



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Fakultät für Medizin

**Detektion zirkulierender Tumorzellen im venösen Vollblut von
Patienten mit einem metastasierten Urothelkarzinom während der
Chemotherapie mit Paclitaxel und RAD001**

Stephanie Hromatke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Margitta Retz
2. Prof. Dr. Florian Bassermann

Die Dissertation wurde am 09.09.2021 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 05.01.2022
angenommen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1 Anatomie der Harnblase	7
1.2 Risikofaktoren für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms	10
1.3 Histologische Klassifikation und Pathogenese	11
1.4 Symptomatik	13
1.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	13
1.6 Radiologische Diagnostik und Staging des Harnblasenkarzinoms	14
1.7 Stadienadaptierte Therapie des Harnblasenkarzinoms	15
1.8 Hintergrund der Studie	17
1.9 Ziele der Studie	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Studiendesign und ethische Grundlagen	20
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien für die CRAD001LDE17T Studie	22
2.3 Studienmedikation	25
2.3.1 Paclitaxel	25
2.3.2 RAD001	26
2.4 Untersuchungen bei Studieneinschluss und im Verlauf der Therapie ...	27
2.5 Studienablauf und Verlaufsbeurteilung	28
2.6 Bestimmung des objektiven Therapieansprechens	29
2.7 Routinelaborparameter	31
2.8 Evaluation der Leistungsfähigkeit anhand des ECOG-Status	32
2.9 Dokumentation der Studiendaten - Datenplattform	33
2.10 CTC Detektion	33
2.11 CTC Detektion in der CRAD001LDE17T Studie	36
2.12 Assoziation der CTC Zahl mit dem Therapieverlauf	37
2.13 Statistische Auswertung	38
3. Ergebnisse	40
3.1 Patientenkollektiv	40
3.1.1 Demographie	40
3.1.2 Vortherapien	42
3.1.3 Metastasierungsmuster	42
3.1.4 Therapieverlauf	43
3.2 CTC Detektion im Patientenkollektiv	45
3.2.1 CTC Zahl im gesamten Kollektiv im Therapieverlauf	45
3.2.2 CTC Detektion bei den Studienteilnehmern mit 6 Zyklen Chemotherapie	47
3.2.3 CTC Detektionsrate in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters	48
3.2.4 Höhe der CTC Zahl in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters	49
3.3 Assoziation der CTC Zahl mit Routinelaborparametern	51
3.3.1 Assoziation der CTC Zahl mit dem Hämoglobin-Wert	51
3.3.2 Assoziation der CTC Zahl mit der Laktatdehydrogenase	52
3.3.3 Assoziation der CTC Zahl mit der Alkalischen Phosphatase	53
3.4 Assoziation der CTC Zahl mit der Leistungsfähigkeit des Patienten ...	55
3.4.1 Assoziation der CTC Zahl mit dem ECOG-Status bei Studienbeginn	56
3.5 Assoziation der CTC Zahl mit dem objektiven Therapieansprechen	57

Inhaltsverzeichnis

3.5.1 CTC Zahl in Abhängigkeit des frühen objektiven Therapieansprechens.....	60
3.5.2 Assoziation der CTC Zahl mit dem Therapieansprechen im Studienverlauf	63
3.6 Assoziation der CTC Zahl mit dem PFS und dem OS	65
3.6.1 Assoziation der CTC Zahl mit dem progressionsfreien Überleben.....	66
3.6.2 Assoziation der CTC Zahl mit dem Gesamtüberleben	68
4. Diskussion	70
4.1 Detektion zirkulierender Tumorzellen beim metastasierten Urothelkarzinom	70
4.1.1 Assoziation der CTC Zahl und dem Metastasierungsmuster	72
4.1.2 Assoziation der CTC Zahl und dem besten Therapieansprechen.....	74
4.1.3 Rückschlüsse auf die prognostische Bedeutung von CTCs	75
4.1.4 Assoziation der CTC Zahl mit Routinelaborparametern	76
4.1.5 Assoziation der CTC Zahl und dem ECOG- Status des Patienten.....	77
4.2 Kritische Betrachtung des CellSearch® Systems	78
4.3 Patientenkollektiv	80
4.4 Kritische Betrachtung der Studie	81
5. Zusammenfassung.....	84
Literaturverzeichnis.....	86
Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	98
Anhang	99
Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
Art.	Arteria/ Arterie
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
BTA	Blasentumor-Antigen
bzw.	beziehungsweise
CD 45	Cluster of differentiation
CK PE	Zytokeratin Antikörper an Phycoerythrin gebunden
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CSS	Cell Search® System
CT	Computertomographie
CTC	zirkulierende Tumorzelle
CTCs	zirkulierende Tumorzellen
DAPI	Diamino-2-Phenylindol
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digital Rektale Untersuchung
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EOT	End of Treatment
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
FDA	United States Food and Drug Administration
FITC	Anti Fluorescein
5 FU	5 Fluoruracil
ggf.	gegebenenfalls
HA-HAase Test	Hyaluronic acid- Hyaluronidase Test
Hb	Hämoglobin

Abkürzungsverzeichnis

HD	high dose
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i. v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LDH	Laktatdehydrogenase
Lig.	Ligamentum
LK	Lymphknoten
m	männlich
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin
Na ² EDTA	Natrium Ethyldiamintetraessigsäure
NMP22	nuclear matrix protein 22
NYHA	New York Heart Association
OS	Overall Survival
PD	Progressive Disease
PD-L1	Programmed Cell Death Protein Ligand 1
PFS	Progression Free Survival
p. o.	per os
PR	Partial Response
PS	Performance Status
q	Zyklus der Paclitaxel und RAD001 Therapie
QLQ-C30	Quality of Life Questionnaire-Core 30
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
RKI	Robert Koch Institut
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SOP	Standard Operating Procedure
Tc 99m	Technetium 99m
TNM	Klassifikation zur Einstufung des Tumorstadiums; T= Tumor, N= Lymphknoten, M= Metastasen
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase

Abkürzungsverzeichnis

UICC	Union for International Cancer Control
ULN	upper limit of normal/ obere Normalgrenze
vs	versus
w	weiblich
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Im Laufe ihres Lebens erkranken laut Krebsregisterdaten des Robert Koch Institutes (RKI) von 2016 43 % der Frauen und 51 % der Männer in Deutschland an Krebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 69 Jahren und bei Männern bei 70 Jahren (Robert Koch Institut, 2016). Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste Tumor im Urogenitaltrakt. Etwa 2 % aller malignen Entartungen lassen sich auf Karzinome der Harnblase zurückführen. Für den Mann ist dies nach Lunge, Prostata und Kolon somit die vierthäufigste und für die Frau die vierzehnthäufigste Tumorerkrankung. Allein 2012 wurde bei 15.410 Deutschen zum ersten Mal ein invasives Harnblasenkarzinom nachgewiesen. Ein Viertel der Neuerkrankungen traten bei Frauen auf. Additiv dazu kamen noch rund 13.500 Neuerkrankte mit nicht-invasiven papillären Karzinomen und in situ Tumoren der Harnblase (Robert Koch Institut, 2015). Bei Erstdiagnose weisen 75 % der Patienten ein oberflächliches, 20 % ein invasives und 5 % bereits ein metastasiertes Harnblasenkarzinom auf. Vergleicht man die Anzahl der Neuerkrankungen der einzelnen Länder, so stellt man fest, dass die Inzidenz in industrialisierten Ländern drei Mal höher ist als in Entwicklungsländern (Rink et al., 2012). Auch zwischen den Geschlechtern besteht ein Unterschied in der Inzidenz. Ab dem 25. Lebensjahr sind Männer dreimal häufiger betroffen als Frauen und der altersabhängige Anstieg ist bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen (DGU, S3 Leitlinie, 2016). An den Folgen der Tumorerkrankung starben allein 2012 in Deutschland 5.617 Menschen. Ein Drittel davon waren Frauen (Robert Koch Institut, 2015). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei nicht-invasiver Erkrankung bei 94 %. Sobald jedoch Metastasen vorliegen sinkt das 5-Jahres-Überleben auf unter 20 % (von der Maase et al., 2005). Fast die Hälfte aller Patienten entwickeln Metastasen und sterben letztendlich an der Erkrankung (Stein et al., 2001).

