



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische

Anatomie (Direktor: Prof. Dr. Wilko Weichert)

Tumorregression nach neoadjuvanter Therapie des Pankreas-
karzinoms: Charakterisierung der Stromareaktion

Anne-Christine Kapp

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Irene Esposito
2. Prof. Dr. Helmut Friess

Die Dissertation wurde am 15.03.2018 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.12.2018
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.2 Therapiemöglichkeiten des PDAC.....	2
1.3 Die desmoplastische Stromareaktion als morphologisches Merkmal des PDAC	5
1.3.1 Makroskopie.....	5
1.3.2 Mikroskopie.....	6
1.4 Allgemeine Bedeutung der Bestimmung der Tumorregression nach neoadjuvanter Therapie.....	11
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Probenmaterial.....	16
3.2 Reagenzien, Kits und Geräte	18
3.3 Färbemethoden – histologische und histochemische Färbungen	19
3.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	21
3.3.2 Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) Alcianblau	21
3.3.3 Movat Pentachromfärbung nach Verhöff	22
3.4 Immunhistochemie	23
3.5 TUNEL assay	26
3.6 Auswertung der Ergebnisse	26
3.7 Statistik	31
4 Ergebnisse.....	32

4.1	Klinisch-pathologische Daten	32
4.2	Histopathologische Charakterisierung der neoadjuvant vorbehandelten Tumoren ...	36
4.2.1	Makroskopie.....	36
4.2.2	Mikroskopie.....	37
4.2.3	Charakterisierung der Stromareaktion mittels Movat Pentachromfärbung nach Verhöff	43
4.2.4	Definiens Developer XD gestützte Auswertung der Movat Pentachromfärbung nach Verhöff.....	45
4.3	Erstellen eines Regressionsgrades	46
4.3.1	Proliferation (Ki67-Antigen) und Apoptose (TUNEL assay).....	54
4.3.2	Charakterisierung der Stromareaktion mittels -Glattmuskelaktin (-SMA)	56
4.3.3	Charakterisierung der Stromareaktion mittels Tenascin C.....	58
4.3.4	Charakterisierung der Stromareaktion mittels SPARC.....	60
4.3.5	Charakterisierung der Stromareaktion mittels NT-3.....	60
4.3.6	Charakterisierung der Stromareaktion mittels -Crystallin B.....	61
4.3.7	Vergleich prä- versus posttherapeutische Befunde	62
4.3.8	Vergleich neoadjuvant vorbehandeltes PDAC versus therapienaives PDAC.....	65
5	Diskussion.....	66
6	Zusammenfassung.....	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Abbildungsverzeichnis	83
9	Tabellenverzeichnis	87
10	Appendix.....	88
11	Danksagung.....	104

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
CAP	College of American Pathologists
CK	Cytokeratin
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. epidermal growth factor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
engl.	Englisch
et al.	lat. und andere
FAMMM	engl. familial atypical multiple mole–melanoma
FOLFIRINOX	<u>F</u> olinsäure, <u>F</u> luorouracil, <u>I</u> rinotecan, <u>O</u> xaliplatin
FU	Fluorouracil
GFAP	engl. glial fibrillary acidic protein
G1	gut differenziert (Graduierungsgrad)
G2	mäßig differenziert (Graduierungsgrad)
G3	schlecht differenziert (Graduierungsgrad)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEP	hepatische Metastasierung
HSC	engl. hepatic stellate cells
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
lat.	Latein
Ig	Immunglobulin
Ki67	Kiel 67 (Entdeckung in Kiel auf der Platte 67)
max.	maximal/e/er/es
min.	minimal/e/er/es
ml	Milliliter (1 Milliliter = 0,001 Liter)

Abkürzung	Erläuterung
µl	Mikroliter (1 Mikroliter = 0,000001 Liter)
MRT	Magnetresonanztomographie
nab	engl. nanoparticle albumin-bound
NGF	engl. nerve growth factor
NT-3	Neurotrophin-3
p	pathologisch
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCC	engl. pancreatic cancer cells
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PER	peritoneale Metastasierung
PSC	engl. pancreatic stellate cells
R0	Resektionsrand mikroskopisch frei von Karzinomzellen
R1	Karzinomzellen am Resektionsrand mikroskopisch nachweisbar
RX	Resektionrand nicht sicher klassifizierbar
ROI	engl. region of interest
SDCC	engl. severely degenerative cancer cells
SPARC	engl. secreted protein acidic and rich in cysteine
T	Primärtumor
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TRG	Tumorregressionsgraduierung
TUNEL	engl. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	engl. Weltgesundheitsorganisation
y	nach einer (Vor-)Behandlung

Sonderzeichen	Erläuterung
	alpha
-SMA	engl. alpha-smooth muscle actin
°C	Grad Celsius
%	Prozent
<	kleiner
	kleiner gleich
>	größer

1 Einleitung

1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Über 90% der Pankreaskarzinome zeigen eine duktales Differenzierung [Bosman et al., 2010]. An einem duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) erkranken in der Bundesrepublik Deutschland pro Jahr etwa 16.000 Menschen neu. Beide Geschlechter sind etwa gleich häufig betroffen. In der Statistik der Krebsneuerkrankungen rangiert das PDAC bei Frauen auf Platz 7 und bei Männern auf Platz 9. Der Häufigkeitsgipfel liegt im fortgeschrittenen Lebensalter mit einem mittleren Erkrankungsalter für Frauen bei 75 Jahren und für Männer bei 71 Jahren. Die Diagnose ist fatal. Innerhalb eines Jahres versterben etwa 15.000 Menschen an einem PDAC. Inzidenz- und Mortalitätskurve verlaufen annähernd parallel. Ein Langzeitüberleben ist die Ausnahme. In Deutschland stellt das PDAC die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und Männern dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt lediglich bei 8% und ist die niedrigste unter allen Krebserkrankungen in der Bundesrepublik [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. et al., 2013].

Die Ätiologie des PDAC ist weitgehend unbekannt. Genetische Disposition und hereditäre Syndrome (zum Beispiel Hereditäre Pankreatitis, Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom [Herold, 2013a], Peutz-Jeghers-Syndrom [Giardiello et al., 2000] und familial atypical multiple mole–melanoma (FAMMM-Syndrom) [Vasen et al., 2000]) erhöhen das Risiko, im Laufe des Lebens an einem PDAC zu erkranken. Als gesicherte Risikofaktoren gelten Zigarettenrauchen, Adipositas [Nilsen et al., 2000] und eine lang vorbestehende chronische Pankreatitis [Hidalgo, 2010, Ryan et al., 2014].

Die initiale Symptomarmut bzw. eine spät eintretende unspezifische klinische Präsentation (Appetit- und Gewichtsverlust, Oberbauch- und Rückenschmerz, Übelkeit und schmerzloser Ikterus) erweisen sich als großes diagnostisches Problem bei der Früherkennung des PDAC [Herold, 2013a, Hidalgo, 2010]. Pathologisch kennzeichnend für das PDAC sind eine außerordentlich frühe lymphogene Metastasierung in regionäre Lymphknoten, eine perineurale

Ausbreitung in das retroperitoneale peripankreatische Fettgewebe sowie eine hämatogene Metastasierung über das Pfortaderstromgebiet mit der primären Organpräferenz Leber [G. Klöppel, 2008]. Bei der Mehrzahl der Patienten (80%) liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein inoperables Stadium vor. Eine hohe Resistenz des PDAC gegenüber Chemo- und Strahlentherapie kommt für die Behandlung erschwerend hinzu [Hidalgo, 2010].

1.2 Therapiemöglichkeiten des PDAC

Die adjuvante Therapie des PDAC

Die chirurgische Therapie ist derzeit das einzige potenziell kurative Therapieverfahren beim Vorliegen eines PDAC [Doi et al., 2008, Lim et al., 2003]. Allerdings sind lediglich ca. 20% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung resektabel [Alexakis et al., 2004, Geer et al., 1993]. Trotz Tumorresektion liegt das mediane Überleben dieser Patienten bei nur 20-22 Monaten [Hidalgo, 2010].

Bei Pankreaskopftumoren kann die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso oder die partielle Duodenopankreatektomie nach Whipple und Kausch durchgeführt werden. Beide Operationstechniken gelten derzeit als gleichwertig [Diener et al., 2008]. Bei Karzinomen des Pankreaskorpus und -schwanzes wird eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie oder eine totale Duodenopankreatektomie mit Splenektomie durchgeführt [Christein et al., 2005]. Operationsziel ist stets die Resektion im Gesunden (Resektionsränder mikroskopisch frei von Karzinomzellen = R0) [Hartwig et al., 2011, Verbeke, 2008, Wagner et al., 2004], die allerdings durch die anatomische Lage des Organs und die aggressive Biologie des Tumors in lediglich 20-25% der Fälle gelingt [Esposito et al., 2008]. Ist eine Resektion möglich, besteht die größte Chance für ein progressionsfreies Überleben [Hartwig et al., 2011, Wagner et al., 2004]. Das Langzeitüberleben beim PDAC wird durch Lokalrezidive und Fernmetastasen limitiert [Wagner et al., 2004]. Nach aktuellem Stand der Medizin soll nach R0-Resektion eines PDAC im Union for International Cancer Control (UICC)-Stadium I-III (d.h. jedes Tumorstadium, jedes Lymphknotenstadium aber keine Fernmetastasen) eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt

werden, da diese eine signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens im Vergleich zur alleinigen Chirurgie erzielt (5-Jahres-Überlebensrate: 20,7% versus 10,4%, 10-Jahres-Überlebensrate 12,2% versus 7,7%) [Oettle et al., 2013]. Als adjuvante Chemotherapie wird der Einsatz von Gemcitabin oder 5-Fluorouracil (FU) 4-8 Wochen nach der Operation empfohlen. Beide Therapieregime werden als gleichwertig angesehen und sollten für 6 Monate verabreicht werden [Neoptolemos et al., 2004, Oettle et al., 2007]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Patienten, die nach R1-Resektion mit Gemcitabin therapiert wurden, ein signifikant besseres krankheitsfreies Überleben (15,8 versus 5,5 Monate) und ein besseres Gesamtüberleben (22,1 versus 14,1 Monate) als die Kontrollgruppe zeigten [Oettle et al., 2007]. Für eine kombinierte adjuvante Radiochemotherapie gibt es derzeit außerhalb von randomisierten kontrollierten Studien keine Empfehlungen [Kaiser et al., 1985, Neoptolemos et al., 2004]. Optimierte Radiochemotherapien und zielgerichtete Tumortherapien sind Gegenstand aktueller Forschung [Ahn et al., 2016].

Ca. 80% der PDAC-Patienten präsentieren sich bei Diagnosestellung in einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium. Zu diesem Zeitpunkt ist keine kurative Resektionsmöglichkeit gegeben [Huguet et al., 2010]. Die palliative bzw. neoadjuvante Pharmakotherapie gewinnt in solchen Situationen zunehmend an Bedeutung [Seufferlein et al., 2014].

Die palliative Therapie des PDAC

Aktuell wird Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen bzw. metastasierten PDAC bei gutem Allgemeinzustand zu einer palliativen Chemotherapie geraten, da diese das Überleben verlängert und die Lebensqualität der Patienten verbessert [Sultana et al., 2007]. Mit der palliativen Chemotherapie sollte unverzüglich nach Diagnosestellung begonnen werden. Lange Zeit galt Gemcitabin als Standardchemotherapeutikum der Wahl in der Palliativtherapie des PDAC [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013b)]. Die 1-Jahres Überlebensrate unter Gemcitabintherapie liegt bei 18-20% [Sultana et al., 2007]. Gemcitabin kann alternativ mit Erlotinib, einem Epidermal growth factor (EGF)-Rezeptor (Tyrosinkinaseinhibitor), kombiniert

werden [Moore et al., 2007], da dieser epidermale Wachstumsfaktorrezeptor bei bis zu 50% der PDAC-Patienten hoch exprimiert ist [Valsecchi et al., 2012, Walsh et al., 2013]. Diese Kombinationstherapie zeigt eine statistisch signifikante, mit 13,7 Tagen, klinisch jedoch kaum relevante Verlängerung des Überlebens [Moore et al., 2007]. Publierte Phase-III-Daten haben in jüngerer Vergangenheit zur Zulassung der Kombination nanoparticle albumin-bound (nab)-Paclitaxel/Gemcitabin in der Erstlinientherapie geführt. Die Ergebnisse zeigen signifikante Verbesserungen bezüglich des medianen progressionsfreien Überlebens, des Gesamtüberlebens und des Tumoransprechens, verglichen mit veröffentlichten Daten zur Gemcitabin-Monotherapie [Von Hoff et al., 2013]. Bei ausgewählten Patienten erzielt auch das Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin (FOLFIRINOX)-Protokoll deutlich bessere Resultate als das Gemcitabin-Monoregime. Ein signifikanter Überlebensvorteil im medianen Überleben (11,1 versus 6,8 Monate) konnte in Studien beobachtet werden [Conroy et al., 2011].

Die neoadjuvante Therapie des PDAC

Der Begriff neoadjuvant (griechisch neo = neu; latein adjuvare = helfen, unterstützen) bezeichnet in der Medizin eine Therapie (Strahlentherapie, Strahlenchemotherapie, Chemotherapie oder Hormontherapie), welche dem Patienten präoperativ verabreicht wird. Sie soll zu einem Downsizing (Größenreduktion) oder Downstaging (Erniedrigung des Klassifikationsstadiums) des Tumors führen und idealerweise Operabilität und Heilungschance verbessern [Herold, 2013b].

Neoadjuvante Therapieverfahren finden in der Situation des lokal fortgeschrittenen und primär nicht resektablen PDAC zunehmend Anwendung. Im Verlauf einer neoadjuvanten Therapie kann in einigen Fällen eine chirurgische Resektabilität bei diesen Patienten erreicht werden [Heinemann et al., 2013, Katz et al., 2008]. Eine R0-Resektion ist ein prognostischer Schlüsselfaktor für PDAC-Patienten. In der Mehrzahl der Fälle werden PDAC-Patienten jedoch R1 (Karzinomzellen am Resektionsrand nachweisbar) reseziert [Esposito et al., 2008]. Nach neoadjuvanter Therapie steigt die Wahrscheinlichkeit für eine R0-Resektion [Katz et al., 2008]. Eine neoadjuvante Therapie sollte nach aktuellem Kenntnisstand bei Patienten mit als resektabel eingeschätztem PDAC

außerhalb von Studien nicht erfolgen. Es konnte kein Vorteil einer neoadjuvanten Therapie hinsichtlich Gesamtüberlebens und rezidivfreien Überlebens gegenüber der alleinigen Operation nachgewiesen werden [Assifi et al., 2011b].

1.3 Die desmoplastische Stromareaktion als morphologisches Merkmal des PDAC

1.3.1 Makroskopie

Etwa 60-70% der Pankreaskarzinome sind im Pankreaskopf lokalisiert, seltener finden sich Karzinome im Korpus (5-15%) oder im Schwanz des Pankreas (10-15%). Karzinome im Pankreaskorpus und Pankreasschwanz sind bei Diagnosestellung in der Regel größer als Pankreaskopftumore. Makroskopisch imponiert das PDAC als derbe und unscharf begrenzte Raumforderung. Die Schnittfläche des Tumors präsentiert sich von weißgrauer bis gelblicher Farbe (Abbildung 1). Charakteristisch für das Karzinom ist sein verdrängendes und infiltratives Wachstum in das lobuläre Drüsengewebe. Infiltrationen von Duodenum, Gallengang/Papille und peri- bzw. retropankreatischem Fettgewebe sind gehäuft zu beobachten. Obstruktionen des Gallen- und/oder des Pankreasgangs können bei Pankreaskopfkarzinomen beobachtet werden. Insbesondere ersteres Phänomen imponiert klinisch als schmerzloser Verschlussikterus [G. Klöppel, 2008].

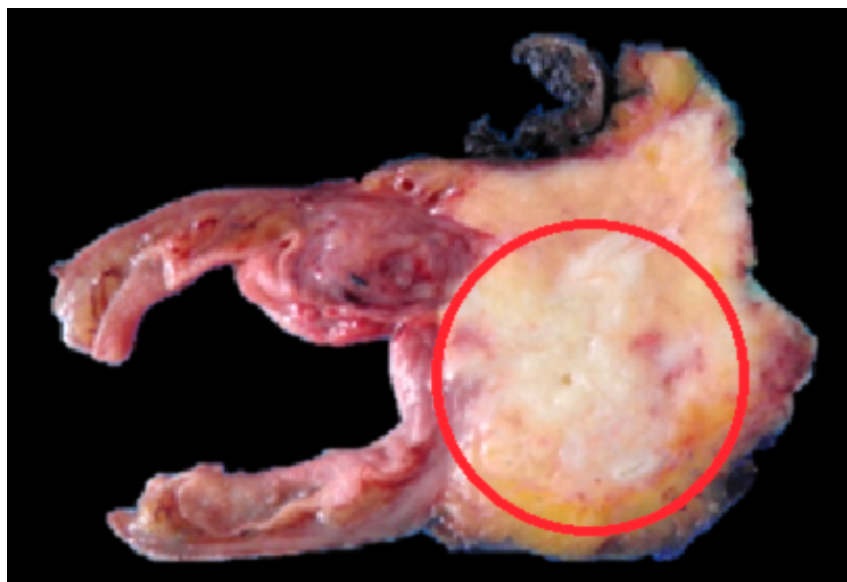


Abbildung 1 Primär reseziertes PDAC mit Lokalisation im Pankreaskopf. Der Tumor ist kreismarkiert und makroskopisch nicht gut abgrenzbar. Die Schnittfläche imponiert von weißgrauer bis

gelblicher Farbe. Links ist eine sichtbare Tumordinfiltration in das c-förmige Duodenum erkennbar. Die Absetzungsränder sind tuschemarkiert.

1.3.2 Mikroskopie

Das histologische Bild des PDAC wird geprägt von tubulären Strukturen mit atypischem mehrschichtigem und polymorphzelligem Epithel, welche an Pankreasgänge erinnern. Die Tumorformationen sind dabei in ein prominentes desmoplastisches Bindegewebe eingebettet (Abbildung 2).

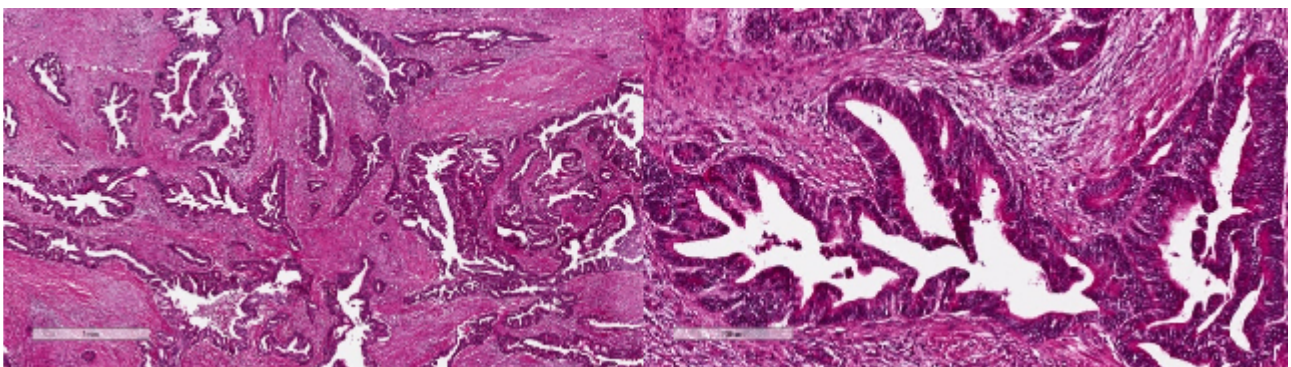


Abbildung 2 Mäßig differenziertes, primär reseziertes PDAC des Pankreaskopfes. Es zeigen sich gangartige Drüsenverbände mit atypischem, mehrschichtigem, polymorphzelligem Epithel, die von desmoplastischem Bindegewebe umgeben sind. Ein Ausschnitt der linken Abbildung ist rechts in Vergrößerung dargestellt. HE-Färbung

Desmoplastisches Bindegewebe stellt eine wichtige morphologische Eigenschaft des PDAC dar. Mikroskopisch lassen sich atypische Zellen mit Kernpleomorphien, gesteigerter Mitoseaktivität und Muzinproduktion erkennen. Anhand dieser Kriterien wird der Grad der Differenzierung ermittelt. Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation unterscheidet man mikroskopisch zwischen gut (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3) differenzierten Pankreaskarzinomen. Zumeist weisen die Karzinome eine gute bis mäßige Differenzierung auf. Das PDAC wächst auf direktem Weg in das peripankreatische Fettgewebe ein. Es zeigt dabei regelhaft eine perineurale Invasion (Abbildung 3). Blut- und Lymphgefäßinvasionen sind zudem nachweisbar [Esposito et al., 2015].

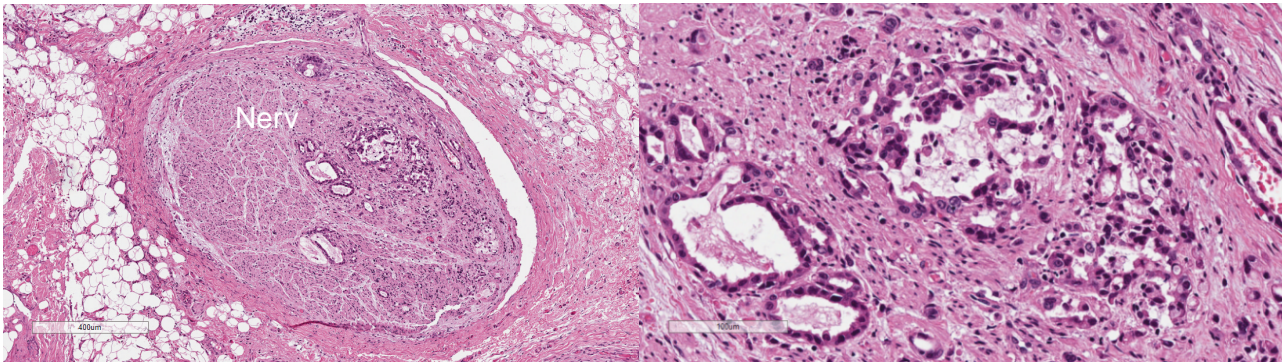


Abbildung 3 Bild einer Perineuralscheideninfiltration – Dargestellt ist ein von Tumorzellen infiltrierter Nerv des peripankreatischen Fettgewebes. Ein Ausschnitt der linken Abbildung ist rechts in Vergrößerung dargestellt. HE-Färbung

Ein zentrales morphologisches Charakteristikum des PDAC ist seine stark ausgeprägte Desmoplasie [Pandol et al., 2009]. Als Desmoplasie bezeichnet die Pathologie Karzinom-assoziiertes Gewebe mit deutlich erhöhtem Anteil an kollagenem Bindegewebe (Fibrose) [Apte et al., 2012]. Jahrelang lag der Fokus zahlreicher Studien jedoch auf der Erforschung der in der Desmoplasie vorkommenden Karzinomzellen [Apte et al., 2013]. Dies änderte sich im Jahr 1998, als es Apte und Kollegen [Apte et al., 1998] sowie Bachem und Kollegen [Bachem et al., 1998] unabhängig voneinander gelang, pankreatische Stellatumzellen (pancreatic stellate cells, PSC) zu isolieren und zu kultivieren. PSC wird nach aktuellem Stand der Wissenschaft eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der Desmoplasie zugesprochen [Erkan et al., 2012a].

Die Entdeckung der Stellatumzellen ging auf den Pathologen Karl von Kupffer zurück, der im Jahr 1876 erstmals „Sternzellen“ im Disse-Raum der Leber beschrieb - sogenannte Hepatic stellate cells (HSC) [Erkan et al., 2012a, Friedman, 2008]. 1982 konnten PSC dann erstmals mit Hilfe eines Elektronenmikroskops in Pankreasgewebe von Nagetieren, später im menschlichen Pankreasgewebe nachgewiesen werden. In physiologischem Pankreasgewebe befinden sich PSC in ihrem Ruhestadium periacinär, interlobular sowie um Blutgefäße lokalisiert [Watari et al., 1982] und kommen in weiteren Organen wie Lunge, Leber, Niere, Milz, Darm und Stimmbändern vor [Wake, 1980]. Die Frage nach ihrem Ursprungsort ist bis heute nicht abschließend geklärt [Erkan et al., 2012a]. PSC tragen mit einem Anteil von 4-7% zur physiologischen Gesamtmasse der

Bauchspeicheldrüse bei. Ihr prozentualer Anteil an der Organmasse kann bei Vorliegen eines PDAC bis auf 90% ansteigen [Kleger et al., 2014, Rhim et al., 2014]. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der PSC imponiert ein zentraler Nucleolus, umgeben von reichlich rauem endoplasmatischem Retikulum, Kollagenfibrillen und Vakuolen. Bei diesen Vakuolen handelt es sich um Vitamin A-haltige Fetttröpfchen, die in großer Menge in PSC zu finden sind [Apte et al., 1998, Bachem et al., 1998]. In gesundem Pankreasgewebe sind PSC an der Aufrechterhaltung der Gewebearchitektur durch Synthese und Abbau von extrazellulärer Matrix, Wachstumsfaktoren und Zytokinen beteiligt. PSC exprimieren in ihrem inaktiven Zustand Vimentin, Desmin, Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Nestin und Synemin und können hierdurch von Fibroblasten differenziert werden [Erkan et al., 2012a]. Kommt es zu Verletzungen des Pankreasgewebes, transformieren ruhende PSC in einen aktiven Zustand und nehmen einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp an. Sie verlieren ihre Vitamin A-haltigen Lipidtröpfchen und beginnen mit der Synthese von alpha-Glattmuskelaktin (alpha-smooth muscle actin = α -SMA). Die Expression von α -SMA kennzeichnet somit den Übertritt zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp und ist ein Biomarker für aktivierte PSC [Krizhanovsky et al., 2008].

In Folge dieser Aktivierung kommt es zu einer massiven Produktion und Sekretion von extrazellulärer Matrix, Proteinen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren [Masamune et al., 2009]. Der hieraus resultierende Verlust des homöostatischen Gleichgewichts bedingt die charakteristische Desmoplasie des PDAC, die sich durch eine vermehrte Proliferation und Aktivierung von Stroma (PSC, Fibroblasten, Myofibroblasten), Entzündungszellen und einer massiven Synthese an Komponenten der extrazellulärer Matrix auszeichnet und unterhält. Das neu gebildete Bindegewebe weist hierdurch eine hohe Heterogenität zellulärer und azellulärer Komponenten auf (Tabelle 1) [Erkan et al., 2012a, Erkan et al., 2012b, Erkan et al., 2012c].

zelluläre Komponenten	azelluläre Komponenten
Fibroblasten	Extrazelluläre Matrix z.B.
Pancreatic stellate cells (PSC)	Kollagen I, III, IV
Immunzellen	Fibrinogen
Endothelzellen	Hyaluron
Nervenzellen	Fibrin
	Fibronectin
	Laminin
	und eine Vielzahl weiterer Proteine, Enzyme und Wachstumsfaktoren

Tabelle 1 Tabellarische Übersicht zellulärer und azellulärer Komponenten der desmoplastischen Stromareaktion

Das Stromareichtum und die hieraus resultierende Hypovaskularisation sind definierende Merkmale des PDAC. Sie sind hauptursächlich für die ausgeprägte Hypoxie im Zentrum des Tumors [Erkan et al., 2012a]. Hypoxie-induzierte Mechanismen, wie Veränderungen des Tumorzellmetabolismus (vermehrte Energiegewinnung über die anaerobe Glykolyse), Veränderungen des Tumorzellphänotyps durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und die Entwicklung von einem lokal wachsenden zu einem metastasierenden Tumor werden hierdurch induziert [Erkan et al., 2009, Lu et al., 2010]. Diese extremen Bedingungen führen im Verlauf zu einer Selektion aggressiver Subklone und fördern die Invasivität des Tumors [Erkan et al., 2009, Kleger et al., 2014]. Stromareichtum und Hypovaskularisation bewirken einen eingeschränkten Transport zytotoxischer Substanzen an die Tumorzellen. Die Ausbildung von abnormalen und partiell funktionslosen Tumorgefäßen erschwert zusätzlich den Zugang der Chemotherapeutika zum Wirkort Tumor, insgesamt alles Gründe für die geringe Effektivität einer Zytostatikatherapie beim PDAC [Assifi et al., 2011a, Provenzano et al., 2012].

Trotz intensiver Forschungsbemühungen der vergangenen Jahre haben sich für das PDAC bisher nur wenige Moleküle als nützliche prognostische oder prädiktive Biomarker erwiesen. Anhand der aktuell existierenden Datenlagen wurden folgende 5 desmoplastische Stromamarker ausgewählt, um die Stromareaktion in dieser Arbeit näher zu charakterisieren:

-SMA ist der bestbekannteste Marker zur Charakterisierung von aktivierten PSC (Abbildung 4). Lässt sich in gesundem Pankreasgewebe lediglich eine geringe Menge an -SMA nachweisen,

imponiert in pathologisch desmoplasie-reichen Arealen ein prominentes Färbemuster [Apte et al., 2004].

Tenascin C ist ein Protein der extrazellulären Matrix, welches in soliden Tumoren häufig überexprimiert wird. Die Expression von Tenascin C ist im PDAC signifikant höher als in normalem Pankreasgewebe und kann dort in PSC und im Stroma nachgewiesen werden [Esposito et al., 2006].

Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), auch Osteonectin-1 genannt, ist in desmoplastischem Stroma beim PDAC häufig überexprimiert. Das Glykoprotein wird von PSC exprimiert (Abbildung 4). Eine hohe SPARC-Expression im PDAC korreliert mit einer hohen Tumoraggressivität und einem schlechteren Überleben [Mantoni et al., 2008].

Neurotrophin-3 (NT-3), zur Nerve Growth Factor (NGF)-Familie gehörend, stimuliert und kontrolliert die Neurogenese von Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems. Eine Überexpression von NT-3 ist im PDAC zu beobachten [Ohta et al., 1997].

-Crystallin B gehört zur Familie der Hitzeschockproteine und wird hauptsächlich in Augenlinse sowie Muskelgewebe exprimiert [Tallot et al., 2003]. In Adenokarzinomen, wie dem duktalem Mammakarzinom, gilt -Crystallin B als prognostisch schlechter Marker [Kim et al., 2011].

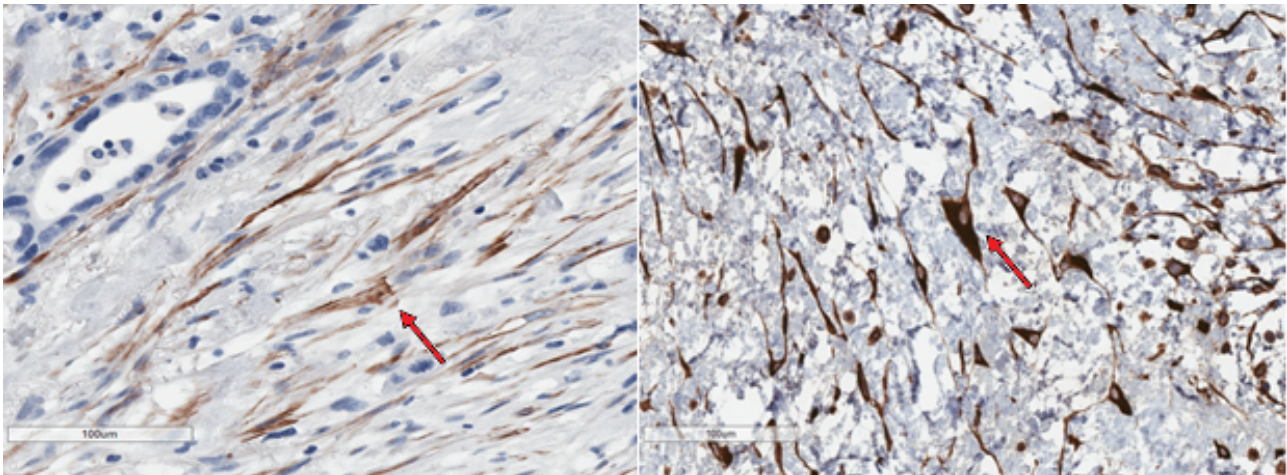


Abbildung 4 Exemplarisch pfeilmarkierte PSC im desmoplastischen Bindegewebe eines neoadjuvant vorbehandelten PDAC. Links: Darstellung der PSC in der α -SMA Färbung, rechts: Darstellung der PSC in der SPARC-Färbung.

1.4 Allgemeine Bedeutung der Bestimmung der Tumorregression nach neoadjuvanter Therapie

Die Anwendung einer neoadjuvanten Therapie führt im Regelfall zu morphologischen Veränderungen des Karzinomgewebes, idealerweise sogar zu dessen totaler Rückbildung (keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar) [Wittekind et al., 2012]. Die postoperative Beurteilung durch den Pathologen soll das Ausmaß der Tumorregression und mögliche vorhandene Therapieeffekte exakt erfassen [Hartman et al., 2012]. Die histopathologische Beurteilung erfolgt in der Regel mit Hilfe einer Tumorregressionsgraduierung (TRG), welche zwischen fehlender Regression, partieller Regression (mehrere Zwischenzustände sind hier möglich) und kompletter Regression differenziert [Verbeke et al., 2015, Wittekind et al., 2012]. Als Zeichen eines Therapieeffekts können für Adenokarzinome im Allgemeinen, wie für das PDAC im Speziellen, histomorphologische Merkmale wie Schleimseen [Becker et al., 2003, Evans et al., 1992, Shia et al., 2011], zytoplasmatische Vakuolen [Becker et al., 2003, Sethi et al., 2012, Srigley et al., 2012], Nekrosen und Fibrosebezirke [Becker et al., 2003, Sethi et al., 2012, White et al., 2005] beobachtet werden. In der Literatur werden einige dieser Merkmale bezüglich ihrer (Prä)existenz und prognostischen Aussagekraft im PDAC jedoch kontrovers diskutiert [Hartman et al., 2012]. Der in der Vergangenheit erbrachte Nachweis einer histopathologischen Tumorregression nach

neoadjuvanter Therapie korrelierte in Studien für Tumorentitäten wie beispielsweise dem Magen- [Ajani et al., 2005], Rektum- [Garcia-Aguilar et al., 2003] und Ösophaguskarzinom [Meredith et al., 2010] mit einem besseren Überleben. Für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC konnten White und Kollegen anhand 54 Patienten zeigen, dass Patienten mit hoher Tumorlast im postoperativen Pankreaspräparat nach neoadjuvanter Chemotherapie ein kürzeres Überleben zeigten als Patienten mit einer mittleren bis fehlenden Tumorlast nach neoadjuvanter Therapie [White et al., 2005].

