Zusammenhang gebracht mit den Ergebnissen der Doppelmessungen, um zu sehen ob größere Tumore eine Auswirkung auf die Anzahl detektierter CTCs hat. Dabei kann beobachtet werden, dass ein Großteil der Werte über zehn CTCs bei Patienten mit Tumorstadium T4 vorkommt. Lediglich vier Proband im Stadium T3 erreichte CTC-Werte > 10 Zellen. Das Stadium T3 wird klassifiziert durch eine Tumorgroße > 7cm, während im Stadium T4 sich der Tumor bereits im gesamten Mediastinum ausgebreitet hat.

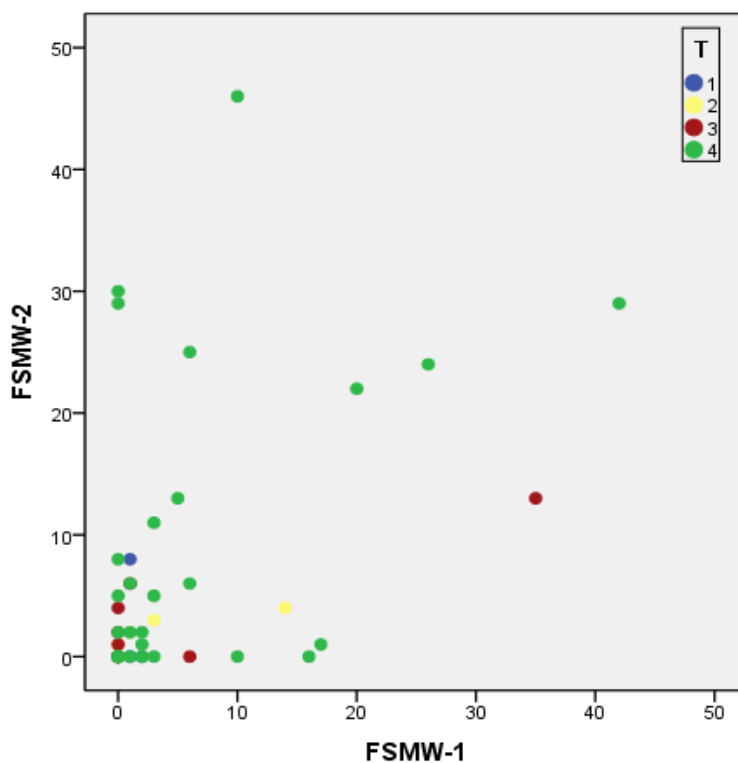


Abbildung 9: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes (Functionalized and structured medical wire) in einem Scatterplot unter Einbeziehung der Tumorgroße (T) entsprechend der TNM-Klassifikation (N: Lymphknotenstatus, M: Metastasierung) dargestellt.

Was allerdings entscheidend in Abbildung 9 ist, dass bei Probanden mit höheren Tumorstadien auch mehr CTCs detektiert werden.

### 3.1.7 Bland-Altman Plot zum Vergleich von Draht-1 und Draht-2

Der Bland-Altman Plot (Differenzen-Plot), ein statistisches Verfahren, welches ursprünglich beim Vergleich von unterschiedlichen Messmethoden zur Anwendung kommt, soll an dieser Stelle dem Vergleich zwischen erster und zweiter Messreihe dienen. Das Ziel dieser Anwendung ist Abweichungen und Schwankungen der Messungen besser darzustellen. Dabei wurde auf der Y-Achse die Differenzen zwischen FSMW-1 und FSMW-2 gegen die Mittelwerte der einzelnen Wertepaare der Doppelanwendung auf der X-Achse aufgetragen. Die horizontalen Linien dienen der Orientierung, wobei die mittlere Linie den Mittelwert der Differenzen bildet. Dieser Mittelwert ist aus den gesamten auf der Y-Achse aufgetragenen Differenzen gebildet, nicht zu verwechseln mit den auf der X-Achse aufgetragenen Mittelwerten. Die beiden durch die anderen Linien markierten Grenzen werden definiert durch  $\pm 1,96 \times SD$  (Standard Deviation). Gemäß einer Normalverteilung sollten in diesem Bereich 95,4% aller Werte liegen.

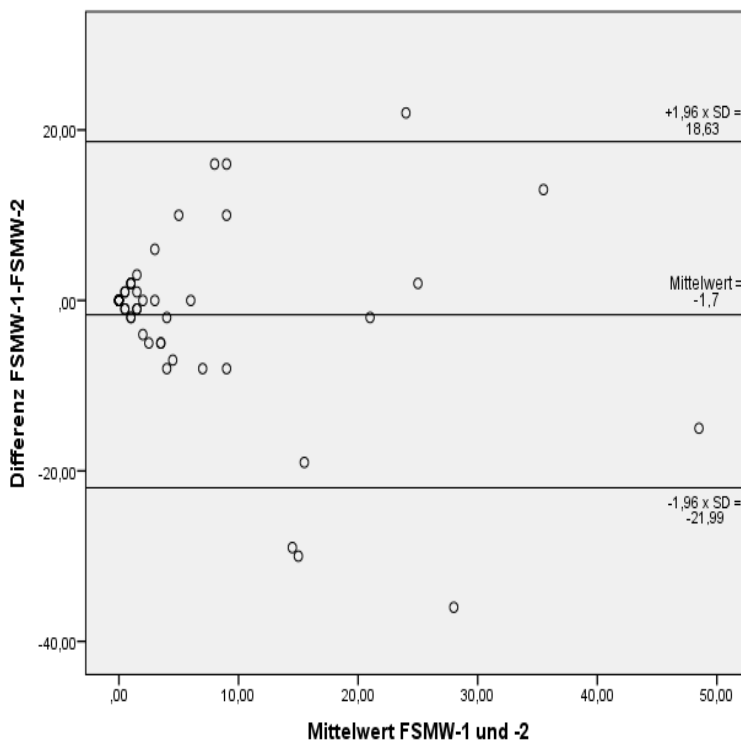


Abbildung 10: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1 auf S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes (Functionalized and structured medical wire) in einem Bland-Altman Plot zum Einschätzen der Wertegenauigkeit beider Messreihen dargestellt. (SD: Standarddeviation)

Auffällig ist, dass bei niedrigen CTC-Ergebnissen die Werte gehäuft im Bereich des Mittelwerts der Differenzen liegen, das heißt es liegt nur eine geringe Streuung um den Mittelwert  $\bar{x} = -1,48$  vor. Mit höheren Mittelwerten, also auch höheren CTC-Ergebnissen, wird die Streuung um den Mittelwert größer, demnach nimmt die Differenz aus FSMW-1 und FSMW-2 zu. Daraus lässt sich erkennen, dass bei niedrigen CTC-Werten die Abweichung aus Draht 1 und Draht 2 kleiner ist als bei höheren Werten.

## 3.2 Vergleich CellCollector™ mit der Referenzmethode CellSearch®

Bei jedem Probanden wurde zusätzlich zum CellCollector™ - FSMW auch eine CellSearch®-Probe entnommen und ausgewertet, allerdings konnten davon fünf Proben wegen vermehrter Gerinnung in den Röhren nicht ausgewertet werden. Diesem Umstand ist die Angabe der Gesamt-CellSearch® Proben auf n = 45 im Folgenden geschuldet.

**Tabelle 5: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnen Blutprobe in vitro nachweist, in einer Kontingenztafel nach „negativem“ (= 0) und „positivem“ (> 0) Tumorzellnachweis kategorisiert.**

CellSearch® -Zellzahl = 0	CellSearch® -Zellzahl > 0	<b>Gesamt</b>
<b>28</b>	<b>17</b>	<b>45</b>

Da das Hauptaugenmerk nun auf den Vergleich beider Methoden zur Gewinnung von zirkulierenden Tumorzellen gelegt werden soll, werden in Tabelle 6 die Ergebnisse beider Methoden gegenübergestellt. Zur ersten Spalte ist zu sagen, dass in n = 10 Fällen sowohl auf dem ersten Draht und in der dazugehörigen CellSearch®-Probe keine CTCs nachweisbar waren. Ebenso gilt dies für den Vergleich zwischen FSMW-2 und den dazugehörigen CellSearch®-Proben. Bei n = 18 Probanden, bei welchen auf Draht-1 CTCs detektiert wurden, konnten auf den dazugehörigen CellSearch®-Proben keine CTCs detektiert werden. Ebenso beim Vergleich von Draht-2 mit CellSearch®. Vergleicht man nun die alle positiven CellSearch®-Ergebnisse mit den FSMW-Ergebnissen, derselben Probanden, fällt auf, dass jeweils auf n = 7 Drähten von FSMW-1 und auf n = 7 Drähten von FSMW-2 keine CTCs detektiert wurden, während in den entsprechenden CellSearch®-Proben CTCs gefunden wurden. Bei jeweils n = 10 Proben von FSMW-1 und -2 konnten auch in den dazugehörenden CellSearch®-Proben CTCs detektiert werden. Betrachtet man die letzten beiden Spalten von Tabelle 6 fällt auf, dass bei n = 6 Patienten sowohl in CellSearch® als auch auf den beiden entsprechenden FSMWs keine CTCs detektiert wurden. Bei nur drei Proben konnte ein positives CellSearch®-Ergebnis ermittelt werden, wohingegen auf beiden FSMWs keine CTCs nachzuweisen waren. In der letzten Spalte der Tabelle wird aufgezeigt, wie sich die CellSearch®-Ergebnisse im Vergleich zu positiven CTC-Zellzahlen auf den FSMWs verhalten. Bei n = 22 Probanden sind

wenigstens auf einem der beiden Drähte CTCs nachzuweisen, während CellSearch® keine CTCs detektierte und bei 14 Probanden mit im CellSearch®-Verfahren nachgewiesenen CTCs sind auf wenigstens einem Draht auch CTCs nachzuweisen.