1.1 Anatomie der Harnblase

Die Harnblase (Vesica urinaria) liegt hinter der Symphyse im kleinen Becken und sammelt den von den Nieren produzierten Urin. Zusammen mit der Harnröhre bildet die Harnblase den unteren Harntrakt. Beim Mann ist der Blasengrund fest mit der

Prostata verwachsen. Bei der Frau grenzt die Harnblase unten an die Cervix uteri und die Vorderwand der Vagina. Bis auf den Bereich im Trigonum vesicae, also der Einmündung der Ureteren, ist die Schleimhaut der Blase gegen die Muskelschicht verschieblich und liegt in leerem Zustand in zahlreichen Falten. Anatomisch lässt sich die Blase in 4 Teile gliedern. Die kraniale Fläche der Blase ist von Peritoneum überzogen und wird als Apex vesicae bezeichnet. Der Corpus vesicae, also der Blasenkörper, macht den größten Anteil der Blase aus. Die Urethra tritt am Blasengrund (Fundus vesicae) aus der Blase aus. Und der trichterförmige Blasen Hals wird als Cervix vesicae bezeichnet. Die Harnblase wird sowohl durch den Beckenboden, als auch den Musculus retrourethralis, den Musculus vesicovaginalis und das Lig. pubovesicale bei der Frau und bei Mann durch den Musculus vesicoprostaticus und das Lig. puboprostaticum an ihrem Platz gehalten. Die Harnblase an sich besteht aus vier Schichten, welche von innen nach außen wie folgt aufgebaut sind: Die Mucosa besteht aus spezialisiertem Übergangsepithel, dem Urothel, zum Schutz vor den osmotischen Einflüssen des Harns. Direkt daran grenzt die Submukosa. Um sowohl die Kontinenz, als auch die Miktion zu gewährleisten besitzt die Harnblase eine ausgeprägte, mehrschichtige Muskularis. Die äußere Schicht bildet die Adventitia, welche dem Einbau in das umliegende Bindegewebe dient. Nerval versorgt wird die Blase durch den Sympathikus und Parasympathikus im Plexus vesicalis. Die arterielle Versorgung erfolgt über die Arteria vesicalis inferior aus der Art. iliaca interna und der Art. vesicalis superior aus der Art. umbilicalis. Über den Plexus venosus vesicalis erfolgt der venöse Abfluss in die Vena iliaca interna. Das normale Fassungsvermögen der Blase beträgt ca. 500 cm³ und kann jedoch erheblich variieren (Guzzo et al., 2012).

Einleitung

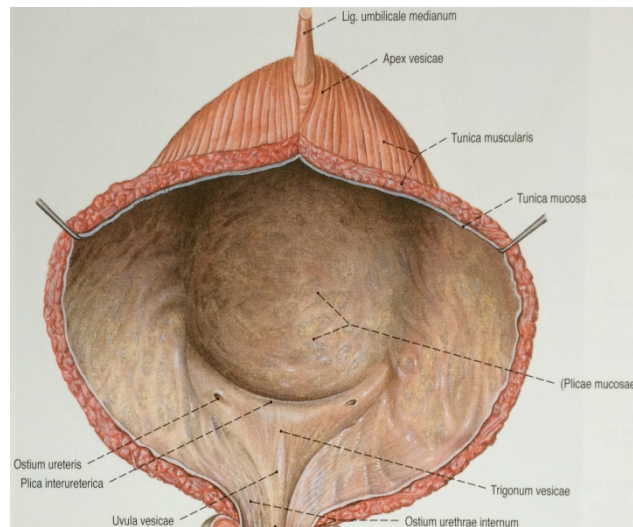


Abbildung 1: Anatomie der Harnblase von ventral (Putz/Pabst, Sobotta, 2007)

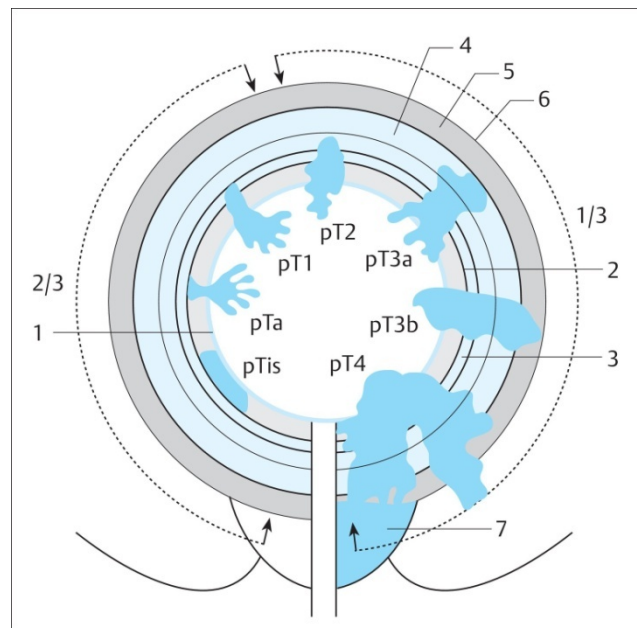


Abbildung 2: T-Stadien des Harnblasenkarzinoms (gemäß TNM-Klassifikation der UICC von 2017) (Schmid et al., 2018)

1 = Schleimhaut, 2 = Lamina propria, 3 = Submukosa, 4 = Muskularis, innere Schicht,
5 = Muskularis, äußere Schicht, 6 = Adventitia, 7 = Prostata.

1.2 Risikofaktoren für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms

Zahlreiche Toxine sind in der Literatur als Auslöser des Harnblasenkarzinoms beschrieben. Beim Mann sind 48 % und bei der Frau 28 % der durch Harnblasenkrebs bedingten Todesfälle auf den jahrelangen aktiven und passiven Konsum von Zigaretten zurückzuführen (Zeegers et al., 2000). Dabei spielt vor allem 2-Naphthylamin eine entscheidende Rolle. Die Karzinogene werden über die Lunge aufgenommen, gelangen in die Blutbahn, werden über die Nieren filtriert und erreichen so in konzentrierter Form die Harnblase. Auch aromatische Amine, die durch die Leber hydroxyliert und glukoronidiert werden, finden so ihren Weg in die Blase. Aromatische Amine werden bei Zwischenschritten in der Farbstoffsynthese und auch bei der Zersetzung und Zerstörung von Farben freigesetzt. Des Weiteren ist die kanzerogene Wirkung von polyzyklischen aromatischen Wasserstoffen, welche bei Verbrennungsprozessen entstehen, sowie für die Medikamente Chlornaphazin, Phenacetin und Cyclophosphamid beschrieben (Burger et al., 2012). In Ländern wie China und Indien spielt auch mit Arsen verseuchtes Grundwasser eine große Rolle (Mink et al., 2008). Der immer wieder auftauchende allgemeine Risikofaktor der Umweltverschmutzung scheint einen niedrigen Stellenwert zu besitzen. Was jedoch nicht außer Acht gelassen werden darf, ist der Einfluss der genetischen Prädisposition auf die Tumorentstehung (Ahirwar et al., 2008). Zwischen dem Kontakt mit Kanzerogenen und dem Auftreten des Tumors liegt in der Regel eine Latenzzeit von 10-40 Jahren (Gazdar et al., 2001). Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die bekannten beziehungsweise die vermuteten Risikofaktoren für die Entstehung eines Urothelkarzinoms der Harnblase (Tabelle 1).

Da viele der oben genannten Stoffe früher in der Industrie eine große Rolle gespielt haben und die Latenzzeit zwischen Exposition und Erkrankung lang ist, werden auch heute noch Harnblasenkarzinome als Berufserkrankung anerkannt, wenn die Patienten in ausgewählten Arbeitsbereichen tätig waren. Zu den betroffenen Personenkreisen zählen Arbeiter in Malerei- und Lackierbetrieben, Chemiemitarbeiter, Arbeiter im Holz-, Metall- und Bergbau, als auch in der Textil- und Lederverarbeitung (Robert Koch Institut, 2015; DGU, S3 Leitlinie, 2016).

Tabelle 1: Risikofaktoren Harnblasenkarzinom (Facharztwissen Urologie, 2014)

Risikofaktoren	Zusammenhang	Bemerkung
Rauchen	Gesichert	2- bis 6-fach erhöhtes Risiko
Berufsbedingt (Färbemittelindustrie, Gummiindustrie, Maler, Lederindustrie)	Gesichert für aromatische Amine	Latenzzeit zwischen 15–40 Jahren
Cyclophosphamid	Gesichert	Dosisabhängige Beziehung, v. a. Plattenepithelkarzinome und Sarkome
Phenacetin	Gesichert	2- bis 6-fach erhöhtes Risiko
Chronische Infektionen (Schistosoma haematobium, andere Zystitiden)	Gesichert für Schistosoma, möglich für andere	
Strahlentherapie	Wahrscheinlich	1,4-fach erhöht nach externer Bestrahlung der Prostata
Karzinogene im Trinkwasser (Arsen, Produkte der Chlorung [Haloalkane], Pestizide)	Möglich	

1.3 Histologische Klassifikation und Pathogenese

Entsprechend der WHO-Klassifikation von 2016 werden urotheliale Neoplasien im Gegensatz zur Klassifikation von 2004 lediglich in 2 Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe werden alle Arten des invasiven Urothelkarzinoms zusammengefasst. Die zweite Gruppe bilden nicht-invasive urotheliale Läsionen (DGU, S3 Leitlinie, 2016). Urothelkarzinome machen mehr als 90 % der Blasentumore aus. Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome sind mit 3-5 % bzw. 1-2 % deutlich seltener. Sekundäre Blasentumore, mesenchymale Tumoren und Infiltrationen von Hämoblastosen stellen mit <1 % den kleinsten Anteil dar. Blasentumore treten entweder unifokal oder multifokal in Erscheinung (Dahm et al., 2003).