Problematik der Bestimmung einer TRG mit Blick auf bereits vorhandene Methoden

Das PDAC mit seiner kennzeichnenden desmoplastischen Stromareaktion wirft Hürden für eine exakte Regressionsbestimmung seines Tumoralagers auf. Im Einzelfall kann es schwierig bis unmöglich sein, spontane von therapieinduzierten Stromaveränderungen mittels konventioneller Mikroskopie zu unterscheiden bzw. räumlich voneinander abzugrenzen [Hartman et al., 2012].

Aktuell existieren mehrere TRG zur histopathologischen Beurteilung der Tumorregression für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC, vorgeschlagen von Ishikawa und Kollegen, Evans und Kollegen, The College of American Pathologists (CAP), Chatterjee und Kollegen sowie White und Kollegen (Tabelle 2).

Ende der 1980er entwickelten Ishikawa und Kollegen ein dreistufiges Klassifikationssystem, welches den Effekt einer Strahlentherapie auf 12 PDAC-Präparate bewerten sollte. Die Autoren untersuchten die Menge ($<1/3$, $1/3-2/3$ und $>2/3$) der massiv degenerativ veränderten Tumorzellen (severely degenerative cancer cells (SDCC)) in Relation zur gesamten Tumorzellpopulation [Ishikawa et al., 1989].

Evans und Kollegen schätzten in einem vierstufigen Graduierungssystem den prozentualen Anteil vitaler Tumorzellen in der zurückgebliebenen Tumoraläsion ein. Grad I: $<10\%$ oder keine Tumorzelldestruktion, Grad IIa: $10-50\%$ Tumorzelldestruktion, Grad IIb: $51-90\%$ Tumorzelldestruktion, Grad III: wenige vitale Tumorzellen $<10\%$ und Grad IV: keine vitalen

Tumorzellen im Präparat mehr nachweisbar. Zusätzlich wurden (azelluläre) Schleimseen als regressives Merkmal bewertet [Evans et al., 1992].

CAP entwickelte ebenfalls ein vierstufiges Modell. Grad 0: komplettes Ansprechen (keine vitalen Tumorzellen), Grad 1: deutliches Ansprechen (einzelne Tumorzellen oder kleine Gruppen von Tumorzellen), Grad 2: mäßiges Ansprechen (Residualtumor mit überwiegender Fibrosierung) und Grad 3: mangelndes bis fehlendes Ansprechen nach neoadjuvanter Therapie (minimale bis fehlende Tumorregression, ausgeprägter Residualtumor) [Washington et al., 2013].

Chatterjee und Kollegen schlugen vor, die existierende TRG von CAP aufgrund einer fehlenden Konsequenz bezüglich der Überlebensprognose für Grad 2 und Grad 3 in ein dreistufiges Modell abzuändern. Grad 0: kein Residualtumor, Grad 1: minimaler Residualtumor (<5%) und Grad 2: 5% Residualtumor oder mehr nachweisbar [Chatterjee et al., 2012].

White und Kollegen legten ein dreistufiges Klassifikationssystem vor. Die Größeneinteilung des Residualtumors (groß, moderat oder klein) erfolgte anhand des Prozentsatzes vitaler Karzinomzellen (>90%, 10%-90% und 0-<10%) im Präparat [White et al., 2005].

Klassifikation	Grad	Beschreibung
Ishikawa und Kollegen	1	<1/3% SDCC
	2	1/3-2/3 SDCC
	3	>2/3% SDCC
Evans und Kollegen	I	<10% oder keine Tumorzelldestruktion
	II	10-90% Tumorzelldestruktion IIa 10-50% Tumorzelldestruktion IIb 51-90% Tumorzelldestruktion
	III	wenige vitale Tumorzellen <10% IIIM messbare Schleimseen
	IV	keine vitalen Tumorzellen IVM azelluläre Schleimseen
The College of American Pathologists (CAP)	0	komplettes Ansprechen (keine vitalen Tumorzellen)
	1	deutliches Ansprechen (einzelne Zellen oder kleine Gruppen von Tumorzellen)
	2	mäßiges Ansprechen (Residualtumor mit überwiegender Fibrosierung)
	3	mangelndes bis fehlendes Ansprechen (minimale bis fehlende Tumorregression, ausgeprägter Residualtumor)

Chatterjee und Kollegen	0	kein Residualtumor mehr nachweisbar
	1	minimaler Residualtumor (<5%) nachweisbar (einzelne Zellen oder kleine Gruppen von Tumorzellen)
	2	>5% Residualtumor oder mehr nachweisbar
White und Kollegen	Residuale Tumorgroße	
	groß	>90% vitale Tumorzellen
	moderat	10-90% vitale Tumorzellen
	klein	0-<10% vitale Tumorzellen

Tabelle 2 Tabellarischer Überblick der derzeit existierenden TRG für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC

Die Vielzahl koexistierender TRG für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC verdeutlicht die Schwierigkeit ein Klassifikationssystem zu etablieren. Eine internationale Vereinbarung für den Forschungs- und Klinikalltag fehlt bis heute [Chatterjee et al., 2012]. Die prognostische Signifikanz und Reproduzierbarkeit der derzeit verfügbaren TRG ist weitgehend unbekannt [Verbeke et al., 2015]. Neoadjuvante Therapiestrategien beim PDAC sind somit aktuell nur schwer zu überprüfen und zu optimieren [Hartman et al., 2012].

2 Zielsetzung

Die Biologie des PDAC wirft der Wissenschaft trotz eines kontinuierlichen Erkenntnisgewinns innerhalb der letzten Jahre noch zahlreiche Fragen auf. Der Aufbau des Stromas und die darin stattfindenden Interaktionen sind sehr komplex und erst in ihren Ansätzen verstanden [Erkan et al., 2012a].

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels histochemisch- und immunhistochemischer Färbungen, die Stromareaktion von neoadjuvant therapierten PDAC näher zu untersuchen und zu charakterisieren. Die vorliegende Arbeit behandelt folgende Fragen:

1. Wie sehen qualitative und quantitative histomorphologische Veränderungen im neoadjuvant vorbehandelten PDAC aus - insbesondere mit Blick auf die Komposition des Stromas?
2. Ergeben sich hieraus charakteristische Merkmale, die auf eine Veränderung von Tumorbiologie und Therapieansprechen schließen lassen? Können Biomarker für Karzinom assoziierte Fibroblasten (-Crystallin B, -SMA, NT-3, SPARC, Tenascin C) oder Marker zur Charakterisierung der proliferationsaktiven (Kiel (Ki)67) bzw. apoptotischen Tumorzellen (TUNEL assay) diese Veränderungen abbilden?
3. Wie kann eine TRG unter Berücksichtigung der Stromareaktion für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC aussehen?

3 Material und Methoden

Ein positives Ethikvotum der Technischen Universität München mit der Studiennummer 1967/2007 wurde für die verwendeten Gewebeproben und Daten erteilt.

3.1 Probenmaterial

Für die vorliegende Arbeit konnte neoadjuvant vorbehandeltes PDAC-Gewebe von 27 Patienten gesammelt werden. Diese Patienten hatten sich alle in der Abteilung für Viszeralchirurgie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München zwischen September 2008 bis Januar 2014 einer Resektion ihres zuvor diagnostizierten und therapierten PDAC unterzogen.

Die Operationspräparate wurden über Nacht in 4%igem Formalin fixiert, nach einem standardisierten Protokoll [Esposito et al., 2008] zugeschnitten und (nahezu) komplett in Paraffin eingebettet. Die Tumorklassifikation erfolgte nach dem UICC 2009 Schema [International Union Against Cancer (UICC), 2009]. Anhand der histopathologischen Befunde und nach sorgfältiger Sichtung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Schnitte, wurden 1 bis 3 repräsentative Gewebelöcke pro Fall ausgewählt und weiter untersucht. Idealerweise repräsentierte ein Gewebelöck einen zentralen (Tumorzentrum), ein zweiter Gewebelöck einen peripheren und ein dritter Gewebelöck einen intermediären (zwischen zentralem und peripherem Areal lokalisierten) Anteil des Tumors. Es sollte hierdurch ein möglichst exakter Eindruck über Wachstum, Größe und Ausdehnung des Tumors und der Stromareaktion erzielt werden (Abbildung 5). Für 5 Fälle standen 2 und für 4 Fälle stand ein repräsentativer Gewebelöck zur Verfügung.

Von den ausgewählten Gewebelöcken wurden für weitere Untersuchungen mittels Rotationsmikrotoms (Thermo Fisher Scientific) 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und gefärbt.

Von 5 Patienten (Fall 6, 8, 9, 16, 20) konnte zusätzlich prätherapeutisches Biopsiematerial untersucht werden. Weiter konnten 10 primär resezierte (therapienaive) PDAC-Fälle (5 Pankreaskopfkarzinome und 5 Pankreasschwanzkarzinome) auf ihre Stromazusammensetzung

sowie auf mögliche Unterschiede im Vergleich zum neoadjuvant therapierten PDAC untersucht werden. Die 10 primär resezierten PDAC-Fälle stammten aus der Pathologie der Universität Heidelberg. Der Verwendung der Gewebeproben wurde durch das Ethikkomitee der Universität Heidelberg mit der Studiennummer 301/2001 stattgegeben.

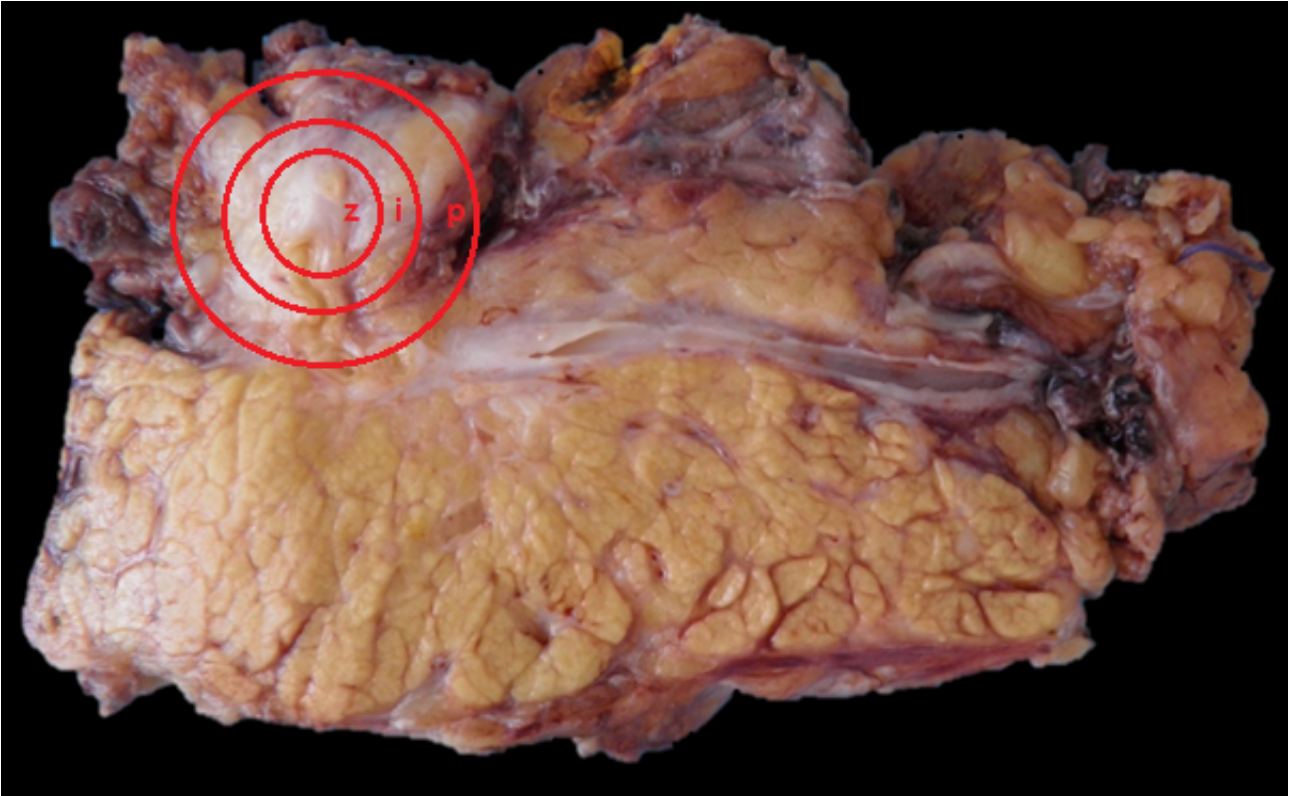


Abbildung 5 Neoadjuvant vorbehandeltes Pankreaslinksresektat mit schematischer Darstellung der eingeteilten Zonen (z = zentral, i = intermediär und p = peripher)

3.2 Reagenzien, Kits und Geräte

Die verwendeten Reagenzien (Tabelle 3), Kits sowie Geräte und Software (Tabelle 4) sind nachfolgend alphabetisch aufgelistet:

Reagenzien	Firma
Alcianblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Alexa Fluor488 goat anti mouse IgG	Life Technologies GmbH, Darmstadt (D)
Antibody diluent Dako REAL™	Dako Deutschland GmbH, Hamburg (D)
Citrat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Dako EnVision™ Detektionssystem (Kaninchen)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg (D)
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Essigsäure 100%ig	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ethanol 70%ig	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ethanol 96%ig	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Formalin 4%ig	Staub & Co. GmbH, München (D)
Hämalaun nach Mayer	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Isopropanol 100%ig	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Na-Perjodat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Normalserum (Ziege) 3%ig	abcam, 330 Cambrigde Science Park (GB)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	GE Healthcare, München (D)
Pronase	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Proteinkinase K	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Schiffsches Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Streptavidin-Peroxidase	medac GmbH, Hamburg (D)
Ventana Bluing Reagent	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana Cell Conditioner 1 (CC1)	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana EZ Prep™ 10X	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana Liquid Coverslip (LCS)	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana Protease 1	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana Reaction Buffer 10X	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana ultraView™ Copper	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana ultraView™ DAB Chromogen	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana ultraView™ DAB H ₂ O ₂	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana ultraView™ HRP Universal Multimer	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Ventana ultraView™ Inhibitor	Ventana Medical Systems, Inc., Basel, (CH)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%ig	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

Tabelle 3 Liste der verwendeten Reagenzien

Verwendete Kits

ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101, Millipore S.A.S., Molsheim (F):

Inhalt: Equilibration Buffer, Reaction Buffer, TdT Enzyme, Stop/Wash Buffer, Anti-Digoxigenin-Peroxidase, Plastic Coverslips, Control Slides, DAB Substrate, DAB Dilution Buffer

Bright-DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Substrat Kit, medac GmbH, Hamburg (D):

Inhalt: DAB Dilution Buffer und DAB Substrate

MOVAT'S Pentachrom nach VERHÖFF Färbekit, MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main (D):

Inhalt: Alcianblau 1%ig, Verhöff Gebrauchslösung A, B, C, Eisen(III)Chlorid 1%ig, Brilliant-Crocein-Säurefuchsin, Phosphorwolframsäure 2%ig, Safron du Gatinais

Geräte und Software

Produkt	Firma
Aperio ImageScope-Viewing-Software	Leica Biosystems, Wetzlar (D)
Aperio Scanscope CS	Leica Biosystems, Wetzlar (D)
Dako AutoStainer Färbesystem	Dako Deutschland GmbH, Hamburg (D)
Definiens Tissue Studio digital pathology image analysis	Definiens AG, München (D)
Eindeckautomat RCM 2000	MEDITE GmbH, Burgdorf (D)
Hareus Hera Safe CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
IBM SPSS inc., Version 21	IBM Deutschland GmbH, Ehningen (D)
Microm HM 335 E	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Schnellkochtopf	WMF, Geislingen/Steige (D)
Tissue Stainer TST 40	MEDITE GmbH, Burgdorf (D)
Ventana Bench Mark XT	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (D)

Tabelle 4 Liste der verwendeten Geräte und Software

3.3 Färbemethoden – histologische und histochemische Färbungen

Die in dieser Arbeit erfolgten Färbungen sind nachfolgend beschrieben. Abbildung 6 gibt einen tabellarischen Überblick der durchgeführten Färbungen der zentralen, intermediären und peripheren Zone. Zum Ausschluss vitaler Tumorzellen wurde nachträglich für 3 einzelne Schnitte die Färbung anti-Cytokeratin(CK)pan-MNF116 durchgeführt.

	zentral	intermediär	peripher
HE			
PAS-Alcian			
Movat			
-SMA			
-Crystallin B			
Ki67			
NT-3			
SPARC			
Tenascin C			
TUNEL assay			

Abbildung 6 Exemplarische Übersicht der erfolgten Färbungen in der zentralen, intermediären und peripheren Zone

3.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist die am häufigsten verwendete Färbemethode für die morphologische Untersuchung feingeweblichen Materials. Sie setzt sich aus zwei Einzelfärbungen zusammen, der Hämalaun- und Eosinfärbung. Hämalaun färbt basophile Strukturen wie beispielsweise Zellkerne und Ribosomen blau an. Eosin färbt eosinophile Strukturen wie Kollagen, Zellplasmaproteine, Mitochondrien und das glatte endoplasmatische Retikulum rot an.

Für den Färbevorgang wurde das Paraffin der Schnitte in einem Brutschrank bei 65 Grad Celsius (°C) zum Schmelzen gebracht. Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten vollautomatisch im Tissue Stainer TST 40 des Routinelabors der Pathologie der Technischen Universität München. Die Leerschnitte wurden maschinell entparaffiniert, rehydriert und für 2 mal 3 Minuten im Hämalaunbad gefärbt. Für 2 mal 2 Minuten wurden die Schnitte anschließend in einem Wasserbad gespült und weiter für 2 Minuten in einem Eosinbad gefärbt. Zuletzt erfolgten die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe sowie das Eindeckeln der Schnitte.

Die Vorbehandlung der Paraffinschnitte erfolgte für alle manuell durchgeführten Färbungen nach folgendem Schema und ist nachfolgend exemplarisch beschrieben: Die in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Vor Beginn des Färbevorgangs wurde das Paraffin der Schnitte in einem Brutschrank bei 65°C zum Schmelzen gebracht. Weiter wurden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 100%ig, Ethanol 96%ig, Ethanol 70%ig, je 10 Minuten) rehydriert und mit Dako Waschpuffer (Verdünnung 1:10) gespült.

3.3.2 Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) Alcianblau

Hierbei handelt es sich um eine Färbemethode, welche die PAS- und die Alcianblaufärbung miteinander kombiniert. Mit Hilfe der PAS-Färbung werden stark kohlenhydrathaltige Bestandteile rot-violett angefärbt, während die Alcianblaufärbung saure Polysaccharide bläut. Die manuell vorbehandelten Schnitte wurden für 2 Minuten in 3%ige Essigsäure getaucht und anschließend für 10 Sekunden in destilliertem Wasser gespült. Weiter wurden die Schnitte für 5 Minuten in

Alcianblau getaucht und unter laufendem Wasser entbläut. Die anschließende PAS-Färbung erfolgte vollautomatisch im Tissue Stainer TST 40. Für 5 Minuten wurden die Schnitte maschinell in ein Natriumperiodat-Bad eingetaucht, für 15 Sekunden in 70%igen Alkohol, für 6 Minuten in Schiffssches Reagenz und für 5 Minuten in ein Wasserbad verbracht. Die Gegenfärbung erfolgte für 8 Minuten in Hämalaun. Nachfolgend wurden die Schnitte in einem Wasserbad gespült. Zuletzt erfolgten die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe sowie das maschinelle Eindeckeln der Schnitte.

3.3.3 Movat Pentachromfärbung nach Verhöff

Mit der Movat Pentachromfärbung können die verschiedenen Bindegewebskomponenten in einer Färbung dargestellt werden. Die Färbung erleichtert somit die Differenzierung einzelner Bindegewebsarten und erlaubt eine präzisere Charakterisierung der Stromareaktion des PDAC. Zellkerne erscheinen blauschwarz, Muskulatur und elastische Fasern rot, Grundsubstanz blau, Kollagen gelb, Knorpel blau-grün und Knochen dunkelrot. Die Movat Pentachromfärbung erfolgte manuell bei Raumtemperatur.

Die manuell vorbehandelten Schnitte wurden zunächst für 30 Sekunden in 3%ige Essigsäure getaucht. In einem Bad aus 1%igem Alcianblau wurden die Schnitte für 30 Minuten gefärbt und anschließend für 2 Minuten mit Leitungswasser gespült. Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Schnitte für 8 Minuten in Verhöff-Gebrauchslösung getaucht (Zusammensetzung: Verhöff-Stammlösung A, B und C im Verhältnis 3:2:1), zum Beizen für 1 Minute in Eisen(III)Chlorid 1%ig getaucht und für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Das Zytoplasma wurde für 6 Minuten mit Brillant-Crocein-Säurefuchsin angefärbt. Zum Differenzieren des Gewebes wurden die Schnitte für 30 Sekunden in 1%ige Essigsäure getaucht, danach für 15 Minuten in 2%iger Phosphorwolframsäure gebeizt und für 3 sowie anschließend für 15 Minuten in 99%igem vergällten Ethanol entwässert. Kollagenfasern wurden mit der Lösung Safron du Gatinais für 15 Minuten angefärbt. Zuletzt erfolgten die Dehydratation mit Ethanol, Isopropanol und Xylol sowie das maschinelle Eindeckeln der Schnitte.

3.4 Immunhistochemie

Die anti-NT-3, anti-SPARC und anti- -Crystallin B Färbungen wurden auf dem Dako AutoStainer Färbesystem nach hierfür eigens etablierten Färbeprotokollen (Tabelle 5) durchgeführt. Die manuell vorbehandelten Schnitte wurden einer hitzeinduzierten oder enzymatischen Epitopdemaskierung unterzogen. Für die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (anti-SPARC und anti- -Crystallin B) wurden die Schnitte auf Schaukeln aufgesteckt und in einem mit Citratpuffer (10 Millimolar, pH-Wert 6,0) gefüllten Schnellkochtopf für 20 Minuten auf maximaler Stufe gekocht. Anschließend wurde der Schnellkochtopf mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Schnitte wurden für 30 Minuten in lauwarmem Citratpuffer inkubiert. Für die enzymatische Epitopdemaskierung (anti-NT-3) wurde auf jeden Schnitt Pronase (pH-Wert 6-7; verdünnt mit Dako Waschpuffer 1:20) aufgetragen und für 4 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden 3-mal hintereinander mit Dako Waschpuffer gespült und anschließend auf den Dako AutoStainer aufgesteckt. Zwischen jedem einzelnen Färbeschritt erfolgte die automatische Spülung der Schnitte mit Dako Waschpuffer. Die endogene Peroxidase wurde mittels Auftragens von 3%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Methanol blockiert. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen erfolgte mit 3%igem Normalserum (Ziege). Danach wurden die Schnitte mit ihrer entsprechenden Primärantikörperlösung in der jeweiligen spezifischen Verdünnung in REAL™ Antibody Diluent für eine Stunde inkubiert. Weiter wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Ziege-gegen-Maus (für die SPARC-Färbung) oder dem Dako EnVision™ Detektionssystem (für die NT-3- und -Crystallin-B-Färbung) für 30 Minuten inkubiert. Für die SPARC-Färbung war zudem eine 30-minütige Behandlung mittels Streptavidin-Peroxidase notwendig. Die Visualisierung der Farbreaktion erfolgte mit Dako Bright DAB (3,3'-Diaminobenzidin), welches für 5 Minuten aufgetragen wurde. Anschließend wurden die Schnitte dem Dako AutoStainer entnommen und mit destilliertem Wasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte in einer mit Mayer's Hämalaun gefüllten Glasküvette für 10 Minuten. Unter fließend Warmwasser wurden die Schnitte für 10 Minuten gebläut. Zuletzt erfolgten die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe sowie das maschinelle Eindeckeln der Schnitte.

Die -SMA-, Tenascin C-, Ki67- (Bestimmung der Proliferationsrate) und CKpan-MNF116-Färbungen wurden auf der Ventana Bench Mark XT, einem vollautomatischen Färbesystem für immunhistochemische Färbungen, durchgeführt (Tabelle 5). Spezielle Deckgläschen wurden während des Färbevorgangs verwendet, um einer Evaporation wasserhaltiger Reagenzien entgegenzuwirken. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Schnitte mit Ventana Reaktionspuffer (pH-Wert 7,6) gespült.

Die in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden auf Objektträger aufgezogen, über Nacht in einem 37°C warmem Brutschrank inkubiert und für den Färbevorgang auf die Ventana BenchMark XT aufgesteckt. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte bei 76°C mit Hilfe der Ventana EZ Prep™ Entparaffinierungslösung. Es folgte eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mittels Ventana Cell Conditioning 1 (Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer pH-Wert 8,4) bei 95°C für die -SMA-, Tenascin C- und Ki67-Färbung. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte nachfolgend mit Ventana ultraView™ Inhibitor (3 %iges H₂O₂) für 4 Minuten inkubiert. Für die CKpan-MNF116-Färbung erfolgte eine enzymatische Epitopdemaskierung mittels Ventana Protease 1 (pH-Wert 7,4) für 8 Minuten bei 37°C. Eine für jede Färbung spezifische gebrauchsfertige Primärantikörperlösung wurde aufgetropft und für 20 bis 32 Minuten bei 37°C inkubiert. Weiter wurden die Schnitte mit der Ventana ultraView™ Horseradish Peroxidase Universal Multimer (einem Substanzgemisch aus anti-Kaninchen, anti-Maus Immunglobulin (Ig)G und anti-Maus IgM) für 8 Minuten inkubiert. Mit Ventana ultraView™ DAB Chromogen und Ventana ultraView™ DAB H₂O₂ (0,04 %iges H₂O₂) wurden die Schnitte für 8 Minuten inkubiert. Weiter wurde ein Tropfen der Ventana ultraView™ Copper Lösung (5g/l Kupfersulfat) aufgetropft und für 4 Minuten inkubiert, um die Farbreaktion zu intensivieren. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämalaun für 8 Minuten. Eine maschinelle Bläuung des Gewebes für 4 Minuten mit Spülung folgte. Zuletzt wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und maschinell eingedeckelt.

Antikörper	Reaktionsmuster	Vorbehandlung	Verdünnung	Inkubationszeit	Spezies	Firma
Anti-CKpan-MNF116	intrazytoplasmatisch, Intermediärfilamente	Protease für 8 Minuten bei 37°C	1:200	32 Minuten bei 37°C	Maus, monoklonal	DCS - Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg (D)
Anti-NT-3	intrazytoplasmatisch, PSC, Stromazellen, Nerven	Pronase für 4 Minuten bei 37°C	1:100	60 Minuten bei Raumtemperatur	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg (D)
Anti-SPARC	intrazytoplasmatisch, PSC, extrazelluläre Matrix, Epithelzellen, Nerven	Citrat (pH-6,0) für 20 Minuten auf voller Stufe	1:500	60 Minuten bei Raumtemperatur	Maus, monoklonal	Invitrogen™, Darmstadt (D)
Anti-Tenascin C	intrazytoplasmatisch, PSC, extrazelluläre Matrix	EDTA (pH-8,4) für 30 Minuten bei 95°C	1:10	28 Minuten bei 37°C	Maus, monoklonal	Leica Biostystems, Wetzlar (D)
Anti- -Crystallin B	intrazytoplasmatisch, Augenlinse, inaktive PCS	Citrat (pH-6,0) für 20 Minuten auf voller Stufe	1:200	60 Minuten bei Raumtemperatur	Maus, monoklonal	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach (D)
Anti- -SMA (HHF35)	intrazytoplasmatisch, aktivierte PSC, glatte Muskelzellen	EDTA (pH-8,4) für 30 Minuten bei 95°C	1:200	28 Minuten bei 37°C	Maus, monoklonal	Dako Deutschland GmbH, Hamburg (D)
Ki67Antigen (MIB1)	intranukleär, in aktiven Phasen der Mitose exprimiert	EDTA (pH-8,4) für 30 Minuten bei 95°C	1:50	20 Minuten bei 37°C	Maus, monoklonal	Dako Denmark A/S, Glostrup (DK)

Tabelle 5 Tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper, ihre Reaktionsmuster und spezifischen Besonderheiten

3.5 TUNEL assay

Die erstmals im Jahr 1992 beschriebene TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient dem Nachweis von Zellkernen apoptotischer Zellen in Gewebeschnitten [Gavrieli et al., 1992]. Für die TUNEL-Färbung wurde das Apoptosis Detection Kit der Firma Millipore verwendet. Die Färbung erfolgte manuell nach nachfolgendem Färbeprotokoll.

Auf die manuell vorbehandelten Schnitte wurde Proteinase K (20µg/ml, im Verhältnis 1:1000 mit Phosphate Buffered Saline (PBS) verdünnt) aufgetropft und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte für 2 mal 2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 5 Minuten mit 3%igem H₂O₂ (30%-iges H₂O₂ verdünnt mit PBS) inkubiert und weiter für 2 mal 5 Minuten mit Dako Waschpuffer gespült. Equilibrationspuffer wurde für 10 Minuten auf die Schnitte aufgetropft. Bei 37°C erfolgte für 60 Minuten eine Inkubation mit Working Strength terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT-Enzym) Reagenz (TdT-Enzym verdünnt mit Reaktionspuffer). Zur Unterbrechung der Enzymreaktion wurde eine Stop/Waschpuffer-Lösung (verdünnt mit destilliertem Wasser) für 10 Minuten aufgetropft. Es folgten drei Waschvorgänge von jeweils 1 Minute mit Dako Waschpuffer. Weiter wurden die Schnitte in einer Inkubationsbox für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Antidigoxigeninkonjugat inkubiert und anschließend 4-mal für 2 Minuten mit Waschpuffer gespült. Zur Visualisierung der Farbreaktion wurde für 3 bis 6 Minuten DAB-Substrat aufgetragen und die Schnitte wurden anschließend 3-mal mit destilliertem Wasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte in einer mit Mayer's Hämalaun gefüllten Glasküvette für 10 Minuten. Unter fließend Warmwasser wurden die Schnitte für 10 Minuten gebläut. Zuletzt erfolgten die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe sowie das maschinelle Eindeckeln der Schnitte.

3.6 Auswertung der Ergebnisse

Die gefärbten Schnitte wurden mikroskopisch gesichtet und anschließend mittels Aperio Scanscope CS und Aperio ImageScope-Viewing-Software digitalisiert. Die Auswertung der Schnitte erfolgte zunächst getrennt nach Zonen. Die Endergebnisse wurden jedoch nicht auf

Schnitte, sondern stets auf den Fall im Gesamten bezogen. Bei Heterogenität innerhalb eines Falls wurde ein Mittelwert gebildet.

Die Auswertung der HE- und PAS-Alcian Schnitte erfolgte visuell deskriptiv unter Anlehnung an die histopathologischen Befundberichte der 27 Patienten.

Die Auswertung der Movat Pentachromfärbung nach Verhöff erfolgte visuell deskriptiv, sowie zur exakten prozentualen Differenzierung des tumorassoziierten Stromagewebes objektiv, computergestützt mittels morphometrischer Analyse. Der Hauptfokus der Auswertungen lag auf der Untersuchung und Beschreibung des Bindegewebes, welches sich einerseits als kollagenreiche, reife, inaktive Fibrose (gelb gefärbt) und andererseits als muzinreiche, unreife, aktive Grundsubstanz (blau gefärbt) präsentierte (Abbildung 7). Zudem wurde das Bindegewebe bezüglich seiner Dichte bewertet und in kompakt versus locker strukturiert kategorisiert.

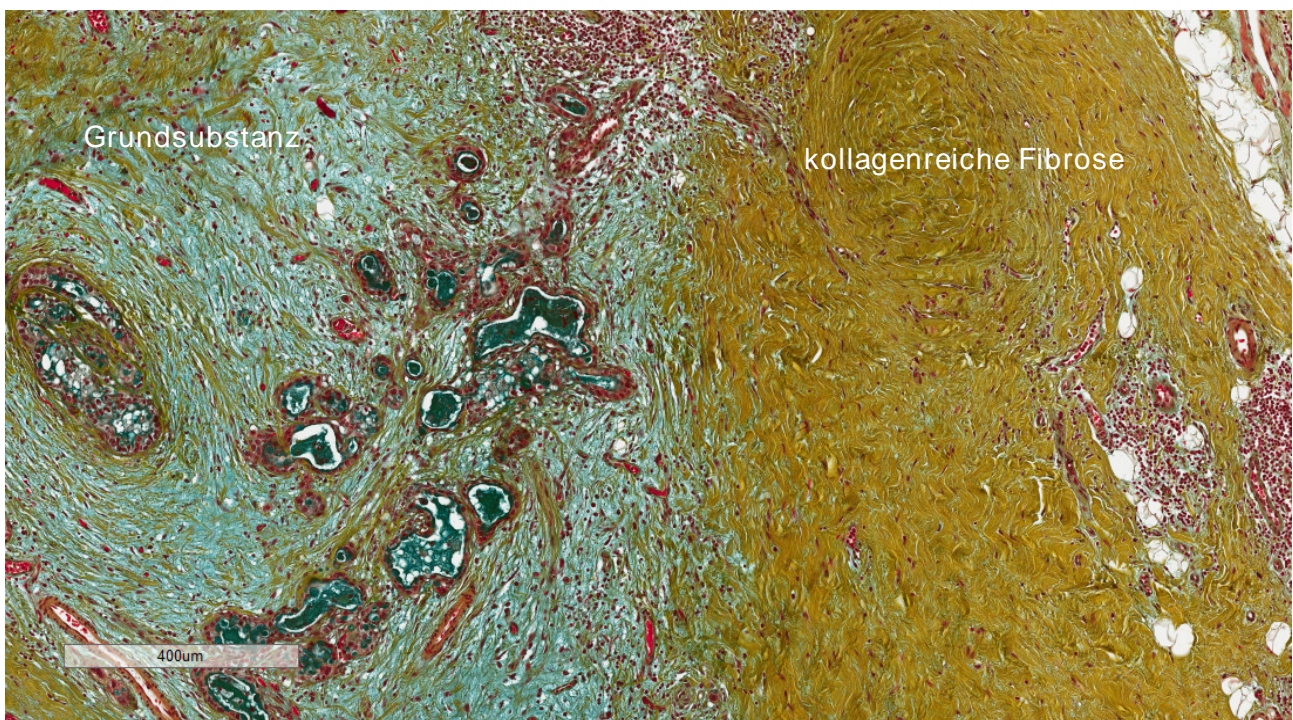


Abbildung 7 Gegenüberstellung von muzinreicher, aktiver Grundsubstanz (blau gefärbt) links und kollagenreicher, reifer Fibrose (gelb gefärbt) rechts. Die Grundsubstanz imponiert hier locker strukturiert, die Fibrose kompakt strukturiert.