**Tabelle 6: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die detektierten Tumorzellzahlen der Doppelanwendung FSMW-1 und FSMW-2 des funktionalisierten Drahtes ( Functionalized and structured medical wire) und die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnen Blutprobe in vitro nachweist, in einer Kontingenztafel nach „negativem“ (= 0) und „positivem“ (> 0) Tumorzellnachweis kategorisiert.**

	FSMW-1 = 0	FSMW-1 > 0	FSMW-2 = 0	FSMW-2 > 0	FSMW-1 und -2 = 0	FSMW-1 oder -2 > 0
CellSearch® = 0	10	18	10	18	6	22
CellSearch® > 0	7	10	7	10	3	14

Zum Vergleich beider Methoden wurde beim CellCollector™ auf die Ergebnisse von FSMW-1 zurückgegriffen, da diese denen von FSMW-2 in ihrer Gesamtheit äußerst ähnlich sind und demzufolge sich keine erkennbaren Unterschiede in der statistischen Auswertung ergeben würden, wie aus Tabelle 6 ersichtlich wird.

### 3.2.1 Sensitivität von CellSearch® im Vergleich zum CellCollector™

Die CellSearch®-Methode als bisher etablierte Methode detektierte nur in einem guten Drittel der Fälle CTCs in den entnommenen Proben. Bis auf einen Ausreißer, welcher unten im Text noch genauer beschrieben wird, sind alle in CellSearch® ermittelten CTC-Zahlen < 10. Aus den Ergebnissen in Tabelle 5 lässt sich die Sensitivität von CellSearch® anhand der in der Studie ermittelten Daten errechnen:

→ Richtig als krank Erkrankte / Alle Erkrankten = Sensitivität

→  $17 / 45 = 0,38$

### 3.2.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse von CellCollector™ und CellSearch® durch Boxplots

Zunächst werden in einem Boxplot die Ergebnisse von CellSearch® als Referenzmethode zum CellCollector™ FSMW dargestellt. In einem weiteren Boxplot werden dann die Ergebnisse von FSMW-1 und CellSearch® gegenüber gestellt. Nicht im Boxplot befindliche Punkte werden als Ausreißer betrachtet und mit Kreisen in den Diagrammen gekennzeichnet.

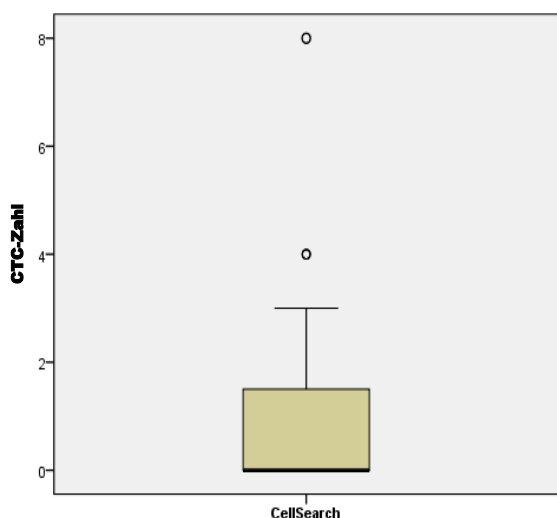


Abbildung 11: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnen Blutprobe in vitro nachweist, in einem Boxplot dargestellt.

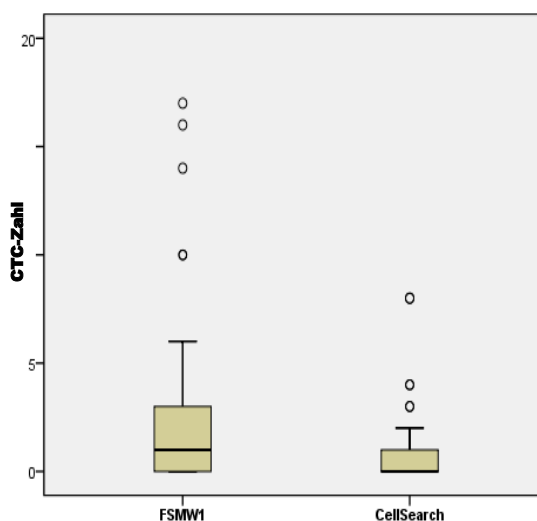


Abbildung 12: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen des funktionalisierten Drahtes FSMW-1 (Functionalized and structured medical wire) und die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnen Blutprobe in vitro nachweist, in einem Boxplot dargestellt.

Beim oben dargestellten Boxplot liegt der Median der CellSearch®-Ergebnisse bei  $\tilde{x} = 0$  und von FSMW-1 bei  $\tilde{x} = 1$ . Das CellSearch®-Ergebnis von Patient *Lu-UL-008* mit einem Wert von CTCs = 300 ist zwar aufgelistet wird allerdings als extremer Ausreißer angesehen und deshalb weder in den Grafiken noch in den Analysen der Werte berücksichtigt. Das CellSearch®-Ergebnis in diesem Fall steht einer detektierten Zellzahl bei FSMW-1 von CTCs = 0 und bei FSMW-2 von CTCs = 5 gegenüber. Dieser Patient hatte ein Großzelliges Lungenkarzinom und befand sich in einem weit fortgeschrittenen bereits metastasierten Tumorstadium.

### 3.2.3 Scatterplot aus CellCollector™ - Draht-1 und CellSearch® mit Regressionsanalyse

Des Weiteren wurden Scatterplots angefertigt, um die Ergebnisse des CellCollectors™ FSMW-1 und CellSearch® im Vergleich zu veranschaulichen. In Abbildung 13 wird die CTC-Zahl im Referenzsystem CellSearch® gegen die Ergebnisse von FSMW-1 auf der X-Achse aufgetragen. Die Regressionsgerade in der Abbildung gemäß einer linearen Regression sowie der Korrelationskoeffizient von  $R = 0,09$  geben Hinweis darauf, dass nahezu kein Zusammenhang zwischen FSMW und CellSearch® besteht. Die Skalierung der Y-Achse wurde den Werten von CellSearch® angepasst und entspricht damit nicht der Skalierung der X-Achse, was bei der Beurteilung der Regressionsgeraden zu beachten ist. Die Verteilung der Punkte entlang der X-Achse zeigt, dass beim CellCollector™ FSMW vergleichsweise mehr CTCs detektiert werden als dies bei CellSearch® der Fall ist. Das in der Tabelle angezeigte 95%-Konfidenzintervall von -0,2887 bis 0,3050 enthält die Null und ist somit nicht signifikant.

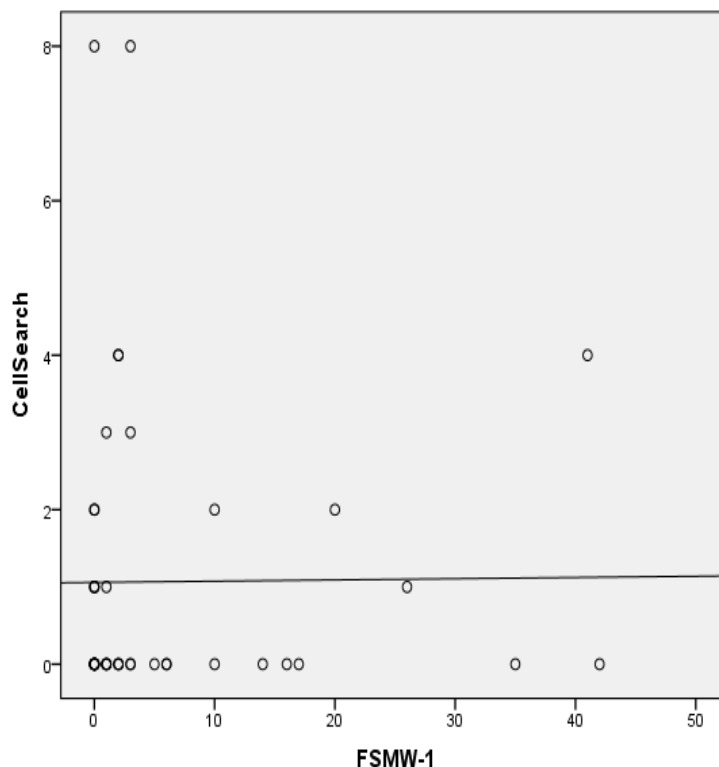


Abbildung 13: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen des funktionalisierten Drahtes FSMW-1 (Functionalized and structured medical wire) und die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnenen Blutprobe in vitro nachweist, in einem Boxplot mit Regressionsgerade dargestellt.



### 3.2.4 Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung der CellSearch®-Ergebnisse

In Abbildung 13 wird dann die detektierte Zellzahl auf beiden Drähten, FSMW-1 und FSMW-2, im direkten Vergleich zu den CellSearch®-Ergebnissen dargestellt. Die CellSearch®-Ergebnisse sind hier farbig klassifiziert nach ihrer CTC-Zahl. Dabei fällt auf, dass niedrige CellSearch®-Ergebnisse nicht immer mit niedrigen FSMW-Ergebnissen einhergehen, was sich gut an den blauen Punkten erkennen lässt. Diese Tatsache hat sich bereits bei der Regression bzw. dem Regressionskoeffizienten bemerkbar gemacht.