Die klinische Einteilung erfolgt mit Hilfe der TNM-Klassifikation, welche in der Tabelle 2 dargestellt ist.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (Facharztwissen Urologie, 2014)

Stadium		Charakteristika/Definition
Primärtumor		
Ta		Nichtinvasiver papillärer Tumor
Tis		Carcinoma in situ
T1		Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2		Tumor infiltriert die Muskulatur
	T2a	Tumor infiltriert die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
	T2b	Tumor infiltriert die tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3		Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
	T3a	Mikroskopisch
	T3b	Makroskopisch
T4		Tumor infiltriert:
	T4a	Prostata, Uterus, Vagina
	T4b	Becken- oder Bauchwand
Regionäre Lymphknoten		
NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		Eine LK-Metastase im Becken (hypogastrisch, obturatorisch, iliakal extern, präsakral)
N2		Mehrere LK-Metastasen im Becken (hypogastrisch, obturatorisch, iliakal extern, präsakral)
N3		LK-Metastase im Bereich der V. iliaca communes
Fernmetastasierung		
Mx		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen

Aufgrund der guten Versorgung der Muskulatur der Harnblase mit Blut- und Lymphgefäßen bestehen gute Voraussetzungen zur Gefäßinfiltration und Generalisierung der Erkrankung. 5 % der Patienten weisen bei Erstdiagnose bereits Metastasen auf. Die regionalen Lymphknoten sind am Häufigsten von Metastasen betroffen, wobei die Wahrscheinlichkeit der lymphogenen Metastasierung mit dem Tumorstadium korreliert (Kausch et al., 2007). Bei nicht-muskelinvasivem Wachstum liegen in 5 % Lymphknotenmetastasen vor, bei T2a Tumoren bereits in 18 % der Fälle und bei T2b in 27 % der Fälle. Patienten mit T3 und T4 Tumoren sind in 43-45 % von lymphogenen Metastasen betroffen, wobei nochmals ein deutlicher Unterschied zwischen T4a (40 %) und T4b (80 %) zu vermerken ist (Leissner et al., 2004). Bevorzugte hämatogene Metastasierungsorte stellen Leber, Lunge und Knochen dar (Zeegers et al., 2004). Auch hier sind bei nicht-muskelinvasiven Tumoren Metastasen selten (<1 %). Tumorpatienten im Stadium pT1 G3 weisen in

10 % Fernmetastasen auf, Patienten im Stadium pT2/3 bereits in 30-60 %. Über 60 % der Tumorpatienten sind in Leber, Lunge oder Knochen metastasiert, wenn sie sich im Stadium pT4 befinden (Kausch et al., 2007).

1.4 Symptomatik

Das Leitsymptom eines Blasenkarzinoms ist die schmerzlose Makro- oder Mikrohämaturie. Dies trifft sowohl auf das nicht-invasive, als auch auf das invasive Karzinom zu. Weitere Symptome können Pollakisurie, Nykturie, Dysurie oder eine Urge-Symptomatik sein. Wächst das Karzinom in der Nähe der Ostien, kann dies zu einer uni- oder bilateralen Harnstauungsniere mit daraus resultierenden Flankenschmerzen führen (Zeegers et al., 2004; Bruyninckx et al., 2003).

1.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Bei V.a. einen Blasentumor erfolgt eine klinische Untersuchung mit Palpation der Nierenlager, des Abdomens, des Unterbauches und eine digital rektale Untersuchung (DRU) bei Männern, für die Untersuchung der Prostata und eine vaginale Untersuchung bei Frauen für die lokale Ausbreitungsdiagnostik. Anschließend kann eine zytologische Untersuchung des Spontanurins oder einer Blasenspülprobe auf Transitionalzellen und Karzinomzellen durchgeführt werden. Diese Methode ist nicht invasiv und ist deshalb ideal um möglichst frühzeitig durchgeführt zu werden. Die Sonographie des Abdomens und der Harnblase kann eine Beurteilung eventueller Raumforderungen der Nieren und größerer intra- und extraluminal gelegener Veränderungen der Harnblase ermöglichen (Meola et al., 2012). Zusätzlich kann mit Hilfe der Sonographie beurteilt werden, ob ein Harnstau des Nierenbeckenkelchsystems vorliegt (DGU, S3 Leitlinie, 2016). In der heute noch bestehenden urologischen Routine können durch die intravenöse Pyelographie mit Hilfe von Kontrastmittelaussparungen im Hohlsystem ggf. Tumoren in der Blase, dem Nierenbeckenkelchsystem und den Harnleitern dargestellt werden (Purysko et al., 2012). Jedoch wird die Ausscheidungsurographie zunehmend durch schnittbildgebende Verfahren wie CT und MRT aufgrund einer verbesserten Sensitivität verdrängt (DGU, S3 Leitlinie, 2016). Mit Hilfe der starren oder flexiblen

Zystoskopie wird die Blase selbst, sowie auch die Harnleiterostien und die Harnröhre, nach möglichen Quellen der Mikro- oder Makrohämaturie bzw. auf das Vorliegen von Tumoren beurteilt. Da diese Untersuchung mit mehr Aufwand verbunden und für den Patienten invasiv ist, eignet sie sich nicht für ein Screening, sondern nur als gezielte Untersuchung, wenn ein Verdacht besteht. Die Zystoskopie stellt momentan den Goldstandard der lokalen Diagnostik dar (Bi et al., 1993; Kamat et al., 2012). Bei positiven Befunden in der Urinzytologie oder suspekten Arealen in der Blase können multifokal Biopsien entnommen werden (Al Hussain et al., 2013). Diese histologische Sicherung des Harnblasenkarzinoms erfolgt mit Hilfe der transurethralen Resektion der Harnblase (TUR-B). Dabei ist das primäre Ziel den Tumor komplett zu reseziieren, unter Einbeziehung der muskulären Schichten der Harnblase. Die nachfolgende histopathologische Auswertung mit Bestimmung der Infiltrationstiefe des Tumors anhand des T-Stadiums sowie des Tumorgradings stellt die Entscheidungsgrundlage für die weitere Diagnostik und Therapie dar (DGU, S3 Leitlinie, 2016).

1.6 Radiologische Diagnostik und Staging des Harnblasenkarzinoms

Beim muskelinvasiven Urothelkarzinom ist eine Ausbreitungsdiagnostik, ein sogenanntes Staging erforderlich. Um die fragliche Invasion oder Metastasierung von Nachbarorganen zu klären, sollte eine CT oder eine MRT durchgeführt werden (Purysko et al., 2012). Eine CT des Beckens kann dazu genutzt werden, um die Iliakalregion, die Fossa obturatoria und die paraaortale bzw. paracavale Region nach Lymphknotenmetastasen abzusuchen. Bei der Durchführung der mehrphasigen kontrastmittelgestützten CT soll das gesamte Abdomen, einschließlich des Beckens, berücksichtigt werden und soll zusätzlich eine urographische Phase mit CT-Urographie des oberen Harntraktes beinhalten. Alternativ kann ggf. auch eine MRT durchgeführt werden (DGU, S3 Leitlinie, 2016). Zur Abklärung von Lungenmetastasen wurde über lange Zeit ein Röntgen Thorax in zwei Ebenen angefordert (Purysko et al., 2012). Jedoch sollte entsprechend der aktuellen S3 Leitlinie zum Harnblasenkarzinom eine CT des Thorax durchgeführt werden, da diese sensitiver als die klassische Röntgenuntersuchung des Thorax ist (DGU, S3 Leitlinie, 2016). Über das potentielle Vorhandensein von Knochenmetastasen gibt

eine Knochenszintigraphie Aufschluss (Majewski et al., 2012). Die Szintigraphie ist jedoch nur bei Verdacht auf das Vorliegen von Knochenmetastasen durchzuführen, z.B. bei Schmerzen oder einer erhöhten alkalischen Phosphatase im Blut. Ebenso ist eine Schädel-CT (CCT) nur bei klinischem Verdacht auf zerebrale Metastasen erforderlich (DGU, S3 Leitlinie, 2016).

Bei Patienten mit einem metastasierten Blasenkarzinom sollte ein analoges Staging mit CT-Thorax/ Abdomen/ Becken sowie ggf. ergänzend Skelettszintigraphie und CCT erfolgen. Im Rahmen einer Chemotherapie sollte die Diagnostik sowohl initial bei Diagnose bzw. vor Beginn der Therapie erfolgen, als auch im Therapieverlauf im Abstand von jeweils zwei Zyklen der Chemotherapie (DGU, S3 Leitlinie, 2016).

1.7 Stadienadaptierte Therapie des Harnblasenkarzinoms

Je nachdem wie weit fortgeschritten das Harnblasenkarzinom bei seiner Entdeckung ist, wird dem Patienten die jeweilige Therapie zugeführt.

Bei den nicht-invasiven Urothelkarzinomen der Harnblase unterscheidet sich die Therapie des Carcinoma in situ von der Therapie der papillären Urothelkarzinome. Bei Vorliegen eines Carcinoma in situ wird das betroffene Areal endoskopisch über einen transurethralen Zugang mittels TUR Blase reseziert (Librenjak et al., 2012). Hierbei steht jedoch nicht die komplette chirurgische Resektion im Vordergrund, sondern vielmehr die histologische Sicherung. Anschließend erfolgt eine topische Immunotherapie mit Bacillus-Calmette-Guérin (BCG). Im Falle eines Therapieversagens besteht die Indikation zur Zystektomie (DGU, S3 Leitlinie, 2016). Oberflächliche Karzinome der Stadien Ta/ T1 werden operativ transurethral komplett entfernt. Je nach Grading und Klassifikation erfolgt eine Nachresektion oder gegebenenfalls eine Rezidiv- bzw. Progressionsprophylaxe mit einem lokal angewendeten Chemotherapeutikum, z. B. mit Mitomycin C oder BCG (Roupret et al., 2010; DGU, S3 Leitlinie, 2016). In der heutigen Zeit gehört außerdem die Induktions- und gegebenenfalls sogar die Erhaltungstherapie mit Immuntherapeutika wie dem Tuberkulose Impfstoff BCG zur Senkung der Rezidiv Häufigkeit und des Progressionsrisikos zum Standardprocedere beim nicht-invasiven Urothelkarzinom (DGU, S3 Leitlinie, 2016; Sylvester et al., 2002).