Die Software-gestützte morphometrische Analyse der Movat-Pentachromfärbung wurde von Frau Dr. Annette Feuchtinger am Helmholtz Zentrum München mittels Definiens Tissue Studio digital pathology image analysis Software, durchgeführt (Abbildung 8). Zuvor war das zu untersuchende Gewebe von Hand am Computer mittels einer Region of interest (ROI) markiert worden. Damit große, nicht-stromale Strukturen wie Pankreasinseln, Pankreasgänge, Blutgefäße und Muskulatur so wenig Einfluss wie möglich auf die Stromaauswertung nehmen konnten, wurden sie mittels einer non-ROI (grüne Areale) von Hand ausgeschlossen. Eine Farbschwelle wurde festgelegt, ab der die Software ein Areal als gelb oder blau erkennen sollte. Das Programm unterteilte die zu untersuchende ROI in viele kleine Areale (Maps) und wertete jedes einzelne Areal separat aus. Anschließend wurden alle blauen und gelben Areale sowie Areale, die weder als eindeutig blau noch als eindeutig gelb erkannt wurden, separat addiert. Letztere Areale, die vom Softwareprogramm nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden als „candid“ (pinke Areale) klassifiziert. Um die Objektivität der computergestützten Auswertung nicht nachträglich zu schwächen, wurden diese Areale im Folgenden als „gemischte Areale“ (Muzin und Kollagen zu ungefähr gleichen Anteilen) interpretiert und nicht in den statistischen Berechnungen berücksichtigt. Die Kategorie „candid“ hatte zudem in der Regel einen geringen Prozentanteil am Gesamtanteil. Nicht alle Fälle konnten computergestützt ausgewertet werden.

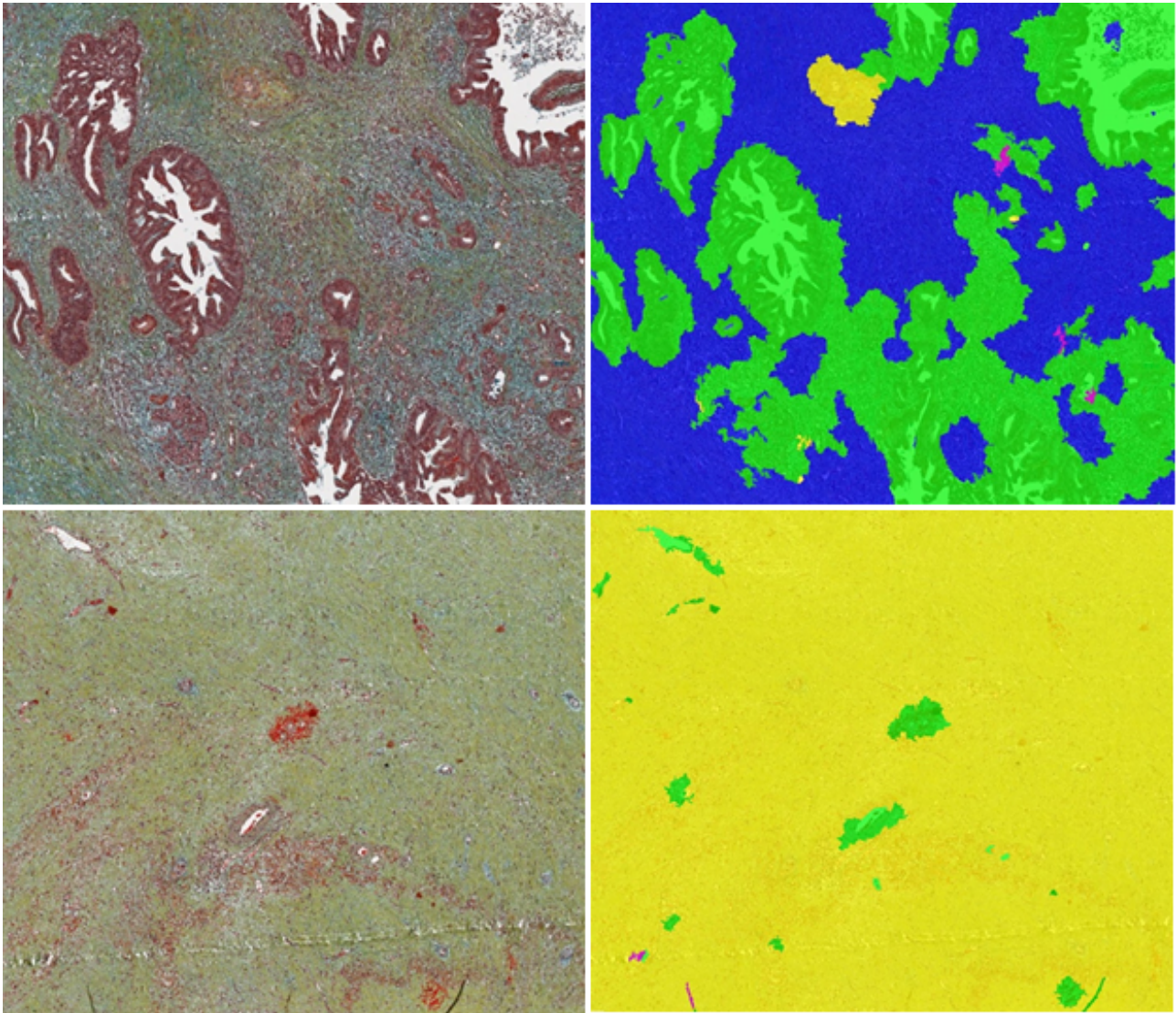


Abbildung 8 Dargestellt sind die Movat Pentachromfärbung (links) sowie die Software unterstützte Auswertung des zugehörigen Movatschnitts (rechts). Die Softwarebilder setzen sich aus vielen kleinen Arealen (Maps) zusammen. Mittels Farberkennungssoftware wurden Areale entweder der Farbe Gelb oder der Farbe Blau zugeordnet. „Gemischte Areale“ = „candid“ (Blau- und Gelbanteil zu ungefähr gleichen Anteilen) kamen in der Farbe Pink zur Darstellung. Pinkfarbene Areale waren für das Softwareprogramm weder der Farbe Gelb noch der Farbe Blau eindeutig zu zuordnen. Nichtstromale Strukturen wie beispielsweise Pankreasinseln oder Blutgefäße (nicht alle konnten zuvor von Hand ausgeschlossen werden) wurden von der Software erkannt und als „non-ROI“ grün markiert.

Die Schnitte der Immunhistochemie wurden hinsichtlich

- Lokalisation: peritumoral = Lokalisation in der Umgebung von (vitalen) Karzinomformationen oder stromal (in der Fibrose ohne spezifischen Bezug zu epithelialen Strukturen). Es konnte hierbei sowohl eine zytoplasmatische Anfärbung der PSC als auch eine Anfärbung der Matrix nachgewiesen werden. Weitere Lokalisationsbezeichnungen wie periduktal, periazinär und inter-/perilobulär dienten insbesondere der Positivkontrolle.
- Häufigkeit: keine Anfärbung 0, <10% der PSC/Matrix angefärbt 1+, 10-50% der PSC/Matrix angefärbt 2+, >50% der PSC/Matrix angefärbt 3+

ausgewertet. Die Ausprägung des Expressionsmusters in diffus oder fokal wurde mit erfasst.

Tabelle 6 gibt eine exemplarische Übersicht der untersuchten Eigenschaften.

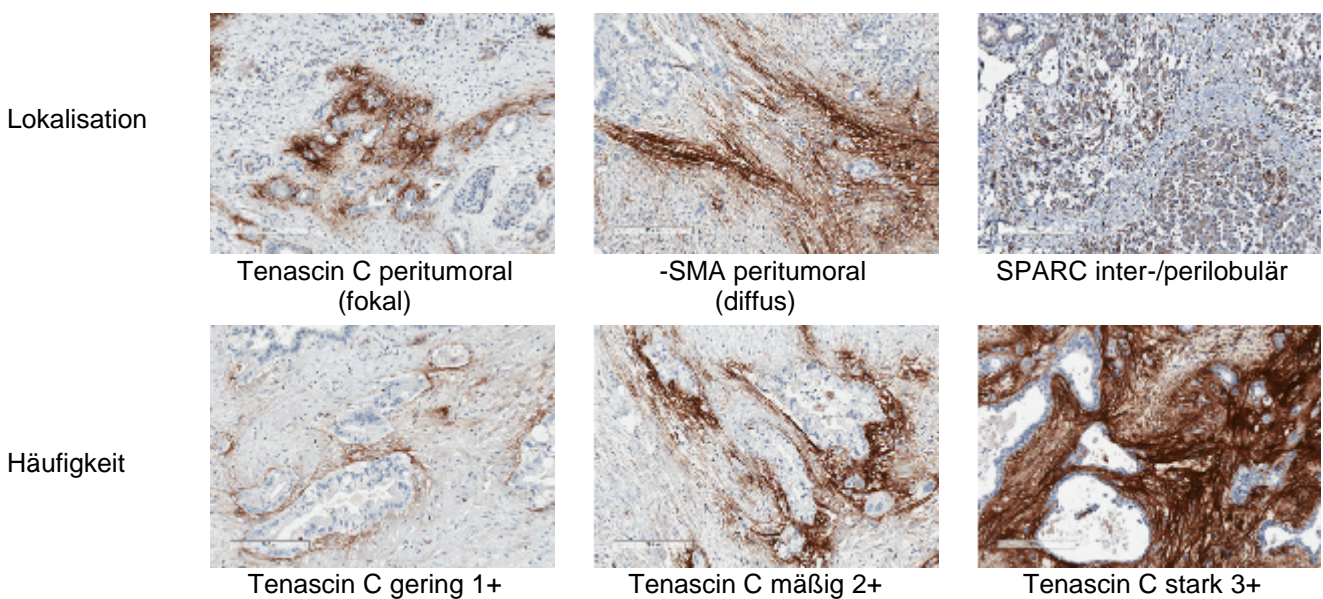


Tabelle 6 Exemplarische Darstellung der Auswertung von Häufigkeit und Lokalisation der Antikörperfärbungen

Für die Auswertung der Ki67-Antigen-Färbung (Proliferationsrate) und den TUNEL assay (Apoptosenachweis) wurden im zentralen Tumorschnitt 1000 vitale Tumorzellen ausgezählt. Ki67 detektiert und markiert das im Zellkern befindliche Antigen, welches in allen aktiven Phasen (G1-, S-, G2- und M-Phase) des Zellzyklus exprimiert wird. In der Ruhe-Phase (G0-Phase) findet keine Exprimierung statt. Der Prozentanteil der Ki67 positiven Zellkerne spiegelt folglich die

Proliferationsrate in Zellpopulationen wider [Scholzen et al., 2000]. Für Fälle mit deutlicher Tumorregression (vitaler Tumoranteil <20%) sowie im Falle des Biopsiematerials wurden 500 vitale Tumorzellen ausgezählt. Der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Tumorzellen und das Färbemuster (homogenes versus heterogenes Bild) wurden notiert, Mittelwerte errechnet und eine Korrelation zwischen Proliferation und Regression getestet. Die Auszählung erfolgte in 20-facher Vergrößerung von Hand, in 3 Gesichtsfeldern oder mehr. Abgeschilferte, nicht eindeutig identifizierbare und randständige Tumorzellen wurden aus Qualitätsgründen nicht gewertet.

3.7 Statistik

Alle Berechnungen sind mit IBM SPSS inc., Version 21, durchgeführt worden. Für stetige Variablen wurde der Mittelwert angegeben und mittels Streudiagrammen abgebildet. Unterschiede wurden mit dem Unpaired t-test bzw. Mann-Whitney-U-Test geprüft. Eine logistische Regression wurde für die Identifikation prognostischer Parameter durchgeführt. Für alle Auswertungen wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ festgelegt, so dass alle Ergebnisse mit $p<0,05$ als statistisch signifikant angesehen werden können.

4 Ergebnisse

4.1 Klinisch-pathologische Daten

Daten von 27 Patienten, darunter 11 Frauen (41%) und 16 Männer (59%), wurden ausgewertet. Bei diesen Patienten wurde im Zeitraum von 2006 bis 2013 ein PDAC diagnostiziert. Die Diagnose konnte in allen 27 Fällen präoperativ mittels Bildgebung (Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT)) belegt werden. Vor Therapiebeginn war in 5 Fällen (19%) eine Gewebebiopsie und in 10 Fällen (37%) eine Punktionzytologie erfolgt. In 2 Fällen (7%) wurde keine Histologie durchgeführt. In 10 Fällen (37%) war retrospektiv nicht mehr zu klären, ob eine prätherapeutische Biopsie erfolgt war. In 19 Fällen (70%) war das PDAC im Pankreaskopf, in 3 Fällen (11%) im Kopf- und Korpusbereich, in einem Fall (4%) im Korpus-Schwanzbereich und in 4 Fällen (15%) im Pankreasschwanz lokalisiert. Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose lag für Frauen bei 62,82 Jahren und für Männer bei 62,44 Jahren. Alle 27 Patienten zeigten bei Erstdiagnose ein fortgeschrittenes, inoperables Karzinom. Zum Downsizing bzw. Downstaging des PDAC erhielten die Patienten eine neoadjuvante Therapie. Die Therapieschemata waren individuell verschieden und die Therapiedauer mit ca. 2 bis 22 Monaten unterschiedlich lang. Nach Abschluss der neoadjuvanten Therapie erfolgte die chirurgische Resektion des PDAC in München am Klinikum rechts der Isar, in der Abteilung für Viszeralchirurgie. Postoperativ schloss sich die histopathologische Aufarbeitung und Beurteilung der Operationspräparate an. Für das 27-köpfige Patientenkollektiv ergaben sich folgende Daten: 24 Karzinome (89%) wurden als ypT3/ypT4, 3 Karzinome (11%) als ypT1/ypT2 klassifiziert. In 13 Fällen (48%) lagen Lymphknotenmetastasen und in 5 Fällen (19%) Fernmetastasen (hepatisch (HEP) oder peritoneal (PER)) vor. Pro Fall wurden 6 bis maximal (max.) 43 Lymphknoten entnommen. In allen Fällen zeigte sich eine Perineuralscheideninvasion. 7 Patienten (26%) wurden lokal R0, 16 Patienten (59%) R1 reseziert. Bei 4 Patienten (15%) konnte der Resektionsstatus nicht klassifiziert werden (RX). Eine detaillierte Darstellung der erhobenen klinisch-pathologischen Daten mit Legende findet sich in Tabelle 7.

Fall	Geschlecht	Alter bei ED	prä-operative Gewebeprobe	Neoadjuvante Therapie mit Applikationszeitraum und Therapieschema	OP-Jahr	OP-Verfahren	Tumorlokalisation im Pankreas	Tumorgröße (H/B/T) in cm	pT	pN	cM	R	Pn	BZ Diagnose bis Tod/BE (Monate)	BZ OP bis Tod/BE (Monate)	Gesamtgrad
1	M	58	-	06/08 bis 07/08: 36 Gy + 5-FU	2008	2	Kopf	2,3 x 2,2 x 2,0	3	0 (0/6)	0	1 (dorsal)	1	53,2	49,8	IV
2	M	69	Zytologie	01/09 bis 03/09: 6 Zyklen GemOx	2009	2	Kopf, Korpus	3,5 x 8,0 x 3,5	3	0 (0/11)	-	0	1	26,5	22,1	IV
3	W	52	-	01/08 bis 06/08: GemOx 03/09 bis 05/09: GemOx	2009	3	Schwanz	7,5 x 2,0 x 1,7	3	0 (0/8)	-	1 (ventral)	1	29,6	13	III
4	W	63	-	11/09 bis 03/10: 4 Zyklen Gemcitabin	2010	2	Kopf	2,5 x 2,0 x 3,0	2	0 (0/18)	0	0	1	29,8	24,4	IV
5	W	60	-	04/10 bis 07/10: 4 Zyklen GemOx	2010	2	Kopf	3,0	4	1 (2/22)	1 (PER)	1 (dorsal, medial)	1	18,7	14,5	III
6	W	65	Biopsie	10/09 bis 05/10: 7 Zyklen Gemcitabin	2010	1	Kopf (Proc. Uncinatus)	2,8 x 2,0 x 1,5	4	1 (1/24)	1 (PER)	1 (dorsal, medial)	1	16,3	6	III
7	W	63	-	07/10 bis 11/10: 4 Zyklen Gemcitabin + Erlotinib	2010	3	Schwanz	1,5 x 2,0 x 0,7	1	0 (0/23)	1 (HEP)	0	1	29,2	24,3	II
8	W	64	Biopsie	08/11 bis 09/11: Hyperthermie mit Cisplatin + Gemcitabin	2011	2	Kopf (Proc. Uncinatus)	1,8 x 1,5 x 1,5	3	0 (0/18)	-	1 (ventro-medial)	1	3,8	0,6	II
9	M	61	Biopsie	ab 12/11: 12 Zyklen Folfirinox	2012	3	Schwanz	3,8 x 2,0 x 1,5	3	0 (0/16)	-	1 (dorsal)	1	15,8	8,6	II
10	M	53	Zytologie	07/12 bis 08/12: 3 Zyklen Folfirinox	2012	1	Kopf	3,0 x 2,0 x 2,0	3	1 (3/20)	0	1 (dorsal)	1	23,9	21,2	III
11	M	61	Zytologie	07/12 bis 10/12: 6 Zyklen Folfirinox + 50,4 Gy 12/12 bis 01/13: 5-FU	2013	1	Kopf (Proc. Uncinatus)	2,5	3	1 (1/17)	0	X	1	23,5	14,1	II

12	W	67	Zytologie	01/12: Folfirinox ab 06/12: Gemcitabin ab 09/12: 6 Zyklen Folfirinox	2013	1	Kopf	3,0 x 2,5 x 2,0	3	1 (6/11)	-	0	1	29,7	13,6	III
13	M	62	-	03/09 bis 07/09: 4 Zyklen Gemcitabin + Erlotinib	2009	4	Kopf	7,0 x 7,0 x 6,0	3	0 (0/9)	0	X	1	9,3	3,5	II
14	M	73	Zytologie	07/11 bis 09/11: 32,2 Gy + Gemzar	2011	3	Korpus, Schwanz	1,5 x 1,5 x 1,0	3	0 (0/16)	0	X	1	9,8	6,3	II
15	M	68	-	05/08 bis 06/08: Cisplatin	2008	4	Kopf, Korpus	5,0 x 3,0 x 2,5	3	1 (2/7)	0	1 (dorsal, Parenchym)	1	7,4	4,5	III
16	M	58	Biopsie	05/12 bis 08/12: Folfirinox	2012	1	Kopf	2,8 x 2,8 x 1,8	4	1 (1/33)	1 (PER)	1 (dorsal)	1	34,3	30,4	III
17	W	69	-	12/07 bis 06/08: 12 Zyklen GemOx	2008	1	Kopf	2,5	3	1 (3/30)	0	1 (dorsal)	1	13,1	5,9	III
18	M	66	-	11/07 bis 05/08: Gemcitabin 11/07 bis 03/08: Erlotinib	2008	4	Kopf	2,0	3	0 (0/25)	1 (HEP)	0	1	24,4	17,8	II
19	M	62	Zytologie	10/13 bis 01/14: 5 Zyklen Folfirinox	2014	1	Kopf (Proc. Uncinatus)	3,5	3	0 (0/20)	-	1 (dorsal)	1	15,3	11,5	III
20	M	66	Biopsie	03/09 bis 09/09: 10 Zyklen GemOx	2009	1	Kopf	3,5 x 3,5 x 2,0	3	0 (0/15)	-	1 (dorsal)	1	15	8,4	II
21	W	69	-	08/09 bis 09/09: 30 Gy + 5-FU	2009	2	Kopf, Korpus	4,5 x 2,5 x 2,0	4	1 (2/43)	0	X	1	14,4	11,7	III
22	W	48	-	ab 08/09: GemOx	2010	1	Kopf	3,0	4	0 (0/21)	-	1 (medial, Parenchym)	1	25,3	13,1	III
23	W	71	Zytologie	04/10 bis 06/10: 2 Zyklen Gemcitabin + Erlotinib 06/10 bis 02/11: 8 Zyklen Gemcitabin	2011	1	Kopf	2,0 x 2,3 x 2,0	3	0 (0/9)	-	0	1	25,7	13,8	IV

24	M	58	Zytologie	12/12 bis 02/13: Folfirinnox	2013	2	Kopf	3,0 x 2,0 x 1,5	3	1 (2/17)	-	1 (Parenchym)	1	25,8	22,8	III
25	M	61	Zytologie	12/06: Cisplatin, Gemcitabin 05/07: Gemcitabin, Tarceva 10/07: 36 Gy + 5-FU 07/08 bis 10/08: Oxaliplatin Xeloda	2008	1	Kopf	4,0	4	1 (1/13)	0	1 (dorsal)	1	101,1	77,7	III
26	M	55	Zytologie	02/09 bis 05/09: 2 Zyklen GemOx	2009	2	Kopf	2,7 x 1,5 x 2,0	3	1 (8/12)	-	1 (dorsal)	1	8,4	4,1	III
27	M	68	-	11/08 bis 05/09: 7 Zyklen Cis- und Carboplatin + Gemzar	2009	3	Schwanz	2,4 x 2,5 x 2,0	2	1 (1/8)	-	0	1	8,9	1	III

Legende: W = weibliches Geschlecht, M = männliches Geschlecht, „ - „ = keine Information, ED = Erstdiagnose, GemOx = Gemcitabin plus Oxaliplatin,

35

FOLFIRINOX = Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin, 5-FU = 5-Fluorouracil, Gy = Gray, Proc. = Processus, AR = Absetzungsrand, X = keine Aussage möglich, H/B/T = Höhe/Breite/Tiefe, T = Primärtumor, T1 = Tumor auf Pankreas begrenzt <2 cm, T2 = Tumor auf Pankreas begrenzt >2 cm, T3 = Organübergreifende Infiltration, T4 = Infiltration Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior, N = Lymphknotenmetastasen, M = Fernmetastasen, HEP = hepatische Metastasierung, PER = peritoneale Metastasierung, c = klinisch, p = pathologisch, y = nach einer Behandlung, R = Resektionsausmaß, R0 = Resektionsrand frei von Karzinomzellen, R1 = Nachweis von Karzinomzellen am Resektionsrand, Pn = Perineuralscheideninvasion, BZ = Beobachtungszeitraum, BE = Beobachtungsende, OP = Operation

Operationstechnik: 1 = partielle Duodenopankreatektomie nach Whipple und Kausch, 2 = pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie nach Traverso,

3 = Pankreaslinksresektion mit Splenektomie, 4 = Totale Pankreatektomie mit Splenektomie

Tabelle 7 Detaillierte Übersicht über die klinisch-pathologischen Daten der 27 ausgewerteten Fälle

4.2 Histopathologische Charakterisierung der neoadjuvant vorbehandelten Tumoren

4.2.1 Makroskopie

Makroskopisch zeigte sich ein unscharf begrenztes, induriertes, grauglasiges Tumorklager (Abbildung 9) von derber Konsistenz mit abschnittsweise kleinzystischer Schnittfläche. Die Karzinome im Pankreaskopf präsentierten sich mit einem minimalen (min.) Durchmesser von 1,5 cm und einem max. Durchmesser von 8,0 cm. Im Pankreasschwanz war das Tumorklager im min. Durchmesser 0,7 cm und max. Durchmesser 7,5 cm groß. Häufig war das Tumorklager schwer vom benachbarten Fettgewebe abgrenzbar bzw. hatte dieses oder benachbarte Organe bereits infiltriert. In 16 Fällen (59%) reichte das Tumorklager bis an mindestens einen Absetzungsrand heran oder war <0,1 cm davon entfernt. Der Ductus pancreaticus wurde des Öfteren als stenotisch beobachtet. Im peripankreatischen Fettgewebe waren Lymphknoten mit einem Durchmesser von min. 0,5 cm bis max. 1,5 cm nachweisbar.



Abbildung 9 Neoadjuvant vorbehandeltes Pankreaslinksresektat mit unscharf begrenztem, induriertem Tumorklager (kreismarkiert) von grauglasiger Farbe

4.2.2 Mikroskopie

In allen 27 Fällen ließ sich im makroskopisch beschriebenen Tumorknoten histologisch ein invasives PDAC nachweisen mit einem vitalen Tumorzellanteil von min. 10% bis max. 100% pro Fall. In 4 Fällen (15%) konnte im gesamten Präparat Karzinom nachgewiesen werden (keine sichtbare Tumorregression). In 8 Fällen (30%) zeigte sich das homogene Bild einer beginnenden Regression (vitaler Tumoranteil >20%). In 7 Fällen (26%) zeigte sich ein sehr heterogenes Bild. In der Gesamtschau war hier für jeden Fall eine Reduktion an Tumormasse nachweisbar, innerhalb der einzelnen Zonen reichte das Bild jedoch von einem fehlenden bis hin zu einem deutlich sichtbaren Therapieansprechen. In 8 Fällen (30%) zeigte sich eine deutliche Reduktion an Tumormasse (vitaler Tumoranteil 20%). In je einer zentralen, intermediären und peripheren Zone von 3 unterschiedlichen Fällen waren keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch eine nachträglich durchgeführte negative CKpan-MNF116 Färbung (Abbildung 10). Eine komplette Regression für einen Fall zeigte sich jedoch nicht.

Das Wachstumsmuster des neoadjuvant vorbehandelten PDAC präsentierte sich überwiegend duktal mit kribriformen Arealen, teilweise fielen solide Areale auf. Die Drüsenstrukturen waren irregulär gestaltet (Abbildung 11). Die Kern-Plasmarelation war zugunsten des Zellkerns verschoben. Abhängig vom Differenzierungsgrad ließen sich mäßige bis hochgradige Kernatypien nachweisen. Teilweise waren die Zellkerne bizarr geformt mit prominenten Nukleolen. Mitosen waren häufig, mitunter waren atypische Mitosen nachweisbar (Abbildung 12). Abschnittsweise zeigte sich ein hellzelliges Zytoplasma der Tumorzellen. In der Umgebung des invasiv wachsenden PDAC konnte in 26 Fällen (96%) eine deutlich ausgeprägte Kollagenfaservermehrung beobachtet werden. Angiolymphatische Karzinominfiltrationen waren ebenfalls darstellbar.

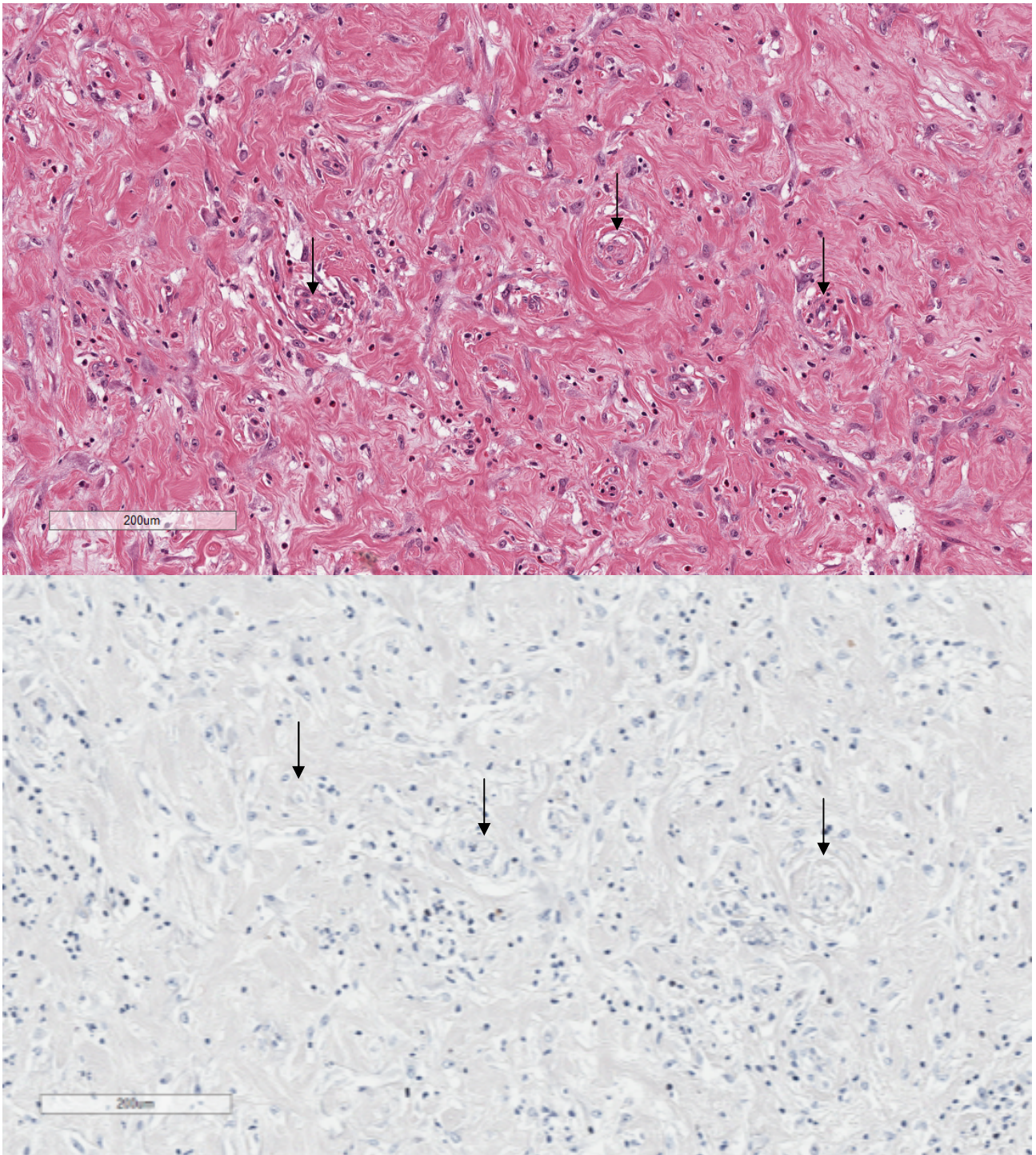


Abbildung 10 Suspekt wirkende Zellen (pfeilmarkiert) in der HE-Färbung (oben), die in der CKpan-MNF116 Färbung (unten) jedoch nicht zur Darstellung kommen. Ausschluss vitaler Tumorzellen.

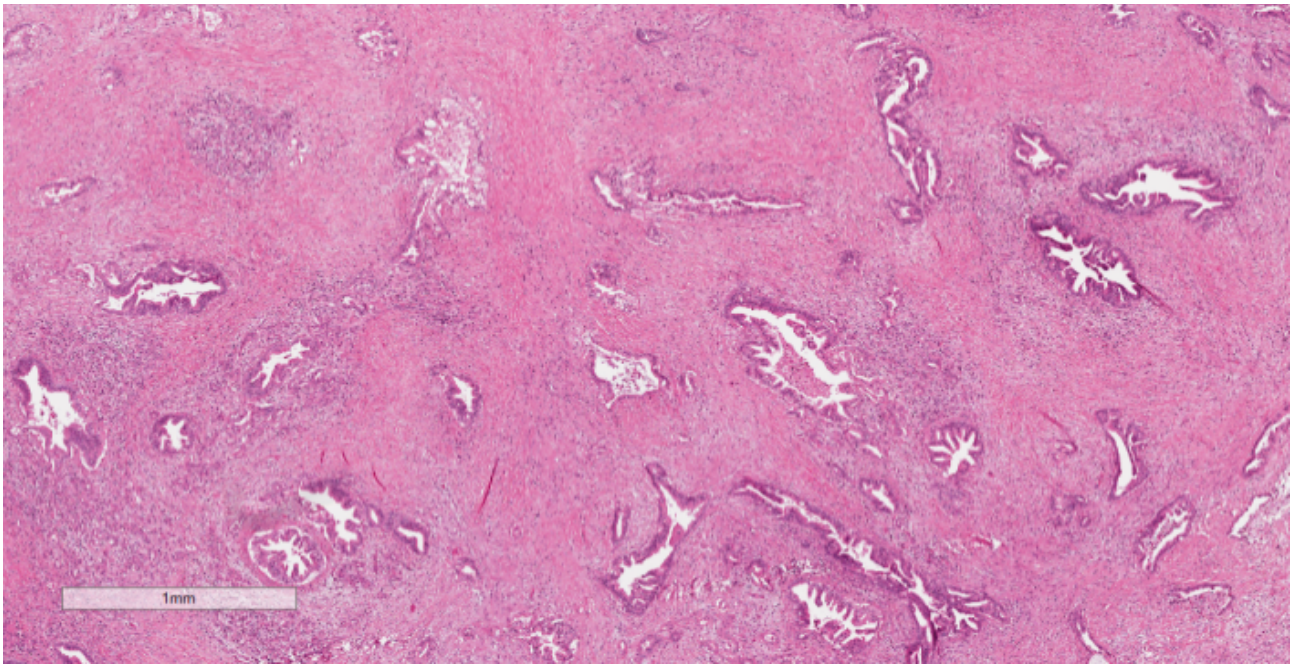


Abbildung 11 Bild eines neoadjuvant vorbehandelten PDAC. Karzinom mit irregulär gestalteter Drüsenstruktur ist im gesamten Präparat nachweisbar. In unmittelbarer Umgebung der Tumorformationen findet sich eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion. HE-Färbung

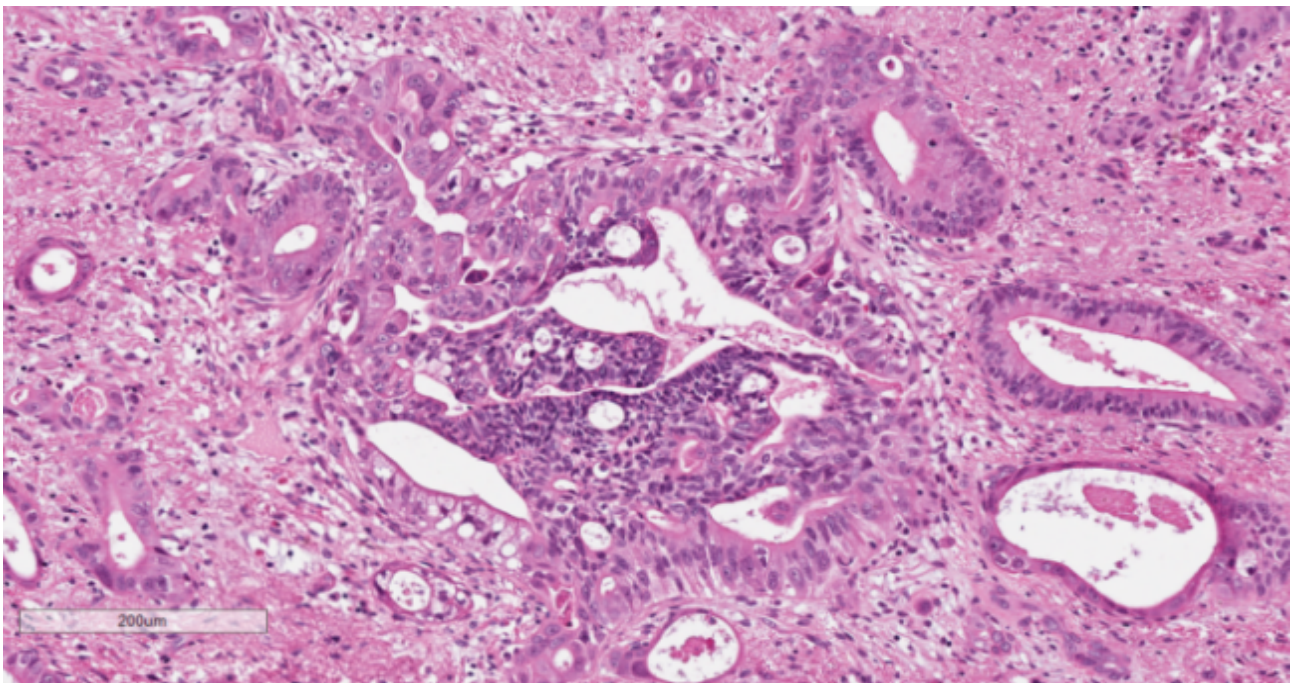


Abbildung 12 Bild eines neoadjuvant vorbehandelten PDAC. Gering differenziertes Karzinom mit atypisch, mehrschichtig gestaltetem Epithel. Deutliche Anisokaryose, Pleomorphie und vermehrte Mitoserate sind erkennbar. Schleimbildende Drüsenstrukturen sind ebenfalls auszumachen. HE-Färbung

Neben regressiven Zellveränderungen und einer ausgeprägten desmoplastischen Reaktion zeigten sich weitere qualitativ morphologische Merkmale wie (azelluläre) Schleimseen (Abbildung 13), zytoplasmatische Vakuolen (Abbildung 14) und Nekrosen (Abbildung 15). In 11 Fällen (41%) zeigten sich Schleimseen in mindestens einer Zone mit einem Gesamtanteil von <5% bis max. 50%, bezogen auf die Gesamtmasse des Tumors. In der intermediären und peripheren Zone waren Schleimseen etwas häufiger zu beobachten. In 25 Fällen (93%) konnten zytoplasmatische Vakuolen mit einem Gesamtanteil von ca. 1% bis max. 10% nachgewiesen werden. Nekrotisches Gewebe, mit einem Anteil von <5% bis max. 30%, war in 17 Fällen (63%) nachweisbar. Fibrose ließ sich in 26 Fällen (96%), entzündliche Überlagerungen in 5 Fällen (19%) darstellen.