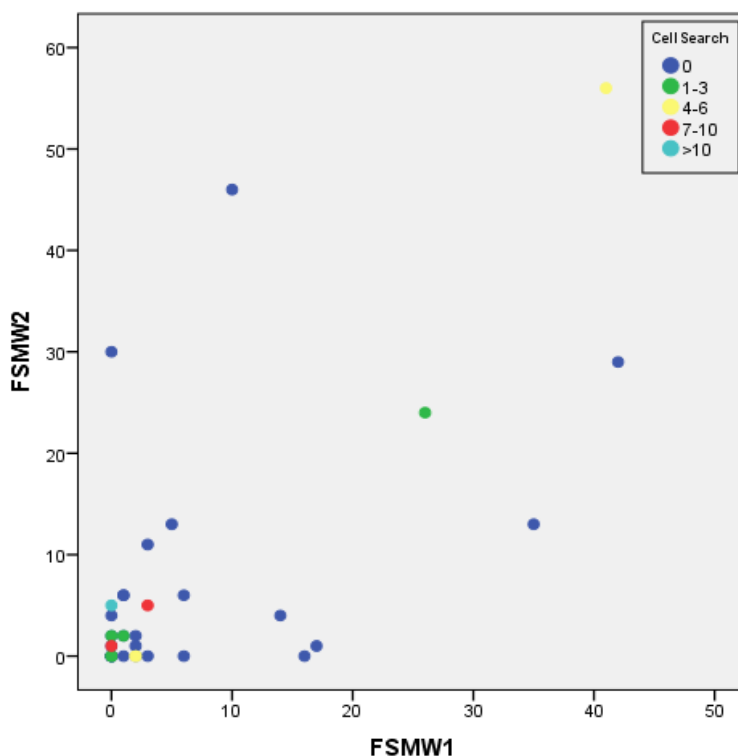


Abbildung 14: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen des funktionalisierten Drahtes FSMW-1 (Functionalized and structured medical wire) und die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnenen Blutprobe nachweist, in einem Boxplot unter Einbeziehung der kategorisierten CellSearch®-Ergebnisse dargestellt.

### 3.2.5 Scatterplot aus CellCollector™ - Draht-1 und CellSearch® unter Einbeziehung des Tumorstadiums

Abbildung 15 zeigt in einem Scatterplot den Vergleich zwischen FSMW-1 und CellSearch®, wobei zu erwähnen ist, dass die Y-Achse anders skaliert ist als die X-Achse, um einen besseren Überblick über die CellSearch®-Ergebnisse zu erhalten, was bei einer Skalierung entsprechend der X-Achse nicht der Fall wäre. Was an der Verteilung der Werte in Abbildung 15 auffällt ist die Tatsache, dass ein Großteil der im CellSearch®-System als positiv detektierten Probanden sich in Tumorstadium IV (= 4) befand. Wohingegen bis auf einen Probanden, bei allen in Tumorstadium III (= 3) befindlichen Studienteilnehmer keine CTCs detektiert wurden.

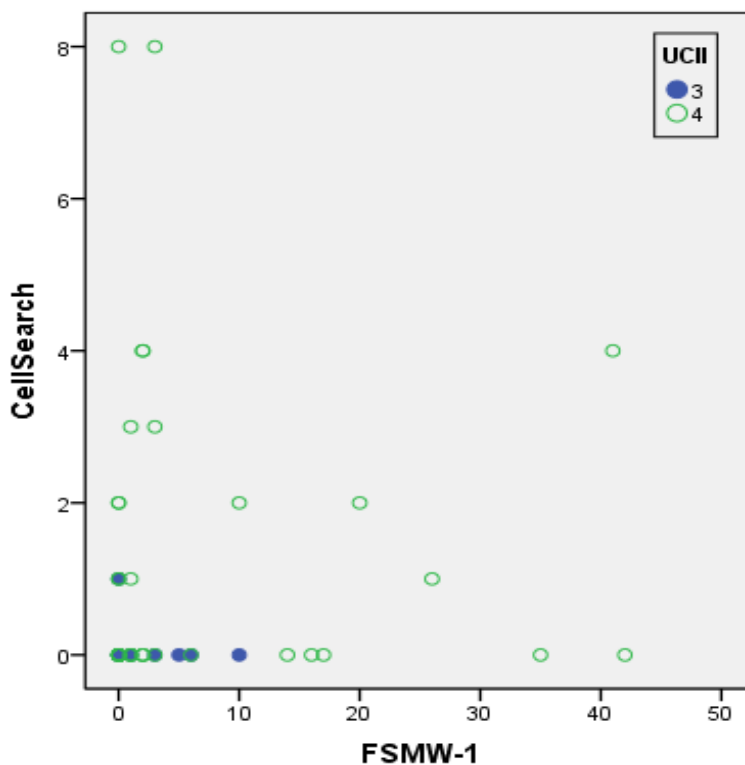


Abbildung 15: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen des funktionalisierten Drahtes FSMW-1 (Functionalized and structured medical wire) und die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnenen Blutprobe in vitro nachweist, in einem Boxplot unter Einbeziehung des Tumorstadiums III (entspricht 3 = blau) und IV (entspricht 4 = grün) gemäß UICC dargestellt.

### 3.2.6 Scatterplot aus CellCollector™ - Draht-1 und CellSearch® unter Einbeziehung der Tumorgröße

Betrachtet man in Abbildung 16 den Vergleich von FSMW-1 und CellSearch® unter Einbeziehung der Tumorgröße ist bei der CellSearch®-Methode kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Höhe der detektierten CTC-Zahlen und Tumorgröße festzustellen, was z.B. an den beiden CellSearch® Ergebnissen mit dem Wert = 8 und einem T-Stadium von 1 und 2 deutlich wird. Anders ist die bei FSMW-1, wo hohe CTC-Zahlen auch einhergehen mit zunehmender Tumorgröße.

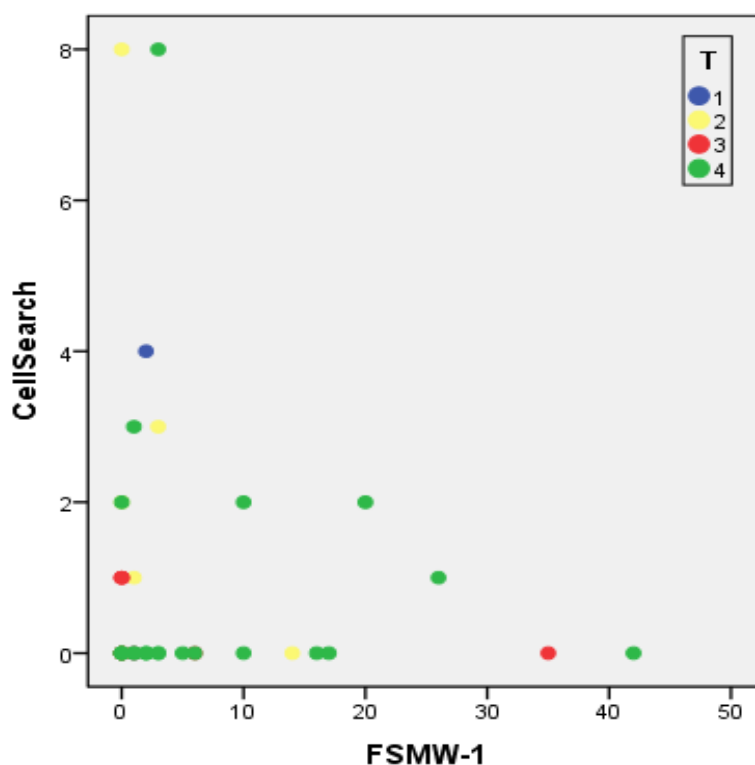


Abbildung 16: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen des funktionalisierten Drahtes FSMW-1 (Functionalized and structured medical wire) und die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnen Blutprobe in vitro nachweist, in einem Boxplot unter Einbeziehung der Tumorgröße gemäß TNM-Klassifikation dargestellt. (T: Tumorgröße, N: Lymphknotenstatus, M: Metastasierung; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10)

### 3.2.7 Bland-Altman Plot zum Vergleich CellCollector™ und CellSearch®

In Abbildung 17 wird wiederum ein Bland-Altman Plot (Differenzen-Plot) herangezogen, um diesmal den CellCollector™ mit der Referenzmethode CellSearch® zu vergleichen. Zusätzlich wurde das Tumorstadium gemäß UICC-Klassifikation eingefügt, um weitere Informationen darüber zu gewinnen, in wie weit das Tumorstadium die Ergebnisse beeinflusst. Zum einen zeigt sich eine deutliche Kumulation der Punkte im Bereich von Null, weil im Bereich von kleineren Werten die beiden Methoden sich weniger unterscheiden, als bei hohen Werten. Die Punkteverteilung bei höheren Werten deutet darauf hin, dass sich die beiden Methoden je mehr unterscheiden, desto höher die gemessenen CTC-Zahlen sind. Die untere Begrenzungslinie mit einem y-Achsenabschnitt = -16,48 wird nicht unterschritten. Die obere Begrenzungslinie beim y-Achsenabschnitt = 26,88 wird durch drei Werte überschritten, was sich dadurch erklärt, dass an dieser Stelle sehr hohe Werte von FSMW-1 mit besonders kleinen CellSearch®-Werten einhergehen, was die geringe Korrelation der beiden Methoden abermals unterstreicht. Nur bei wenigen Differenzen ( $< 0$ ) liegt bei CellSearch® eine höhere CTC-Zahl vor, welche dann allerdings meist Patienten im Stadium IV (= 4) sind. Die Markierung des Tumorstadiums zeigt, dass kleine Werte bzw. kleine Differenzen tendenziell im Stadium III (= 3) eher als im Stadium IV zu erwarten sind und hohe detektierte CTC-Zahlen vor allem bei Patienten im Stadium IV vorkommen.