Die radikale Zystektomie ist die Therapie der Wahl bei bereits lokal invasivem Wachstum (Griffiths et al., 2012). Um das Überleben zu verbessern wird den

Patienten ggf. eine adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie empfohlen (Matsubara et al., 2013). Die Harnableitung kann anschließend z. B. durch eine Neoblase oder ein Ileum Conduit erfolgen (Philip et al., 2009).

Beim metastasierten Urothelkarzinom soll, wenn der Allgemeinzustand und die Komorbidität des Patienten es erlauben, eine cisplatinhaltige Chemotherapie z. B. mit Gemcitabin/ Cisplatin, durchgeführt werden. Dieses Regime hat eine ähnliche Wirksamkeit wie die ursprüngliche Therapie mit Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin (MVAC) oder high dose (HD)-MVAC (DGU, S3 Leitlinie, 2016). Aufgrund von gesundheitlichen Einschränkungen (ECOG Performance Status (PS) ≥ 2 oder Karnofsky PS ≤ 70 %), einer Kreatinin-Clearance von unter 60 ml/min, einem höhergradigen Hörverlust, einer peripheren Neuropathie oder einer Herzinsuffizienz von \geq NYHA III können 30-50 % der Patienten keine cisplatin-basierte Therapie erhalten. Bei lediglich geringer Einschränkung der oben genannten Parameter kann überlegt werden, Cisplatin in aufgeteilten Dosen zu verabreichen. Alternativ kann eine Therapie mit Gemcitabin/Carboplatin oder eine Monochemotherapie durchgeführt werden. Hier lässt sich nach heutigem Kenntnisstand jedoch weder eine Präferenz bezüglich einer einzelnen Substanz, noch der geeigneten Anzahl an Chemotherapiezyklen aussprechen (DGU, S3 Leitlinie, 2020). Nach aktuellen Empfehlungen kommt auch eine Therapie mit den Checkpoint-Inhibitoren Atezolizumab oder Pembrolizumab in Betracht. Die Voraussetzung hierfür ist ein positiver PD-L1-Status. Auf Grund der noch dürftiger Datenlage kann noch keine Empfehlung bezüglich der präferierter Therapie mit Zytostatika oder Checkpoint-Inhibitoren ausgesprochen werden (DGU, S3 Leitlinie, 2020).

Eine Zweitlinienchemotherapie beim metastasierten Harnblasenkarzinom sollte bei Tumorprogress nach primärer Chemotherapie oder nach perioperativer Chemotherapie oder Immuntherapie angeboten werden (DGU, S3 Leitlinie, 2020). Nach Versagen einer platinhaltigen Therapie soll die Behandlung mit dem Immuncheckpoint Inhibitor Pembrolizumab erfolgen. Gegebenenfalls kann diese auch mit Atezolizumab oder Nivolumab durchgeführt werden. Nur bei vorliegenden Kontraindikationen gegen Immuncheckpoint-Inhibitoren soll die Therapie mit Vinflunin erfolgen. Alternativ kann auch Gemcitabin mit Paclitaxel in Kombination eingesetzt werden, aber nur dann, wenn diese Chemotherapeutika nicht bereits in der Primärtherapie zur Anwendung gekommen sind (DGU, S3 Leitlinie, 2020). Bei Versagen einer Erstlinientherapie mit Checkpoint-Inhibitoren kann als

Zweitlinientherapie eine Mono- oder Kombinationschemotherapie durchgeführt werden (DGU, S3 Leitlinie, 2020).

1.8 Hintergrund der Studie

Chemotherapie naive Patienten mit einem metastasierten Harnblasenkarzinom haben eine schlechte Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von weniger als 6 Monaten. Eine Chemotherapie mit Gemcitabine und Cisplatin ist die Therapie der ersten Wahl bei lokal fortgeschrittenem oder metastasierten Urothelkarzinomen (DGU, S3 Leitlinie, 2016). Eine Zweitlinienchemotherapie nach Versagen einer platinhaltigen Chemotherapie war zum Zeitpunkt dieser Studie nicht definiert. Ziel der vorliegenden Studie ist die Evaluation der Effektivität und Sicherheit der Kombinationstherapie von RAD001 plus Paclitaxel bei Patienten mit einem metastasierten Urothelkarzinom nach Versagen einer vorhergehenden platinbasierten Chemotherapie. In dieser Studie wird unter Zuhilfenahme von CT, MRT und Skelettszintigraphie die Tumoransprechrates und die Tumorprogression mit Hilfe der RECIST Kriterien beurteilt.

Aktuell existiert kein Tumormarker, um den Erfolg einer Chemotherapie bei Patienten mit einem metastasierten Urothelkarzinom der Harnblase einschätzen oder kontrollieren zu können. Die genannten Möglichkeiten des Stagings mit bildgebenden Verfahren (CT, MRT, Skelettszintigraphie) können den therapeutischen Erfolg oder Misserfolg nur unzureichend abschätzen. Deswegen wäre eine sensitivere Methode vorteilhaft, um frühzeitig den therapeutischen Erfolg abschätzen zu können.

Ein diagnostischer Ansatz ist die Detektion zirkulierender Tumorzellen mit dem CellSearch®-System (Veridex, Immunicon, PA, USA). Das CellSearch®-System ist eine automatisierte Präparations- und Analysenmethode zur quantitativen Detektion und Zählung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) im peripheren Blut von Tumorpatienten. Die Detektion von CTCs mit dem CellSearch®-System ist eine standardisierte und leicht anwendbare Methode mit der Möglichkeit über einen nicht invasiven Zugang kurzfristig und zu jedem Zeitpunkt den Therapieerfolg der Chemotherapie individuell zu evaluieren. Beim Mamma-, Colon- und Prostatakarzinom wird das CellSearch®-System zur Detektion von CTCs zur Therapieüberwachung und Nachsorge eingesetzt. Die FDA hat diese Untersuchungsmethode für die Überwachung von Patienten mit fortgeschrittenem

Mamma- und Colonkarzinom bereits 2004 zugelassen (Hayes et al., 2006; Cohen et al., 2008).

Zirkulierende Tumorzellen wurden 1869 zum ersten Mal dokumentiert und dienen seitdem in über 1500 Publikationen als Diskussionsgrundlage (Naoe et al., 2007). Im Laufe der Jahre wurden mehrere Methoden entdeckt um CTCs nachzuweisen (Loberg et al., 2004). Immer wieder auf den Markt kommende Neuerungen haben schließlich zur Entwicklung des CellSearch®-Systems geführt.

Beim Prostatakarzinom nimmt diese Methode einen immer größeren Stellenwert ein (de Bono et al., 2008). In führenden Studien konnte gezeigt werden, dass eine Senkung der Anzahl zirkulierender Tumorzellen während der Therapie die Prognose z. B. von metastasierten Prostatakarzinompatienten deutlich verbessern kann. Bei Patienten mit einem hormonrefraktären Prostatakarzinom ist die Anwesenheit zirkulierender Tumorzellen, bestimmt mit dem CellSearch®-System, der signifikanteste Vorhersageparameter für das Gesamtüberleben in uni- und multivariaten Analysen. Ein Grenzwert von ≥ 5 CTCs in 7,5 ml Blut wurde als prognostisch ungünstig bestimmt. Durch eine Senkung der CTC Zahl infolge einer Chemotherapie unter 5 CTCs pro 7,5 ml Blut konnten das Gesamtüberleben (OS) und das progressionsfreie Überleben (PFS) signifikant verbessert werden (Moreno et al., 2005).

Erste Studien zur Detektion der CTC Zahl mit dem CellSearch®-System im peripheren Blut von Patienten mit einem metastasierten Urothelkarzinom wurden durch Naoe et al. durchgeführt. EpCAM wird regelmäßig auf der Oberfläche von Urothelkarzinomzellen exprimiert. Bei Patienten mit einem metastasierten Urothelkarzinom der Harnblase konnte eine mittlere CTC Zahl von 15,9 pro 10 ml Blut detektiert werden (Naoe et al., 2007). Patienten mit metastatischen Läsionen der Leber oder des Skeletts zeigten erhöhte CTC-Zahlen im Vergleich zu Patienten mit einer ausschließlich lymphogenen Metastasierung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Anzahl der Metastasenläsionen ($n > 2$) mit der Höhe der CTC-Zahl korreliert (Gallagher et al., 2008). Zusammenfassend könnte die Detektion der CTCs mit dem CellSearch®-System das Monitoring der Chemotherapie verbessern und so zu individuelleren Therapiemöglichkeiten von Patienten mit urologischen Karzinomen führen.

1.9 Ziele der Studie

Beim lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinom der Blase ist die Chemotherapie mit Gemcitabine und Cisplatin die Therapie der ersten Wahl (von der Maase et al., 2005). Da zum Zeitpunkt dieser Studie noch kein standardisiertes Chemotherapiekonzept nach Versagen einer platinhaltigen Chemotherapie existierte, wurde eine einarmige, multizentrische Phase II- Studie mit RAD001 in Kombination mit Paclitaxel für Patienten mit metastasiertem Harnblasenkrebs nach Versagen einer vorherigen Platin-basierten Chemotherapie durchgeführt (CRAD001LDE17T).