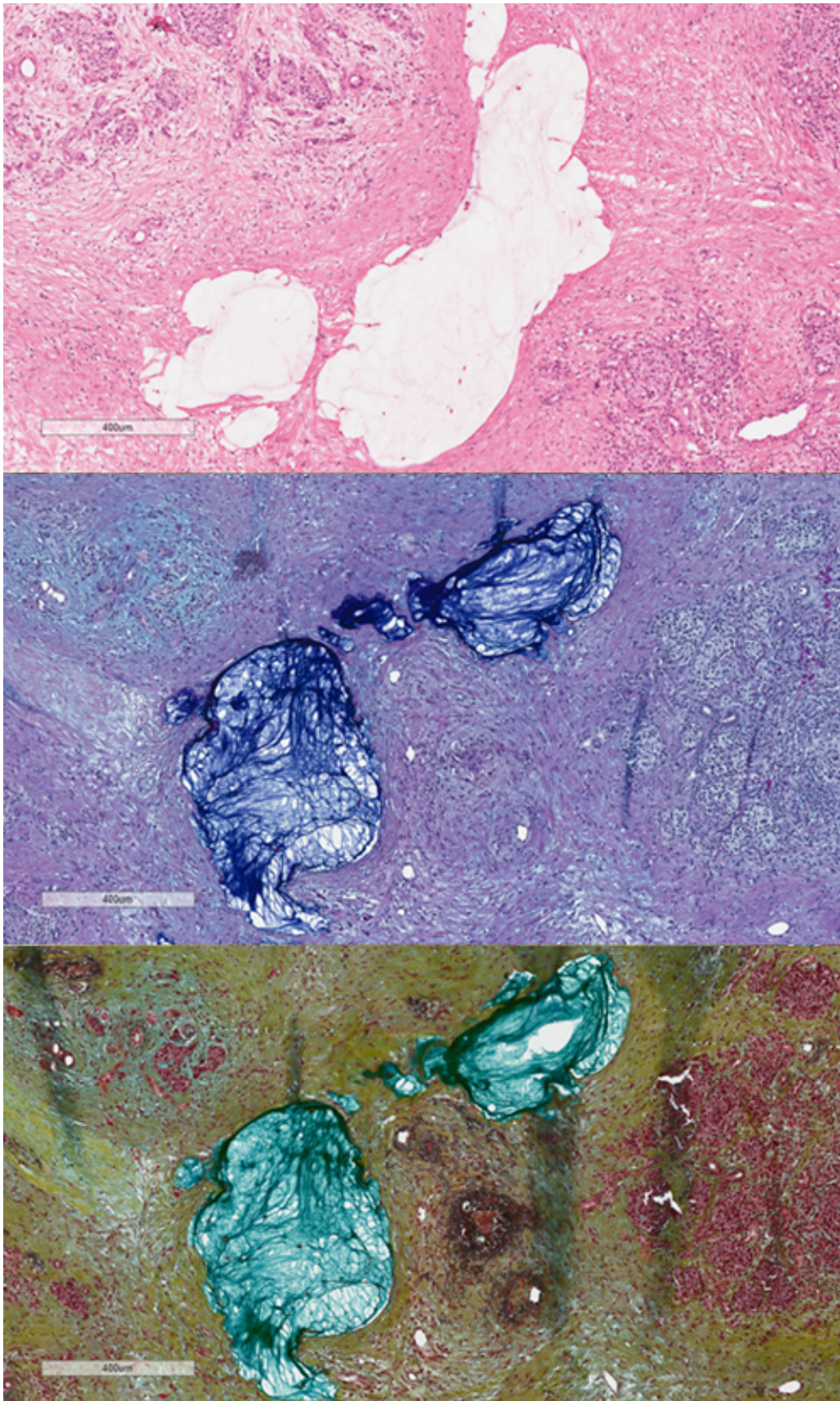


Abbildung 13 Dargestellt sind azelluläre Schleimseen als Zeichen der Regression in der HE- (oben), PAS-Alcian- (Mitte) und Movat Pentachromfärbung (unten).

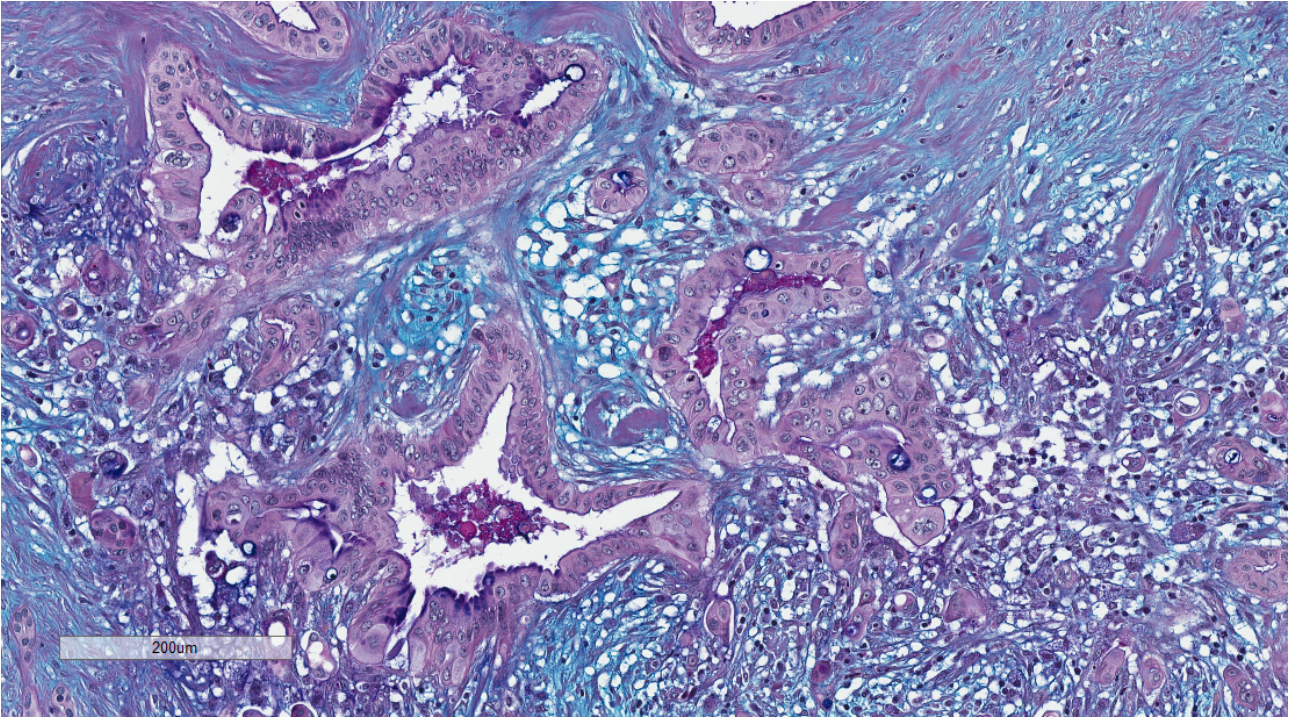


Abbildung 14 Dargestellt sind zytoplasmatische Vakuolen als Zeichen der Regression. PAS-Alcian-Färbung

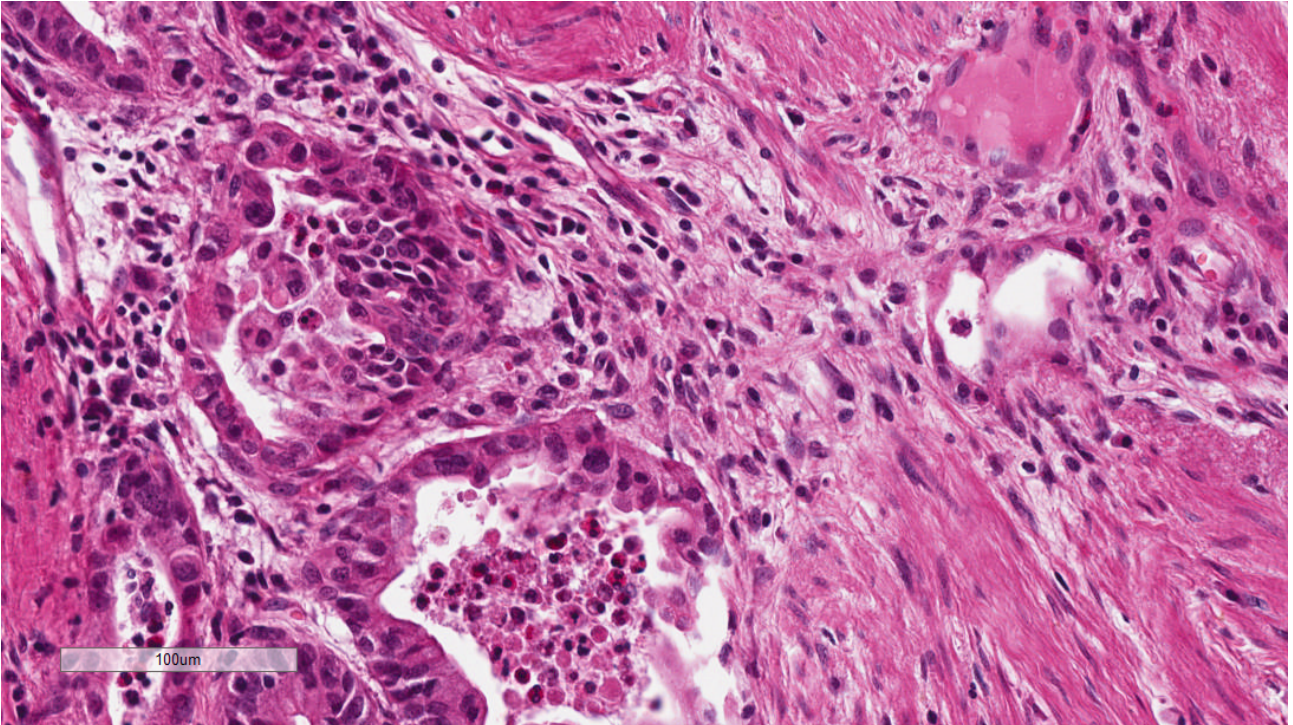


Abbildung 15 Bild einer Nekrose mit granulozytärem Infiltrat als Zeichen der Regression. HE-Färbung

4.2.3 Charakterisierung der Stromareaktion mittels Movat Pentachromfärbung nach Verhöff

Im Rahmen der visuellen Auswertung der Movat Pentachromfärbung konnten insbesondere drei Färbemuster beobachtet werden (Abbildung 16, Tabelle 9).

1. Homogenes Bild mit überwiegend blauer, muzinreicher, aktiver Grundsubstanz von lockerer Struktur. Die Grundsubstanz umfasst hierbei den Anteil der extrazellulären Matrix, der keine Fasern enthält (d.h. extrazelluläre Matrix abzüglich Kollagen und anderen Fasern).
2. Homogenes Bild mit überwiegend gelbem, kollagenreichem und reifem Stroma von meist kompakter Struktur.
3. Heterogenes Bild – zentral um die Tumorherde blau gefärbte, muzinreiche, unreife und aktive Grundsubstanz, locker strukturiert. In der Tumorperipherie überwiegend gelbgefärbtes, kollagenreiches und reifes Stroma von kompakter Struktur.

Für 26 Fälle (100%) konnte visuell deskriptiv ein Gesamtfärbemuster bestimmt werden. In 8 Fällen (31%) präsentierte sich überwiegend Färbemuster 1, in 4 Fällen (15%) Färbemuster 2 und in 14 Fällen (54%) zeigte sich ein heterogenes Bild im Sinne von Färbemuster 3.

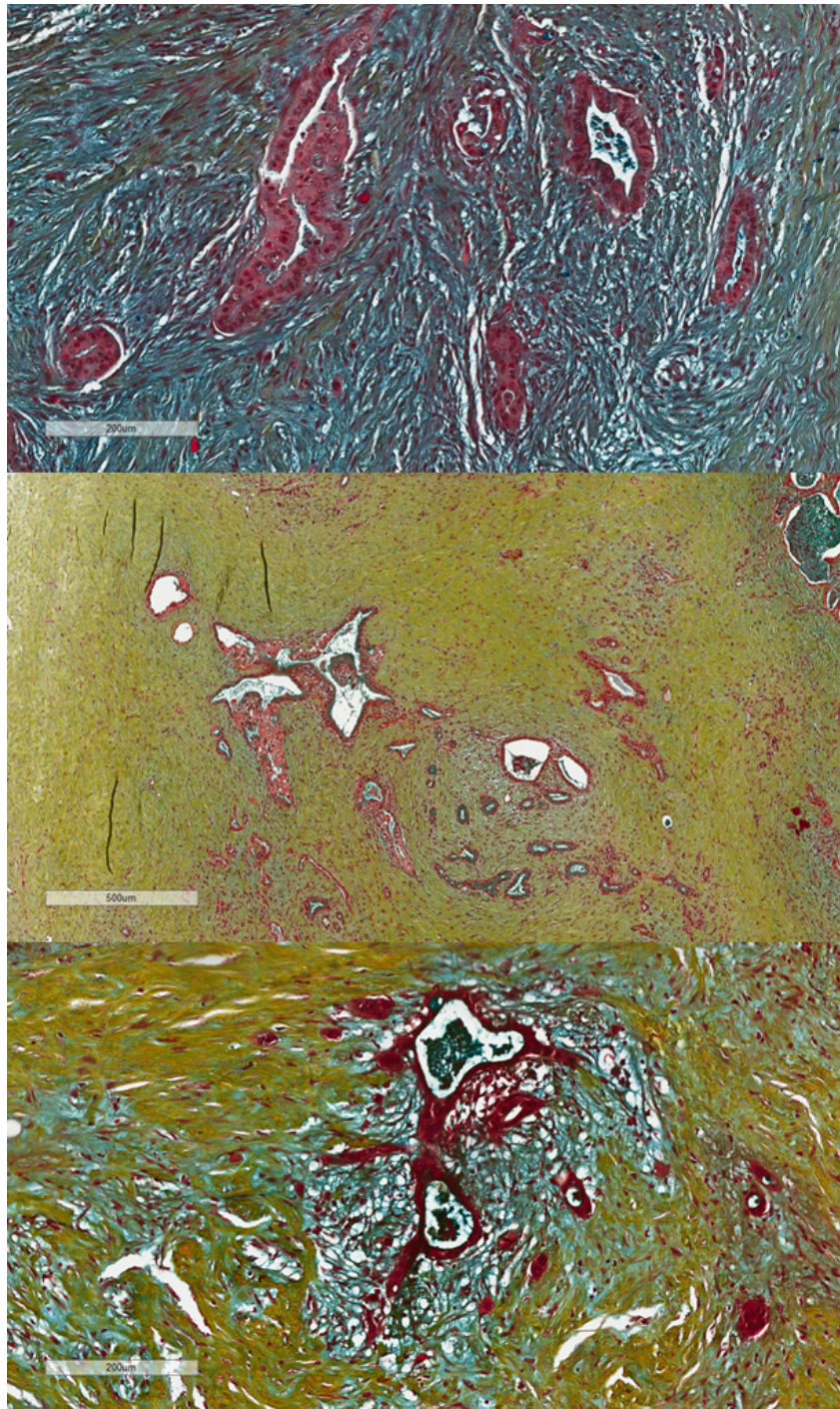


Abbildung 16 Darstellung der oben beschriebenen Färbemuster in der Movat Pentachromfärbung.

Färbemuster 1 (oben): blaue, muzinreiche, aktive Grundsubstanz von lockerer Struktur.

Färbemuster 2 (Mitte): gelbes, kollagenreiches und reifes Stroma von überwiegend kompakter Struktur. Färbemuster 3 (unten): heterogenes Bild, um das Tumorzentrum imponiert blaue, muzinreiche, aktive Grundsubstanz, locker strukturiert. In der Tumorperipherie zeigt sich gelbes, kollagenreicheres Stroma, überwiegend kompakt strukturiert.

4.2.4 Definiens Developer XD gestützte Auswertung der Movat Pentachromfärbung nach Verhöff

Zur exakten objektiven prozentualen Analyse des tumorassoziierten Stromagewebes wurde eine Software-gestützte morphometrische Analyse mittels Definiens Developer XD durchgeführt. Die ermittelten prozentualen Farbwerte (Appendix) wurden weiter statistisch ausgewertet. Interessanterweise waren muzinreiche Fälle (niedriger Kollagengehalt) mit hohen Regressionsgraden (insbesondere Regressionsgrad III und IV) assoziiert (Abbildung 17). Diese Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant ($p=0,217$).

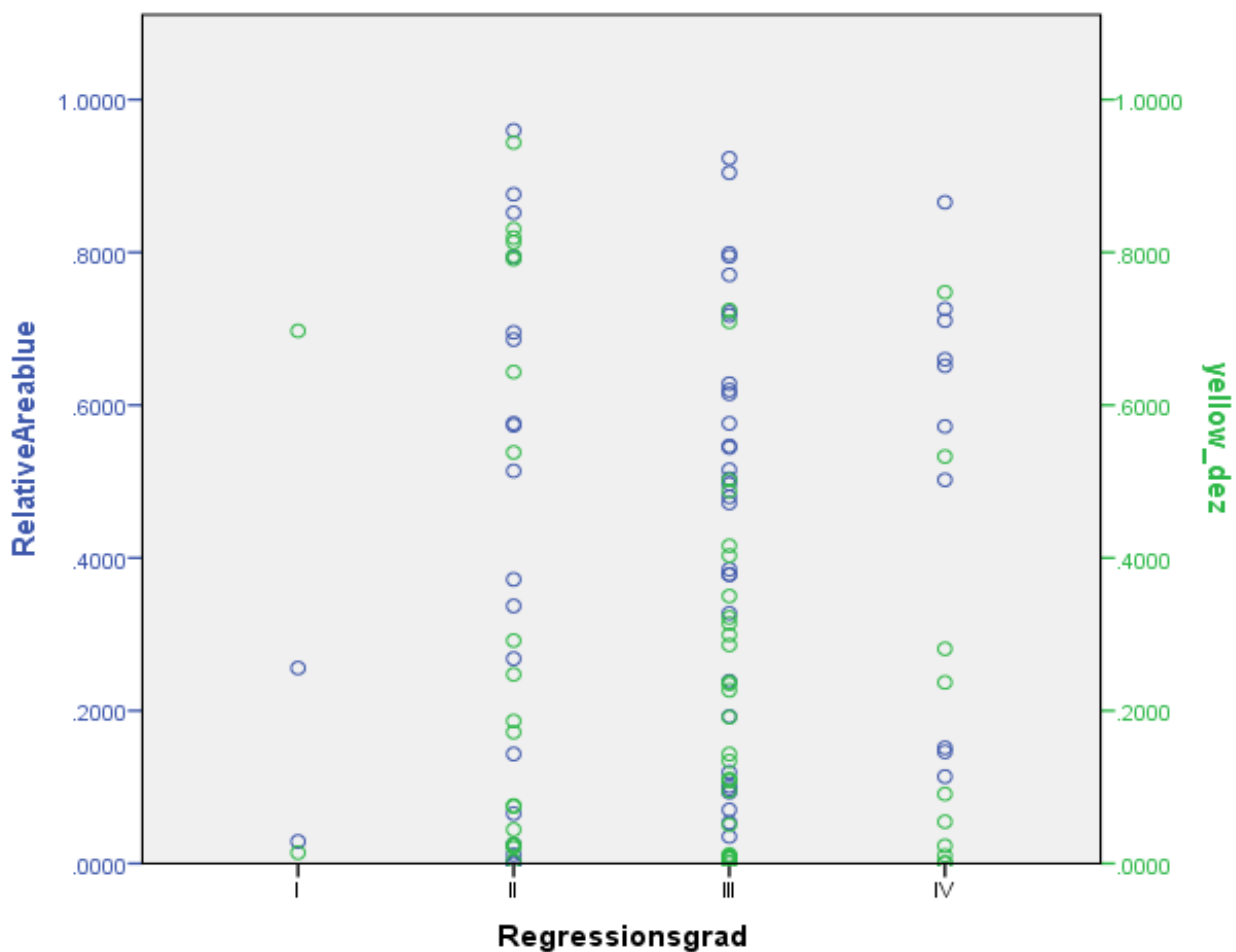


Abbildung 17 Streudiagramm: Niedrige Gelbanteile (d.h. muzinreich und kollagenarm) in der Movat Pentachromfärbung sind mit einem hohem Regressionsgrad (insbesondere Regressionsgrad III und IV) und geringer bis fehlender Tumorregression assoziiert, statistisch jedoch nicht signifikant.

4.3 Erstellen eines Regressionsgrades

Als Grundlage für die Erstellung einer eigenen TRG für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC dienten die histochemisch gefärbten Schnitte der 27 PDAC-Fälle mit ihren 3 Zonen (zentral, intermediär und peripher) sowie die in der Literatur vorbeschriebenen TRG (Tabelle 2). Die Reduktion vitaler Tumormasse (Abbildung 18) und regressive Veränderungen wie der Nachweis von Schleimseen, zytoplasmatischen Vakuolen und Nekrose-Arealen wurden notiert. Zudem wurde die Stromareaktion detailliert untersucht. Zunächst wurde jede Zone einzeln ausgewertet und für jede Zone ein separater Regressionsgrad erstellt. Später wurde für jeden Fall ein Gesamtgrad – in Form eines Mittelwerts - errechnet, der sich aus den einzelnen Regressionsgraden innerhalb eines Falls ergab. Das Ergebnis zeigt ein vierstufiges Graduierungssystem (Tabelle 8).

Tumorregressionsgraduierung für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC	
I	Keine vitalen Tumorzellen im Präparat
II	Eindeutig sichtbare Tumorreduktion, 20% vitale Tumorzellen
III	Sichtbare Tumorreduktion, >20 % vitale Tumorzellen
IV	Keine sichtbare Tumorreduktion, lediglich qualitative Veränderungen der Tumorzellen bzw. kein Effekt

Tabelle 8 TRG des neoadjuvant vorbehandelten PDAC

Die Prozentangaben von Tumorzellen und qualitativen Veränderungen bezogen sich auf die Gesamtgröße des Tumoralagers. Der Schwellenwert von 20% bzw. >20% vitaler Tumorzellen zwischen Regressionsgrad II und III wurde empirisch festgelegt, um unpräzise Bezeichnungen, wie beispielsweise „kleine Gruppen von Zellen“, zu vermeiden.

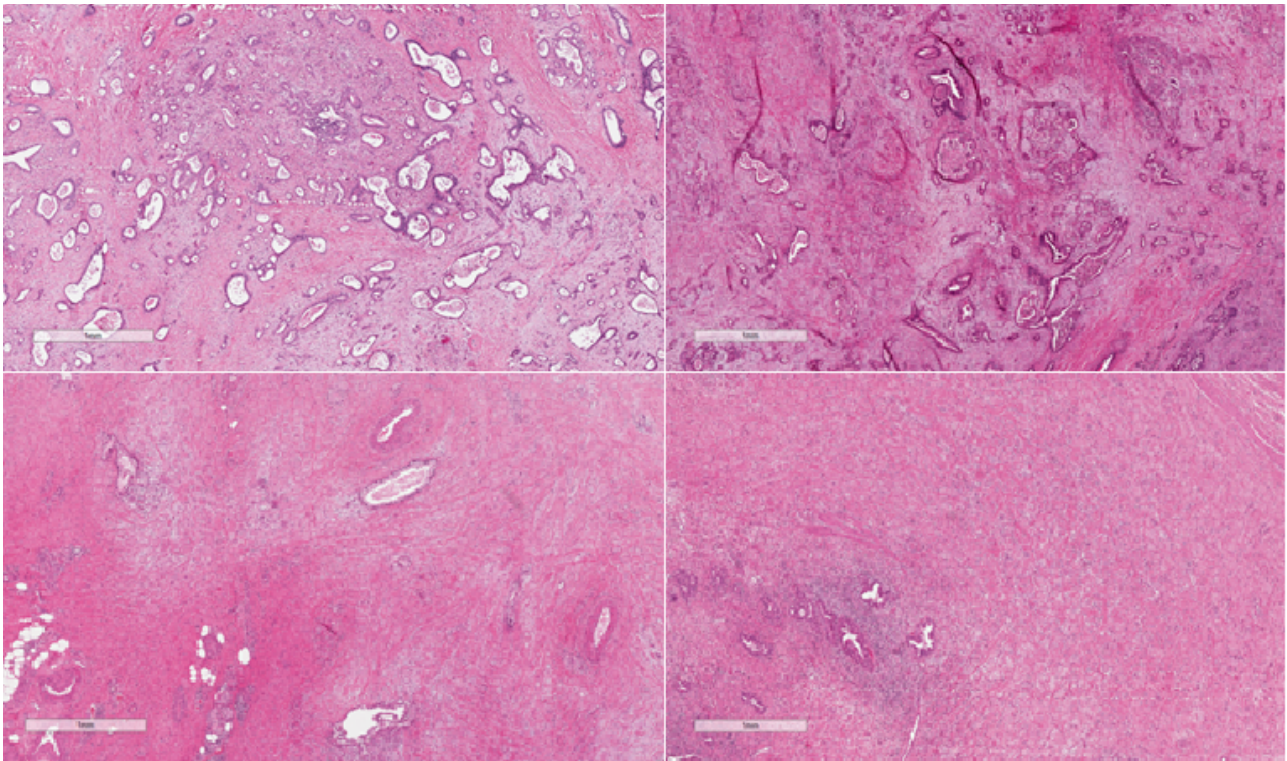


Abbildung 18 Spektrum der Regression: keine sichtbare Tumorregression (oben links), sichtbare Tumorregression = >20% vitale Tumorzellen (oben rechts), eindeutig sichtbare Tumorregression = 20% vitale Tumorzellen (unten links), keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar (unten rechts). HE Färbung

Für 15 (55%) von 27 Fällen ergab sich ein Gesamtgrad III. Gesamtgrad II ergab sich für 8 Fälle (30%) und Gesamtgrad IV für 4 Fälle (15%). Der Gesamtgrad I (komplette Regression) ergab sich für keinen Fall, jedoch waren in jeweils einer zentralen, intermediären und peripheren Zone der Fälle 8, 13 und 14 keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar. Eine komplette Übersicht der TRG für jeden Tumorschnitt und Fall mit entsprechenden Regressionsmerkmalen ist in Tabelle 9 dargestellt. Zur einfacheren und schnelleren Visualisierung sind die Regressionsgrade I-IV mit einem Farbcode – ähnlich einem Ampelschema - hinterlegt: grün (Grad I), gelb (Grad II), orange (Grad III) und rot (Grad IV).

Fall 1	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	IV vitale Tumorzellen 93%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	ca. 3%	ca. 3%	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	aktiv und unreif, stellenweise kollagenreichere Abschnitte	überwiegend aktiv, unreif, locker strukturiert	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreicher,	
	vitale Tumorzellen	100%	90%	90%	
	Tumorregression	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad IV	
Fall 2	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	<5% (azellulär)	-	-	IV vitale Tumorzellen 100%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	ca. 3%	ca. 5%	
	Nekrose	ca. 30%	ca. 30%	ca. 20%	
	Stroma	zellreich, extrem stromaarm	zellreich, extrem stromaarm	zellreich, extrem stromaarm	
	vitale Tumorzellen	100%	100%	100%	
	Tumorregression	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad IV	
Fall 3	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	<5% (teilweise von vitalen Tumorzellen umgeben)	-	<5% (avital)	III vitale Tumorzellen 60%
	zytoplasmatische Vakuolen	-	ca. 3%	ca. 2%	
	Nekrose	<5%	ca. 5%	ca. 15%	
	Stroma	um Tumorherde aktiv, kompakt peripher: reif, kollagenreich, locker	um Tumorherde: aktiv peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	kollagenreich, reif, kompakt	
	vitale Tumorzellen	70%	90%	20%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad II	
Fall 4	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	<5% (azellulär)	<5% (wenig vitale Tumorzellen)	-	IV vitale Tumorzellen 90%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 5%	ca. 5%	ca. 2%	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	überwiegend aktiv, unreif, locker, stellenweise kollagenreicher	um Tumorherde: aktiv peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreicher, kompakt	
	vitale Tumorzellen	90%	90%	90%	
	Tumorregression	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad IV	

Fall 5	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 50%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 5%	ca. 5%	ca. 10%	
	Nekrose	-	ca. 10%	-	
	Stroma	3 aktive, unreife Herde umgeben von kollagenreicherer Sklerose	überwiegend aktiv; peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	überwiegend aktiv, unreif; stellenweise von reifen Fasern durchzogen	
	vitale Tumorzellen	20%	60%	70%	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	
Fall 6	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 70%
	zytoplasmatische Vakuolen	-	ca. 3%	ca. 2%	
	Nekrose	-	-	ca. 10%	
	Stroma	um Tumorherde: aktives, kompaktes Stroma peripher: reifer	überwiegend aktiv, unreif; von reifen Anteilen durchzogen	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreicher	
	vitale Tumorzellen	70%	80%	60%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	
Fall 7	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	II vitale Tumorzellen 18%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	ca. 3%	-	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	aktives Stroma umgeben von reiferem, inaktivem	überwiegend aktiv, unreif, locker strukturiert	-	
	vitale Tumorzellen	15%	20%	-	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	Regressionsgrad II	-	
Fall 8	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	ca. 10% (avitale Tumorzellen)	II vitale Tumorzellen 10%
	zytoplasmatische Vakuolen	-	ca. 3%	ca. 1%	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	heterogenes Bild; Stroma überwiegend kompakt	überwiegend reif, kollagenreich, locker strukturiert	heterogenes Bild: aktives neben kollagenreichem Stroma	
	vitale Tumorzellen	0%	10%	20%	
	Tumorregression	Regressionsgrad I	Regressionsgrad II	Regressionsgrad II	

Fall 9	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	ca. 20% (avital)	II vitale Tumor- zellen 18%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 2%	ca. 3%	ca. 1%	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	überwiegend reif, kollagenreich und kompakt	überwiegend reif, kollagenreich, stellenweise aufgelockert	überwiegend reif, kollagenreich, kompakt, stellenweise locker	
	vitale Tumorzellen	15%	20%	20%	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	Regressionsgrad II	Regressionsgrad II	
Fall 10	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumor- zellen 63%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 5%	ca. 10%	ca. 5%	
	Nekrose	-	-	<5%	
	Stroma	überwiegend aktiv, unreif, locker strukturiert	überwiegend aktiv, unreif, stellenweise von reifen Fasern durchzogen	heterogenes Bild: aktives neben kollagenreichem Stroma	
	vitale Tumorzellen	60%	60%	70%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	
Fall 11	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	II vitale Tumor- zellen 20%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	ca. 5%	ca. 5%	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	aktives Stroma um Tumorherde peripher kollagenreicher, kompakt	um Tumorherde: aktiv peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	überwiegend aktiv, unreif, kompakt peripher: kollagenreicher	
	vitale Tumorzellen	15%	15%	30%	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	Regressionsgrad II	Regressionsgrad III	
Fall 12	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	<5% (wenig vitale Tumorzellen)	<5% (wenig vitale Tumorzellen)	-	III vitale Tumor- zellen 60%
	zytoplasmatische Vakuolen	<10%	<5%	-	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	überwiegend aktiv, unreif, locker strukturiert	überwiegend aktiv, unreif peripher: kompakter organisiert	-	
	vitale Tumorzellen	40%	80%	-	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	-	

Fall 13	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	II vitale Tumorzellen 12%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	ca. 3%	-	
	Nekrose	-	-	<5%	
	Stroma	heterogenes Bild, kompakt strukturiert	um Tumorherde aktiv peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	heterogenes Bild: aktives Stroma, peripher: kollagenreicher	
	vitale Tumorzellen	15%	20%	0%	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	Regressionsgrad II	Regressionsgrad I	
Fall 14	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	ca.10% (azellulär)	<5% (azellulär)	ca.10% (azellulär)	II vitale Tumorzellen 13%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 5%	-	-	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	aktives Stroma um Tumorherde peripher: kollagenreicher,	überwiegend reif, kollagenreich, locker strukturiert	überwiegend reif und kollagenreich	
	vitale Tumorzellen	20%	0%	20%	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	Regressionsgrad I	Regressionsgrad II	
Fall 15	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	<5% (wenig vitale Tumorzellen)	<5% (wenig vitale Tumorzellen)	<5% (wenig vitale Tumorzellen)	III vitale Tumorzellen 77%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 10%	ca. 10%	ca. 5%	
	Nekrose	<5%	ca. 10%	<5%	
	Stroma	überwiegend aktiv und unreif, locker strukturiert	um Tumorherde aktiv peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	überwiegend aktiv, locker peripher: kollagenreicher, kompakt	
	vitale Tumorzellen	80%	80%	70%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	
Fall 16	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 60%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 5%	ca. 3%	ca. 3%	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	überwiegend aktives Stroma stellenweise von kollagenreichem Stroma durchzogen	um Tumorherde aktiv peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	um Tumorherde aktiv, lockerperipher: kollagenreicher, kompakt	
	vitale Tumorzellen	70%	60%	50%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	

Fall 17	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	ca. 50% (mit vitalen Tumorzellen)	ca.15% (wenig vitale bis avitale Tumorzellen)	5% (wenig vitale bis avitale Tumorzellen)	III vitale Tumorzellen 43%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	ca. 3%	ca. 3%	
	Nekrose	ca. 5%	<5%	-	
	Stroma	überwiegend reif, kollagenreich, kompakt	um Tumorherde aktiv peripher: kollagenreicher, reifer, kompakt	reiferes, kollagenreiches Stroma überwiegt	
	vitale Tumorzellen	20%	70%	40%	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	
Fall 18	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	II vitale Tumorzellen 20%
	zytoplasmatische Vakuolen	-	-	-	
	Nekrose	ca. 2%	-	-	
	Stroma	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreich,	-	-	
	vitale Tumorzellen	20%	-	-	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	-	-	
Fall 19	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 77%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 5%	ca. 5%	ca. 5%	
	Nekrose	-	ca. 10%	<5%	
	Stroma	heterogenes Bild: aktives und reifes Stroma nebeneinander	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreich, reifer,	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreicher,	
	vitale Tumorzellen	90%	80%	60%	
	Tumorregression	Regressionsgrad IV	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	
Fall 20	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	II vitale Tumorzellen 20%
	zytoplasmatische Vakuolen	-	-	-	
	Nekrose	<5%	-	-	
	Stroma	um Tumorherde: aktiv peripher: kollagenreich, kompakt	-	-	
	vitale Tumorzellen	20%	-	-	
	Tumorregression	Regressionsgrad II	-	-	

Fall 21	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 37%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	ca. 3%	ca. 3%	
	Nekrose	<5%	<5%	-	
	Stroma	reifes, lockeres Stroma überwiegt, partiell aktiv um Tumorherde	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreich, reifer, kompakt	überwiegend aktiv, locker, dazwischen reifer und kompakt	
	vitale Tumorzellen	60%	30%	20%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	Regressionsgrad II	
Fall 22	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 45%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 10%	-	-	
	Nekrose	<10%	-	-	
	Stroma	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: reifer, kollagenreich, kompakt	-	tendenziell kollagenreich, reif, kompakt	
	vitale Tumorzellen	70%	-	20%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	-	Regressionsgrad II	
Fall 23	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	<10% (überwiegend azellulär bzw. avital)	-	<5% (azellulär)	IV vitale Tumorzellen 90%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	-	-	
	Nekrose	<5%	-	<5%	
	Stroma	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: reifer, kollagenreich, kompakt	-	überwiegend aktiv, unreif peripher: kollagenreicher und reifer	
	vitale Tumorzellen	90%	-	90%	
	Tumorregression	Regressionsgrad IV	-	Regressionsgrad IV	
Fall 24	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 70%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 2%	-	-	
	Nekrose	<5%	-	-	
	Stroma	um Tumorherde: aktiv, locker peripher: kollagenreich,	-	-	
	vitale Tumorzellen	70%	-	-	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	-	-	

Fall 25	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	<5% (azellulär)	-	<10% (azellulär/avital)	III vitale Tumorzellen 70%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 2%	-	ca. 10%	
	Nekrose	<5%	ca. 10%	ca. 15%	
	Stroma	überwiegend reif, kollagenreich, kompakt	überwiegend reif, kollagenreich, kompakt	überwiegend reif, kollagenreich, kompakt	
	vitale Tumorzellen	70%	60%	80%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	Regressionsgrad III	
Fall 26	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 50%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 3%	-	ca. 5%	
	Nekrose	ca. 10%	-	<5%	
	Stroma	überwiegend aktiv, kompakt, um Tumorherde: stellenweise reifer	-	heterogenes Bild, aktives und reifes Stroma	
	vitale Tumorzellen	80%	-	20%	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	-	Regressionsgrad II	
Fall 27	Kriterien	Zentral	Intermediär	Peripher	Gesamtgrad
	Schleimseen	-	-	-	III vitale Tumorzellen 60%
	zytoplasmatische Vakuolen	ca. 10%	-	-	
	Nekrose	-	-	-	
	Stroma	um Tumorherde: aktiv und locker peripher: kompakt, kollagenreich	-	-	
	vitale Tumorzellen	60%	-	-	
	Tumorregression	Regressionsgrad III	-	-	

Tabelle 9 Tabellarische Übersicht der TRG mit regressiven Merkmalen aller untersuchten Fälle

4.3.1 Proliferation (Ki67-Antigen) und Apoptose (TUNEL assay)

Die Analyse zum Nachweis proliferationsaktiver bzw. apoptotischer Tumorzellen (Ki67, TUNEL assay) wurde jeweils in 25/27 Fällen am zentralen Tumorschnitt durchgeführt (Appendix).