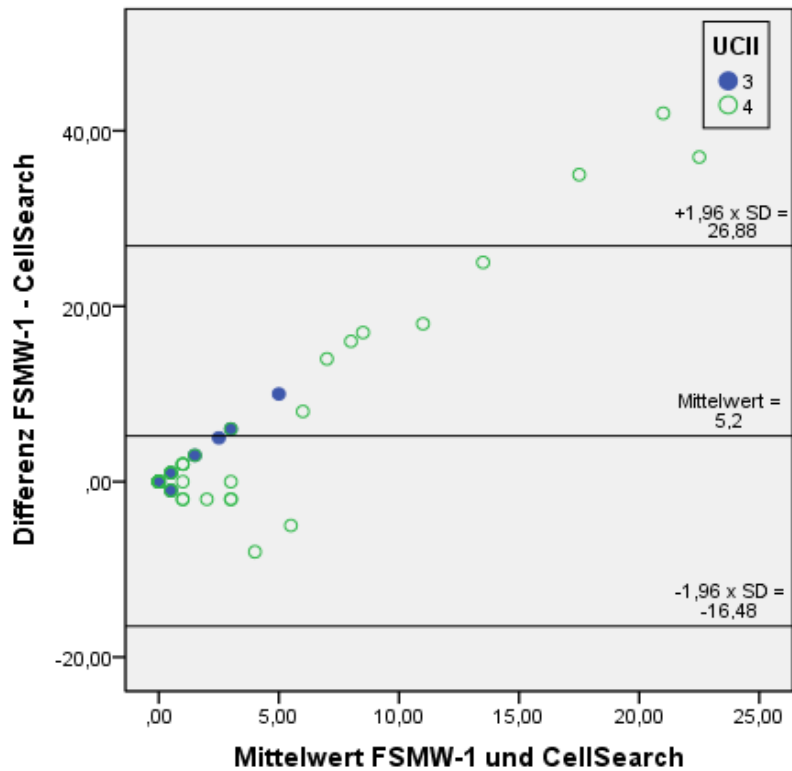


Abbildung 17: Klinische Studie am Universitätsklinikum Ulm, 2012-2014, zur Detektion zirkulierender Tumorzellen bei Lungenkarzinom-Patienten im Tumorstadium III und IV gemäß UICC (Union internationale contre le cancer; Einteilung siehe Tabelle 1, S. 10). In dieser Abbildung werden die in vivo detektierten Tumorzellzahlen des funktionalisierten Drahtes FSMW-1 (Functionalized and structured medical wire) und die detektierten Tumorzellzahlen der Vergleichsmethode CellSearch®, welche Tumorzellen aus einer gewonnenen Blutprobe in vitro nachweist, in einem Bland-Altman Plot unter Einbeziehung des Tumorstadiums gemäß UICC (Union internationale contre le cancer) dargestellt. Hierbei entspricht 3 = III und 4 = IV. (SD: Standarddeviation)

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Ergebnisse des CellCollectors™**

Der CellCollector™ FSMW der Firma Gilupi wurde als in vivo Verfahren entwickelt, um zirkulierende Tumorzellen aus dem Blut von Patienten zu gewinnen. Dabei ging es um die Frage, ob sich das neue Verfahren im klinischen Alltag etablieren lässt und ob es herkömmlichen Methoden wie CellSearch® von Veridex übertrifft. Bisher hatten Methoden zu Gewinnung von Tumormaterial aus CTCs klinisch nur wenig Bedeutung, da die Verfahren eine geringe Sensitivität und eine komplizierte Auswertung mit sich bringen. Jedoch sind, wie in der Einleitung schon dargestellt, invasive Verfahren zur Gewinnung von Tumorgewebe z.B. durch Bronchoskopien äußerst belastend für Patienten. Vor allem die immunzytochemischen Analysen der Tumorzellen mit dem Ziel einer tumorspezifischen Therapie sind in den letzten Jahren immer wichtiger geworden, um die Therapie für den Patienten besser verträglich zu gestalten.

Zunächst wurden im Ergebnisteil die Werte von Draht 1 und Draht 2 gegenübergestellt, um eine Aussage treffen zu können, inwiefern bei einer Messwiederholung die Ergebnisse voneinander abweichen. Im Versuchsaufbau der Studie wurden jedem Patienten jeweils zwei Drähte für einen Zeitraum von 30 Minuten über eine Venenverweilkanüle appliziert. Nach dem ersten Draht wurde umgehend der zweite Draht eingebracht und ebenfalls für 30 Minuten in der Vene belassen. Die Anwendung des FSMWs war bei beiden Anwendungen exakt identisch, weshalb auch die Ergebnisse von FSMW-1 und FSMW-2 in Korrelation gebracht werden konnten, um eine Art Re-test-Reliabilität zu ermitteln. Auf Basis dieser und der Sensitivität des CellCollectors™ soll dann vor dem Hintergrund der klinischen Praktikabilität der Nutzen und die Bedeutung dieser Methode evaluiert werden.

#### **4.1.1 Sensitivität des CellCollectors™**

Die Ergebnisse der oben genannten Studie ergaben bei 39 von 50 Patienten auf zumindest einem von zwei Drähten ein positives Ergebnis und nur bei 21 Patienten waren auf beiden Drähten CTCs nachzuweisen. Daraus wurde für den CellCollector™ eine Sensitivität von 78% (39/50) ermittelt. Vergleicht man diese Studiendaten mit denen von Vergleichsstudien zur CellCollector™-anwendung bei Lungenkarzinom-Patienten wie beispielsweise eine

Studie der Thorax-chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Posen, stößt man auf eine Sensitivität von 94,1% (32/34). (Gasiorowski et al. 2012) Diese Abweichung wird in der anschließenden Fehlerdiskussion erörtert.

Was jedoch viel relevanter ist, ist die Häufigkeit mit der der CellCollector™ CTC = 0 ermittelt hat. Bei n = 29 Patienten konnten auf mindestens einem Draht keine CTCs detektiert werden und bei n = 11 Patienten ergaben beide FSMWs CTC = 0.

#### **4.1.2 Darstellung der Ergebnisse des CellCollectors™ durch Boxplots**

Dies wird in Abbildung 4 anhand von zwei Boxplots verdeutlicht, in dem der Median von FSMW-1 bei  $\tilde{x} = 1$  und der Median von FSMW-2 bei  $\tilde{x} = 2$  angegeben wird. Der Großteil der ermittelten CTC-Werte liegt im Bereich des Boxplots, also bei FSMW-1 liegt das 75%-Quantil = 6, d.h. 75% der ermittelten Werte bei FSMW-1 sind  $< 7$  und bei FSMW-2 liegt das 75%-Quantil = 8, d.h. 75% der Werte sind  $< 9$ . Der Großteil der Werte kumulierten somit im Bereich  $< 9$  CTCs und nur bei n = 15 Patienten konnten Zellzahlen  $> 8$  CTCs ermittelt werden. Eine breite Streuung der Werte wie man sie z.B. in der Studie der Posener Arbeitsgruppe findet, konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. (Gasiorowski et al. 2012) Obwohl man aufgrund der Aufnahme von Patienten im UICC-Stadium IV im Gegensatz zu der Posener Arbeitsgruppe, in der nur Patienten bis Tumorstadium IIIB aufgenommen wurden, höhere CTC-Ergebnisse und damit eine größere Streuung der Werte erwarten würde. Die teilweise kleinen detektierten CTC-Zahlen können bei Patienten in höheren Tumorstadien, wo man höhere Werte erwarten würde, vor allem durch methodische Fehler erklärt werden. Dazu folgt im Weiteren eine ausführliche Fehleranalyse.

#### **4.1.3 Scatterplot aus Draht-1 und -2 mit Regressionsanalyse**

In einem Scatterplot (Abbildung 5) wurde dann noch versucht den Zusammenhang von FSMW-1 und -2 grafisch darzustellen und mittels Regressionsgerade und Korrelationskoeffizienten zu beschreiben. Dabei lässt sich sehen, dass viele Werte um den Nullpunkt kumulieren. Der Korrelationskoeffizient von  $R = 0,60$  zwischen Draht 1 und 2 weist auf eine positive Korrelation beider Messungen hin. Im Sinne einer Re-Test-

Reliabilität zeigen die Ergebnisse, dass nur drei Wertepaare der Drähte, auf welchen CTCs nachweisbar waren in ihrem Ergebnis exakt übereinstimmen, allerdings die restlichen Wertepaare nur gering voneinander abweichen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Doppelmessungen des CellCollectors™ im Wesentlichen übereinstimmen und dadurch ein Gütekriterium für die klinische Anwendung gegeben ist.

#### **4.1.4 Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung des Tumorstadiums**

In Abbildung 6 wurden in einem weiteren Scatterplot die Ergebnisse von FSMW-1 und -2 aufgetragen, diesmal aber unter Einbeziehung des Tumorstadiums. Hierzu lässt sich sagen, dass im Wesentlichen kein Unterschied zwischen Stadium III und IV besteht, was die detektierten CTCs anbelangt. In beiden Stadien wurden niedrige und hohe Werte detektiert, wenngleich auch bei  $n = 21$  Patienten auf dem zweiten Draht CTCs entdeckt wurden, während nur bei  $n = 14$  Patienten auf dem ersten Draht CTCs entdeckt wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass vor der ersten Anwendung die Patienten meist einige Zeit bereits in sitzender Position verbrachten und somit der Kreislauf nicht sonderlich erregt war, wohingegen einige Patienten vor der Anwendung des zweiten Drahtes kurz aufgestanden sind, z.B. um auf die Toilette zu gehen, was den Kreislauf aktiviert haben dürfte, und somit das den Draht umfließende Blutvolumen erhöht haben könnte.