Die primären Studienziele bestanden zum einen darin, zu zeigen, dass RAD001 und Paclitaxel eine effektive Chemotherapie beim metastasierten Urothelkarzinom mit vorherigem Versagen einer platinbasierten Therapie darstellt. Zum anderen sollte eruiert werden, wie lange sich eine Progression der Erkrankung aufhalten lässt (progression free survival) und sich dadurch das Überleben des Patienten verlängert (overall survival). Des Weiteren sollte das Auftreten von unerwünschten Ereignissen im Zusammenhang mit der Chemotherapie näher untersucht werden.

Die urologische Klinik des rechts der Isar in München beschäftigte sich im Rahmen des Begleitprogramms der Studie vor allem mit der Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut bei Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom. Primärer Endpunkt des Begleitprogramms der Studie war die Untersuchung der Nutzbarkeit der CTC Bestimmung zum Therapiemonitoring der Kombinationstherapie mit Paclitaxel und RAD001. Dies geschah mit dem Ziel CTCs als neuen prognostischen Marker beim Harnblasenkarzinom zu etablieren. Sekundäre Endpunkte stellten zum einen die prognostische Bedeutung von zirkulierenden Tumorzellen und deren Änderung im Verlauf der Therapie auf das Gesamtüberleben (overall survival) und auf das progressionsfreie Überleben (progression free survival) dar. Zum anderen wurde auch die Korrelation der Anzahl der CTCs mit der objektiven Ansprechrate und der Ansprechdauer untersucht. Zusätzlich fand ein Vergleich der Höhe der CTCs im Blut mit Markern des Knochenstoffwechsels (Alkalische Phosphatase) und allgemeinen Laborparametern (LDH, Hb) statt. Die Bestimmung der CTC Zahl erfolgte aus dem peripher venösen Blut mit dem CellSearch®-System, welches durch die Firma Veridex zur Verfügung gestellt wurde (Veridex, LLC, PA, USA).

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign und ethische Grundlagen

Die CRAD001LDE17T Studie war eine einarmige, multizentrische Phase II Studie. Im Zeitraum von Januar 2009 bis Dezember 2011 nahmen folgende 6 Kliniken an der Studie teil: die Urologische Klinik der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. P. Albers, die Urologische Klinik der Universitätsklinik Essen unter der Leitung von Prof. Dr. med. H. Rübben, die Urologische Klinik am Klinikum rechts der Isar der TU München unter der Leitung von Prof. Dr. med. J. Gschwend, die Urologische Klinik der Universitätsklinik Münster unter der Leitung von Prof. Dr. med. L. Hertle, die Urologische Klinik der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Fisch und die Urologische Klinik der Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Stöckle. Die klinische Leitung der Studie übernahm Prof. Dr. med. P. Albers. Insgesamt sollten 30 Patienten eingeschlossen werden. Die Teilnehmer der Studie litten alle an einem lokal progredienten oder metastasierten Urothelkarzinom des Urogenitaltraktes. Die Vortherapie bzw. Diagnose erfolgte entweder über eine radikale Zystektomie oder eine TUR-Blase. Primäres Einschlusskriterium waren eine Kontraindikation oder ein Versagen einer Platin-basierten Erstlinientherapie mit Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin (Thalgott et al., 2009; Niegisch et al., 2015). Vor Studienbeginn wurde das Studiendesign der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf vorgelegt und genehmigt (Studienprotokoll: CRAD001LDE17T, NCT00933374; EudraCT-Nr: 2008-006791-29) mit dem Titel: „Einarmige, multizentrische Phase II-Studie zur Evaluation der Kombinationstherapie von Paclitaxel und RAD001 bei Patienten mit einem Urothelkarzinom der Harnblase nach vorausgegangener platinhaltiger Chemotherapie“. Durch nachträgliche Ergänzung des Studienprotokolls konnten auch Patienten mit einem Urothelkarzinom des oberen Urogenitaltraktes eingeschlossen werden. Dies war nötig, da initial zu wenig Studienteilnehmer rekrutiert werden konnten. Die Studie wurde in Anlehnung an die Deklaration von Helsinki (Finnland) vom Juni 1964 und deren Erweiterungen und Ergänzungen geplant und durchgeführt. Zusätzlich prüfte und genehmigte die für uns zuständige

Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der TU München das Studienprotokoll sowie das von uns vorgelegte wissenschaftliche Begleitprogramm zur „Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTC) mit dem CellSearch®-System im venösen Blut von Patienten mit einem fortgeschrittenen Urothelkarzinom der Harnblase während der Kombinationstherapie von Paclitaxel und RAD001 nach vorausgegangener platinhaltiger Chemotherapie“. Hierbei wurde neben dem Ablauf der Studie auch die Patienteninformation und Einwilligungserklärung genehmigt (Protokollnummer: CRAD001LDE17T) (Thalgott et al., 2009). Ebenso wie das Hauptprogramm der Studie entsprach das Begleitprogramm den Richtlinien der Deklaration von Helsinki und stimmte mit den aktuellen klinischen und ethischen Leitlinien überein. Alle Patienten, die an diesem wissenschaftlichen Begleitprogramm teilnahmen, unterschrieben eine gesonderte Aufklärung, die von den Mitarbeitern der TU München erstellt wurde. In Abbildung 3 ist das Studiendesign schematisch dargestellt. Zusätzlich ist in Abbildung 5 der Ablauf des Begleitprogramms als Grundlage dieser Dissertationsarbeit schematisch dargestellt.

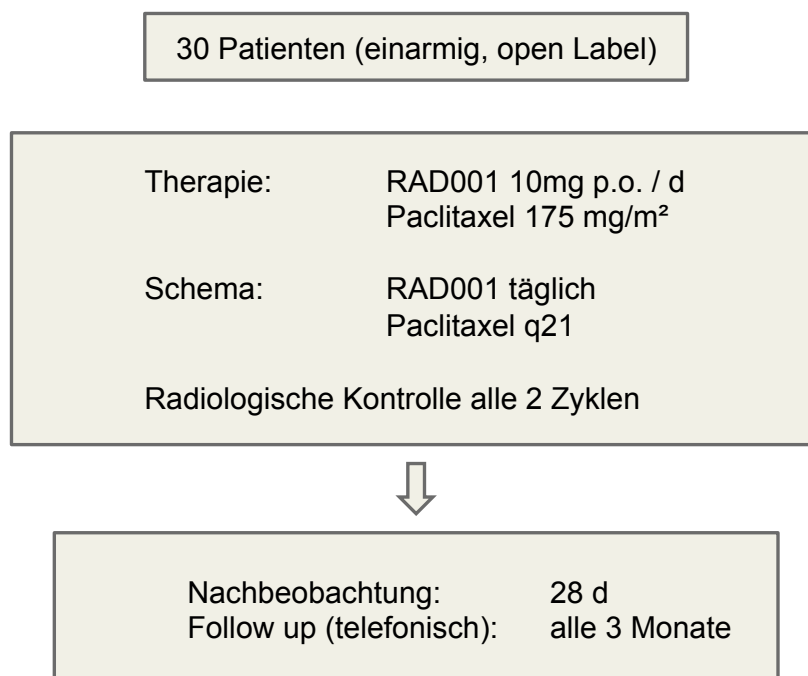


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studiendesigns der CRAD001LDE17T Studie

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien für die CRAD001LDE17T Studie

Die folgenden Ein- und Ausschlusskriterien wurden im Rahmen des Studienprotokolls zur CRAD001L DE17T festgelegt und dokumentiert (Thalgott et al., 2009).

Folgende Kriterien müssen zum Einschluss in die Studie erfüllt werden:

- Patienten mit einem histologisch gesicherten Urothelkarzinom des Urogenitaltraktes einschließlich der Harnblase oder des unteren Harntraktes. Wegen einer mangelnden Anzahl an Studienteilnehmern wurden nach einem Amendment auch Patienten mit einem Urothelkarzinom des oberen Harntraktes eingeschlossen.
- In Bildgebungsverfahren nachgewiesenes Lokalrezidiv oder metastasierte Erkrankung. Dafür ist mindestens eine messbare Läsion nach RECIST Kriterien nötig.
- Bei Knochenmetastasen als einzigen Metastasierungsort ist die Quantifizierung der Läsion(en) mittels MRT erforderlich.
- Versagen einer vorausgegangenen adjuvanten oder neo-adjuvanten Platin-basierten Chemotherapie entweder mit Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin.
- Die Patienten dürfen kein Rezidiv innerhalb der ersten drei Monate der Platin-basierten Chemotherapie (primary failure), innerhalb von drei Monaten nach Ende der Platin-basierten Chemotherapie (early relapse) oder innerhalb von drei Monaten nach der Zystektomie/ Ureterektomie aufweisen.
- Adjuvante oder neo-adjuvante Therapie mit ≤ 4 Chemotherapeutika.
- Keine gleichzeitige Behandlung mit anderen Krebsmedikamenten oder experimentellen Medikamenten.
- Der ECOG Status muss zwischen 0 und 2 liegen.
- Sowohl die hämatologischen, als auch die Leber- und Nierenwerte müssen adäquat sein. Dies bedeutet: Neutrophilenzahl $>1500/\text{mm}^3$; Hämoglobin >9 g/dl; Thrombozyten $\geq 100\ 000/\text{mm}^3$; Serumbilirubin $\leq 1,5 \times \text{ULN}$; ALT und AST $\leq 2,5 \times \text{ULN}$; Serumkreatinin $\leq 2 \times \text{ULN}$. Bei Patienten mit bekannten Lebermetastasen müssen ALT und AST $\leq 5 \times \text{ULN}$ sein.
- Zugelassen werden auch Patienten mit einer anderen Krebserkrankungen, wenn diese abzugrenzen sind, nicht lebensbedrohlich sind und weder mit

Chemotherapie noch Bestrahlung therapiert werden müssen (z.B.: CLL, nicht melanomatöser Hautkrebs).