Die Wachstumsfraktion der 25 Fälle (100%) für den anti-Ki67 Antikörper lag zwischen min. 1,4% bis max. 48% pro Fall (Abbildung 19), mit einem Mittelwert von 23,3%. Das Expressionsmuster war in 21 Fällen (84%) mehrheitlich homogen. In 5 Fällen (20%) mit fehlender Tumorregression

(Regressionsgrad IV) wurde ein Mittelwert für die Wachstumsfraktion mit 22,3% errechnet. Für 12 Fälle (48%) mit sichtbarer Tumorregression (Regressionsgrad III) lag die Proliferationsrate im Mittel bei 31,7%. Für 8 Fälle (32%) mit einer eindeutig sichtbaren Tumorregression (Regressionsgrad II) in der zentralen Zone lag der Mittelwert für die Wachstumsfraktion bei 11,4%. Mittels dem Unpaired t-test konnte nachgewiesen werden, dass Fälle mit deutlich sichtbarer Tumorregression (Regressionsgrad II) signifikant weniger positiv gefärbte Ki67 Tumorzellen und somit eine geringere Wachstumsfraktion zeigten als Fälle mit weniger Regression bzw. fehlender Regression (Regressionsgrad III und IV zusammen; $p=0,004$, logistische Regression $p=0,017$; OR: 0,89 (95%-KI: 0,82-0,98)).

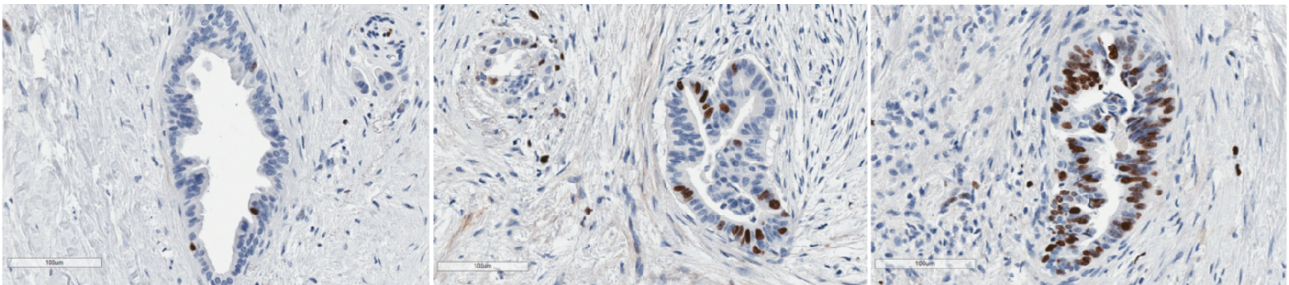


Abbildung 19 Darstellung unterschiedlich starker Expressionsraten von Ki67 in vitalen Tumorzellen

Für 25 Fälle (100%), gefärbt nach der TUNEL-Methode, zeigte sich ein homogenes Bild mit minimaler bis fehlender Apoptoserate (Abbildung 20). In 22 Fällen (88%) war eine Apoptoserate von min. 0,1% bis max. 1,4% nachweisbar. In 3 Fällen (12%) wurden keine apoptotischen Tumorzellen detektiert. Der Mittelwert lag für die 25 Fälle bei 0,4%. Aufgrund der geringen bis fehlenden Apoptoserate wurde auf eine weitere statistische Auswertung der TUNEL-Färbung verzichtet.

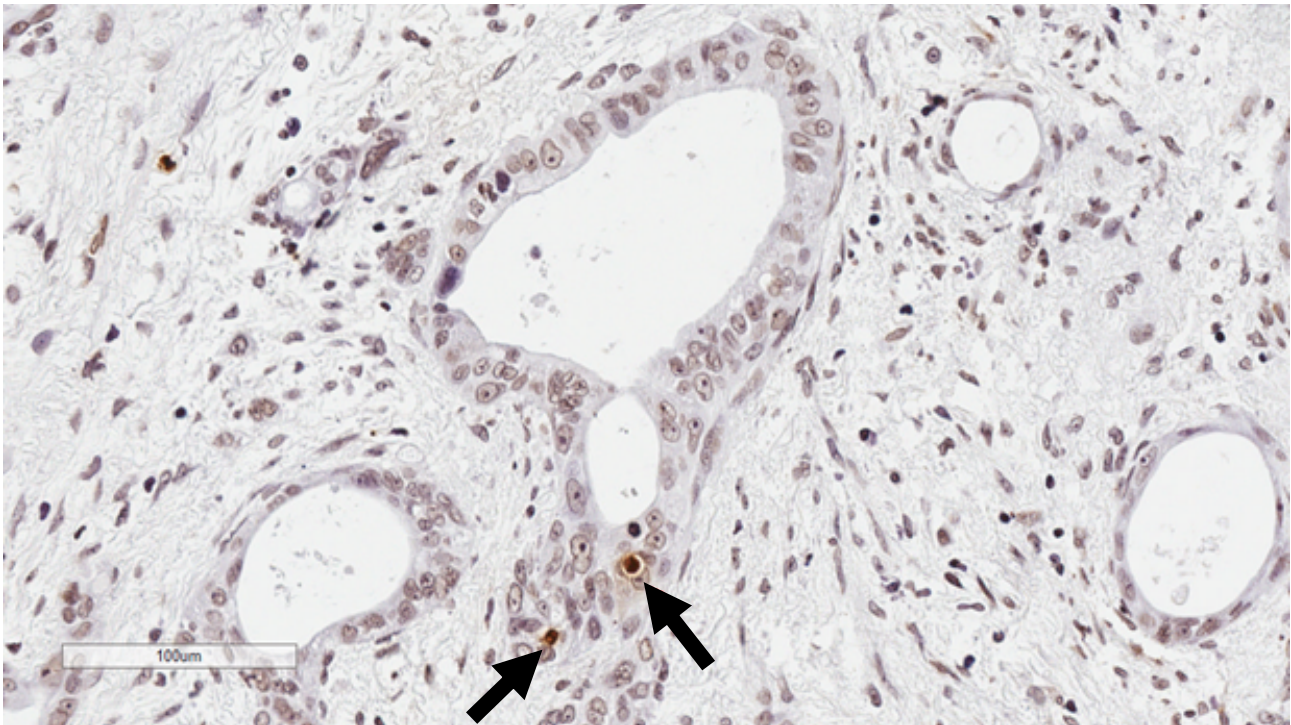


Abbildung 20 Dargestellt ist eine Tumorerkrankung mit zwei nach der TUNEL-Methode gefärbten, apoptotisch geschrumpfte Zellen (pfeilmarkiert).

4.3.2 Charakterisierung der Stromareaktion mittels α -Glattmuskelaktin (α -SMA)

Neoadjuvant vorbehandeltes PDAC-Gewebe von 27 Fällen (100%) wurde gegen den Antikörper α -SMA gefärbt. Für die Auswertung standen 27 zentrale und 19 periphere Tumorschnitte (Appendix) zur Verfügung. In allen 27 Fällen (100%) kam die Hauptlokalisation peritumoral zur Darstellung. Insbesondere Fälle mit fehlender Regression (Regressionsgrad IV) präsentierten zudem ein diffuses Expressionsmuster mit 3+ Häufigkeit (Abbildung 21). Für Fälle mit nachweisbarer Regression (Regressionsgrad III und II) wurden visuell eine tendenzielle Abnahme der Häufigkeit (2+ bis 1+) sowie eine zunehmende Konzentrierung der peritumoralen Lokalisation beobachtet (Abbildung 22 und 23). Insgesamt imponierten die Tumorschnitte innerhalb eines Falls überwiegend homogen.

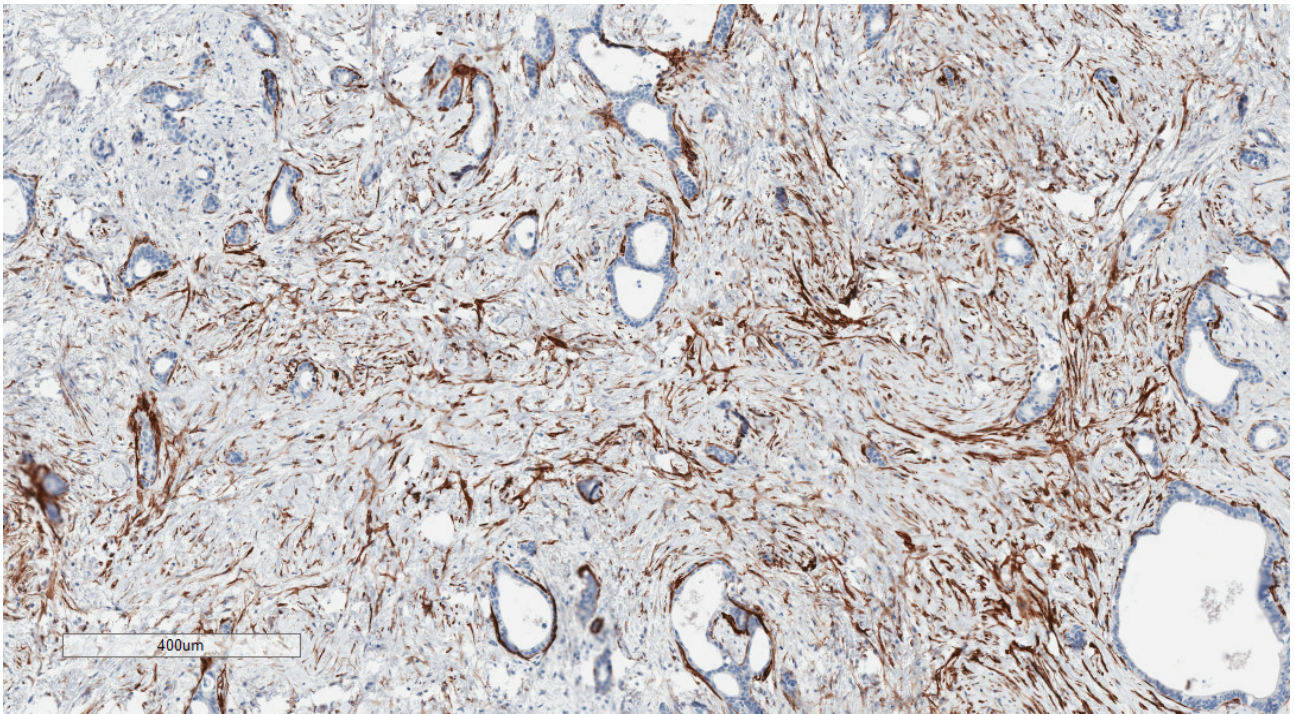


Abbildung 21 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der –SMA Färbung. Der Tumor weist keine Zeichen der Regression auf. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 3+ Häufigkeit und diffusem Expressionsmuster.

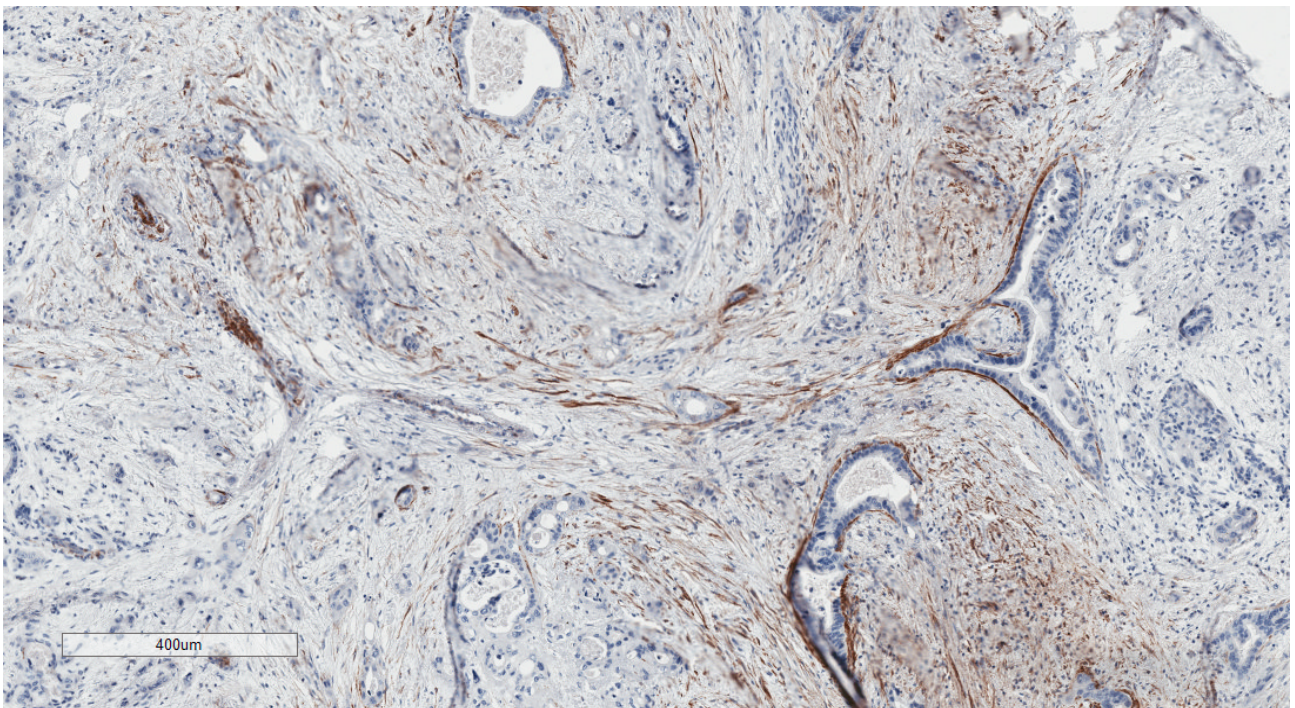


Abbildung 22 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der –SMA Färbung. Der Tumor weist Zeichen der Regression auf. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 2+ Häufigkeit und diffus, fokal akzentuiertem Expressionsmuster.

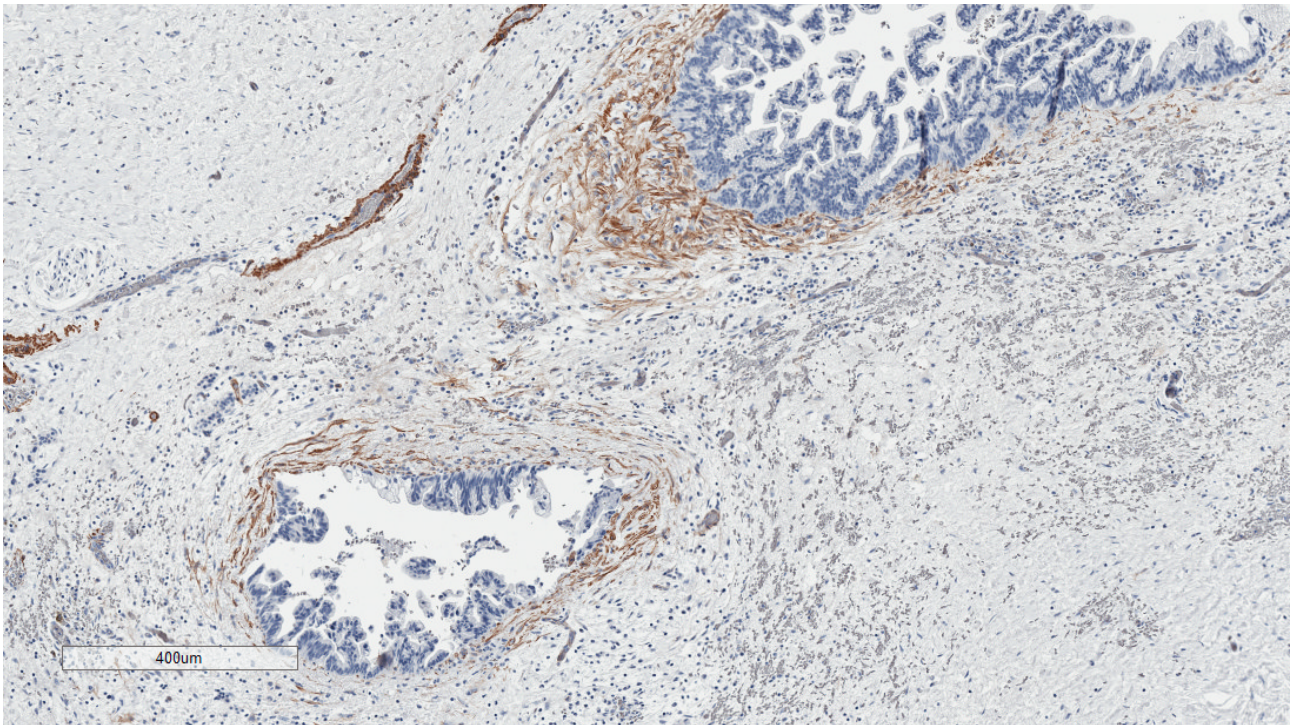


Abbildung 23 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der α -SMA Färbung. Der Tumor weist deutliche Zeichen einer Regression auf. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 2+ Häufigkeit und fokalem Expressionsmuster.

4.3.3 Charakterisierung der Stromareaktion mittels Tenascin C

Neoadjuvant vorbehandeltes PDAC-Gewebe von 27 Fällen (100%) wurde gegen den Antikörper Tenascin C gefärbt. Für die Auswertung standen 27 zentrale und 21 periphere Tumorschnitte (Appendix) zur Verfügung. In 22 Fällen (81%) dominierte eine diffuse Expression. Eine peritumorale Lokalisation war in allen 27 Fällen in mindestens einem Tumorschnitt nachweisbar (Abbildung 24). Visuell zeigte sich einerseits die Abnahme von Häufigkeit der peritumoralen Lokalisation bei zunehmender Tumorregression, andererseits zeigte sich bei erfolgter Tumorregression eine nachweisbare Persistenz von diffus darstellbarer Matrix in abgeschwächter Häufigkeit (Abbildung 25).

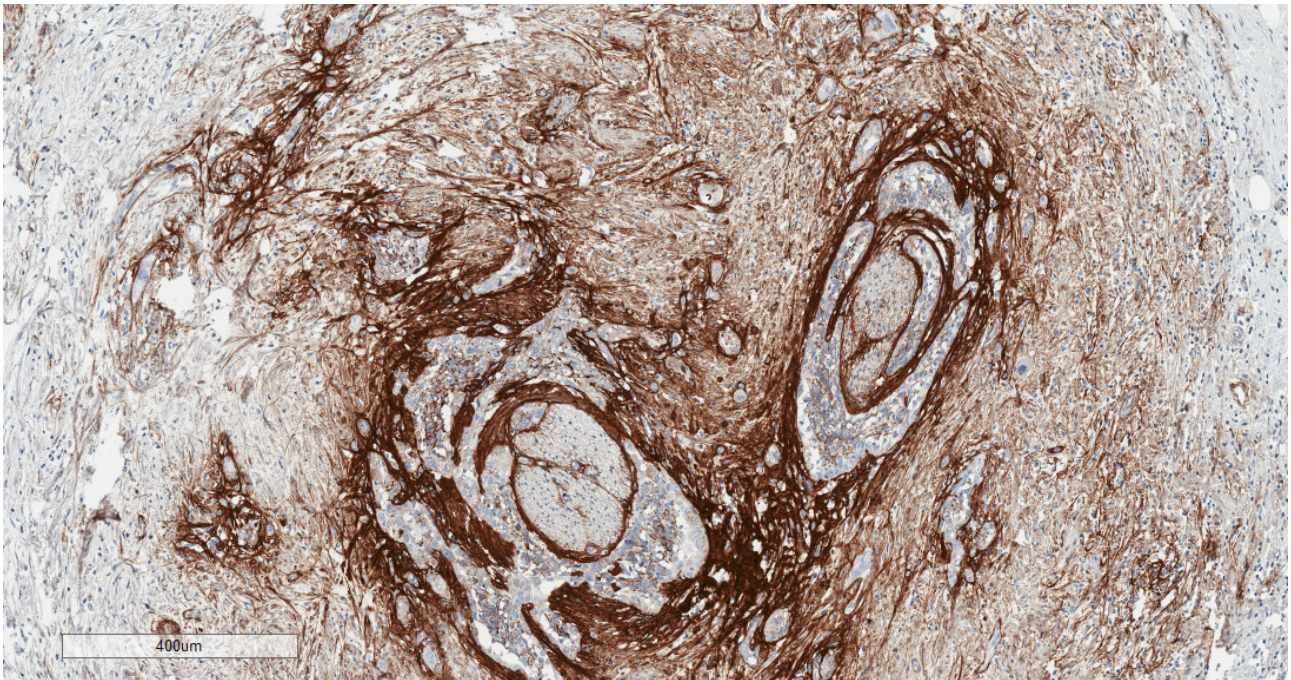


Abbildung 24 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der Tenascin C Färbung. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 2+ Häufigkeit und diffus, periläsional akzentuiertem Expressionsmuster.

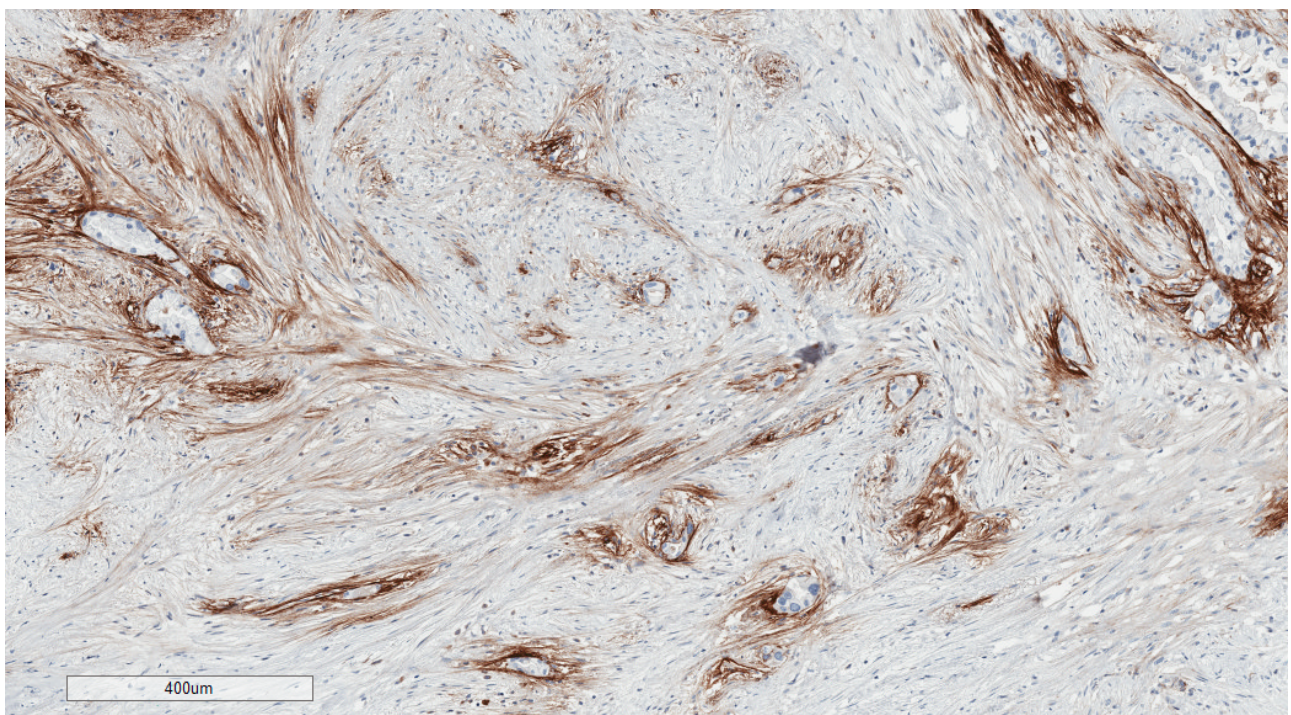


Abbildung 25 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der Tenascin C Färbung. Sichtbare Abnahme von Häufigkeit der peritumoralen Lokalisation mit zunehmender Regression. Für Areale mit stattgefundenener Tumorregression zeigt sich eine diffuse, reduzierte Anfärbung der Matrix.

4.3.4 Charakterisierung der Stromareaktion mittels SPARC

Neoadjuvant vorbehandeltes PDAC-Gewebe von 27 Fällen (100%) wurde gegen den Antikörper SPARC gefärbt. Für die Auswertung standen 27 zentrale und 20 periphere Tumorschnitte (Appendix) zur Verfügung. In allen 27 Fällen (100%) dominierte ein diffuses Expressionsmuster (Abbildung 26). Die Hauptlokalisierung peritumoral kam in allen 27 Fällen (100%) zur Darstellung und präsentierte sich im Durchschnitt mit 2+ Häufigkeit. Innerhalb eines Falls präsentierten sich die Tumorschnitte bezüglich Hauptlokalisierung, Häufigkeit und Expressionsmuster weitgehend homogen. Eine zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen wurde regelhaft beobachtet.

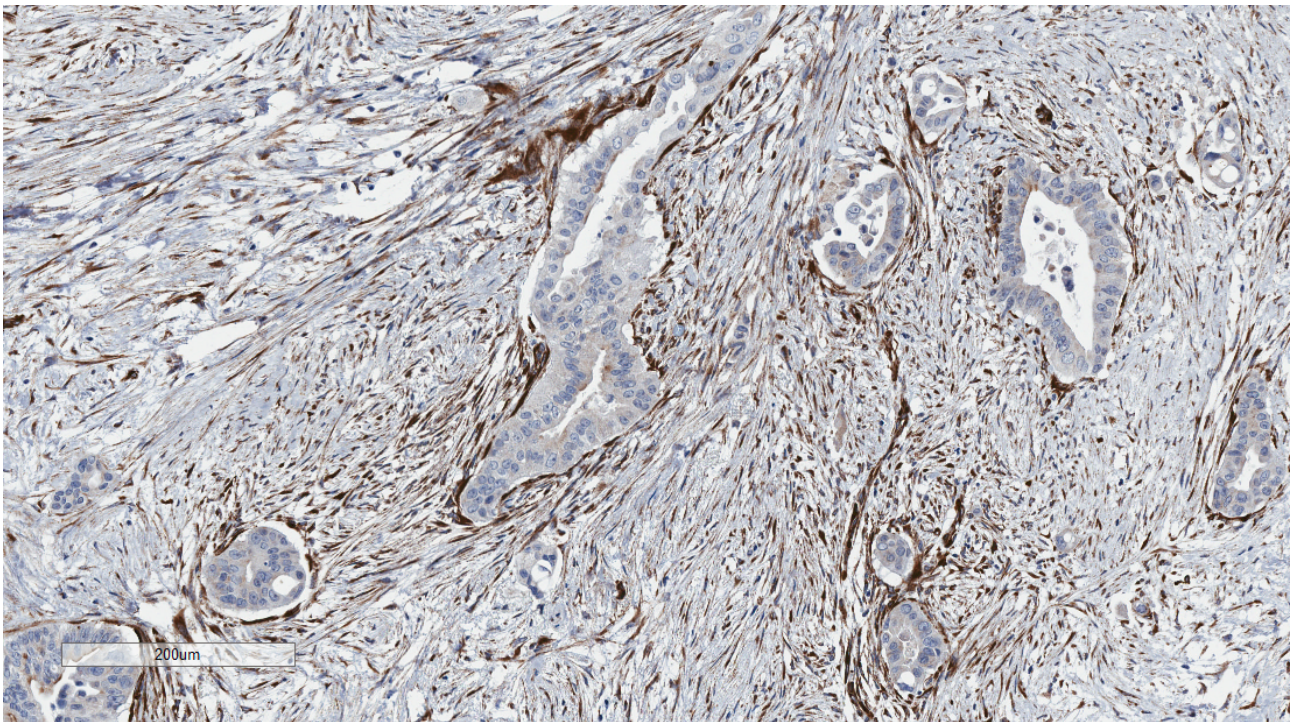


Abbildung 26 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der SPARC Färbung. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix mit 3+ Häufigkeit und prominent diffusem Expressionsmuster. Eine leichte zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen ist sichtbar.

4.3.5 Charakterisierung der Stromareaktion mittels NT-3

Neoadjuvant vorbehandeltes PDAC-Gewebe von 27 Fällen (100%) wurde gegen den Antikörper NT-3 gefärbt. Für die Auswertung standen 27 zentrale und 21 periphere Tumorschnitte

(Appendix) zur Verfügung. In allen 27 Fällen kam die Hauptlokalisierung peritumoral, mit 1+ bis 2+ Häufigkeit in 25 Fällen (93%) und in 2 Fällen (7%) mit 3+ Häufigkeit, zur Darstellung (Abbildung 27). Kollagenreichere Fibrose-Areale kamen zudem in 13 Fällen (48%) zur Darstellung. Die 27 Fälle präsentierten sich innerhalb ihres Falls weitgehend homogen. Zwischen den Fällen zeigte sich jedoch eine Heterogenität in Bezug auf die Merkmale Häufigkeit und Expressionsmuster. Eine visuelle Korrelation zwischen Expressionseigenschaften und Regression konnte nicht ermittelt werden. Eine intrazytoplasmatische Färbung von Tumorzellen kam in unterschiedlich starker Ausprägung regelhaft zur Darstellung.