#### **4.1.5 Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung des Metastasierungsgrades und Regressionsgeraden**

In Abbildung 7 werden die Ergebnisse der Doppelmessungen des FSMWs in Zusammenhang mit dem Grad der Metastasierung dargestellt. In Anbetracht dessen, dass Metastasierung sich auf das UICC-Stadium IV beschränkte, ergibt sich rein grafisch dasselbe Bild, allerdings wurden die einzelnen Punkte zugunsten von zwei Regressionsgeraden weggelassen. Dabei wurden die Korrelationskoeffizienten für beide Stadien (Stadium III = nicht-metastasiert, Stadium IV = metastasiert) ermittelt. Der Koeffizient in Stadium III zwischen Draht-1 und Draht-2 liegt bei  $R = 0,64$  und der in Stadium IV bei  $R = 0,73$ . Damit zeigt sich, wie bereits oben beschrieben, dass die



Ergebnisse zwischen den beiden Drähten bei Stadium IV eher übereinstimmen als bei Stadium III. Diese Auffälligkeit könnte sich durch die sehr geringe Anzahl an Probanden im Stadium III ergeben, wohingegen die meisten Studienteilnehmer sich im Stadium IV befanden und somit hier eine klarere statistische Aussage getroffen werden kann als bei Stadium III. Der Grund für das ungleich Studienkollektiv ist die Tatsache, dass an Lungenkarzinom erkrankte Patienten häufig erst bei Symptomen wie Hämoptysen oder therapieresistenter Dyspnoe der weitergehenden Diagnostik zugeführt werden und sich somit viele Patienten bei Diagnose bereits in weit fortgeschrittenen Tumorstadien befinden.

#### **4.1.6 Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung der TumorgroÙe**

Diese Tatsache erklärt auch in Abbildung 8 die ungleiche Verteilung über die T-Stadien, obwohl die TNM-Einteilung von der UICC-Klassifikation abweicht. In Abbildung 8 weisen die meisten Probanden TumorgroÙenstadium 4 auf, was auÙerdem noch dadurch verstärkt wird, dass auch ein Teil der Patienten mit UICC-Stadium III sich im GroÙenstadium T4 gemäß TNM-Klassifikation befinden. Das Entscheidende in dieser Abbildung ist allerdings, dass bei Probanden im Stadium-T4 auch hohe CTC-Zahlen gemessen werden bzw. hohe CTC-Zahlen nicht bei Probanden in T-Stadium 1 oder 2 vorkommen. Auch wenn für eine eindeutig signifikante Aussage in diesem Punkt die Probandenanzahl in den T-Stadium 1 bis 3 höher sein müsste so gibt der Zusammenhang der vorhandenen Werte trotzdem eine Richtung vor. Diese ist wichtig, weil ein Verfahren zur Gewinnung von CTCs aus dem Blut eine positive Korrelation mit der Tumorlast besitzen sollte. Als Stellvertreter der Tumorlast werden hier Tumorstadium bzw. Metastasierung und TumorgroÙe angeführt. Wohingegen bei ersteren in Abbildung 6 und 7 der Zusammenhang noch nicht vollends deutlich erscheint, so fällt spätestens bei Abbildung 8 auf, dass bis auf ein Ergebnis (rot markiert) alle detektierten CTC-Zahlen >15 von Probanden stammen, welche sich im GroÙenstadium T4 befanden. Wichtig an dieser Stelle ist die Tatsache, dass das System des CellCollectors™ eine hohe Tumorlast sensibel detektiert, was der Fall zu sein scheint und eine Grundvoraussetzung für die klinische Evaluierung dieser Technik darstellt.

#### **4.1.7 Bland-Altman Plot zum Vergleich von Draht-1 und -2**

Außerdem wurde um die beiden Drähte zu vergleichen noch ein Bland-Altman Plot (Abbildung 9) erstellt. Bei diesem liegt ein Großteil der Werte im Bereich  $\pm 1,96 \times \text{SD}$  um den Mittelwert. Nur selten sind Ausreißer jenseits der definierten Grenzen zu beobachten. Wiederum fällt auf, dass bei niedrigen Mittelwerten der Doppelmessung die Abweichung der einzelnen Differenzen vom Mittelwert der Differenzen geringer ist, als dies bei höheren Differenzen und den dazugehörigen Mittelwerten der Wertepaare der Fall ist. Zum einen ist bei hohem CTC-Zahlen von einer zunehmenden Messungenauigkeit auszugehen, zum anderen ist der Zustand des Drahtes nach Entnahme von Bedeutung. Wie uns vom Labor mitgeteilt wurde, stellt eine Verunreinigung der Drähte mit makroskopisch sichtbarem Blut eine große Herausforderung für die Auswertung da.

#### **4.1.8 Fehleranalyse und –diskussion der Ergebnisse des CellCollectors™**

Im Weiteren folgt nun eine Fehleranalyse und –diskussion über bei der Anwendung aufgetretene Probleme. Um die Verunreinigung mit Blutresten nochmals aufzugreifen, falls diese zu groß wird kann der Draht nicht richtig analysiert werden. Vom Labor der Herstellerfirma wurde dies dann häufig als Ergebnis Null deklariert, was zum einen aus labortechnischer Sicht fragwürdig ist, weil sozusagen die Auswertung der CTCs mit Blutresten überlagert war und deshalb nicht sicher gesagt werden konnte, dass keine CTCs auf dem Draht waren, zum anderen dadurch die statistische Aussagekraft der Ergebnisse herabgesetzt wurde. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoller gewesen, bei betreffenden Probanden die Messungen zu wiederholen bzw. diese Probanden in der Auswertung zu zensurieren. Eine Wiederholung der Messung vor Therapie wäre nicht mehr möglich gewesen, da die Ergebnisse erst mehrere Wochen nach der Aufnahme in die Studie bei uns eintrafen. Eine Zensur aller fragwürdigen Ergebnisse könnte allerdings die auszuwertenden Fallzahlen soweit reduzieren, dass eine gültige statistische Aussage schwierig werden würde.

Zu weiteren Fehlerquellen im Ablauf der Probenentnahme soll zunächst auf die Entnahmetechnik eingegangen werden. Zur Anwendung des CellCollectors™ wird von der Herstellerfirma die Cubitalvene bevorzugt. In der Praxis haben sich jedoch die venösen Gefäße des Unterarmes (Vv. Ulnares und Vv. Radiales) als geeigneter herausgestellt. Zum

einen weil die Anwendung des CellCollector™ in dieser Studie meist jeweils vor einer Chemotherapie stattfand und somit eine gelenknahe Vene wegen des Risikos eines Paravasates ungeeignet erschien. Zum anderen weil sich beim Einführen des Drahtes in die Vene häufig Schwierigkeiten ergaben den Draht so weit wie es optimaler Weise nötig ist in die Vene einzuführen ohne dabei die Cubitalvene zu verletzen. Kann der Draht nicht so weit wie nötig in die Vene eingeführt werden, verringert sich die den Draht umfließende Blutmenge drastisch, wodurch weniger CTCs am Draht gebunden werden können. Auch wenn die Gefahr einer Kollabierung des Gefäßes an den Unterarmvenen größer ist als in der Cubitalvene, so hat sich in der Studie die Anwendung des CellCollectors™ am Unterarm praktisch bewehrt.

Erörtert man Probleme beim Versand so ist anzuführen, dass die Proben der Patienten Lu-UL-007 bis -010 im Labor der Herstellerfirma in aufgetautem Zustand eingetroffen sind. Zur Vereinfachung der Abläufe wurde auf Wunsch der Herstellerfirma die Lieferung nicht wie eigentlich üblich mit Trockeneis gekühlt, sondern mit Kühlakkus. Offensichtlich hat diese Art der Kühlung während des Transports nicht ausgereicht, um eine Unterbrechung der Kühlkette zu verhindern. Daraufhin wurden alle weiteren Transporte wieder mit Trockeneis gekühlt. Gemäß Produktbeschreibung ist es möglich den Draht, falls ein umgehender Versand erfolgt, noch am selben Tag bei Raumtemperatur in einer dafür mitgelieferten Laborlösung zu transportieren; in diesem Fall ist der Draht innerhalb von 96 h auszuwerten. Falls ein Versand am Tag der Probenentnahme nicht gewährleistet werden kann, werden die CellCollectoren™ bei -20 °C tiefgefroren und in diesem Zustand gefroren und trocken versandt. Diese Art des Versands wurde in dieser Studie aus logistischen Gründen gewählt, da der Transport zum Labor der Herstellerfirma in Potsdam von Ulm aus, sowie eine Auswertung in einem Zeitraum von 96 h für nicht praktikabel gehalten wurden. Laut Herstellerfirma waren die oben genannten Drähte Lu-UL-007 bis -010 trotz der unterbrochenen Kühlkette beim Transport noch auswertbar, allerdings waren auf allen Drähten dieser Lieferung keine CTCs nachweisbar. Diese Tatsache lässt stark darauf schließen, dass eine Unterbrechung der Kühlkette beim Transport zu einer Beeinträchtigung des Ergebnisses führt.

Im Rahmen der Auswertung, welche von der Herstellerfirma in Potsdam übernommen wurde, stellte sich mehrmals das Problem von zu stark makroskopisch mit Blutresten verunreinigten Drähten, was eine Auswertung der FSMWs wohl erheblich erschwert. Aus diesem Grund wurde bei der Anwendung nach der Fixierung des Drahtes mit dem gelben

Schraubstopfen an der Venenverweilkanüle, diese mit 10 ml NaCl gespült, bevor der Draht in die Vene eingeschoben wurde. Dadurch ließ sich die makroskopische Verunreinigung der Drähte minimieren. Jedoch ist auch zu erwähnen, dass jeder Patient durch die Chemotherapie bedingt eine andere Blutzusammensetzung besitzt, was bei der makroskopischen Verunreinigung der Drähte durchaus eine Rolle gespielt haben dürfte.