- Frauen im gebärfähigen Alter dürfen nur an der Studie teilnehmen, wenn ein negativer Serum- oder Urinschwangerschaftstest innerhalb von zwei Wochen vor Beginn der ersten Therapie mit der Studienmedikation vorliegt. Außerdem müssen gebärfähige Frauen vom Tag des Screenings bis 3 Monate nach Abschluss der Studie zweifach kontrazeptiv versorgt werden (z.B.: Pille und Kondom). Temperaturmessung und ähnliche Praktiken zur Verhütung werden nicht akzeptiert.
- Alter: >18 Jahre.
- Patienten müssen in der Lage sein den Inhalt und die Anforderungen der Studie zu verstehen und den Anweisungen des Arztes Folge zu leisten. Die Einverständniserklärung muss verstanden und unterschrieben werden.

Aus den oben aufgeführten Einschlusskriterien ergeben sich die Ausschlusskriterien der Studie.

- Patienten die vier Wochen vor der ersten Gabe des Studienmedikamentes andere Chemotherapien, Bestrahlungen oder Krebsmedikamente erhalten haben.
- Teilnahme an anderen klinischen Prüfungen innerhalb der letzten vier Wochen vor erstmaliger Einnahme der Studienmedikation.
- Patienten mit bekannter Überempfindlichkeit gegenüber RAD001 oder anderen Rapamycin-Analoga, wie Sirolimus oder Temsirolimus, und Taxanen oder anderen Bestandteilen.
- Patienten, die in letzter Zeit RAD001, mTOR Inhibitoren, Taxane wie Paclitaxel oder Epothilone oder Ixaepilone eingenommen haben.
- Patienten mit bekannten Metastasen des ZNS.
- Patienten mit symptomatischem Pleuraerguss oder Aszites.
- Patienten mit Bestrahlung von ≥ 25 % des Knochenmarks in den letzten vier Wochen vor Studienbeginn.
- Patienten, die mit intravenöser Radionukleotid-Therapie behandelt wurden.
- Patienten mit größeren Eingriffen (z.B. intraabdominell, intrathorakal), offenen Biopsien oder signifikanten traumatischen Verletzungen in den vier Wochen

vor Therapiebeginn oder von denen sich die Patienten noch nicht erholt haben.

- Patienten mit systemischer Langzeitkortikoidtherapie mit einem Prednisolon-Äquivalent von >10 mg täglich. Patienten, die Kortikosteroide bekommen, müssen mindestens vier Wochen vor Therapiebeginn auf eine stabile Dosis eingestellt werden vor der ersten RAD001 Gabe. Topische oder inhalative Kortikosteroide stellen kein Ausschlusskriterium dar.
- Nicht zugelassen werden Patienten, die als Begleitmedikation starke CYP3A4-Inhibitoren oder –Induktoren einnehmen.
- Die Einnahme von oralen Antikoagulantien stellt kein Ausschlusskriterium dar, solange der INR Wert stabil ist. Wenn der INR nicht stabil ist, muss er überwacht werden.
- Patienten mit aktiven Blutungen.
- Patienten mit einer Neuropathie >Grad 1.
- Patienten mit einer anderen ernsten oder unkontrollierbaren medizinischen Erkrankung wie instabile Angina pectoris, dekompensierte Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt vor ≤ 6 Monaten, unkontrollierte Hyperlipidämie, chronische oder persistierende Hepatitis.
- Patienten mit stark eingeschränkter Lungenfunktion mit Spirometrie-/ DLCO-Werten ≤ 50 % des Normbereiches und/ oder einer Sauerstoffsättigung von ≤ 88 % in Ruhe.
- Patienten mit unkontrolliertem Diabetes mit einem nüchtern Glukosewert von $>2 \times$ ULN.
- Schwangere und stillende Patientinnen und auch Patientinnen, die keine effektive Kontrazeption anwenden wollen, dürfen nicht an der Studie teilnehmen.
- Patienten mit einer eingeschränkten Leberfunktion mit einer Child- Pugh-Score >9 .
- Patienten mit einer signifikanten, nicht malignen Erkrankung in den zwei Wochen vor Studieneinschluss.
- Patienten mit operativen oder anderen medizinischen Beeinträchtigungen, welche signifikant die Absorption, die Distribution, den Metabolismus und/oder die Ausscheidung der Medikamente beeinflusst. Der untersuchende Arzt muss

dies anhand von Anamnese, Vorgeschichte und Laborparametern untersuchen und bewerten.

- Patienten mit einer Immundefekterkrankung, inklusive HIV.
- Patienten mit Alkohol- oder Drogenmissbrauch in den vergangenen 12 Monaten vor Studieneinschluss.

2.3 Studienmedikation

Im Rahmen der CRAD001 Studie erhielt jeder Patient eine Kombinationstherapie bestehend aus dem Chemotherapeutikum Paclitaxel und dem mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001). Therapieziel war es jedem Studienteilnehmer 6 Zyklen der Chemotherapie zu verabreichen. Bei Progress der Erkrankung oder bei Verschlechterung des Gesundheitszustandes wurde die Therapie abgebrochen. Dem Therapieschema folgend nahmen die Patienten täglich 10 mg Everolimus oral ein. Um die alltäglichen Einschränkungen der Studienteilnehmer durch die Chemotherapie so gering wie möglich zu halten, wurden ihnen jeweils bei Zyklusbeginn alle 21 Everolimus Tabletten mitgegeben. Alle Teilnehmer wurden darauf hingewiesen, wie wichtig es ist, sich genau an das Therapiekonzept zu halten und regelmäßig die Studienmedikation einzunehmen. Zusätzlich zur oralen Medikation wurde im Abstand von 21 Tagen 175 mg/m² Paclitaxel intravenös verabreicht. Die Gabe der i.v. Medikation erfolgte in dem jeweiligen behandelnden Studienzentrum.

2.3.1 Paclitaxel

Paclitaxel ist ein Chemotherapeutikum, das 1967 aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) von Dr. Monroe E. Wall und Dr. Mansukh C. Wani entdeckt wurde (Wani et al., 1971). Heute wird es bei vielen Krebserkrankungen, wie Bronchial-, Ovarial- und Mammakarzinomen, sowie dem Karposi-Sarkom eingesetzt. Es bindet an β -Tubulin, stabilisiert so die Mikrotubuli und hemmt dadurch ihren Abbau. Somit wird der Ablauf der Mitose und damit der normale Zellzyklus gestört. Da Paclitaxel nicht nur die Tumorzellen angreift, sondern auch Einfluss auf andere Körperzellen

hat, kann es bei Patienten unter Umständen zu Nebenwirkungen kommen. Die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen sind: Alopezie, Knochenmarksuppression mit Neutropenie und Anämie, periphere Neuropathie, Arthralgie, Myalgie, gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall und Mukositis (Schneider et al., 2021). In dieser Studie wurde den Teilnehmern Paclitaxel alle drei Wochen in einer Dosis von 175 mg/m^2 intravenös verabreicht (Thalgott et al., 2009; Niegisch et al., 2015).

2.3.2 RAD001

Everolimus ist ein aus Streptomyzeten isoliertes Derivat von Rapamycin. Es bildet einen Komplex mit dem Protein mTOR und inhibiert es dadurch. mTOR Inhibitoren haben zwei Angriffspunkte. Zum einen haben sie einen direkten Effekt auf Krebszellen indem sie ihr Wachstum und ihre Proliferation hemmen und zum anderen beeinträchtigen sie indirekt das Tumorstadium, indem sie die Angiogenese unterbinden (Voss et al., 2011). In Abbildung 4 sind die Angriffsmechanismen der mTOR Inhibitoren nochmals graphisch dargestellt. Nebenwirkungen der Therapie mit Everolimus sind Myelonsuppression mit einhergehender Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie, Wundheilungsstörungen, Mukositis, Fatigue, Kopfschmerzen, Exanthem und nicht-infektiöse Pneumonitis. Alle Nebenwirkungen sind meist nur leicht ausgeprägt und verschwinden schnell wieder (Nashan et al., 2012). Die Studienteilnehmer nahmen jeden Tag eigenverantwortlich, auch an den Tagen mit Paclitaxel-Gabe, 10 mg RAD001 p. o. ein. Das Rezept für die Everolimus Tabletten erhielten sie von ihrem betreuenden Arzt in einem der Studienzentren.