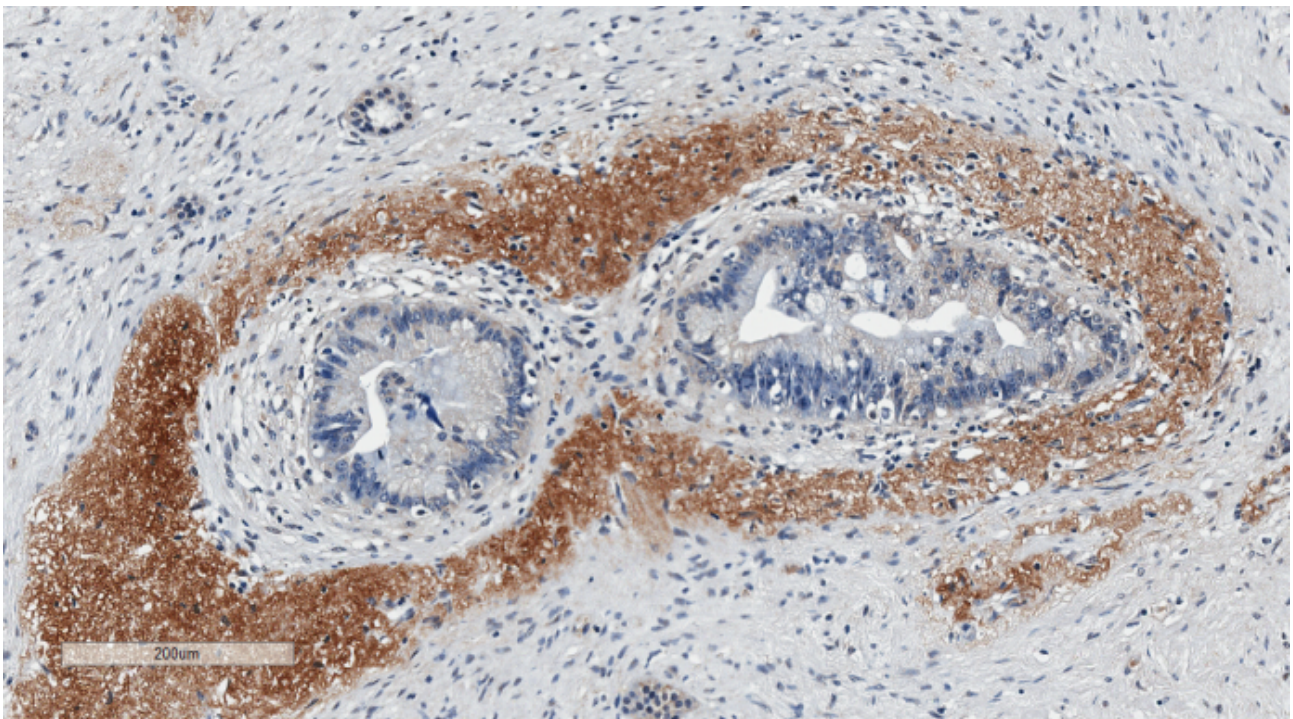


Abbildung 27 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der NT-3-Färbung. Peritumorale Lokalisation von PCS/Matrix mit 2+ Häufigkeit und fokalem Expressionsmuster. Eine schwache zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen ist sichtbar.

4.3.6 Charakterisierung der Stromareaktion mittels α -Crystallin B

Neoadjuvant vorbehandeltes PDAC-Gewebe von 26 der 27 zentralen Tumorschnitten wurde gegen den Antikörper α -Crystallin B gefärbt (Appendix). In 5 Fällen (19%) kam keine PSC/Matrix zur Anfärbung. Innerhalb der verbliebenen 21 zentralen Tumorschnitten (81%) zeigte sich in 12 Fällen (46%) ein diffuses, nicht peritumorales Expressionsmuster mit 1+ und 2+ Häufigkeit in je der

Hälfte der Fälle (Abbildung 28). In 9 Fällen (35%) zeigte sich ein fokales, nicht peritumorales Expressionsmuster mit 1+ Häufigkeit. Eine zytoplasmatische Färbung von Tumorzellen wurde regelhaft beobachtet. Im Unterschied zu den Färbungen -SMA, SPARC, Tenascin C und NT-3 kam in der -Crystallin B Färbung in keinem Fall die Lokalisation peritumoral zur Darstellung. Aufgrund der geringen Aussagekraft der Färbung in den zentralen Tumorschnitten wurde auf eine Färbung der peripheren Tumorschnitte verzichtet.

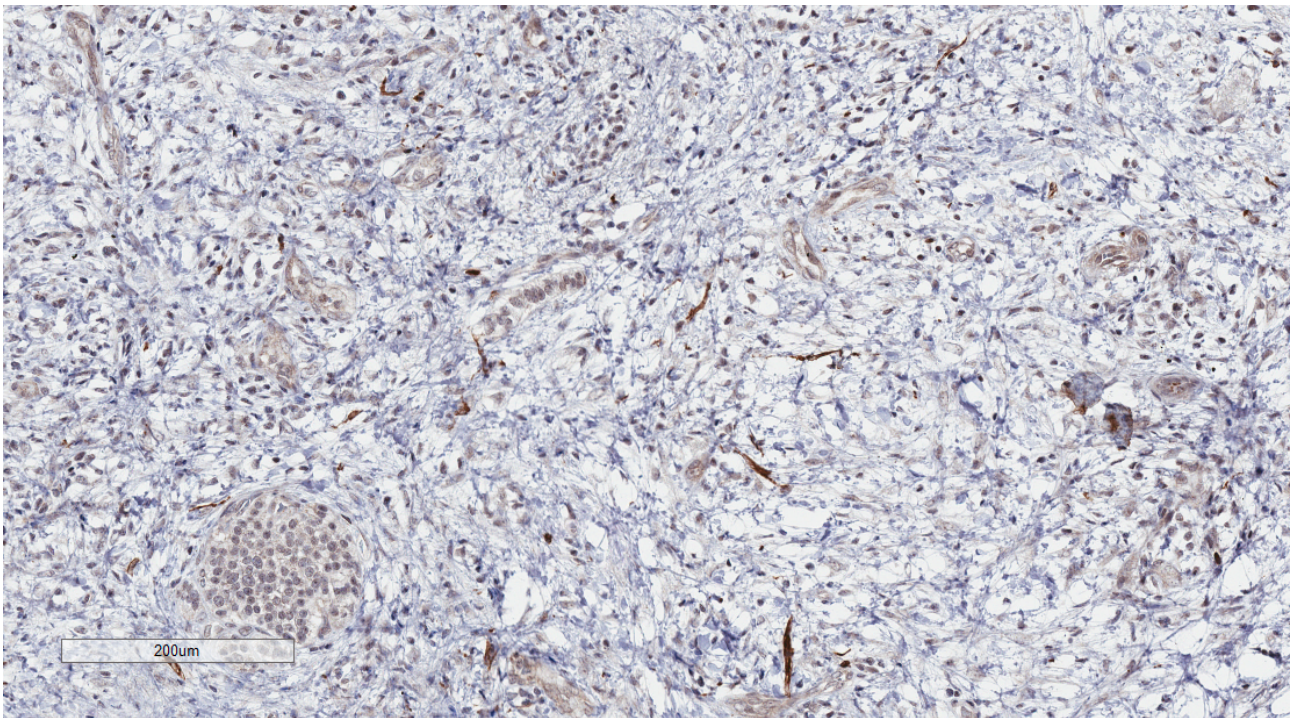


Abbildung 28 Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der -Crystallin B Färbung. Ein diffuses, nicht periläsionales Expressionsmuster ist erkennbar. Vereinzelt sind Zellen (PSC) in der Fibrose von geringer Häufigkeit und diffusem Expressionsmuster nachweisbar.

4.3.7 Vergleich prä- versus posttherapeutische Befunde

Von 27 Fällen (100%) konnten 5 prätherapeutische Gewebebiopsien (19%) untersucht werden. Das Biopsiematerial wurde mittels HE, Tenascin C, Ki67, SPARC und Movat Pentachromfärbung gefärbt (Tabelle 10). Für die Auswertung stellte das mengenmäßig geringe Biopsiematerial einen limitierenden Faktor dar.

Regressionsgrad (z)	Fall Biopsie	Tenascin C	Ki67	SPARC	Movat
6	III	peritumoral 2+, diffus, fokal akzentuiert	28,90%	peritumoral 2+, diffus	blau: 72,18%, gelb: 0,65%
	Biopsie	peritumoral 3+, diffus, fokal akzentuiert	21,40%	peritumoral 3+, diffus	blau: 48,29%, gelb: 4,73%
8	I	fokal in der Fibrose 3+	keine vitalen Tumorzellen	diffus in der Fibrose 3+	nicht auswertbar
	Biopsie	peritumoral 2+, diffus, fokal akzentuiert	nicht auswertbar	peritumoral 1+, diffus	blau: 57,28%, gelb: 1,16%
9	II	peritumoral 1+, diffus in der Fibrose 3+	5,20%	peritumoral 3+, diffus in der Fibrose 2+	blau: 2,52%, gelb: 79,52%
	Biopsie	peritumoral 3+, diffus, fokal akzentuiert	41,00%	peritumoral 3+, diffus	blau: 37,98%, gelb: 7,82%
16	III	peritumoral 2+, diffus, fokal akzentuiert	21,30%	peritumoral 3+, diffus	blau: 50,39%, gelb: 22,67%
	Biopsie	nicht auswertbar	11,20%	peritumoral 1+, diffus	nicht auswertbar
20	II	peritumoral 1+, diffus, fokal akzentuiert	1,40%	peritumoral 1+, diffus	nicht auswertbar
	Biopsie	peritumoral 3+, diffus, fokal akzentuiert	nicht auswertbar	peritumoral 3+, diffus	blau: 17,68%, gelb: 2,63%

Tabelle 10 Prä- versus Post-Therapie-Vergleich mit Markern der Immunhistochemie (Tenascin C, Ki67, SPARC) und Movat Penatachromfärbung

In der HE-Färbung zeigte sich für alle 5 prätherapeutischen Gewebe-biopsien das Bild eines invasiven PDAC mit teilweise reichlich anhängendem peripankreatischem Fettgewebe. Alle 5 posttherapeutischen zentralen Tumorschnitte zeigten eine Abnahme an vitalem Tumorgewebe von unterschiedlichem Ausmaß. Für Tenascin C zeigte sich übereinstimmend eine Abnahme der Häufigkeit der peritumoralen Lokalisation aller 4 auswertbaren Biopsien gegenüber dem posttherapeutischen Befund (Abbildung 29). Für die Ki67-Antigen Färbung zeigte sich in 1 von 3 Fällen eine prozentuale Abnahme gefärbter Tumorzellen und in zwei Fällen eine Zunahme von Ki67 positiv gefärbten Tumorzellen. Im Mittel lag die Wachstumsfraktion der Karzinomzellen in der Biopsie bei 24,5%. Für die SPARC Färbung zeigte sich im prä- versus posttherapeutischen Vergleich für 1 Fall kein Unterschied, für je 2 Fälle eine Zu- bzw. Abnahme bezüglich der Häufigkeit und Lokalisation. In der Movat Pentachromfärbung zeigte sich für 4 auswertbare Biopsien eine dominierende aktive blaue Grundsubstanz von lockerer Struktur (Mittelwert

Blauanteil 40,31% versus Mittelwert Gelbanteil 4,09%). Aufgrund von fehlendem Vergleichsmaterial in 3 Fällen war eine genauere Analyse der Movat Pentachromfärbung nicht möglich.

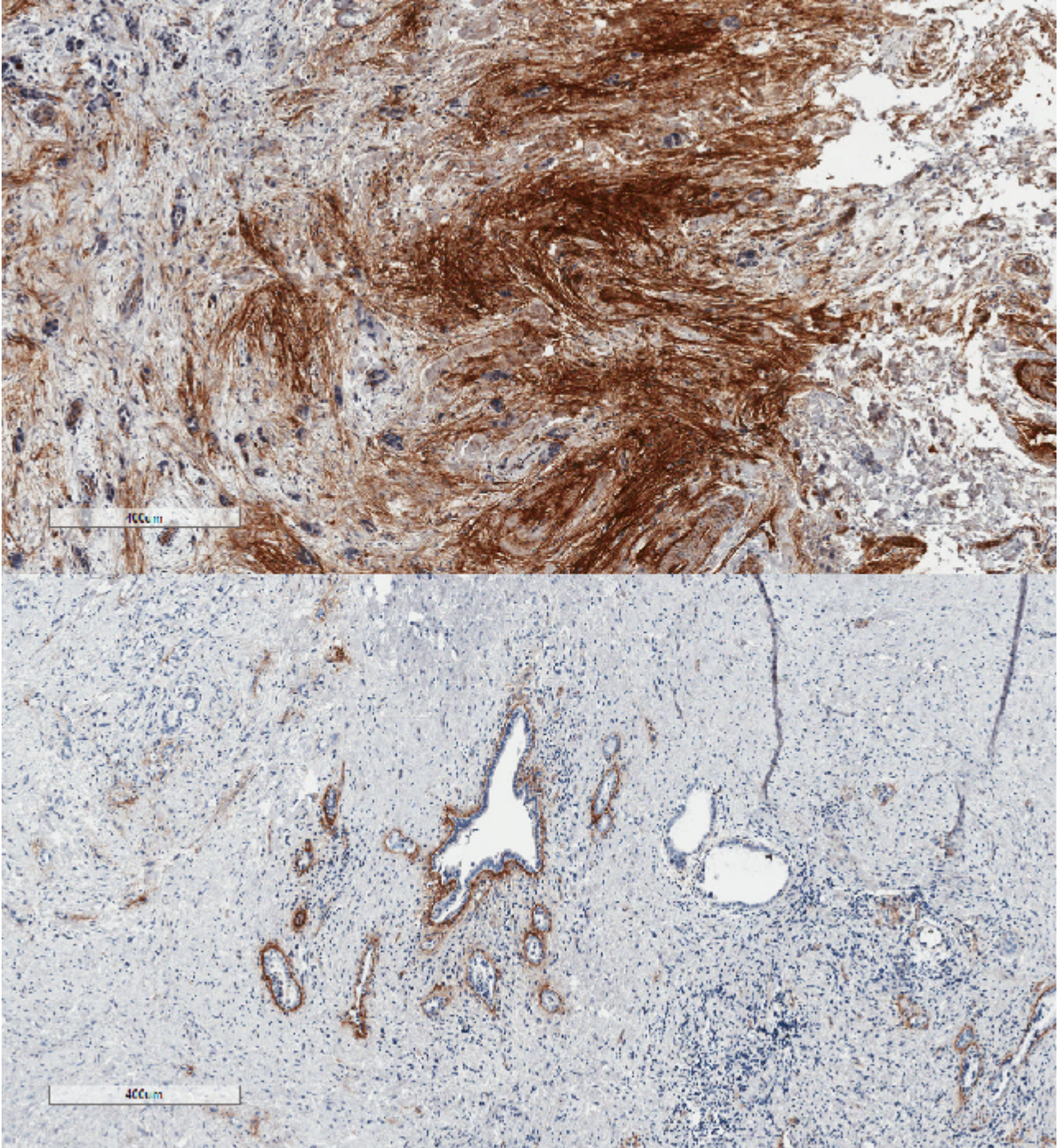


Abbildung 29 Ausschnitt einer prätherapeutischen Gewebebiopsie (oben) mit der Tenascin C Färbung mit 3+ Häufigkeit der peritumoralen Lokalisation und diffusem Expressionsmuster. Im posttherapeutischen Vergleich (unten) zeigt sich mit 1+ Häufigkeit eine deutliche Abnahme der peritumoralen Lokalisation.

4.3.8 Vergleich neoadjuvant vorbehandeltes PDAC versus therapienaives PDAC

PDAC-Gewebe von 10 therapienaiven PDAC-Fällen wurde HE und Movat Pentachrom sowie mit Antikörpern gegen -SMA, Tenascin C, SPARC, NT-3 und -Crystallin B gefärbt und ausgewertet (Appendix). In der HE-Färbung war in allen 10 Fällen prominent vitaler Tumor im Präparat nachweisbar. Nekrose, anteilig zwischen <5%-<10% bezogen auf die Tumormasse, wurde in 9 Fällen (90%) nachgewiesen. Zytoplasmatische Vakuolen waren mit einem Anteil von ca. 3%-5% in 10 Fällen (100%) darstellbar. Schleimseen waren für therapienaive Fälle nicht nachweisbar. In der Movat Pentachromfärbung dominierte visuell blaue Grundsubstanz bzw. überwog der Anteil blauer Grundsubstanz in einem heterogenen Stroma. Desmoplastisches Stroma war in allen 10 Fällen nachweisbar. In der Software-gestützten morphometrischen Analyse der Movat Pentachromfärbung lag der Mittelwert des Blauanteils bei 55,34%, der Mittelwert des Gelbanteils bei 8,60%.

In der -SMA-Färbung zeigte sich in 8 Fällen (80%) ein diffuses Expressionsmuster. Die Färbung war in 10 Fällen peritumoral lokalisiert mit einer 1+, 2+ und 3+ Häufigkeit von je ca. 1/3. In der Tenascin C Färbung imponierte in 6 Fällen (60%) ein diffuses Expressionsmuster und in 4 Fällen (40%) ein fokales Expressionsmuster. Eine peritumorale Darstellung zeigte sich für alle Fälle, davon in 3+ Häufigkeit für 7 Fälle (70%), einer 2+ Häufigkeit für 2 Fälle (20%) und einer 1+ Häufigkeit für einen Fall (10%). In der SPARC Färbung zeigte sich für alle 10 Fälle ein diffuses und peritumorales Expressionsmuster. Für alle 10 Fälle zeigte sich in der NT-3 Färbung ein fokales Expressionsmuster. In der -Crystallin B Färbung kam die Lokalisation peritumoral nicht zur Darstellung. Für 8 Fälle (80%) konnte die Anfärbung einzelner PSC beobachtet werden.

Unterschiede bezüglich Hauptlokalisation, Häufigkeit und Expressionsmuster therapienaiver Fälle versus neoadjuvant vorbehandelter Fälle mit fehlender Regression ergaben sich in den immunhistochemischen Färbungen nicht.

5 Diskussion

Neoadjuvante Therapien finden in der Situation des lokal fortgeschrittenen bzw. nicht resektablen PDAC zunehmend Einsatz [Heinemann et al., 2013, Katz et al., 2008]. Durch die verstärkte Anwendung einer neoadjuvanten Therapie werden Pathologen zunehmend mit der Herausforderung, Therapieeffekte und Response exakt zu beurteilen, konfrontiert [Hartman et al., 2012, Verbeke et al., 2015, Wittekind et al., 2012]. Hilfestellung für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC bieten TRG von Ishikawa und Kollegen [Ishikawa et al., 1989], Evans und Kollegen [Evans et al., 1992], CAP [Washington et al., 2013], Chatterjee und Kollegen [Chatterjee et al., 2012] sowie White und Kollegen [White et al., 2005]. Ein optimales System mit prognostischer Bedeutung fehlt jedoch bis heute [Chatterjee et al., 2012]. Regressive Schädigungen sind schwer zu quantifizieren, ferner sind Wertigkeit und Relevanz regressiver Merkmale unklar bzw. strittig [Hartman et al., 2012, Verbeke et al., 2015]. Beispielsweise werteten White und Kollegen neben einer hohen Tumorlast auch den Nachweis von Nekrose im neoadjuvant vorbehandelten Präparat als schlechten Prognosefaktor [White et al., 2005]. Evans und Kollegen hingegen sahen in der Nekrose kein verlässliches Regressionskriterium, da Nekrose auch im therapienaiven PDAC nachweisbar sei [Evans et al., 1992]. Die Beobachtung von Evans konnte in dieser Arbeit durch einen Vergleich mit therapienaivem PDAC-Gewebe bestätigt werden. Ursächlich für dieses überlappende Phänomen wird der zytopathische Effekt mit der Noxe Ischämie verantwortlich gemacht. Eine hervorgerufene Gewebeschädigung (Nekrose) kann Folge einer neoadjuvanten Therapie (direkte zytotoxische Effekte und/oder therapieinduzierte Ischämie), aber auch direkt tumorassoziiert aufgrund einer insuffizienten vaskulären Versorgung bei rasantem Tumorwachstum sein. Die Schwierigkeit besteht histopathologisch in der Zuordnung der möglichen Ursache zum gleichen Endergebnis, der Nekrose [Hartman et al., 2012]. Bei neoadjuvant vorbehandelten Adenokarzinomen werden weiter auch zytoplasmatische Vakuolen [Becker et al., 2003, Srigley et al., 2012] und Schleimseen [Evans et al., 1992, Shia et al., 2011] im Sinne regressiver Veränderungen beobachtet. In eigenen Untersuchungen waren zytoplasmatische Vakuolen wiederum sowohl in therapienaiven als auch in neoadjuvant vorbehandelten Fällen nachweisbar. Somit handelt es sich hier im Fall des PDAC ebenfalls nicht um ein exklusives neoadjuvantes

Merkmal und stellt die Bedeutung dieses Merkmals im Sinne der Response in Frage. Schleimseen hingegen wurden als exklusives Merkmal lediglich im neoadjuvant vorbehandelten PDAC beobachtet. Einen signifikanten Einfluss auf die Prognose beim Nachweis von Schleimseen beim neoadjuvant vorbehandelten Rektumkarzinom konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [Shia et al., 2011]. Ein weiteres Merkmal der Tumorregression ist eine Fibrosierung des Tumorgewebes [Becker et al., 2003, Sethi et al., 2012]. Allerdings ist es rein morphologisch sehr schwierig, die Karzinom assoziierte Fibrose (Desmoplasie) von Therapie induzierter Fibrose makro- oder mikroskopisch zu unterscheiden, bzw. räumlich präzise abzugrenzen, so dass das Tumoralter nach durchgeführter neoadjuvanter Therapie nicht eindeutig definierbar und somit auch nicht messbar ist [Hartman et al., 2012, Verbeke et al., 2015]. Ein erstes Ziel dieser Arbeit war, die Stromareaktion des neoadjuvant vorbehandelten PDAC zu charakterisieren und mit der Stromadesmoplasie zu vergleichen, um eventuelle spezifische Eigenschaften der Regression zu identifizieren, als Hilfestellung für das Herausarbeiten einer neuen TRG. Hierfür wurde neben der HE- und PAS-Alcian-Färbung speziell die Movat Pentachromfärbung verwendet sowie 7 immunhistochemische Färbungen, die entweder als Marker für Karzinom assoziierte Fibroblasten (-Crystallin B, -SMA, NT-3, SPARC, Tenascin C) oder als Marker für proliferationsaktive bzw. apoptotische Tumorzellen (Ki67, TUNEL assay) gelten.

Es ist bekannt, dass die desmoplastische Stromareaktion durch ein zell- und grundsubstanzreiches Bindegewebe charakterisiert ist [Theocharis et al., 2000]. Speziell der Muzinkomponente Hyaluron werden Eigenschaften wie Malignität und Resistenz in Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu fördern, zugesprochen [Toole et al., 2008]. In eigenen Analysen war ein erhöhter Blauanteil im therapienaiven PDAC mit dominierender aktiver blauer Grundsubstanz von lockerer Struktur nachweisbar. Durch den Einsatz der Movat Pentachromfärbung ist es möglich, die Bindegewebskomponenten Grundsubstanz und reifes Kollagen mit den Farben Blau und Gelb zu unterscheiden. Diese Visualisierung bietet den Vorteil einer optischen anteilmäßigen Differenzierung, die quantifiziert werden kann. Mittels der in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen konnte ein tendenzieller Zusammenhang hoher Blauanteile von lockerer Struktur (grundsubstanzreich) mit fehlender bzw. geringer

Regression gegenüber hohen Gelbanteilen von kompakter Struktur (kollagenreich) mit deutlicher Tumorregression aufgezeigt werden. Der Umstand einer fehlenden statistischen Signifikanz dürfte auf die geringe Anzahl an untersuchten Gewebeprobe zurückzuführen sein. Nichtsdestotrotz lassen diese Erkenntnisse die Vermutung zu, dass ein (hoher) Blauanteil für vitales Tumorgewebe spricht. Insbesondere bei spärlichen Tumorresten besteht die Herausforderung vitale Tumorzellen zu identifizieren [Hartman et al., 2012]. Die Movat Pentachromfärbung könnte zukünftig einen wertvollen Beitrag zur sicheren Detektion spärlichen vitalen Tumorgewebes leisten und somit die exakte Beurteilung einer Tumorregression erleichtern. Eine sichere Unterscheidung zwischen einer präexistenten Fibrose und einer Therapie induzierten Fibrose [Chatterjee et al., 2013] konnte mittels Movat Pentachromfärbung nicht gewährleistet werden (Abbildung 30).

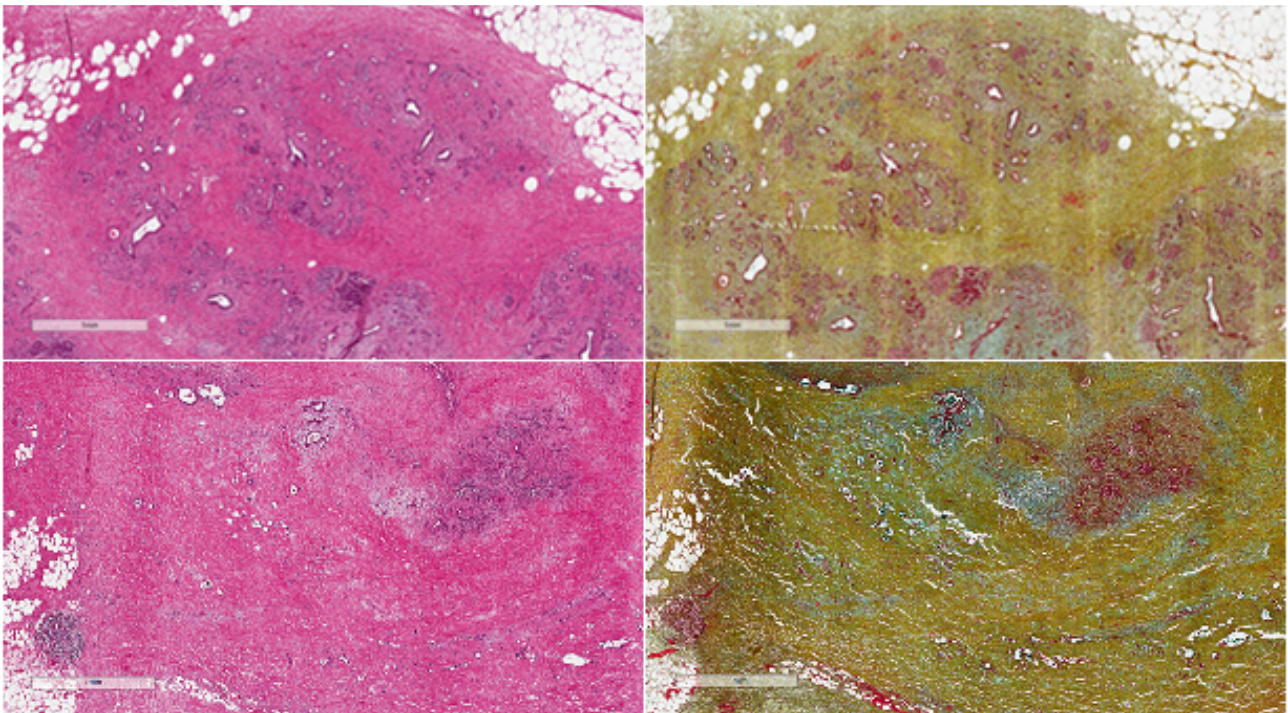


Abbildung 30 Ergänzend zur HE-Färbung (links) kann die Movat Pentachromfärbung (rechts) zusätzliche Informationen über das Bindegewebe geben. Bläuliches Gewebe in der Movat Pentachromfärbung (Bild unten) ist hinweisend auf vitales Tumorgewebe. Gelblich gefärbtes Stroma deutet hingegen auf organisiertes, reifes, inaktives Bindegewebe hin (Bild oben). Hierbei kann es sich jedoch um eine Therapie induzierte Fibrose oder um eine präexistente Fibrose handeln. Mittels der Movat Pentachromfärbung kann dies nicht näher spezifiziert werden.

In beiden Fällen könnte der Vergleich mit der prätherapeutischen Gewebebiopsie zusätzliche Erkenntnisse liefern - sofern ausreichend prätherapeutisches Vergleichsmaterial zur Verfügung steht.

Darüber hinaus konnten mittels Immunhistochemie weitere stromale Veränderungen nach neoadjuvanter Therapie abgebildet werden. α -SMA ist der bekannteste Marker für aktivierte PSC im PDAC [Apte et al., 2004]. In normalem Pankreasgewebe kommt α -SMA nur minimal zur Anfärbung [Haber et al., 1999]. Für PDAC-Fälle mit fehlender Regression (Regressionsgrad IV) hingegen zeigte sich in der α -SMA Färbung ein diffuses Expressionsmuster mit peritumorale Anfärbung in überwiegend starker Frequenz. Gleiches Verhalten zeigten in dieser Arbeit therapienaive Fälle. Für Fälle mit nachgewiesener Regression (Regressionsgrad II und III) wurde visuell eine tendenzielle Abnahme der Häufigkeit der Färbung sowie eine zunehmende räumliche Konzentrierung des Expressionsmusters peritumoral beobachtet. Eine Abnahme von α -SMA nach neoadjuvanter Therapie spricht somit für eine Abnahme aktivierter PSC, was wiederum auf eine reduzierte Aktivität im Sinne eines inaktiven Stroma hindeuten könnte und somit letztlich ein Therapieansprechen auf stromaler Ebene widerspiegelt.

Korreliert mutmaßlicherweise eine Abnahme von α -SMA mit Tumorregression einerseits, so korreliert möglicherweise eine Persistenz bzw. eine längere Nachweisbarkeit von Tenascin C, in abgeschwächter Häufigkeit, andererseits ebenfalls mit Tumorregression. Insbesondere für Areale mit nachgewiesener Tumorregression wurde in dieser Arbeit teilweise eine diffuse Anfärbung von Matrix in abgeschwächter Häufigkeit mittels Tenascin C nachgewiesen. Im Prä- versus Posttherapievergleich zeigte sich ebenfalls eine Abnahme für die Häufigkeit der peritumoralen Lokalisation. Bekannterweise zeigt Tenascin C ein Remodeling der Gewebsarchitektur an, wie beispielsweise bei der Rückbildung der Brustdrüse nach Laktation, bei entzündlichen Ereignissen und neoplastischen Erkrankungen [Jones et al., 2000]. Im PDAC ist Tenascin C im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe signifikant überexprimiert. Quelle dieser extrazellulären Komponente sind PSC. Zudem sind pankreatische Karzinomzellen (pancreatic cancer cells = PCC) ebenfalls zur Synthese von Tenascin C fähig [Esposito et al., 2006]. Die hier gemachten Beobachtungen könnten somit wie folgt gedeutet werden: Im PDAC steigt Tenascin C als Komponente der

extrazellulären Matrix stark an, bleibt jedoch auch nach Regression im Sinne eines Remodelings (länger) nachweisbar, insbesondere an Stellen, die nach Regression kein Karzinom mehr aufweisen.

Zur Charakterisierung der Stromareaktion hingegen weniger geeignet erwies sich der SPARC Antikörper. Aufgrund seines diffusen und raumgreifenden Färbeverhaltens von PSC und Matrix, war eine präzise Abbildung und Detektion stromaler Vorgänge oder kleinerer Tumorherde nicht möglich. Die anti-NT-3 Färbung detektierte PSC und Matrix, eine visuelle Korrelation zwischen Expressionseigenschaften und Regression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund eines minimalen Anfärbeverhaltens von PSC und Matrix in der anti- α -Crystallin B Färbung, beobachtet für neoadjuvant vorbehandelte wie auch für therapienaive PDAC Fälle, konnte die stromale Architektur nicht aussagekräftig abgebildet und ausgewertet werden.

Die vorgeschlagene histologische TRG dieser Arbeit sieht eine Einteilung in vier Stufen zwischen einer kompletten Regression (Regressionsgrad I = keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar) bis hin zu einem fehlenden Therapieansprechen (Regressionsgrad IV = keine sichtbare Tumorreduktion, lediglich qualitative Veränderungen der Tumorzellen bzw. kein Effekt) vor. Sinnvoll gewählte Zwischenstufen ermöglichen eine qualitative und prozentuale Trennung zwischen geringem (Regressionsgrad III = sichtbare Tumorreduktion, >20% vitale Tumorzellen) und deutlichem Therapieansprechen (Regressionsgrad II = eindeutig sichtbare Tumorreduktion, 20% vitale Tumorzellen). Eine Überprüfung durch Ermittlung der Proliferationsrate mittels Ki67 Antigenfärbung im zentralen Tumorschnitt wurde durchgeführt. Für Fälle mit deutlich sichtbarer Tumorregression (Regressionsgrad II) zeigte sich eine signifikant geringere Wachstumsfraktion vitaler Tumorzellen ($p=0,017$) als für Fälle mit weniger bzw. fehlender Regression (Regressionsgrad III und IV). Dies deutet auf eine prinzipiell richtige Einordnung der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse und des entwickelten Klassifikationssystems, im Sinne einer Abnahme an proliferierenden Zellen bei zunehmender Regression und Abnahme vitaler Tumorzellen, hin. Beim Mammakarzinom ist die Ermittlung des Proliferationsindex mittels Ki67 Antigen im Residualtumor ein anerkannt prädiktiver Marker für das Patientenüberleben [von

Minckwitz et al., 2013]. Die TUNEL-Färbung war aufgrund eines minimalen bzw. fehlenden Färbeverhaltens vitaler Tumorzellen nicht weiter verwertbar.

Die Evaluation zentraler, intermediärer und peripherer Tumorschnitte vermittelt einen Eindruck über Tumorbiologie und Wachstumsverhalten in Bezug auf das Tumorgesamtareal. Der zusätzliche Informationsgewinn durch die präzisere Evaluation der Stromareaktion ist allerdings auf Grund der oben beschriebenen Ergebnisse der Analyse, limitiert. Der Einsatz der Movat Pentachromfärbung, gegebenenfalls mit den zusätzlichen α -SMA und Tenascin C Färbungen, kann die Identifikation spärlicher Tumorzellen bzw. einzelner Tumorzellen vereinfachen, was im Umkehrschluss zu einer objektiveren Beurteilung des Regressionsgrades führen kann.

In der Routinediagnostik der Pathologie kommt aktuell die TRG von CAP [Washington et al., 2013] bevorzugt zum Einsatz. Die 27 PDAC-Fälle wurden neben der neu entwickelten TRG dieser Arbeit auch mit der TRG von CAP klassifiziert und verglichen (Tabellen 11, 12 und Appendix). Nach der TRG von CAP erhielten 4 Fälle (15%) Grad 3, 17 Fälle (63%) Grad 2, 6 Fälle (22%) Grad 1 und kein Fall Grad 0.