## **4.2 Vergleich zwischen CellCollector™ und CellSearch®**

Der Kern dieser Arbeit soll nun der Vergleich zwischen dem CellCollector™ - FSMW und der Referenzmethode CellSearch® ausmachen. Dabei ist als Hauptneuerung des CellCollector™ gegenüber der CellSearch®-Methode anzuführen, dass es sich hierbei um ein in-vivo-Gewinnung, wobei es sich bei CellSearch® um eine in-vitro-Gewinnung von CTCs handelt. Um die Fragestellung dieser Arbeit wieder aufzugreifen, soll hier durch die Auswertung der ermittelten Daten und deren Analyse und Diskussion erörtert werden, ob die Alternativhypothese, dass der CellCollector™ eine geeignetere Methode zur Gewinnung von CTCs ist als das Referenzsystem CellSearch®, als korrekt angenommen werden kann. Dabei wurden die Ergebnisse von FSMW-1 mit denen von CellSearch® verglichen, da die Ergebnisse von FSMW-1 und FSMW-2 hinsichtlich ihrer Häufigkeitsverteilung und Werte sehr stark übereinstimmen, und so davon ausgegangen werden kann, dass sich die statistischen Aussagen beim Vergleich von FSMW-1 und CellSearch® und die von FSMW-2 und CellSearch® gleichen. Ein detaillierter Vergleich zwischen den Ergebnissen von FSMW-1 bzw. von FSMW-2 und CellSearch® ist in Tabelle 6 des Ergebnisteils zu finden. Darin lässt sich die oben getätigte Feststellung der Übereinstimmung von FSMW-1 und -2 im Vergleich mit CellSearch® durch die entsprechenden Zahlen belegen. Bei jeder Anwendung des CellCollectors™ wurde unmittelbar davor jedem Patienten eine CellSearch®-Monovette venöses Blut entnommen und im Anschluss die Probe per Spezialtransport bei Raumtemperatur an die Universitätsklinik Hamburg Eppendorf zur Auswertung geschickt. Bei der Endauswertung konnten lediglich 45 Wertepaare verglichen werden, da fünf der 50 abgesendeten Proben aufgrund von geronnenem Blut in den Röhrchen nicht richtig ausgewertet werden konnten.

### **4.2.1 Sensitivität von CellSearch® im Vergleich zum CellCollector™**

Anhand der Studiendaten konnte für das CellSearch®-System eine Sensitivität von 38% (17/45) ermittelt werden. In einer im Jahr 2010 angefertigten Studie bei Lungenkarzinom Patienten am Hyogo College of Medicine in Japan wurde eine Sensitivität von 30,6% für das CellSearch®-System detektiert. (Tanaka et al. 2010) Allerdings sind bei anderen Karzinomen, wie Prostata- oder Mamma-Karzinomen höhere Sensitivitäten zu erwarten, da es sich bei diesen Tumorarten oft um eine einheitlichere Tumorhistologie handelt als

dies beim Lungenkarzinom der Fall ist. Dementsprechend ist in den USA das CellSearch®-System bisher lediglich für die Anwendung an Patienten mit Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinomen zugelassen. Im Gegensatz zu der niedrigen Sensitivität beim CellSearch®-System wurde anhand der Studiendaten für den eine Sensitivität von 78% ermittelt. In einer ähnlichen Studie zum CellCollector™ der thoraxchirurgischen Abteilung in Posen wurde eine Sensitivität von 94,1% ermittelt, allerdings wurde hier Lungenkarzinom-Patienten mit UICC-Stadium I bis III eingeschlossen. (Gasiorowski et al. 2012) Diese Diskrepanz der Ergebnisse zeigt eindeutig einen Fortschritt von der In-vitro-Methode CellSearch® zur In-vivo-Methode CellCollector™. Da beide Methoden mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene EpCAM und Cytokeratin arbeiten, kann so der Unterschied in der Sensitivität nicht erklärt werden. Ein Hauptunterschied der beiden Methoden ist das Blutvolumen, welches faktisch untersucht wird. Wohingegen beim CellSearch® System 7,5 ml Blut untersucht werden, soll laut Herstellerangaben beim CellCollector™ der Draht mit Blut einer Strömungsgeschwindigkeit von 20 ml/min 30 Minuten lang umspült werden, und somit CTCs in einem Blutvolumen von circa 600 ml detektiert werden. (Saucedo-Zeni et al. 2012) Als weitere Begründung für die unterschiedliche Sensitivität könnte man anführen, dass beim CellSearch®-System eine Auswertung innerhalb von 96 h erfolgen kann, und in diesem Zeitraum die in der Blutprobe befindlichen Zellen einschließlich CTCs bei Raumtemperatur in nicht-fixiertem Zustand sich in der CellSearch®-Monovette befinden und lediglich von ungefähr 300 µl einer Lösung mit Na<sub>2</sub>EDTA und einem Zellkonservierungsmittel vor Gerinnung geschützt werden. Bei einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 2,4 h für zirkulierende Tumorzellen, kann man davon ausgehen, dass in der Zeit zwischen Entnahme der Blutprobe und Auswertung, einige CTC zum Zeitpunkt der Auswertung bereits untergegangen sind. (Meng et al. 2004) Wohingegen beim FSMW-System die Zellen direkt am Patienten gewaschen und mit Aceton fixiert werden, um dann bis zur Auswertung trocken bei – 20 °C gelagert und transportiert zu werden. Zu der oben genannten Halbwertszeit ist zu sagen, dass diese ein gemittelter Wert ist und man vermutet, dass einige sich in der G<sub>0</sub>-Ruhephase des Zellzyklus befindlichen CTCs deutlich länger überleben können. (Pachmann 2012)

#### **4.2.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse des CellCollectors™ und CellSearch® durch Boxplots**

In zwei Boxplots (Abbildung 10 und 11) wurden die Ergebnisse von CellSearch®, denen des CellCollectors™ gegenübergestellt. Dabei zeigt sich, dass bei CellSearch® der Boxplot kleiner ist als beim FSMW, da die Streuung der Ergebnisse geringer ist und bei CellSearch® sehr häufig das Ergebnis CTC = 0 (bei n = 28 Probanden) herauskommt und dementsprechend auch der Median der CellSearch®-Ergebnisse bei  $\tilde{x} = 0$  liegt.

#### **4.2.3 Scatterplot aus den Ergebnissen des CellCollectors™ und CellSearch® mit Regressionsanalyse**

In Scatterplots wurden beide Methoden weiter grafisch aufgearbeitet. Wie z.B. in Abbildung 12, wo beide Methoden in Punkten aufgetragen wurden und durch eine lineare Regressionsgerade und eine Korrelation versucht wurde einen Zusammenhang aufzuzeigen. Wie an der Regressionsgeraden schon ersichtlich und durch das Bestimmtheitsmaß  $R^2=0,009$  und dem Korrelationskoeffizienten  $R=0,09$  besteht zwischen den beiden Methoden nahezu kein Zusammenhang. Ermittelt der CellCollector™ bei einem Probanden ein hohes Ergebnis werden in der CellSearch®-Probe desselben Probanden keine oder nur wenige CTCs nachgewiesen und umgekehrt. Nun könnte man daraus schlussfolgern, dass diese Tatsache die Güte der Ergebnisse, welche mit dem FSMW erzielt wurden, in Frage stellt, da es sich bei CellSearch® um die bisher gängige Methode handelt. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Bei der zum Lungenkarzinom angefertigten Studie der Thorax-chirurgischen Abteilung der Universität Posen wurden in 2 von 34 CellSearch®-Proben CTCs nachgewiesen, wohingegen in 32 von 34 Proben des CellCollectors™-FSMW CTCs nachgewiesen werden konnten. (Gasiorowski et al. 2012) Damit werden die Ergebnisse dieser Studie untermauert, dass nahezu kein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen beider Methoden besteht und der CellCollector™ eine deutlich höhere Trefferquote für die Detektion von CTCs aufweist als das CellSearch®-System aufweist.

#### **4.2.4 Scatterplot aus Draht-1 und -2 unter Einbeziehung der CellSearch®-Ergebnisse**

Abbildung 13 soll nochmals grafisch anders aufgearbeitet die Abweichung der FSMW-Ergebnisse von den CellSearch®-Ergebnissen dargestellt werden. Dabei stehen hohe CTC-Ergebnisse des CellCollectors™ oft kleinen Ergebnissen bei der CellSearch®-Methode gegenüber.

#### **4.2.5 Scatterplot aus den Ergebnissen des CellCollectors™ und CellSearch® unter Einbeziehung des Tumorstadiums**

In Abbildung 14 wird der Vergleich zwischen FSMW-1 und CellSearch® noch ergänzt durch das Tumorstadium als Repräsentant für die Tumorlast der Probanden. Dabei fällt an der Verteilung der Werte auf, dass ein Großteil der im CellSearch®-System als positiv detektierten Probanden sich im Tumorstadium IV befanden, jedoch die meisten Proben von Studienteilnehmern in Stadium III den Wert Null ergaben. D.h. dass CellSearch® in der Lage ist Patienten mit einer Metastasierung von Patienten bei denen noch keine Metastasierung vorliegt zu unterscheiden. Oder anders ausgedrückt, sind die CellSearch®-Ergebnisse deutlich abhängiger vom Metastasierungsgrad der Patienten als dies bei den Ergebnissen des CellCollector™ der Fall ist. In einer im Jahr 2011 veröffentlichten Studie an NSCLC-Patienten, wurde diese Tatsache ebenfalls beschrieben. Die Ergebnisse zeigten, dass das CellSearch®-System im Stadium IV CTC-Zahlen von 0 bis 146 detektierten, während in Stadium IIIB nur Zellzahlen von 0 bis 3 und in Stadium IIIA bereits keine CTCs mehr detektiert werden konnten. In dieser Studie wurde CellSearch® als Verfahren beschrieben, mit dem sich eine vorliegende Metastasierung gut feststellen lässt und somit die Methode ein guter Prognosefaktor ist. (Krebs et al. 2011) Diese Tatsache wurde auch in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie bestätigt (s.o.)