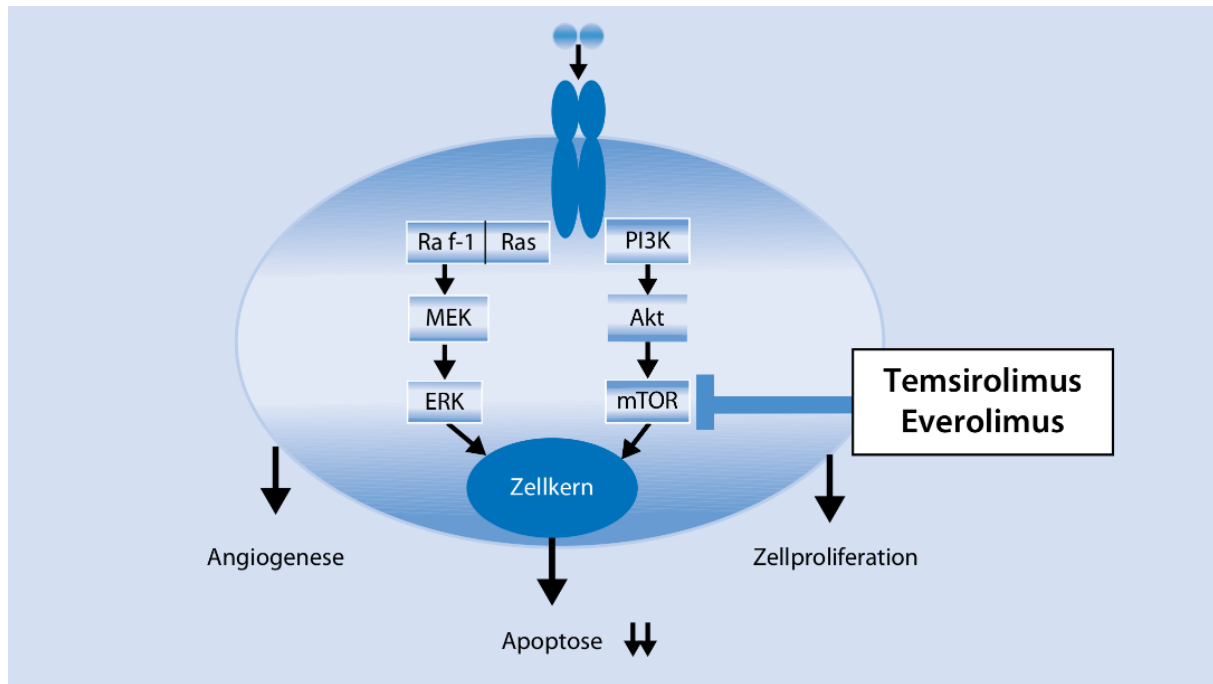


Abbildung 4: Angriffsmechanismus des mTOR Inhibitors Everolimus (Facharztwissen Urologie, 2014)

2.4 Untersuchungen bei Studieneinschluss und im Verlauf der Therapie

Vor Einschluss des Patienten in die Studie erfolgte eine Screening Untersuchung. Diese wurde bei jedem Studienteilnehmer im Zeitraum von maximal 21 Tagen vor Beginn der ersten Studienmedikation durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Anamnese des Patienten mit besonderer Berücksichtigung der onkologischen Vorgeschichte. Dabei wurde zusätzlich gezielt nach Nikotinabusus, Gewichtsverlust in den letzten 6 Monaten, Hämaturie, Malignomen und vorangegangenen Krebstherapien gefragt. Auch über den Beruf und den dabei eventuell vorgekommenen Kontakt mit schädlichen Noxen wurde gesprochen. Ein weiteres Augenmerk lag auf der aktuell eingenommenen Medikation und auch auf den nicht medikamentösen Therapien vor allem in den letzten 30 Tagen vor Studienbeginn (Thalgott et al., 2009; Niegisch et al., 2015). Anschließend wurden die Vitalparameter erhoben und es erfolgte eine körperliche und neurologische Untersuchung. Neben einem 12-Kanal EKG, einer Urinanalyse, einem Labor inklusive Gerinnung und Serum-Lipid-Profil, einer Hämatologie und einer klinischen Chemie, erfolgte bei Frauen ein Serum-Schwangerschaftstest zum Ausschluss einer aktuell vorliegenden Schwangerschaft. Für die Tumorevaluierung wurden innerhalb von 21 Tagen vor Behandlungsbeginn

ein CT-Thorax und –Abdomen oder eine MRT und eine Knochenszintigraphie durchgeführt. Außerdem wurde zur Erfassung der Lebensqualität ein ECOG Performance Status erhoben und die Patienten mussten ein EORTC-QLQ C30 (QoL) Fragebogen ausfüllen. Die Bestimmung der Toxizität dieser Therapie wurde anhand der in Studien üblichen CTCAE-Kriterien (Common Terminology Criteria for Adverse Events) erhoben. Anhand dieser Untersuchungen überprüfte der aufnehmende Studienarzt in Zusammenarbeit mit dem Studienleiter die oben aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien. Nach einem ausführlichem Gespräch, bei dem sowohl der Studienverlauf, die Studienmedikation und auch die Risiken besprochen wurden, unterschrieben alle teilnehmenden Patienten die Einverständniserklärung.

2.5 Studienablauf und Verlaufsbeurteilung

Die Studienmedikation bestand aus Paclitaxel und RAD001 (Everolimus). Geplant wurden 6 Zyklen, wobei jeder Zyklus 21 Tage dauerte. Die Studienteilnehmer nahmen jeden Tag eigenverantwortlich, auch an den Tagen mit Paclitaxel-Gabe, 10 mg RAD001 p. o. ein. Paclitaxel wurde alle drei Wochen in einer Dosis von 175 mg/m² intravenös verabreicht. Die Therapie wurde im Falle eines Therapieansprechens über den maximalen Verlauf von 6 Zyklen Chemotherapie durchgeführt. Im Falle eines dokumentierten Progresses entsprechend der radiologischen Befunde (RECIST Kriterien) oder bei einem klinischen Progress wurde die Studienmedikation vorzeitig beendet und eine weitere Studiennachsorge (Follow-Up) durchgeführt. Die erste Follow-Up Untersuchung fand 28 Tage nach dem Studienende (end of treatment; EOT) mit der zugehörigen abschließenden Untersuchung statt. Die weiteren Follow-Up Untersuchungen erfolgten in einem Abstand von 3, 6, 9 und 12 Monaten.

Am Tag 1 des jeweiligen Zyklus wurde bei jedem Patienten die Vitalzeichen erhoben und ein Hämatologielabor mit Serum-Lipid-Profil, Gerinnung und eine klinische Chemie bestimmt. Des Weiteren wurde eine Urinanalyse durchgeführt. Zusätzlich füllte jeder der Patienten den EORTC-QLQ C30 Fragebogen aus und der ECOG Performance Status wurde bestimmt. Am Tag 8 und Tag 15 des jeweiligen Zyklus wurde dann jeweils ein Hämatologielabor abgenommen und eventuell aufgetretene Nebenwirkungen der Medikation dokumentiert. Nach Einnahme der letzten Studienmedikation erfolgte eine „End of Treatment“-Untersuchung (EOT) mit einer

abschließenden körperlichen und neurologischen Untersuchung, sowie Labor- und Urinkontrollen. Zusätzlich wurden die Nebenwirkungen der Therapie, die Lebensqualität anhand des QLQ C30 Fragebogens und der ECOG-Status erfasst. Die Bestimmung der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut erfolgte durch Abnahme von 20 ml Vollblut vor Studienbeginn und nach 2, 4 und 6 Zyklen der Chemotherapie. Dadurch erfolgte die Gewinnung der Blutprobe zum selben Zeitpunkt wie die Bestimmung der restlichen Laborparameter und der objektiven Kontrolle des Therapieansprechens durch bildgebende Verfahren. Eine schematische Darstellung der Abnahmezeitpunkte der zirkulierenden Tumorzellen im Blut und weiterer Untersuchungen ist in Abbildung 5 dargestellt.

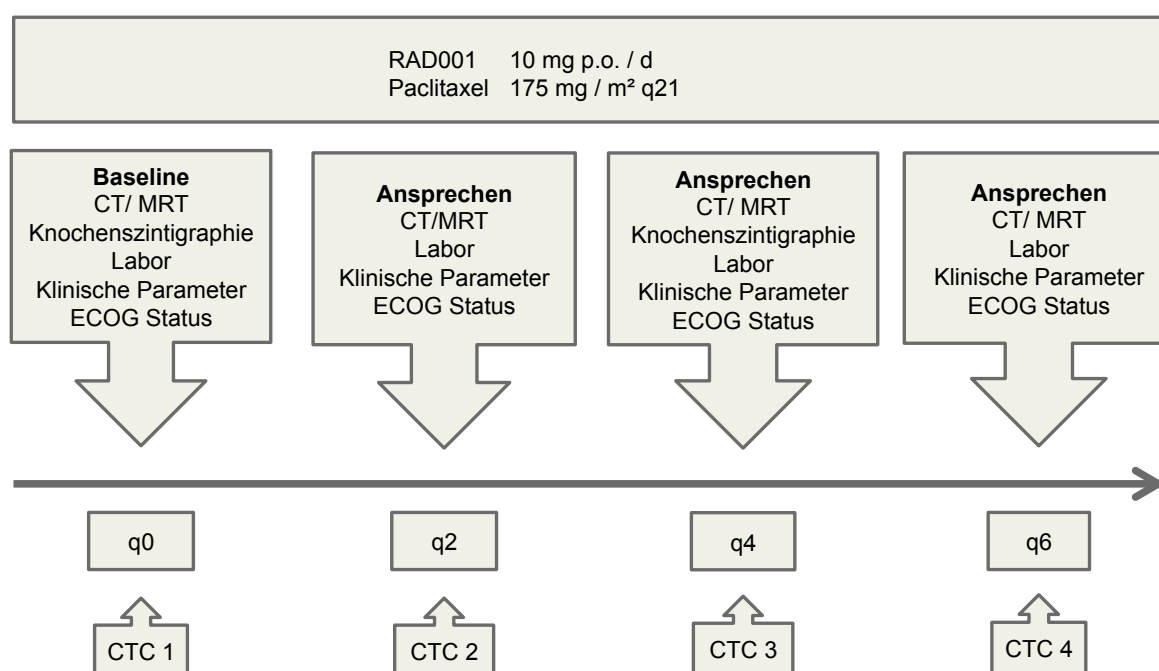


Abbildung 5: Studiendesign mit Darstellung der Zeitpunkte für die CTC Detektion und des Therapieverlaufes

2.6 Bestimmung des objektiven Therapieansprechens

Um die Effektivität der Zweitlinientherapie mit RAD001 und Paclitaxel zu überprüfen, wurde im Verlauf der Studie sowohl die Ausbreitung als auch die Größe der zu Beginn vorliegenden Metastase(n) oder des Lokalrezidivs anhand der

Schnittbildgebung bestimmt. D. h. die bildgebende Erhebung des Tumorstatus erfolgte unmittelbar vor Beginn der Therapie (Baseline) und hiernach jeweils nach zwei Zyklen der Chemotherapie, entsprechend eines Intervalls von 6 Wochen. Dabei wurde darauf geachtet, dass im Verlauf jeweils die gleichbleibende Methode (CT vs. MRT) genutzt wurde, um eine valide Verlaufsbeurteilung zu ermöglichen.