Grad	Beschreibung	Anteil
I	Keine vitalen Tumorzellen im Präparat	0 %
II	Eindeutig sichtbare Tumorreduktion, 20% vitale Tumorzellen	30 %
III	Sichtbare Tumorreduktion, >20 % vitale Tumorzellen	55 %
IV	Keine sichtbare Tumorreduktion, lediglich qualitative Veränderungen der Tumorzellen bzw. kein Effekt	15 %

Tabelle 11 TRG dieser Arbeit

Grad	Beschreibung	Anteil
0	komplettes Ansprechen (keine vitalen Tumorzellen)	0 %
1	deutliches Ansprechen (einzelne Zellen oder kleine Gruppen von Tumorzellen)	22 %
2	mäßiges Ansprechen (Residualtumor mit überwiegender Fibrosierung)	63 %
3	mangelndes bis fehlendes Ansprechen (minimale bis fehlende Tumorregression, ausgeprägter Residualtumor)	15 %

Tabelle 12 TRG nach CAP

Diese Gegenüberstellung verdeutlicht, dass viele Fälle sich im „Mittelfeld“ der TRG bewegen, da eine komplette Regression äußerst selten ist. In einer großen Studie aus den Vereinigten Staaten an 223 Patienten zeigten lediglich 6 Patienten (2,7%) eine komplette Regression nach

neoadjuvanter Therapie [Chatterjee et al., 2012]. Anlässlich dieser Studie reduzierten Chatterjee und Kollegen den Regressionsgradient von CAP um einen Grad, da die Autoren lediglich eine komplette histopathologische Response (Grad 0) bzw. einen minimalen Residualtumoranteil von <5% (Grad 1) mit einem besseren Rezidivfreien- sowie Gesamtüberleben assoziierten [Chatterjee et al., 2012]. Folglich jedoch werden nach diesem Regressionsmodell Patienten mit fehlender Regression bis hin zu einem vitalen Tumoranteil von lediglich 6% der gleichen Gruppe zugeteilt. Dieses Regressionsmodell ist somit kritisch zu sehen, ist es doch für den größten Teil der Patienten (derzeit) überhaupt nicht anwendbar. Es kann mehr als eine Art „Zusatzschema“ bei nahezu kompletter Regression (vitale Tumorzellen <5%) verstanden werden. Sinnvoll gewählte „Zwischenstufen“ sind einerseits essentiell, andererseits auch mit präzisen Prozentangaben zu versehen. Unpräzise Beschreibungen wie „einzelne Zellen oder kleine Gruppen“ oder „mäßiges Ansprechen“, vorgeschlagen von CAP, erschwerten in dieser Analyse die histopathologische Beurteilung der TRG untereinander. Prozentangaben fördern Objektivität und Vergleichbarkeit innerhalb eines Regressionsmodells, unabhängig vom Untersucher. Etwaige Vorteile für das Überleben bei nachgewiesener Regression konnten aufgrund der zu kleinen Fallzahl mittels Kaplan-Meier-Schätzer nicht überprüft werden.

Tumormorphologisch zeigt sich eine Regression beim PDAC in der Mikroskopie häufig in Form einzelner nachweisbarer Residualtumorherde, welche in unterschiedlichem großem Ausmaß von (beträchtlichen) Arealen nicht-neoplastischem Gewebes unterbrochen sein können [Verbeke et al., 2015]. Die frühere Annahme durch Ishikawa und Kollegen der Ballung residualer Tumorzellen auf das Tumorzentrum in Folge einer konzentrischen Tumorreduktion durch neoadjuvante Therapie [Ishikawa et al., 1989], scheint heute unzutreffend. Vielmehr ist bei Regression von einer „Tumorlastreduktion“, d.h. von weniger Tumorzellen bei gleichgroß bleibendem Tumorareal auszugehen [Verbeke et al., 2015]. Grundlage für die tatsächliche Einschätzung von Tumorausmaß, Morphologie [Esposito et al., 2008] und Regression [Verbeke et al., 2015] ist die (nahezu) Kompletteinbettung des PDAC-Gewebes [Verbeke et al., 2015, Zhao et al., 2012]. Nichtsdestotrotz fehlt im Studienaufbau vieler Untersuchungen die Information bezüglich des Umfangs der Materialeinbettung. Nur wenige Daten sind hierzu bekannt [Verbeke et al., 2015]. Im

Jahr 2012 zeigten in einer Studie mit 442 Patienten nur 2,5% der Fälle nach Kompletteinbettung eine vollständige Regression [Zhao et al., 2012]. Studien, in denen weniger Material eingebettet wurde, zeigten hingegen eine komplette Regression in bis zu max. 30% der Fälle [Strobel et al., 2012, Turrini et al., 2010]. Das fehlende standardisierte Vorgehen verdeutlicht das Dilemma für die Forschung. Ob die oben genannten prozentualen Unterschiede letztlich einzig und allein auf die unterschiedlichen neoadjuvanten Therapieregime zurückzuführen sind, bleibt offen [Verbeke et al., 2015].

Limitation der Studie

Histopathologische Effekte und Veränderungen nach neoadjuvanter Therapie beim PDAC sind schwer zu quantifizieren [Hartman et al., 2012]. Ferner existiert eine Vielzahl verschiedener TRG. Eine internationale Vereinbarung für den Forschungs- und Klinikalltag fehlt bis heute. Die prognostische Signifikanz und Reproduzierbarkeit der derzeit verfügbaren TRG ist weitgehend unbekannt [Chatterjee et al., 2012, Hartman et al., 2012]. Die zelluläre Heterogenität im PDAC stellt zudem eine nicht zu unterschätzende Herausforderung dar [Erkan et al., 2012a]. Aus Objektivitätsgründen empfiehlt sich daher eine detaillierte Fotodokumentation regressiver Veränderungen [Verbeke et al., 2015]. Als limitierend für diese Arbeit erwiesen sich u.a. die heterogenen Patientenkohorten mit (zu) kleiner Fallzahl, die nicht leitliniengetreue Erstdiagnose sowie die individuellen Therapiekonzepte verschiedener Kliniken. Obwohl von der S3-Leitlinie für ein lokal fortgeschrittenes, inoperables oder metastasiertes PDAC gefordert [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013a)], erfolgte in dieser Arbeit vor Therapiebeginn nicht in allen Fällen eine Biopsie zur histopathologischen Sicherung der klinischen Diagnose. Nachweislich wurde in 10 Fällen (37%) eine Punktionszytologie und in 5 Fällen (19%) eine Gewebebiopsie durchgeführt. Eine realistische Beurteilung der Therapieeffekte ist im Wesentlichen abhängig von einer standardisierten (nahezu) Kompletteinbettung der Gewebeproben sowie der Verfügbarkeit von äquivalentem und mengenmäßig ausreichend prätherapeutischem Biopsiematerial [Verbeke et al., 2015]. Limitierend für eine aussagekräftige Prä- versus Post-

Therapie-Evaluation in dieser Arbeit erwies sich das zytologische Punktionsmaterial wie auch das spärliche Material der Gewebebiopsie.

Aufgrund der genannten limitierenden Faktoren ist es sinnvoll, unter Mitbeteiligung der Disziplinen Onkologie, Chirurgie, Pathologie, Radiologie und Strahlentherapie eine prospektive Studie auf den Weg zu bringen, mit dem Ziel ein größtmögliches gut evaluiertes Patientenkollektiv von dichtem Informationsgehalt zu generieren. Wie sich in dieser Arbeit gezeigt hat sind standardisierte Abläufe sowie eine lückenlose Dokumentation die Grundlage für Vergleich- und Reproduzierbarkeit klinischer und histopathologischer Daten aus unterschiedlichen medizinischen Einrichtungen, um Forschungs- und Patientenbenefit zukünftig weiter zu optimieren.

6 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zählt zu den aggressivsten Tumorerkrankungen mit einer äußerst ungünstigen Prognose. Neoadjuvante Therapien finden in der Situation des lokal fortgeschrittenen und primär nicht resektablen PDAC zunehmend Anwendung. Die histopathologische Beurteilung regressiver Veränderungen von neoadjuvant vorbehandeltem PDAC-Gewebe gestaltet sich schwierig. Es existieren eine Vielzahl an Tumorregressionsgraduierungen (TRG). Ziel dieser Arbeit war die Beurteilung histomorphologischer Veränderungen im neoadjuvant vorbehandelten PDAC. Der Fokus wurde auf Veränderungen der Stromareaktion und regressiver Merkmale gerichtet, um möglicherweise die Differenzierung von Desmoplasie und Therapie induzierter Fibrose zu erleichtern und als Hilfestellung für das Herausarbeiten einer neuen TRG. Gewebeprobe von 27 Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie oder neoadjuvanter Chemo- und Strahlentherapie sowie 5 prätherapeutische Biopsien wurden untersucht. Zudem standen Gewebeprobe von 10 primär resezierten externen PDAC-Fällen als Vergleichsmaterial zur Verfügung. Zuschnitt und histopathologische Aufarbeitung der (nahezu) komplett eingebetteten neoadjuvant vorbehandelten Gewebeprobe erfolgten nach einem standardisierten Protokoll. Pro Patient wurden 3 repräsentative Gewebeprobe (Tumorzentrum, intermediäres und peripheres Tumorareal) für nachfolgende Färbungen ausgewählt. Histochemisch wurden die Schnitte Hämatoxylin-Eosin (HE), Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)-Alcian und Movat Pentachrom gefärbt. Der Nachweis proliferationsaktiver bzw. apoptotischer Tumorzellen erfolgte retrospektiv durch Ki67 und TUNEL assay. Das Stroma wurde mittels 5 immunhistochemischer desmoplastischer Stromamarker (-Crystallin B, -smooth muscle actin (-SMA), Neurotrophin-3 (NT-3), secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) und Tenascin C) näher charakterisiert. 24 von 27 Karzinomen wurden als ypT3 oder ypT4 (89%), nur 3 Karzinome als ypT1 oder ypT2 klassifiziert. Lymphknotenmetastasen waren in 13 Fällen (48%) und Fernmetastasen in 5 Fällen (13%) nachweisbar. Histomorphologisch zeigte sich in allen 27 Fällen das Bild eines invasiven PDAC. Fibrose war in 26 Fällen (96%), zytoplasmatische Vakuolen in 25 Fällen (93%), Nekrose-Areale in 17 Fällen (63%) und Schleimseen in 11 Fällen (41%) nachweisbar. Eine vierstufige TRG wurde

entwickelt. Eine komplette Regression (keine vitalen Tumorzellen im Präparat = Regressionsgrad I) wurde nicht beobachtet. Acht Fälle (30%) zeigten eine eindeutig sichtbare Tumorreduktion (20% vitale Tumorzellen = Regressionsgrad II). Für 15 Fälle (55%) ergab sich eine sichtbare Tumorreduktion (>20% vitale Tumorzellen = Regressionsgrad III) und für 4 Fälle (15%) zeigte sich keine sichtbare Tumorreduktion (lediglich qualitative Veränderungen der Tumorzellen bzw. kein Effekt = Regressionsgrad IV). In der Movat Pentachromfärbung zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen kollagenreichem Stroma und deutlicher Tumorregression. Weiter zeigten eine Abnahme von α -SMA und eine Persistenz in abgeschwächter Häufigkeit von Tenascin C eine Tendenz zur Korrelation mit Tumorregression. Eine Abnahme von Tenascin C im Prä- (Biopsie) versus Posttherapievergleich konnte übereinstimmend gezeigt werden. Eine Tumorregression war außerdem mit einem niedrigeren Proliferationsindex assoziiert ($p=0,017$). Die stromale Komposition beim PDAC nach neoadjuvanter Therapie ist heterogen und erschwert die Beurteilung. Exklusive regressive Merkmale für das PDAC gibt es wenige. Eine realistische Beurteilung der Therapieeffekte ist im Wesentlichen abhängig von einer standardisierten (nahezu) Kompletteinbettung der Gewebeproben sowie der Verfügbarkeit von ausreichend prätherapeutischem Biopsiematerial. Eine eindeutige Unterscheidung von Tumordesmoplasie und therapieinduzierter Fibrose durch einzelne Biomarker ist nicht möglich. Der Einsatz der Movat Pentachromfärbung, gegebenenfalls mit den immunhistochemischen Färbungen α -SMA und Tenascin C, kann die Identifikation von spärlichem Residualtumor erleichtern, was für eine objektivere Beurteilung der Regression und der Erstellung einer TRG notwendig ist.

7 Literaturverzeichnis

- Ahn, D. H., Williams, T. M., Goldstein, D. A., El-Rayes, B. und Bekaii-Saab, T. Adjuvant therapy for pancreas cancer in an era of value based cancer care. 42 (2016) 10-17.
- Ajani, J. A., Mansfield, P. F., Crane, C. H., Wu, T. T., Lunagomez, S., Lynch, P. M., Janjan, N., Feig, B., Faust, J., Yao, J. C., Nivers, R., Morris, J. und Pisters, P. W. Paclitaxel-based chemoradiotherapy in localized gastric carcinoma: degree of pathologic response and not clinical parameters dictated patient outcome. 23 (2005) 1237-1244.
- Alexakis, N., Halloran, C., Raraty, M., Ghaneh, P., Sutton, R. und Neoptolemos, J. P. Current standards of surgery for pancreatic cancer. 91 (2004) 1410-1427.
- Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C. und Wilson, J. S. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. 43 (1998) 128-133.
- Apte, M. V., Park, S., Phillips, P. A., Santucci, N., Goldstein, D., Kumar, R. K., Ramm, G. A., Buchler, M., Friess, H., McCarroll, J. A., Keogh, G., Merrett, N., Pirola, R. und Wilson, J. S. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. 29 (2004) 179-187.
- Apte, M. V., Pirola, R. C. und Wilson, J. S. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. 3 (2012) 344.
- Apte, M. V., Wilson, J. S., Lugea, A. und Pandol, S. J. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. 144 (2013) 1210-1219.
- Assifi, M. M. und Hines, O. J. Anti-angiogenic agents in pancreatic cancer: a review. 11 (2011a) 464-469.
- Assifi, M. M., Lu, X., Eibl, G., Reber, H. A., Li, G. und Hines, O. J. Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of phase II trials. 150 (2011b) 466-473.
- Bachem, M. G., Schneider, E., Gross, H., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Grunert, A. und Adler, G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. 115 (1998) 421-432.
- Becker, K., Mueller, J. D., Schulmacher, C., Ott, K., Fink, U., Busch, R., Bottcher, K., Siewert, J. R. und Hofler, H. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. 98 (2003) 1521-1530.
- Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H. und Theise, N. D. WHO classification of tumours of the digestive system. . (2010) 417-418.
- Chatterjee, D., Katz, M. H., Rashid, A., Estrella, J. S., Wang, H., Varadhachary, G. R., Wolff, R. A., Lee, J. E., Pisters, P. W., Abbruzzese, J. L., Fleming, J. B. und Wang, H. Pancreatic intraepithelial neoplasia and histological changes in non-neoplastic pancreas associated with neoadjuvant therapy in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. 63 (2013) 841-851.
- Chatterjee, D., Katz, M. H., Rashid, A., Varadhachary, G. R., Wolff, R. A., Wang, H., Lee, J. E., Pisters, P. W., Vauthey, J. N., Crane, C., Gomez, H. F., Abbruzzese, J. L., Fleming, J. B. und Wang, H. Histologic grading of the extent of residual carcinoma following neoadjuvant chemoradiation in pancreatic ductal adenocarcinoma: a predictor for patient outcome. 118 (2012) 3182-3190.
- Christein, J. D., Kendrick, M. L., Iqbal, C. W., Nagorney, D. M. und Farnell, M. B. Distal pancreatectomy for resectable adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. 9 (2005) 922-927.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of, U. und Intergroup, P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. 364 (2011) 1817-1825.

- Diener, M. K., Heukafer, C., Schwarzer, G., Seiler, C. M., Antes, G., Buchler, M. und Knaebel, H. P. Pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) versus pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. (2008) CD006053.
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., Takasaki, K., Funakoshi, A., Wakasugi, H., Asano, T., Hishinuma, S., Ogata, Y., Sunamura, M., Yamaguchi, K., Tanaka, M., Takao, S., Aikou, T., Hirata, K., Maguchi, H., Aiura, K., Aoki, T., Kakita, A., Sasaki, M., Ozaki, M., Matsusue, S., Higashide, S., Noda, H., Ikeda, S., Maetani, S., Yoshida, S. und Japan Pancreatic Cancer Study, G. Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. 38 (2008) 1021-1028.
- Erkan, M., Adler, G., Apte, M. V., Bachem, M. G., Buchholz, M., Detlefsen, S., Esposito, I., Friess, H., Gress, T. M., Habisch, H. J., Hwang, R. F., Jaster, R., Kleeff, J., Kloppel, G., Kordes, C., Logsdon, C. D., Masamune, A., Michalski, C. W., Oh, J., Phillips, P. A., Pinzani, M., Reiser-Erkan, C., Tsukamoto, H. und Wilson, J. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. 61 (2012a) 172-178.
- Erkan, M., Hausmann, S., Michalski, C. W., Fingerle, A. A., Dobritz, M., Kleeff, J. und Friess, H. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. 9 (2012b) 454-467.
- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Deucker, S., Sauliunaite, D., Streit, S., Esposito, I., Friess, H. und Kleeff, J. Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. 11 (2009) 497-508.
- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Kong, B., Esposito, I., Friess, H. und Kleeff, J. The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. 12 (2012c) 288-303.
- Esposito, I., Kleeff, J., Bergmann, F., Reiser, C., Herpel, E., Friess, H., Schirmacher, P. und Buchler, M. W. Most pancreatic cancer resections are R1 resections. 15 (2008) 1651-1660.
- Esposito, I., Penzel, R., Chaib-Harriche, M., Barcena, U., Bergmann, F., Riedl, S., Kayed, H., Giese, N., Kleeff, J., Friess, H. und Schirmacher, P. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. 208 (2006) 673-685.
- Esposito, I., Segler, A., Steiger, K. und Kloppel, G. Pathology, genetics and precursors of human and experimental pancreatic neoplasms: An update. 15 (2015) 598-610.
- Evans, D. B., Rich, T. A., Byrd, D. R., Cleary, K. R., Connelly, J. H., Levin, B., Charnsangavej, C., Fenoglio, C. J. und Ames, F. C. Preoperative chemoradiation and pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas. 127 (1992) 1335-1339.
- Friedman, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. 88 (2008) 125-172.
- G. Klöppel, B. S., J. Lüttges Pathologie. W. Böcker, H. Denk, Ph. U. Heitz, H. Moch. (2008) 838-841.
- Garcia-Aguilar, J., Hernandez de Anda, E., Sirivongs, P., Lee, S. H., Madoff, R. D. und Rothenberger, D. A. A pathologic complete response to preoperative chemoradiation is associated with lower local recurrence and improved survival in rectal cancer patients treated by mesorectal excision. 46 (2003) 298-304.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. und Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. 119 (1992) 493-501.
- Geer, R. J. und Brennan, M. F. Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. 165 (1993) 68-72; discussion 72-63.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und R.-K.-I. Krebs in Deutschland 2009/2010. Robert Koch-Institut

- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2013) 48-51.
- Giardiello, F. M., Brensinger, J. D., Tersmette, A. C., Goodman, S. N., Petersen, G. M., Booker, S. V., Cruz-Correa, M. und Offerhaus, J. A. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. 119 (2000) 1447-1453.
- Haber, P. S., Keogh, G. W., Apte, M. V., Moran, C. S., Stewart, N. L., Crawford, D. H., Pirola, R. C., McCaughan, G. W., Ramm, G. A. und Wilson, J. S. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. 155 (1999) 1087-1095.
- Hartman, D. J. und Krasinskas, A. M. Assessing treatment effect in pancreatic cancer. 136 (2012) 100-109.
- Hartwig, W., Hackert, T., Hinz, U., Gluth, A., Bergmann, F., Strobel, O., Buchler, M. W. und Werner, J. Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome. 254 (2011) 311-319.
- Heinemann, V., Haas, M. und Boeck, S. Neoadjuvant treatment of borderline resectable and non-resectable pancreatic cancer. 24 (2013) 2484-2492.
- Herold, G. Gastroenterologie. Dr. Gerd Herold. (2013a) 506-507.
- Herold, G. Internistische Tumorthherapie. Dr. Gerd Herold. (2013b) 109.
- Hidalgo, M. Pancreatic cancer. 362 (2010) 1605-1617.
- Huguet, F., Orthuon, A., Touboul, E., Marseguerra, R. und Mornex, F. [Pancreatic cancer]. 14 Suppl 1 (2010) S94-102.
- International Union Against Cancer (UICC) Digestive Systeme Tumours: Pancreas. Wiley-Blackwell. 7 (2009) 132-135.
- Ishikawa, O., Ohhigashi, H., Teshima, T., Chatani, M., Inoue, T., Tanaka, S., Kitamura, T., Wada, A., Sasaki, Y., Imaoka, S. et al. Clinical and histopathological appraisal of preoperative irradiation for adenocarcinoma of the pancreatoduodenal region. 40 (1989) 143-151.
- Jones, F. S. und Jones, P. L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. 218 (2000) 235-259.
- Kalser, M. H. und Ellenberg, S. S. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. 120 (1985) 899-903.
- Katz, M. H., Pisters, P. W., Evans, D. B., Sun, C. C., Lee, J. E., Fleming, J. B., Vauthey, J. N., Abdalla, E. K., Crane, C. H., Wolff, R. A., Varadhachary, G. R. und Hwang, R. F. Borderline resectable pancreatic cancer: the importance of this emerging stage of disease. 206 (2008) 833-846; discussion 846-838.
- Kim, H. S., Lee, Y., Lim, Y. A., Kang, H. J. und Kim, L. S. alphaB-Crystallin is a Novel Oncoprotein Associated with Poor Prognosis in Breast Cancer. 14 (2011) 14-19.
- Kleger, A. und Seufferlein, T. Pharmakotherapie beim Pankreaskarzinom: Ein aktueller Über- und Ausblick. 32 (2014) 274-282.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L. und Lowe, S. W. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. 134 (2008) 657-667.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Langversion 1.0. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (2013a) 59.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Langversion 1.0. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (2013b) 95.

- Lim, J. E., Chien, M. W. und Earle, C. C. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. 237 (2003) 74-85.
- Lu, X. und Kang, Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. 16 (2010) 5928-5935.
- Mantoni, T. S., Schendel, R. R., Rodel, F., Niedobitek, G., Al-Assar, O., Masamune, A. und Brunner, T. B. Stromal SPARC expression and patient survival after chemoradiation for non-resectable pancreatic adenocarcinoma. 7 (2008) 1806-1815.
- Masamune, A. und Shimosegawa, T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. 44 (2009) 249-260.
- Meredith, K. L., Weber, J. M., Turaga, K. K., Siegel, E. M., McLoughlin, J., Hoffe, S., Marcovalerio, M., Shah, N., Kelley, S. und Karl, R. Pathologic response after neoadjuvant therapy is the major determinant of survival in patients with esophageal cancer. 17 (2010) 1159-1167.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R. A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., Parulekar, W. und National Cancer Institute of Canada Clinical Trials. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 25 (2007) 1960-1966.
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J. A., Hickey, H., Beger, H., Fernandez-Cruz, L., Dervenis, C., Lacaine, F., Falconi, M., Pederzoli, P., Pap, A., Spooner, D., Kerr, D. J., Buchler, M. W. und European Study Group for Pancreatic, C. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. 350 (2004) 1200-1210.
- Nilsen, T. I. und Vatten, L. J. A prospective study of lifestyle factors and the risk of pancreatic cancer in Nord-Trøndelag, Norway. 11 (2000) 645-652.
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., Niedergethmann, M., Zülke, C., Fahlke, J., Arning, M. B., Sinn, M., Hinke, A. und Riess, H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. 310 (2013) 1473-1481.
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., Gutberlet, K., Kettner, E., Schmalenberg, H., Weigang-Koehler, K., Bechstein, W. O., Niedergethmann, M., Schmidt-Wolf, I., Roll, L., Doerken, B. und Riess, H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. 297 (2007) 267-277.
- Ohta, T., Numata, M., Tsukioka, Y., Futagami, F., Kayahara, M., Kitagawa, H., Nagakawa, T., Yamamoto, M., Wakayama, T., Kitamura, Y., Terada, T. und Nakanuma, Y. Neurotrophin-3 expression in human pancreatic cancers. 181 (1997) 405-412.
- Pandol, S., Edderkaoui, M., Gukovsky, I., Lugea, A. und Gukovskaya, A. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. 7 (2009) S44-47.
- Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D. und Hingorani, S. R. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. 21 (2012) 418-429.
- Rhim, A. D., Oberstein, P. E., Thomas, D. H., Mirek, E. T., Palermo, C. F., Sastra, S. A., Dekleva, E. N., Saunders, T., Becerra, C. P., Tattersall, I. W., Westphalen, C. B., Kitajewski, J., Fernandez-Barrena, M. G., Fernandez-Zapico, M. E., Iacobuzio-Donahue, C., Olive, K. P. und Stanger, B. Z. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. 25 (2014) 735-747.
- Ryan, D. P., Hong, T. S. und Bardeesy, N. Pancreatic adenocarcinoma. 371 (2014) 2140-2141.

- Scholzen, T. und Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. 182 (2000) 311-322.
- Sethi, D., Sen, R., Parshad, S., Khetarpal, S., Garg, M. und Sen, J. Histopathologic changes following neoadjuvant chemotherapy in various malignancies. 2 (2012) 111-116.
- Seufferlein, T., Porzner, M., Heinemann, V., Tannapfel, A., Stuschke, M. und Uhl, W. Duktales Pankreaskarzinom. 111 (2014) 396-402.
- Shia, J., McManus, M., Guillem, J. G., Leibold, T., Zhou, Q., Tang, L. H., Riedel, E. R., Weiser, M. R., Paty, P. B., Temple, L. K., Nash, G., Kolosov, K., Minsky, B. D., Wong, W. D. und Klimstra, D. S. Significance of acellular mucin pools in rectal carcinoma after neoadjuvant chemoradiotherapy. 35 (2011) 127-134.
- Srigley, J. R., Delahunt, B. und Evans, A. J. Therapy-associated effects in the prostate gland. 60 (2012) 153-165.
- Strobel, O., Berens, V., Hinz, U., Hartwig, W., Hackert, T., Bergmann, F., Debus, J., Jager, D., Buchler, M. W. und Werner, J. Resection after neoadjuvant therapy for locally advanced, "unresectable" pancreatic cancer. 152 (2012) S33-42.
- Sultana, A., Smith, C. T., Cunningham, D., Starling, N., Neoptolemos, J. P. und Ghaneh, P. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. 25 (2007) 2607-2615.
- Tallot, P., Grongnet, J. F. und David, J. C. Dual perinatal and developmental expression of the small heat shock proteins [FC12]αB-crystallin and Hsp27 in different tissues of the developing piglet. 83 (2003) 281-288.
- Theocharis, A. D., Tsara, M. E., Papageorgacopoulou, N., Karavias, D. D. und Theocharis, D. A. Pancreatic carcinoma is characterized by elevated content of hyaluronan and chondroitin sulfate with altered disaccharide composition. 1502 (2000) 201-206.
- Toole, B. P. und Slomiany, M. G. Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. 18 (2008) 244-250.
- Turrini, O., Ychou, M., Moureau-Zabotto, L., Rouanet, P., Giovannini, M., Moutardier, V., Azria, D., Delpero, J. R. und Viret, F. Neoadjuvant docetaxel-based chemoradiation for resectable adenocarcinoma of the pancreas: New neoadjuvant regimen was safe and provided an interesting pathologic response. 36 (2010) 987-992.
- Valsecchi, M. E., McDonald, M., Brody, J. R., Hyslop, T., Freyding, B., Yeo, C. J., Solomides, C., Peiper, S. C. und Witkiewicz, A. K. Epidermal growth factor receptor and insulinlike growth factor 1 receptor expression predict poor survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. 118 (2012) 3484-3493.
- Vasen, H. F., Gruis, N. A., Frants, R. R., van Der Velden, P. A., Hille, E. T. und Bergman, W. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). 87 (2000) 809-811.
- Verbeke, C., Lohr, M., Karlsson, J. S. und Del Chiaro, M. Pathology reporting of pancreatic cancer following neoadjuvant therapy: challenges and uncertainties. 41 (2015) 17-26.
- Verbeke, C. S. Resection margins and R1 rates in pancreatic cancer--are we there yet? 52 (2008) 787-796.
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjuland, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutsem, E., Wei, X., Iglesias, J. und Renschler, M. F. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. 369 (2013) 1691-1703.
- von Minckwitz, G., Schmitt, W. D., Loibl, S., Muller, B. M., Blohmer, J. U., Sinn, B. V., Eidtmann, H., Eiermann, W., Gerber, B., Tesch, H., Hilfrich, J., Huober, J., Fehm, T., Barinoff,

- J., Rudiger, T., Erbstoesser, E., Fasching, P. A., Karn, T., Muller, V., Jackisch, C. und Denkert, C. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. 19 (2013) 4521-4531.
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H. und Buchler, M. W. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. 91 (2004) 586-594.
- Wake, K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. 66 (1980) 303-353.
- Walsh, N., Kennedy, S., Larkin, A., Corkery, B., O'Driscoll, L., Clynes, M., Crown, J. und O'Donovan, N. EGFR and HER2 inhibition in pancreatic cancer. 31 (2013) 558-566.
- Washington, K., Berlin, J., Branton, P., Burgart, L., Carter, D. und Compton, C. C. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the exocrine pancreas. (2013). Online only [www.cap.org], access: 4.1.2015.
- Watari, N., Hotta, Y. und Mabuchi, Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. 58 (1982) 837-858.
- White, R. R., Xie, H. B., Gottfried, M. R., Czito, B. G., Hurwitz, H. I., Morse, M. A., Blobe, G. C., Paulson, E. K., Baillie, J., Branch, M. S., Jowell, P. S., Clary, B. M., Pappas, T. N. und Tyler, D. S. Significance of histological response to preoperative chemoradiotherapy for pancreatic cancer. 12 (2005) 214-221.
- Wittekind, C. und Oberschmid, B. [Pathological staging and response evaluation of rectal carcinoma]. 83 (2012) 423-429.
- Zhao, Q., Rashid, A., Gong, Y., Katz, M. H., Lee, J. E., Wolf, R., Balachandran, A., Varadhachary, G. R., Pisters, P. W., Wang, H., Gomez, H. F., Abbruzzese, J. L., Fleming, J. B. und Wang, H. Pathologic complete response to neoadjuvant therapy in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with a better prognosis. 16 (2012) 29-37.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Primär reseziertes PDAC mit Lokalisation im Pankreaskopf. Der Tumor ist kreismarkiert und makroskopisch nicht gut abgrenzbar. Die Schnittfläche imponiert von weißgrauer bis gelblicher Farbe. Links ist eine sichtbare Tumordinfiltration in das c-förmige Duodenum erkennbar. Die Absetzungsrän­der sind tuschemarkiert.. 5
- Abbildung 2 Mäßig differenziertes, primär reseziertes PDAC des Pankreaskopfes. Es zeigen sich gangartige Drüsenverbände mit atypischem, mehrschichtigem, polymorphzelligem Epithel, die von desmoplastischem Bindegewebe umgeben sind. Ein Ausschnitt der linken Abbildung ist rechts in Vergrößerung dargestellt. HE-Färbung 6
- Abbildung 3 Bild einer Perineuralscheideninfiltration – Dargestellt ist ein von Tumorzellen infiltrierter Nerv des peripankreatischen Fettgewebes. Ein Ausschnitt der linken Abbildung ist rechts in Vergrößerung dargestellt. HE-Färbung..... 7
- Abbildung 4 Exemplarisch pfeilmarkierte PSC im desmoplastischen Bindegewebe eines neoadjuvant vorbehandelten PDAC. Links: Darstellung der PSC in der -SMA Färbung, rechts: Darstellung der PSC in der SPARC-Färbung. 11
- Abbildung 5 Neoadjuvant vorbehandeltes Pankreaslinksresektat mit schematischer Darstellung der eingeteilten Zonen (z = zentral, i = intermediär und p = peripher) 17
- Abbildung 6 Exemplarische Übersicht der erfolgten Färbungen in der zentralen, intermediären und peripheren Zone..... 20
- Abbildung 7 Gegenüberstellung von muzinreicher, aktiver Grundsubstanz (blau gefärbt) links und kollagenreicher, reifer Fibrose (gelb gefärbt) rechts. Die Grundsubstanz imponiert hier locker strukturiert, die Fibrose kompakt strukturiert..... 27
- Abbildung 8 Dargestellt sind die Movat Pentachromfärbung (links) sowie die Software unterstützte Auswertung des zugehörigen Movatschnitts (rechts). Die Softwarebilder setzten sich aus vielen kleinen Arealen (Maps) zusammen. Mittels Farberkennungssoftware wurden Areale entweder der Farbe Gelb oder der Farbe Blau zugeordnet. „Gemischte Areale“ = „candid“ (Blau- und Gelbanteil zu ungefähr

gleichen Anteilen) kamen in der Farbe Pink zur Darstellung. Pinkfarbene Areale waren für das Softwareprogramm weder der Farbe Gelb noch der Farbe Blau eindeutig zu zuordnen. Nichtstromale Strukturen wie beispielsweise Pankreasinseln oder Blutgefäße (nicht alle konnten zuvor von Hand ausgeschlossen werden) wurden von der Software erkannt und als „non-ROI“ grün markiert..... 29

Abbildung 9	Neoadjuvant vorbehandeltes Pankreaslinksresektat mit unscharf begrenztem, induriertem Tumorlager (kreismarkiert) von grauglasiger Farbe	36
Abbildung 10	Suspekt wirkende Zellen (pfeilmarkiert) in der HE-Färbung (oben), die in der CKpan-MNF116 Färbung (unten) jedoch nicht zur Darstellung kommen. Ausschluss vitaler Tumorzellen.....	38
Abbildung 11	Bild eines neoadjuvant vorbehandelten PDAC. Karzinom mit irregulär gestalteter Drüsenstruktur ist im gesamten Präparat nachweisbar. In unmittelbarer Umgebung der Tumorformationen findet sich eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion. HE-Färbung	39
Abbildung 12	Bild eines neoadjuvant vorbehandelten PDAC. Gering differenziertes Karzinom mit atypisch, mehrschichtig gestaltetem Epithel. Deutliche Anisokaryose, Pleomorphie und vermehrte Mitoserate sind erkennbar. Schleimbildende Drüsenstrukturen sind ebenfalls auszumachen. HE-Färbung	39
Abbildung 13	Dargestellt sind azelluläre Schleimseen als Zeichen der Regression in der HE- (oben), PAS-Alcian- (Mitte) und Movat Pentachromfärbung (unten).....	41
Abbildung 14	Dargestellt sind zytoplasmatische Vakuolen als Zeichen der Regression. PAS-Alcian-Färbung	42
Abbildung 15	Bild einer Nekrose mit granulozytärem Infiltrat als Zeichen der Regression. HE-Färbung	42
Abbildung 16	Darstellung der oben beschriebenen Färbemuster in der Movat Pentachromfärbung.	44

Abbildung 17	Streudiagramm: Niedrige Gelbanteile (d.h. muzinreich und kollagenarm) in der Movat Pentachromfärbung sind mit einem hohem Regressionsgrad (insbesondere Regressionsgrad III und IV) und geringer bis fehlender Tumorregression assoziiert, statistisch jedoch nicht signifikant.	45
Abbildung 18	Spektrum der Regression: keine sichtbare Tumorregression (oben links), sichtbare Tumorregression = >20% vitale Tumorzellen (oben rechts), eindeutig sichtbare Tumorregression = 20% vitale Tumorzellen (unten links), keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar (unten rechts). HE Färbung	47
Abbildung 19	Darstellung unterschiedlich starker Expressionsraten von Ki67 in vitalen Tumorzellen.....	55
Abbildung 20	Dargestellt ist eine Tumoraläsion mit zwei nach derTUNEL-Methode gefärbten, apoptotisch geschrumpfte Zellen (pfeilmarkiert).....	56
Abbildung 21	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der – SMA Färbung. Der Tumor weist keine Zeichen der Regression auf. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 3+ Häufigkeit und diffusem Expressionsmuster...	57
Abbildung 22	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der – SMA Färbung. Der Tumor weist Zeichen der Regression auf. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 2+ Häufigkeit und diffus, fokal akzentuiertem Expressionsmuster.	57
Abbildung 23	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der – SMA Färbung. Der Tumor weist deutliche Zeichen einer Regression auf. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 2+ Häufigkeit und fokalem Expressionsmuster.	58
Abbildung 24	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der Tenascin C Färbung. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix in 2+ Häufigkeit und diffus, periläsional akzentuiertem Expressionsmuster.	59
Abbildung 25	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der Tenascin C Färbung. Sichtbare Abnahme von Häufigkeit der peritumoralen	