#### **4.2.6 Scatterplot aus den Ergebnissen des CellCollectors™ und CellSearch® unter Einbeziehung der Tumorgröße**

Inwiefern allerdings die Tumorgröße einen unterschiedlichen Einfluss hat auf CellSearch® im Gegensatz zum CellCollector™ soll anhand von Abbildung 15 erörtert werden. Dabei wird das gleiche Scatterplot wie in Abbildung 13 verwendet nur, dass anstatt Tumorstadium die Tumorgröße eingebracht wurde. Hierbei konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Höhe der detektierten CTC-Zahlen und Tumorgröße festzustellen werden. Ganz im Gegenteil fällt auf, dass hohe CTC-Werten bei CellSearch® mit niedrigen Werten beim CellCollector™ und einer geringen Tumorgröße einher gehen. Somit lässt sagen, dass das CellSearch®-System zwar sensitiv gegenüber der Unterscheidung zwischen metastasierten und nichtmetastasierten Lungenkrebs-Patienten ist, sich jedoch aufgrund der Quantität der Ergebnisse keine valide Aussage über die Tumorlast ableiten lässt. Damit repräsentiert der CellCollector™-FSMW die Tumorlast des Patienten, ob in Metastasierungsgrad oder Tumorgröße deutlich besser und gibt dem Anwender ein einheitlicheres Gesamtbild über das Tumorgeschehen des Patienten.

#### **4.2.7 Bland-Altman Plot zum Vergleich der Ergebnisse des CellCollectors™ und CellSearch®**

In Abbildung 16 wird im Rahmen eines Bland-Altman Plots ersichtlich, dass der Zusammenhang beider Methoden sehr inhomogen ist. Werden CTC-Ergebnisse  $< 5$  gemessen ist die Differenz beider Methoden nur gering, werden jedoch höhere CTC Werte detektiert wird der Zusammenhang zwischen den Methoden immer kleiner. So ist in Abbildung 16 eine stetige Zunahme der Differenzen mit steigenden Mittelwerten zu beobachten, was hervorhebt, dass besonders hohe CTC-Ergebnisse auf dem CellCollector™ - FSMW besonders kleinen CTC-Ergebnissen bei CellSearch® gegenüberstehen. Die Verteilung der Punkte nach Tumorstadium zeigt, dass sich die Differenzen aus Stadium 3 eher um den Nullpunkt befinden, und die Ausreißer nach oben bzw. nach unten, also die negativen Differenzen, die Ergebnisse von Patienten im Stadium 4 sind. Diese Verteilung könnte zum einen bedeuten, dass wie bereits festgestellt, CellSearch® leichter im Stadium 4 CTCs detektieren kann, da hier bereits eine Metastasierung vorliegt, was vor allem die die negativen Differenzen erklären würde. Zum anderen detektierten beide Methoden mehr CTCs in Stadium 4 als in Stadium 3, was

wiederum eine gewisse Tendenz hinsichtlich der Tumorlast und damit einhergehenden CTC-Zahl erlaubt.

### **4.3 Bewertung beider Methoden**

Wie in den Studienergebnissen dargestellt, ist CellSearch® eine geeignete Methode, um den Metastasierungsgrad von an Lungenkarzinom Erkrankten zu ermitteln, und stellt somit einen Prognosefaktor für die Erkrankung dar. Des Weiteren gibt es mit CellSearch® die Möglichkeit molekulare Analysen durchzuführen. Diese sind allerdings begrenzt, zum einen durch die geringe Anzahl von detektierten CTCs, wie im Median ( $\tilde{x} = 0$ ) und in der ermittelten Sensitivität (= 39%) deutlich wird, und dadurch eingeschränkte Möglichkeiten zur Analyse, zum anderen durch die geringe Anzahl wirklich Stoffwechsel-intakter CTCs. Das Problem in der Auswertung scheint zu sein, dass nicht vollständig stoffwechsel-aktive Zellen, vom CellSearch®-System häufig unerkant bleiben und somit die gemessene CTC-Zahl hinter der eigentlich im Blut vorhandenen CTC-Konzentration zurückbleibt. Dadurch ist die Aussagefähigkeit der CellSearch®-Methode bzw. eine molekulare Analyse der Zellen zur weiteren Therapieentwicklung stark eingeschränkt.

Mit dem CellCollector™ hingegen werden deutlich häufiger CTCs detektiert (Sensitivität = 78% und Median  $\tilde{x} = 1$ ) auch wenn die gemessenen CTC-Zahlen auf den einzelnen Drähten nicht wesentlich höher sind, so ergeben sich jedoch stabilere Ergebnisse als bei CellSearch®. Des Weiteren lassen sich die gewonnenen CTCs vom CellCollector™ besser molekular auswerten, da die als CTCs ermittelten Zellen klareren Richtlinien für die Anerkennung als CTC unterliegen als dies bei CellSearch® der Fall ist. FSMW als in-vitro Methode ist in der Lage durch die Fixierung der auf dem Draht befindlichen CTCs noch direkt am Patienten nach apoptotischen bzw. und vitalen Zellen zu unterscheiden.

## 4.4 Ausblick in die Zukunft der CTC-Forschung

Bei einzelnen Proben des CellCollectors™ wurde von der Herstellerfirma nun mittels digitaler PCR versucht Mutationen in den gewonnenen CTCs nachzuweisen. Hierbei konnten in der Probe vom Probanden Lu-UL-013 eine KRAS-Mutation mittels TaqMan Mutations Assay und in der Probe des Probanden Lu-UL-043 eine EGFR-Mutation analysiert werden. Diese Mutationen waren bereits bei der immunhistologischen Analyse der Biopsate aufgefallen, welche im Vorfeld der Studie den Probanden bronchoskopisch aus dem Primärtumor der Lunge entnommen wurde. Somit konnten in den zirkulierenden Tumorzellen dieselben Mutationen nachgewiesen werden, wie durch die herkömmliche pathologische Analyse aus den Tumorzellen des Primärtumors. Ließe sich diese Übereinstimmung auch bei weiteren Proben finden, wäre in Zukunft die CTC-Gewinnung mittels CellCollector™ FSMW eine gute Alternative zu bisherigen Materialgewinnung durch Brochoskopien. Dies würde zum einen für die Patienten eine deutlich schonendere Karzinom-Diagnostik bedeuten und zum anderen für den behandelnden Kliniker eine deutlich praktikablere und im klinischen Alltag einfacher durchzuführende Methode darstellen. Der eigentliche Vorteil ganz allgemein besteht jedoch in der Detektion von (Mikro-) Metastasen, der Einschätzung der Wirksamkeit einer Therapie und des Therapieansprechens früher als durch traditionelle bildgebende Verfahren. (Toss et al. 2014)

## 5 Zusammenfassung

Die Behandlung von Tumorerkrankungen des Menschen stellt die behandelnden Ärzte immer wieder vor die Herausforderung geeignetes Tumormaterial zu gewinnen, um den Primärtumor klassifizieren und eine zielgerichtete Therapie einleiten zu können. Da die bisherigen Methoden der Biopsie-Gewinnung wie beispielsweise Bronchoskopien invasiv und belastend für den Patienten sind, erlangt die nicht-invasive Detektion von im Blut zirkulierenden Tumorzellen, auch „Liquid Biopsy“ genannt, zunehmend an Bedeutung.

In dieser Arbeit sollten zwei Methoden zur Gewinnung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) aus dem Blut von Lungenkarzinom-Patienten miteinander verglichen werden, sowie hinsichtlich ihrer klinischen Anwendbarkeit beurteilt werden. Verglichen wurde die als Goldstandard auf dem Gebiet zirkulierender Tumorzellen geltende In-Vitro-Methode CellSearch® von Veridex mit einer neuen Methode der In-Vivo-Gewinnung über einen mit Antikörper gegen EpCAM und Cytokeratine beschichteten Draht (Gilupi CellCollector™). In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie wurden 50 Patienten mit einem Lungenkarzinom UICC Stadium III oder IV vor Therapie eingeschlossen. Die Anwendung bestand zum einen aus Gewinnung einer CellSearch®-Monovette und zum anderen aus einer Doppelanwendung des Nanodetektors unter gleichen Bedingungen. Dabei sollte die Anzahl detektierter CTCs Aufschluss darüber geben, welche Methode eine höhere Sensitivität und Zuverlässigkeit in der klinischen Anwendung aufweist. Es wurde davon ausgegangen, dass sich durch die In-Vivo-Methode mit dem CellCollector™ mehr CTCs aus dem Blut gewinnen lassen als mit CellSearch®.