	Lokalisation mit zunehmender Regression. Für Areale mit stattgefundener Tumorregression zeigt sich eine diffuse, reduzierte Anfärbung der Matrix.	59
Abbildung 26	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der SPARC Färbung. Peritumorale Lokalisation von PSC/Matrix mit 3+ Häufigkeit und prominent diffusem Expressionsmuster. Eine leichte zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen ist sichtbar.	60
Abbildung 27	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der NT-3-Färbung. Peritumorale Lokalisation von PCS/Matrix mit 2+ Häufigkeit und fokalem Expressionsmuster. Eine schwache zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen ist sichtbar.	61
Abbildung 28	Dargestellt ist ein zentraler neoadjuvant vorbehandelter Tumorschnitt mit der - Crystallin B Färbung. Ein diffuses, nicht periläsionales Expressionsmuster ist erkennbar. Vereinzelt sind Zellen (PSC) in der Fibrose von geringer Häufigkeit und diffusem Expressionsmuster nachweisbar.	62
Abbildung 29	Ausschnitt einer prätherapeutischen Gewebebiopsie (oben) mit der Tenascin C Färbung mit 3+ Häufigkeit der peritumoralen Lokalisation und diffusem Expressionsmuster. Im posttherapeutischen Vergleich (unten) zeigt sich mit 1+ Häufigkeit eine deutliche Abnahme der peritumoralen Lokalisation.....	64
Abbildung 30	Ergänzend zur HE-Färbung (links) kann die Movat Pentachromfärbung (rechts) zusätzliche Informationen über das Bindegewebe geben. Bläuliches Gewebe in der Movat Pentachromfärbung (Bild unten) ist hinweisend auf vitales Tumorgewebe. Gelblich gefärbtes Stroma deutet hingegen auf organisiertes, reifes, inaktives Bindegewebe hin (Bild oben). Hierbei kann es sich jedoch um eine Therapie induzierte Fibrose oder um eine präexistente Fibrose handeln. Mittels der Movat Pentachromfärbung kann dies nicht näher spezifiziert werden.....	68

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Tabellarische Übersicht zellulärer und azellulärer Komponenten der desmoplastischen Stromareaktion.....	9
Tabelle 2	Tabellarischer Überblick der derzeit existierenden TRG für das neoadjuvant vorbehandelte PDAC.....	14
Tabelle 3	Liste der verwendeten Reagenzien	18
Tabelle 4	Liste der verwendeten Geräte und Software.....	19
Tabelle 5	Tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper, ihre Reaktionsmuster und spezifischen Besonderheiten.....	25
Tabelle 6	Exemplarische Darstellung der Auswertung von Häufigkeit und Lokalisation der Antikörperfärbungen.....	30
Tabelle 7	Detaillierte Übersicht über die klinisch-pathologischen Daten der 27 ausgewerteten Fälle	35
Tabelle 8	TRG des neoadjuvant vorbehandelten PDAC.....	46
Tabelle 9	Tabellarische Übersicht der TRG mit regressiven Merkmalen aller untersuchten Fälle.....	54
Tabelle 10	Prä- versus Post-Therapie-Vergleich mit Markern der Immunhistochemie (Tenascin C, Ki67, SPARC) und Movat Penatachromfärbung.....	63
Tabelle 11	TRG dieser Arbeit.....	71
Tabelle 12	TRG nach CAP.....	71

10 Appendix

Tabellarische Übersicht der Ergebnisse nach Software-gestützter morphometrischer Analyse der Movat Pentachromfärbung

Fall	Relative Area blau	Relative Area gelb	Relative Area NON	Relative Area candid	Quotient gelb/blau	Regression sgrad
Biopsie 6	48,29%	4,73%	46,96%	0,02%	9,8	-
Biopsie 8	57,28%	1,16%	40,17%	1,39%	2,0	-
Biopsie 9	37,98%	7,82%	46,85%	7,35%	20,6	-
Biopsie 20	17,68%	2,63%	79,68%	0,00%	14,9	-
Fall 1 Z	86,58%	0,10%	11,08%	2,25%	0,1	IV
Fall 1 I	66,02%	23,71%	10,10%	0,18%	35,9	IV
Fall 1 P	15,15%	74,79%	10,02%	0,04%	493,6	IV
Fall 3 Z	79,47%	0,60%	13,10%	6,83%	0,8	III
Fall 3 I	65,15%	1,05%	30,54%	3,25%	1,6	IV
Fall 4 Z	72,60%	2,31%	22,39%	2,70%	3,2	IV
Fall 4 I	50,22%	9,10%	26,72%	13,96%	18,1	IV
Fall 4 P	11,39%	53,28%	35,15%	0,18%	468,0	IV
Fall 5 Z	79,40%	2,07%	18,06%	0,47%	2,6	II
Fall 5 I	38,52%	23,52%	37,44%	0,52%	61,1	III
Fall 5 P	37,84%	40,30%	21,68%	0,18%	106,5	III
Fall 6 Z	72,18%	0,65%	21,34%	5,83%	0,9	III
Fall 6 I	71,76%	14,34%	13,51%	0,40%	20,0	III
Fall 6 P	48,00%	5,06%	6,40%	40,54%	10,5	III
Fall 7 Z	85,21%	0,29%	11,87%	2,63%	0,3	II
Fall 7 I	57,36%	4,44%	30,39%	7,81%	7,7	II
Fall 8 I	14,34%	81,32%	4,27%	0,06%	567,0	II
Fall 8 P	87,61%	7,46%	3,39%	1,54%	8,5	II
Fall 9 Z	2,52%	79,52%	17,91%	0,04%	3160,0	II
Fall 9 I	0,03%	83,05%	16,92%	0,01%	314760,2	II
Fall 9 P	26,82%	53,82%	7,63%	11,73%	200,7	II
Fall 10 Z	79,87%	0,15%	15,20%	4,79%	0,2	III
Fall 10 I	37,80%	0,84%	35,75%	25,61%	2,2	III
Fall 10 P	23,86%	10,79%	49,47%	15,88%	45,2	III
Fall 11 Z	69,54%	24,75%	5,68%	0,03%	35,6	II
Fall 11 I	37,19%	7,59%	17,56%	37,66%	20,4	II
Fall 11 P	61,98%	11,05%	26,57%	0,40%	17,8	III
Fall 12 Z	77,06%	0,86%	20,91%	1,18%	1,1	III
Fall 12 I	49,68%	1,16%	35,99%	13,17%	2,3	III
Fall 13 Z	68,60%	2,51%	12,04%	16,85%	3,7	II

Fall 13 I	33,73%	18,66%	23,67%	23,94%	55,3	II
Fall 13 P	25,59%	1,41%	21,64%	51,36%	5,5	I
Fall 14 Z	51,40%	29,19%	19,24%	0,17%	56,8	II
Fall 14 I	2,88%	69,71%	26,30%	1,11%	2418,4	I
Fall 14 P	0,26%	94,38%	5,35%	0,01%	36656,0	II
Fall 15 Z	90,44%	0,10%	8,20%	1,27%	0,1	III
Fall 15 I	47,19%	28,60%	24,14%	0,06%	60,6	III
Fall 15 P	61,48%	0,98%	14,91%	22,63%	1,6	III
Fall 16 Z	50,39%	22,67%	7,80%	19,14%	45,0	III
Fall 16 I	51,55%	41,59%	4,77%	2,09%	80,7	III
Fall 16 P	54,46%	29,93%	7,61%	8,00%	55,0	III
Fall 17 Z	6,54%	64,34%	27,90%	1,23%	984,5	II
Fall 17 I	92,34%	0,82%	3,55%	3,30%	0,9	III
Fall 17 P	32,75%	10,94%	27,21%	29,09%	33,4	III
Fall 18 Z	1,16%	79,11%	19,37%	0,36%	6844,0	II
Fall 19 Z	14,61%	28,10%	56,95%	0,33%	192,3	IV
Fall 19 I	10,14%	35,01%	54,36%	0,49%	345,4	III
Fall 19 P	5,37%	48,77%	45,59%	0,27%	908,4	III
Fall 21 Z	11,96%	70,90%	9,71%	7,43%	592,7	III
Fall 21 I	9,74%	23,74%	19,03%	47,49%	243,8	III
Fall 21 P	95,97%	2,33%	0,92%	0,78%	2,4	II
Fall 22 Z	57,62%	32,21%	9,24%	0,93%	55,9	III
Fall 22 P	0,10%	81,93%	17,71%	0,25%	79735,5	II
Fall 23 Z	57,22%	5,47%	33,02%	4,30%	9,6	IV
Fall 23 P	71,08%	0,10%	28,62%	0,20%	0,1	IV
Fall 24 Z	19,27%	13,40%	41,14%	26,20%	69,6	III
Fall 25 Z	3,53%	31,41%	52,24%	12,81%	888,9	III
Fall 25 I	7,03%	72,45%	12,03%	8,49%	1030,8	III
Fall 25 P	54,66%	19,16%	9,76%	16,42%	35,0	III
Fall 26 Z	62,83%	9,49%	18,29%	9,39%	15,1	III
Fall 26 P	57,62%	17,19%	15,93%	9,25%	29,8	II
Fall 27 Z	9,32%	50,19%	32,32%	8,17%	538,3	III

Aufgeführt sind nur die computerstützt erfolgreich ausgewerteten Schnitte, Fälle und Biopsien.

Legende: Z = zentral, I = intermediär, P = peripher

Tabellarische Übersicht der Ki67 (Proliferation) Auswertung

Fall	Auszählung	Anteil	Bemerkung	Zentraler Regressionsgrad
1	60 von 1000	6,0%	geringe Proliferation, homogenes Bild	IV
2	16 von 1000	1,6%	geringe Proliferation in einem Tumorabschnitt, Rest keine Proliferation, homogenes Bild	IV
3	448 von 1000	44,8%	starke Proliferation, homogenes Bild	III
4	300 von 1000	30,0%	Areale mit stärker und schwächerer Proliferation, heterogenes Bild	IV
5	43 von 500	8,6%	niedrige Proliferation, homogenes Bild	II
6	289 von 1000	28,9%	mäßige Proliferation, weitgehend homogenes Bild	III
7	110 von 500	22,0%	mäßige Proliferation, homogenes Bild	II
8	-	-	keine vitalen Zellen im Präparat	I
9	26 von 500	5,2%	geringe Proliferation, homogenes Bild	II
10	71 von 1000	7,1%	geringe Proliferation, in sklerosereichen Arealen geringe Proliferation, weitgehend homogenes Bild	III
11	35 von 500	7,0%	geringe Proliferation, große sklerosereiche Areale, homogenes Bild	II
12	341 von 1000	34,1%	mäßige Proliferation, weitgehend homogenes Bild	III
13	131 von 500	26,2%	mäßige Proliferation, sklerosereiche Areale geringere Proliferation, homogenes Bild	II
14	60 von 500	12,0%	niedrige Proliferation, homogenes Bild	II
15	279 von 1000	27,9%	geringe bis starke Proliferation, heterogenes Bild	III
16	213 von 1000	21,3%	mäßige Proliferation, weitgehend homogenes Bild	III
17	45 von 500	9,0%	niedrige Proliferation, homogenes Bild	II
18	-	-	kein Schnitt	II
19	309 von 1000	30,9%	niedrige bis starke Proliferation, heterogenes Bild	IV
20	7 von 500	1,4%	minimale Proliferation, homogenes Bild	II
21	480 von 1000	48,0%	starke bis sehr starke Proliferation, homogenes Bild	III
22	412 von 1000	41,2%	starke Proliferation, homogenes Bild	III
23	430 von 1000	43,0%	starke Proliferation, homogenes Bild	IV
24	442 von 1000	44,2%	starke Proliferation, homogenes Bild	III
25	161 von 1000	16,1%	geringe bis mäßige Proliferation, heterogenes Bild	III
26	404 von 1000	40,4%	starke Proliferation, überwiegend homogenes Bild	III
27	267 von 1000	26,7%	mäßige Proliferation, in sklerosereichen Arealen geringere Proliferation, weitgehend homogenes Bild	III

Tabellarische Übersicht der TUNEL assay (Apoptose) Auswertung

Fall	Auszählung	Anteil	Bemerkung	Zentraler Regressionsgrad
1	3 von 1000	0,3%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	IV
2	4 von 1000	0,4%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	IV
3	5 von 1000	0,5%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
4	6 von 1000	0,6%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	IV
5	1 von 500	0,2%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
6	4 von 1000	0,4%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
7	1 von 500	0,2%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
8	-	-	keine vitalen Zellen im Präparat	I
9	0 von 500	0,0%	homogenes Bild, keine Apoptose in Tumorzellen	II
10	1 von 1000	0,1%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
11	1 von 500	0,2%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
12	4 von 1000	0,4%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
13	5 von 500	1,0%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
14	2 von 500	0,4%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
15	11 von 1000	1,1%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
16	4 von 1000	0,4%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
17	6 von 500	1,2%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
18	1 von 500	0,2%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
19	5 von 1000	0,5%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	IV
20	2 von 500	0,4%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	II
21	3 von 1000	0,3%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
22	0 von 1000	0,0%	homogenes Bild, keine Apoptose in Tumorzellen	III
23	14 von 1000	1,4%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	IV
24	2 von 1000	0,2%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
25	2 von 1000	0,2%	homogenes Bild, niedrige Apoptoserate	III
26	0 von 1000	0,0%	homogenes Bild, keine Apoptose in Tumorzellen	III
27	-	-	kein Schnitt	III

Tabellarische Darstellung der Merkmale der neoadjuvant vorbehandelten Fälle in der SMA-Färbung

Fall	zentral (z) peripher (p)	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressionsmuster	Regressionsgrad	Gesamtgrad
1	z	peritumoral 3+	diffus	IV	IV
	p	peritumoral 2+	diffus	IV	
2	z	peritumoral 2+	diffus	IV	IV
	p	peritumoral 2+	diffus	IV	
3	z	peritumoral 1+	diffus	III	III
	p	peritumoral 3+	diffus	II	
4	z	peritumoral 3+	diffus	IV	IV
	p	peritumoral 2+	diffus	IV	
5	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	III
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	
6	z	peritumoral 1+	diffus	III	III
	p	peritumoral 1+	fokal	III	
7	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
8	z	diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	I	II
	p	peritumoral 1+	fokal	II	
9	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
	p	peritumoral 1+	fokal	II	
10	z	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	
11	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
	p	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	
12	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	kein Schnitt	-	-	
13	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
	p	diffus in der Fibrose 1+	diffus	I	
14	z	peritumoral 1+	fokal	II	II
	p	peritumoral 1+	fokal	II	
15	z	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 2+	diffus	III	
16	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 1+	fokal	III	
17	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	III
	p	kein Schnitt	-	-	
18	z	peritumoral 1+	fokal	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
19	z	peritumoral 3+	diffus	IV	III
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	
20	z	peritumoral 1+	fokal	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
21	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 1+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	II	
22	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	kein Schnitt	-	-	
23	z	peritumoral 3+	diffus	IV	IV

24	p	peritumoral 2+	diffus	IV	III
	z	peritumoral 1+	fokal	III	
25	p	kein Schnitt	-	-	III
	z	peritumoral 1+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	III	
26	p	peritumoral 1+ diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	z	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	III	
27	p	peritumoral 1+ diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	III
	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	
normales Pankreas	p	kein Schnitt	-	-	-
		periduktal 2+ intralobulär 1+	diffus	-	

Tabellarische Darstellung der Merkmale der neoadjuvant vorbehandelten Fälle in der Tenascin C Färbung

Fall	zentral (z) peripher (p)	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressionsmuster	Regressionsgrad	Gesamtgrad
1	z	peritumoral 2+ (heterogen)	diffus, fokal akzentuiert	IV	IV
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	IV	
2	z	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	IV	IV
	p	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	IV	
3	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	
4	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	IV	IV
	p	peritumoral 1+	fokal	IV	
5	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	III
	p	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	III	
6	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	
7	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
8	z	fokal in der Fibrose 3+	fokal	I	II
	p	peritumoral 2+	fokal	II	
9	z	peritumoral 1+ diffus in der Fibrose 3+	fokal	II	II
	p	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 3+	diffus, fokal akzentuiert	II	
10	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	
11	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
	p	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	
12	z	peritumoral 1+	fokal	III	III
	p	kein Schnitt	-	-	
13	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	II

		diffus in der Fibrose 2+			
	p	diffus in der Fibrose 1+	diffus, fokal akzentuiert	I	
14	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	fokal in der Fibrose 1+	fokal	II	
15	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
		diffus in der Fibrose 2+			
	p	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	
16	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 2+	fokal	III	
17	z	peritumoral 1+	fokal	II	III
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	peritumoral 1+	fokal	III	
18	z	peritumoral 1+	fokal	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
19	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	IV	III
		diffus in der Fibrose 2+			
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	
		diffus in der Fibrose 1+			
20	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
21	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
		diffus in der Fibrose 2+			
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	
		diffus in der Fibrose 3+			
22	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	peritumoral 1+	fokal	II	
23	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	IV	IV
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	IV	
		diffus in der Fibrose 1+			
24	z	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	kein Schnitt	-	-	
25	z	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 2+	fokal	III	
26	z	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	peritumoral 1+	diffus, fokal akzentuiert	II	
		diffus in der Fibrose 1+			
27	z	peritumoral 2+	fokal	III	III
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	kein Schnitt	-	-	
normales Pankreas		periduktal 1+	fokal	-	-

Tabellarische Darstellung der Merkmale der neoadjuvant vorbehandelten Fälle in der SPARC Färbung

Fall	zentral (z) peripher(p)	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressionsmuster	Regres- sions- grad	Gesamt- grad
1	z	peritumoral 3+	diffus	IV	IV
	p	peritumoral 3+	diffus	IV	
2	z	peritumoral 3+	diffus	IV	IV
	p	peritumoral 3+	diffus	IV	
3	z	peritumoral 1+	diffus	III	III
	p	peritumoral 2+	diffus	II	
4	z	peritumoral 3+	diffus	IV	IV
	p	peritumoral 3+	diffus	IV	
5	z	peritumoral 2+	diffus	II	III
	p	peritumoral 3+ diffus in der Fibrose 2+	diffus	III	
6	z	peritumoral 2+	diffus	III	III
	p	peritumoral 3+	diffus	III	
7	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
8	z	diffus in der Fibrose 3+	diffus	I	II
	p	peritumoral 3+ diffus in der Fibrose 3+	diffus	II	
9	z	peritumoral 3+ diffus in der Fibrose 2+	diffus	II	II
	p	peritumoral 1+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	II	
10	z	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	p	peritumoral 3+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	III	
11	z	peritumoral 2+	diffus	II	II
	p	peritumoral 3+ diffus in der Fibrose 2+	diffus	III	
12	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	III	III
	p	kein Schnitt	-	-	
13	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	II	II
	p	diffus in der Fibrose 1+	diffus	I	
14	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	II	II
	p	diffus in der Fibrose 1+	diffus	II	
15	z	peritumoral 3+	diffus	III	III
	p	peritumoral 2+	diffus	III	
16	z	peritumoral 3+	diffus	III	III
	p	kein Schnitt	-	-	
17	z	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 2+	diffus	II	III
	p	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 2+	diffus	III	
18	z	peritumoral 2+	diffus	II	II

		diffus in der Fibrose 1+			
19	p	kein Schnitt	-	-	
	z	peritumoral 3+	diffus	IV	III
	p	peritumoral 1+	diffus	III	
20		diffus in der Fibrose 1+			
	z	peritumoral 1+	diffus	II	II
	p	kein Schnitt	-	-	
21	z	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	peritumoral 3+	diffus	II	
22	z	peritumoral 3+	diffus	III	III
	p	peritumoral 1+	diffus	II	
		diffus in der Fibrose 2+			
23	z	peritumoral 3+	diffus	IV	IV
	p	peritumoral 2+	diffus	IV	
24	z	peritumoral 3+	diffus	III	III
	p	kein Schnitt	-	-	
25	z	peritumoral 2+	diffus	III	III
		diffus in der Fibrose 1+			
	p	peritumoral 2+	diffus	III	
		diffus in der Fibrose 1+			
26	z	peritumoral 3+	diffus	III	III
	p	peritumoral 1+	diffus	II	
		diffus in der Fibrose 1+			
27	z	peritumoral 2+	diffus	III	III
	p	kein Schnitt	-	-	
normales Pankreas		inter-/perilobulär 1+	diffus	-	-

Tabellarische Darstellung der Merkmale der neoadjuvant vorbehandelten Fälle in der NT-3 Färbung

Fall	zentral (z) peripher (p)	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressionsmuster	Regres- sions- grad	Gesamt- grad
1	z	peritumoral 2+	fokal	IV	IV
	p	peritumoral 1+	fokal	IV	
2	z	peritumoral 1+	fokal	IV	IV
	p	peritumoral 1+	fokal	IV	
3	z	peritumoral 1+	fokal	III	III
		Fibrose 1+			
	p	peritumoral 1+	fokal	II	
		Fibrose 2+			
4	z	peritumoral 1+	fokal	IV	IV
	p	peritumoral 1+	fokal	IV	
		Fibrose 2+			
5	z	peritumoral 1+	fokal	II	III
	p	peritumoral 1+	fokal	III	
6	z	peritumoral 1+	fokal	III	III
	p	peritumoral 1+	fokal	III	
		Fibrose 1+			
7	z	peritumoral 3+	multifokal	II	II

8	p	kein Schnitt	-	-	II
	z	periduktal 1+, vereinzelt Zellen in der Fibrose	fokal	I	
9	p	peritumoral 1+	fokal	II	II
	z	peritumoral 2+	fokal	II	
10	p	peritumoral 2+ Fibrose 2+	diffus, fokal akzentuiert	II	III
	z	peritumoral 1+	fokal	III	
11	p	peritumoral 1+	fokal	III	II
	z	peritumoral 1+	fokal	II	
12	p	Fibrose 1+	fokal	III	III
	z	peritumoral 1+	fokal	III	
13	p	kein Schnitt	-	-	II
	z	peritumoral 2+	multifokal	II	
14	p	periduktal 1+ Fibrose 2+	multifokal	I	II
	z	peritumoral 2+	multifokal	II	
15	p	Fibrose 2+	fokal	II	III
	z	peritumoral 1+	fokal	III	
16	p	peritumoral 1+	fokal	III	III
	z	peritumoral 1+	fokal	III	
17	p	Fibrose 2+	diffus, fokal akzentuiert	III	III
	z	peritumoral 2+	fokal	II	
18	p	peritumoral 2+	multifokal	III	II
	z	peritumoral 2+	fokal	II	
19	p	kein Schnitt	-	-	III
	z	peritumoral 2+	multifokal	IV	
20	p	peritumoral 1+ peritumoral 1+	multifokal	III	II
	z	peritumoral 3+	fokal	II	
21	p	kein Schnitt	-	-	III
	z	peritumoral 2+	multifokal	III	
22	p	peritumoral 1+ Fibrose 1+	fokal	II	III
	z	peritumoral 2+	multifokal	III	
23	p	Fibrose 2+	fokal	II	IV
	z	peritumoral 2+	fokal	IV	
24	p	peritumoral 1+	fokal	IV	III
	z	peritumoral 2++ Fibrose 1+	multifokal	III	
25	p	kein Schnitt	-	-	III
	z	peritumoral 1+	fokal	III	
26	p	peritumoral 1+	fokal	III	III
	z	peritumoral 1+	multifokal	III	
27	p	Fibrose 3+	diffus, fokal akzentuiert	II	III
	z	peritumoral 2+ Fibrose 1+	multifokal	III	
normales Pankreas	p	kein Schnitt	-	-	-
		periduktal 2+	diffus	-	

Tabellarische Darstellung der Merkmale der neoadjuvant vorbehandelten Fälle in der -
Crystallin B Färbung

Fall	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressions- muster	Regressionsgrad der zentralen Zone
1	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	IV
2	0	-	IV
3	0	-	III
4	periazinär 1+, inter-/perilobulär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	diffus	IV
5	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	II
6	periazinär 2++, inter-/perilobulär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	diffus	III
7	periazinär 1+, inter-/perilobulär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 2+	diffus	II
8	0	-	I
9	diffus in der Fibrose 1+	diffus	II
10	periazinär 1+, inter-/perilobulär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	III
11	einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	II
12	einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	III
13	0	-	II
14	periazinär 1+, inter-/perilobulär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	diffus	II
15	0	-	III
16	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	diffus	III
17	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	II
18	einzelne Zellen in der Fibrose 2+	diffus	II
19	diffus in der Fibrose 2+	diffus	IV
20	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	II
21	einzelne Zellen in der Fibrose 1+	diffus	III
22	diffus in der Fibrose 2+	diffus	III
23	periazinär 1+, diffus in der Fibrose 1+	diffus	IV
24	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	III
25	diffus in der Fibrose 2+	diffus	III
26	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	III
27	kein Schitt	-	III
normales Pankreas	periazinär 1+	fokal	

Untersuchung der therapienaiven PDAC-Fälle auf regressive Merkmale

PDAC	Schleim- seen	zytoplasm atische Vakuolen	Nekrose	Stroma	Tumor
1	-	ca. 5%	<5%	reichlich blaue, aktive Grundsubstanz	im gesamten Präparat
2	-	ca. 3%	<5%	heterogenes Stroma, Anteil der blauen Grundsubstanz überwiegt, überwiegend kompakt strukturiert	prominent
3	-	ca. 5%	<5%	teilweise stromaarm, Anteil der blauen Grundsubstanz überwiegt, überwiegend kompakt strukturiert	im gesamten Präparat
4	-	ca. 3%	-	heterogenes Stroma, Anteil der blauen Grundsubstanz überwiegt, locker strukturiert	prominent
5	-	ca. 3%	<5%	überwiegend blaue, aktive Grundsubstanz, locker strukturiert	im gesamten Präparat
6	-	ca. 3%	<5%	heterogenes Stroma, zentral: blaue, aktive Grundsubstanz, locker strukturiert, peripher: kollagenreicher, kompakter	im gesamten Präparat
7	-	ca. 3%	<10%	heterogenes Stroma, Anteil der blauen Grundsubstanz überwiegt, locker strukturiert	im gesamten Präparat
8	-	ca. 5%	<5%	heterogenes Stroma, zentral: blaue, aktive Grundsubstanz, locker strukturiert, peripher: kollagenreicher, kompakter	im gesamten Präparat
9	-	ca. 3%	<5%	heterogenes Stroma, zentral: blaue, aktive Grundsubstanz, peripher: kollagenreicher, kompakter	im gesamten Präparat
10	-	ca. 3%	<5%	heterogenes Stroma, zentral: blaue, aktive Grundsubstanz, locker strukturiert, peripher: kollagenreicher, kompakter	im gesamten Präparat

Tabellarische Übersicht der Ergebnisse nach Software-gestützter morphometrischer Analyse der Movat Pentachromfärbung therapienaiver Fälle

Fall	Relative Area blau	Relative Area gelb	Relative Area candid
1	50,63%	3,97%	6,35%
2	43,38%	3,22%	30,46%
3	49,08%	5,22%	12,86%
4	82,36%	8,05%	3,51%
5	54,19%	17,29%	13,92%
6	36,82%	6,33%	33,81%
7	64,64%	20,62%	8,61%
8	47,90%	12,19%	27,45%
9	67,30%	4,06%	20,72%
10	57,06%	5,01%	30,01%

Tabellarische Darstellung der Merkmale der therapienaiven PDAC-Fälle in der SMA-Färbung

PDAC	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressionsmuster	Kommentar
1	peritumoral 2+	diffus	peritumorale Färbung in Lymphknotenmetastase
2	peritumoral 2+ inter-/perilobulär 2+	diffus	-
3	peritumoral 3+	fokal	-
4	peritumoral 1+	diffus	-
5	peritumoral 1+	fokal	-
6	peritumoral 3+	diffus	-
7	peritumoral 2+	diffus	-
8	peritumoral 3+ inter-/perilobulär 1+	diffus	-
9	peritumoral 1+	diffus	-
10	peritumoral 2+	diffus	-
normales Pankreas	periduktal 2+ intralobulär 1+	diffus	-

Tabellarische Darstellung der Merkmale der therapienaiven PDAC-Fälle in der Tenascin C-Färbung

PDAC	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressionsmuster	Kommentar
1	peritumoral 2+	diffus, fokal akzentuiert	peritumorale Färbung in LK-Metastase
2	peritumoral 3+ periazinär 2+ inter-/perilobulär 2+	fokal	-
3	peritumoral 3+	diffus, fokal akzentuiert	-
4	peritumoral 3+ periazinär 1+ inter-/perilobulär 2+	diffus	-
5	peritumoral 2+ inter-/perilobulär 1+	fokal	-
6	peritumoral 3+ fokal in der Fibrose 3+	fokal	-
7	peritumoral 3+ fokal in der Fibrose 3+	diffus, fokal akzentuiert	-
8	peritumoral 3+ fokal in der Fibrose 3+	diffus	-
9	peritumoral 1+ periazinär 1+ fokal in der Fibrose 2+	fokal	-
10	peritumoral 3+ fokal in der Fibrose 3+	diffus	-
normales Pankreas	periduktal 1+	fokal	-

Tabellarische Darstellung der Merkmale der therapienaiven PDAC-Fälle in der SPARC Färbung

PDAC	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressions-muster	Kommentar
1	peritumoral 2+	diffus	peritumorale Färbung in Lymphknotenmetastase
2	peritumoral 2+ inter-/perilobulär 1+	diffus	-
3	peritumoral 2+ fokal in der Fibrose 3+	diffus	-
4	peritumoral 2+ periazinär 1+ inter-/perilobulär 2+	diffus	-
5	peritumoral 1+ periazinär 1+ inter-/perilobulär 1+	diffus	-
6	peritumoral 2+ fokal in der Fibrose 2+	diffus	-
7	peritumoral 3+ fokal in der Fibrose 2+	diffus	-
8	peritumoral 3+	diffus	-
9	diffus in der Fibrose 2+	diffus	-
10	peritumoral 2+ diffus in der Fibrose 1+	diffus	-
normales Pankreas	inter-/perilobulär 1+	diffus	-

Tabellarische Darstellung der Merkmale der therapienaiven PDAC-Fälle in der NT-3 Färbung

PDAC	Lokalisation und Häufigkeit in PSC/Matrix	Expressions-muster	Kommentar
1	peritumoral 2+ kollagenreiche Fibrose 2+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
2	peritumoral 1+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
3	peritumoral 2+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
4	peritumoral 2+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
5	peritumoral 2+ kollagenreiche Fibrose 2+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
6	peritumoral 3+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
7	peritumoral 2+	fokal	-
8	peritumoral 2+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
9	peritumoral in der Peripherie 3+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
10	peritumoral 3+	fokal	vereinzelt Färbung von Tumorzellen
normales Pankreas	periduktal 2+	-	Färbung von Inselzellen und einigen Gangepithelzellen

Tabellarische Darstellung der Merkmale der therapienaiven PDAC-Fälle in der -Crystallin B
Färbung

PDAC	Lokalisation und Häufigkeit von PSC/Matrix	Expressions- muster	Kommentar
1	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	Färbung von Tumorzellen
2	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	Färbung von Tumorzellen
3	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	Färbung von Tumorzellen
4	periazinär 1+ einzelne Zellen in der Fibrose 1+	fokal	Färbung von Tumorzellen
5	periazinär 1+	fokal	Färbung von Tumorzellen
6	periazinär 1+ diffus in der Fibrose 3+	diffus	Färbung von Tumorzellen
7	0	-	Färbung von Tumorzellen
8	periazinär 1+ diffus in der Fibrose 2+	diffus	Färbung von Tumorzellen
9	periazinär 1+ inter-/perilobulär 1+ diffus in der Fibrose 1+	fokal	Färbung von Tumorzellen
10	0	-	Färbung von Tumorzellen
normales Pankreas	periazinär 1+	fokal	-

Tabellarische Gegenüberstellung der histopathologischen Klassifizierung der 27 neoadjuvant vorbehandelten Fälle nach dem eigenen Regressionsmodell im Vergleich zu CAP

Fall	Regressionsgrad dieser Arbeit	CAP
1	IV	3
2	IV	3
3	III	2
4	IV	3
5	III	2
6	III	2
7	II	1
8	II	1
9	II	1
10	III	2
11	II	2
12	III	2
13	II	1
14	II	1
15	III	2
16	III	2
17	III	2
18	II	1
19	III	2
20	II	2
21	III	2
22	III	2
23	IV	3
24	III	2
25	III	2
26	III	2
27	III	2

11 Danksagung

Mein Dank gilt...

... im Besonderen Frau Prof. Dr. Irene Esposito für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, ihr entgegengebrachtes Vertrauen, ihre liebenswürdige Unterstützung und bemerkenswerte Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus hat sie mir unvergessene Einblicke in Diagnostik und Forschung der Pathologie ermöglicht.

... allen Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgemeinschaft Esposito, im Speziellen Frau Dr. med. Lena Häberle, für die stets freundschaftliche Unterstützung und unermüdlich fleißige Zusammenarbeit, Frau Dr. med. vet. Katja Steiger für vielfach hilfreiche Ratschläge und Organisation sowie Herrn Dr. med. Björn Konukiewicz für die warmherzige und wertvolle Unterstützung bei der Sichtung der Präparate. Ein großes Dankeschön für die kollegiale Forschungszeit in München gilt Melissa, Sonja, Susi, Angi, Sandra und Ralph.

... dem Routinelabor der Pathologie TU München, unter Leitung von Frau Anette Haas und dem Immunhistochemielabor unter Leitung von Frau Petra Meyer, für Färbetipps und durchgeführte Färbungen.

... Frau Dr. rer. nat. Annette Feuchtinger für die Software-gestützte morphometrische Analyse der Movat-Pentachromfärbung und Herrn Diplom Ing. Carsten Jäger für die Unterstützung der statistischen Auswertungen.

... den leitenden Direktoren der Pathologien TU München, Freising, Neuperlach, Bamberg und Böblingen für die unkomplizierte Bereitstellung des Gewebematerials.

... meiner lieben Kommilitonin und Kollegin Alissa Jell, für ihre Freundschaft und die Erstellung des Layouts.

... von Herzen meinen Eltern, Dr. med. Wolfgang und Brigitte Kapp, für ihre liebevolle und uneingeschränkte Förderung meiner Interessen und Ideen bis heute.