Die Ergebnisse der CellSearch®-Methode wiesen eine Sensitivität von 38% auf, wohingegen die Ergebnisse des Nanodetektors eine Sensitivität von 78% ergaben. Beim CellCollector™ wurden Werte von 1-56 CTCs pro Draht detektiert, während bei CellSearch® häufig keine CTCs detektiert werden konnten (28 von 45 Fällen), jedoch Werte von 1-300 Tumorzellen pro Draht gemessen werden konnten. Der CellCollector™ erwies sich als die zuverlässigere Methode, weil bei deutlich mehr Proben CTCs detektiert werden konnten (30 von 50) und sowohl Tumorgröße als auch Tumorstadium bzw. Metastasierungsgrad bei positiven Ergebnissen mit der Anzahl detektierter CTCs korrelierten. Die Ergebnisse des CellCollectors™ kovariierten ebenso wie die von CellSearch® mit der Tumorlast der Patienten und eignen sich so als Methoden, um den Therapieverlauf zu beobachten. Der Hauptvorteil des CellCollectors™ besteht darin, dass

hierbei die CTCs in vivo gewonnen werden und der Draht 30 Minuten lang von Blut umströmt wird, weshalb das untersuchte Blutvolumen (20 ml/min à 30 min = 600 ml) deutlich größer ist als dies bei CellSearch® (7,5 ml) oder ähnlichen bisher gebräuchlichen In-Vitro-Methoden der Fall ist. Zum anderen hat das CellSearch®-System Schwierigkeiten bei der Unterscheidung stoffwechselaktiver und –inaktiver CTCs.

Der CellCollector™ erwies sich in der klinischen Anwendung als deutlich aufwändiger als die Vergleichsmethode. So muss beispielsweise die Fixierung der Zellen bereits unmittelbar nach Entnahme der Proben am Patienten durchgeführt werden, was aufgrund genau zu beachtender Waschschrte äußerst aufwendig und anfällig für Anwendungsfehler ist. Zum anderen stellte sich im Verlauf der Studie heraus, dass nur ein penibles Einhalten der Kühlkette beim Transport zum auswertenden Labor ein Überleben der auf dem Draht befindlichen Tumorzellen gewährleistet. Diese Tatsachen machen den CellCollector™ zu einer im klinischen Alltag eher ungeeigneten, da sehr zeitintensiven Methode. Das CellSearch®-System hingegen erwies sich als im klinischen Setting gut praktikable Methode, da lediglich eine Probe venösen Blutes entnommen wird, welche dann bei Raumtemperatur innerhalb von 96h in das auswertende Labor versandt werden muss.

Durch die neue Methode des Nanodetektors stehen mehr und auch besser zu Analyse geeignete CTCs für weiterführende molekulare Untersuchungen zur Verfügung. Somit stellt der Gilupi CellCollector™ als In-Vivo-Methode eine revolutionäre Neuerung auf dem Gebiet der Gewinnung zirkulierender Tumorzellen dar. Allerdings besteht meiner Meinung nach Handlungsbedarf hinsichtlich einer Vereinfachung der klinischen Handhabbarkeit und der Auswertung der Drähte, damit sich der CellCollector™ im Praxisalltag behaupten kann.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ashworth T: A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. The Medical Journal of Australia 14: 146-147 (1869)
2. Gasiorowski L, Herold S, Sangwook K P, Schmitz A, Krahn T, Morgenthaler N, Dworacki G, Luecke K, Dyszkiewicz W: In-vivo isolation of circulation tumor cells in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) patients by a medical device. <http://gilupi.de/pdf/ASCO-2012-GILUPI-lung-abstract10536.pdf> (18.04.2016)
3. Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S: Vergleich von Messmethoden. Dtsch Med Wochenschr 132: 69-73 (2007)
4. Janssen Diagnostics: CellSearch - Circulating Tumor Cell Kit. <http://documents.cellsearchctc.com> (27.03.2014)
5. Krebs M, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou J, Greystoke A, Ward T, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, Blackhall F: Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-Small-Cellular Lung Cancer. Journal of Clinic Oncology 29: 1-8 (2011)
6. CellSearch®, Veridex LCC, Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson: CellSave Preservative Tube - Gebrauchsanleitung. <http://documents.cellsearchctc.com> (28.03.2014)
7. Huber R: Thorakale Neoplasien. In: Matthys H, Seeger W (Hrsg) Klinische Pneumologie, 4. Aufl, Springer Medizin Verlag Heidelberg, S. 530-532 (2008)

8. Meng S, Tripathy D, Frenkel E, Shete S, Naftalis E, Huth J, Beitsch P, Meitsch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming T, Herlyn D, Terstappen L, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J: Clinic Cancer Research: Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. *American Association of Cancer Research* 10: 1-2 (2004)
9. Pachmann K: Die Bedeutung der im Blut zirkulierenden Tumorzellen in der Metastasierungskaskade. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie* 42: 11-16 (2012)
10. Alix-Panabières C, Pantel K: Detection methods of circulating tumorcells. *Journal of Thoracic Disease* 4(5): 446-447 (2012)
11. Alix-Panabières C, Pantel K: Circulating Tumor Cells - Liquid Biopsy of Cancer. *American Association for Clinical Chemistry* 59: 110-118 (2013)
12. Stricker T: Neoplasia. In: Robbins S, Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R (Hrsg) *Robbins Basic Pathology*, 8. Aufl, Elsevier Saunders, S. 201-205 (2007)
13. Saucedo-Zeni N, Mewes S, Niestroy R, Gasiorowski L, Murawa D, Nowaczyk P, Propping C, Sterzynska K, Dyszkiewicz W, Zabel M, Kiechle M, Reuning U, Schmitt M, Lücke K: A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *International Journal of Onkology: In vivo Isolation of Circulating Tumor Cells*: 1-9 (2012)
14. Tanaka F, Yoneda K, Hasegawa S: Circulating tumor cells (CTCs) in lung cancer - current status and future perspectives. *Dovepress, Lung Cancer - Targets and Therapy*: 77-84 (2010)
15. Toss A, Mu Z, Fernandez S, Christofanilli M: CTC enumeration and characterization - moving toward personalized medicine. *Annals of Translational Medicine* 2: 4-6 (2014)

Begründung des Alters verwendeter Quellen:

Bei der Auswahl von Quellen wurde darauf geachtet möglichst aktuelle Studien und Abstracts zu zitieren. Im Falle der Quellen über Thomas Ashworth von 1869 soll das Alter der Quelle verdeutlichen, wann die Entwicklung der Detektion zirkulierender Tumorzellen aus dem Blut ihren Ursprung nahm. Das von Grouven 2007 verfasste Paper zu statistischen Methoden ist ein speziell für medizinische Zwecke verfasster Artikel mit einer Zusammenstellung statistischer Vergleichsmethoden, welcher mir vom Institut für Epidemiologie und medizinische Biometrie als besonders geeignet für diese Arbeit empfohlen wurde.



## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht bisheriger Methoden zur Gewinnung zirkulierender Tumorzellen.....	5
Abbildung 2:	Korrekte Position des Cellcollectors™ in peripherer Vene .....	14
Abbildung 3:	Vergrößertes Schema der funktionalisierten Drahtoberfläche .....	14
Abbildung 4:	Auswertungsvorrichtung für CellCollector™ zur Vereinfachung der Tumorzell-Zählung.....	17
Abbildung 5:	Boxplot aus Zellzahl der zirkulierenden Tumorzellen von FSMW-1 und FSMW-2 .....	24
Abbildung 6:	Scatterplot der Ergebnisse von FSMW-1 und FSMW-2 mit Regression..	25
Abbildung 7:	Scatterplot der Ergebnisse von FSMW-1 und FSMW-2 unter Einbeziehung des Tumorstadiums.....	27
Abbildung 8:	Scatterplot der Ergebnisse von FSMW-1 und FSMW-2 unter Einbeziehung des Metastasierungsgrades und Regressionsgeraden .....	27
Abbildung 9:	Scatterplot unter Einbeziehung der Tumorgröße (T) entsprechend der TNM Klassifikation.....	29
Abbildung 10:	Bland-Altman Plot, Vergleich FSMW-1 mit FSMW-2 .....	30
Abbildung 11:	Boxplot der CellSearch®-Ergebnisse.....	34
Abbildung 12:	Boxplot aus FSMW-1 und CellSearch® .....	34
Abbildung 13:	Scatterplot der Ergebnisse von FSMW-1 und CellSearch® .....	35
Abbildung 14:	Darstellung von FSMW-1 und -2 unter Einbeziehung der CellSearch®-Ergebnisse.....	36
Abbildung 15:	Vergleich FSMW-1 mit CellSearch® unter Einbeziehung des Tumorstadiums III und IV gemäß UICC.....	37

Abbildung 16:	Vergleich FSMW-1 mit CellSearch® unter Einbeziehung der Tumorgröße (T) gemäß TNM-Klassifikation.....	38
Abbildung 17:	Bland-Altman Plot, Vergleich FSMW-1 und CellSearch® unter Einbeziehung des Tumorstadiums gemäß UICC.....	40
Tabelle 1:	Klassifikation der Tumorstadien des Lungenkarzinoms .....	10
Tabelle 2:	Marker-Nachweismöglichkeiten CellCollector™ .....	16
Tabelle 3:	Kontingenztafel der kategorisierten Ergebnisse von Draht-1 und Draht-2.....	22
Tabelle 4:	Kontingenztafel der kategorisierten Ergebnisse von Draht-1 und Draht-2 unter Einbeziehung des Tumorstadiums .....	28
Tabelle 5:	Kategorisierte Ergebnisse CellSearch® .....	32
Tabelle 6:	Auflistung der Ergebnisverteilung von FSMW-1 und -2 gegenüber CellSearch®.....	33

Die Daten dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht in folgendem Fachartikel:

Gorges T, Penkalla N, Schalk T, Joosse S, Riethdorf S, Tucholski J, Lücke K, Wikman H, Jackson H, Brychta N, von Ahsen O, Schumann C, Krahn T, Pantel K: Enumeration and Molecular Characterization of Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Novel In Vivo Device for Capturing Circulating Tumor Cells. *Clinical Cancer Research* 22: 2197-2206 (2015)