In unserer Studie war die bevorzugte Schnittbildgebung, um das Ansprechen des Tumors auf die Therapie zu objektivieren, die Computertomographie (CT). Hierbei wird der zu untersuchende Körperteil des Patienten mittels Röntgenstrahlen im Schichtbildverfahren dargestellt. Die entstandenen Bilder erlauben in unserem Fall eine exakte Lage- und Größenbeurteilung der Metastasen.

Alternativ konnte auch eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden. Hierbei werden im Gegensatz zum CT keine Röntgenstrahlen, sondern Magnetfelder und Radiowellen verwendet. Auch durch diese Untersuchung lassen sich Metastasen der inneren Organe hervorragend beurteilen. Lediglich Knochenmetastasen lassen sich auf Grund ihres geringen Wassergehaltes nicht gut darstellen. Die Art der Bildgebung sollte bei einem Patienten im Verlauf der Studie nicht variieren.

Zusätzlich wurde beim Screening und beim Auftreten von Beschwerden, welche auf eine Knochenbeteiligung hinwiesen, eine Knochenszintigraphie durchgeführt. Hier werden durch Tc-99m-Phosphonate kleinste Veränderungen im Knochenstoffwechsel sichtbar gemacht bevor man in anderen Untersuchungen überhaupt eine strukturelle Veränderung des Knochens erkennen kann. Lagen bei der Screening Untersuchung Knochenmetastasen vor, wurde an den zuvor genannten Zeitpunkten zusätzlich eine Knochenszintigraphie zur Verlaufskontrolle durchgeführt.

Die radiologische und nuklearmedizinische Diagnostik wurde jeweils an einem der Studienzentren durchgeführt. Speziell in der Beurteilung von Tumoren und Metastasen ausgebildete Radiologen und Nuklearmediziner des jeweiligen Zentrums analysierten die von ihnen erhobenen Daten und stellten die Ergebnisse auf einer Internetplattform allen anderen an der Studie beteiligten Krankenhäusern zur Verfügung.

Das objektive Therapieansprechen wurde mit Hilfe der RECIST Kriterien 1.0 beurteilt (Therasse et al., 2000). Hierbei wurde im Verlauf der Studie das Wachstum der Metastasen sowie ggf. neu aufgetretene Läsionen für die Beurteilung des Erfolges

der Therapie herangezogen. Trat während der Therapie eine Verkleinerung des längsten Durchmessers der Metastase um mindestens 30 % im Vergleich zum initial gemessenen Durchmesser ein, so war laut Definition ein Partial Response (PR) eingetreten. Eine infolge der Therapie nicht mehr nachweisbare Tumorerkrankung wurde als Complete Remission (CR) definiert. Stieg der Längsdurchmesser um mindestens 20 % im Vergleich zum Ausgangswert in weniger als 12 Wochen seit Aufnahme in die Studie, war eine sogenannte Progressive Disease (PD) eingetreten. Der Patient hat dann nicht wie gewünscht auf die Therapie angesprochen. Der zeitliche Abstand bis zum Progress der Erkrankung musste mindestens 4 Wochen betragen. Ist weder eine Progressive Disease, noch eine Partial Response zu verzeichnen, handelt es sich laut Definition der Response Evaluation Criteria in Solid Tumors um eine Stable Disease (SD) mit einem stabilen bzw. unveränderten Krankheitsverlauf (Eisenhauer et al., 2009).

Bei der zu Beginn durchgeführten Screening Untersuchung wurde die erste Tumorevaluierung durchgeführt. Dazu wurde 21 Tage vor Behandlungsbeginn ein CT-Thorax und -Abdomen oder ein MRT angefertigt. Zusätzlich wurde bei jedem Studienteilnehmer eine Knochenszintigraphie durchgeführt. Die CT bzw. MRT Untersuchung wurde an Tag 1 des Zyklus 3 und Zyklus 5 wiederholt. Somit erfolgte eine CT des Thorax, des Abdomens und des Beckens alle 6 Wochen.

Nach Beendigung der Studientherapie wurden weiterhin alle 12 Wochen eine CT oder MRT angefertigt, bis es bei den Patienten nachweislich zum Progress kam.

2.7 Routinelaborparameter

Eine Kontrolle der Serumwerte, der Gerinnung und des Blutbildes wurde während des Screenings, am Tag 1, 8 und 15 jedes Zyklus und bei allen Nachuntersuchungen durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte zu Beginn der jeweiligen Untersuchung vor Verabreichung der Chemotherapie und Durchführung der Bildgebung. Die Analyse der Blutprobe wurde durch das Labor der Klinischen Chemie des jeweiligen Studienzentrums durchgeführt. Am Tag 8 und 15 des Zyklus erfolgte die Blutentnahme durch den jeweiligen Hausarzt des Studienteilnehmers. Analysiert und befundet wurde die Probe durch das vom Hausarzt beauftragte Labor. Die Ergebnisse erhielten die Zentren dann per Post. Bei der Auswertung der Ergebnisse legten wir ein spezielles Augenmerk auf den Hämoglobin Wert (Hb), die

Laktatdehydrogenase (LDH) und die Alkalische Phosphatase (AP). Insbesondere die zuletzt genannten Laborwerte können als klinische Marker des Therapieverlaufes genutzt werden.

Hämoglobin ist der eisenhaltige Blutfarbstoff der Erythrozyten und kann im Rahmen der Tumortherapie eine Knochenmarksuppression infolge der Chemotherapie, aber auch im Falle einer Knochenmarksinfiltration im Rahmen der Tumorerkrankung, als Marker eines Tumorprogresses genutzt werden. Der Hämoglobinwert ist der wichtigste Parameter, um eine Anämie zu diagnostizieren. Im Rahmen der Studie wurden alle Patienten mit einem Hb <10 g/dl als anämisch bezeichnet. Der Hb Wert des Blutes steht in enger Korrelation mit der Leistungsfähigkeit und damit der Lebensqualität des Betroffenen.

Als ubiquitär vorkommendes Enzym wird die Laktatdehydrogenase beim Tod der Zelle in die Blutbahn freigesetzt. Daher kann die LDH als unspezifischer Tumormarker im Blut genutzt werden und spiegelt insbesondere Weichteiltumore bzw. Weichteilgewebismetastasen wieder.

Die Alkalischen Phosphatasen gehören zur Gruppe der Enzyme und geben bei erhöhten Werten unter anderem einen Hinweis auf Erkrankungen des Knochenstoffwechsels an. Werte oberhalb des Normbereiches können somit auf Knochenmetastasen hinweisen.

2.8 Evaluation der Leistungsfähigkeit anhand des ECOG-Status

Um die Leistungsfähigkeit von Tumorpatienten international standardisiert erfassen zu können, entwickelte die Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 1982 den ECOG Performance Status, auch WHO- oder Zubrod Index genannt. Dieser ermöglicht das subjektive Gefühl der Leistungsfähigkeit von Patienten vergleichbar zu machen, das Wohlbefinden und die Einschränkungen des Patienten im Alltag objektiv zu beurteilen und anhand dessen die weitere Therapie zu planen und zu optimieren. Der ECOG Status unserer Studienteilnehmer wurde durch den behandelnden Studienarzt beim Screening, vor Verabreichen der Chemotherapie zu Beginn jedes Zyklus und bei den Nachsorgeuntersuchungen erhoben und im Studienprotokoll dokumentiert. Die Einteilung erfolgt in Gruppe 0 bis 5, wobei 0 keine Leistungseinschränkung und 5 den Tod des Patienten bedeutet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: ECOG Performance Status (Oken et al., 1982)

Grad	ECOG Status
0	Normale uneingeschränkte Aktivität wie vor der Erkrankung.
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, aber gehfähig; leichte körperliche Arbeit, bzw. Arbeit im Sitzen (z.B. leichte Hausarbeit oder Büroarbeit) möglich.
2	Gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig; kann mehr als 50% der Wachzeit aufstehen.
3	Nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50% oder mehr der Wachzeit an Stuhl oder Bett gebunden.
4	Völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich; völlig an Bett oder Stuhl gebunden.
5	Tod

2.9 Dokumentation der Studiendaten - Datenplattform

Um den Datenaustausch zwischen den einzelnen Zentren zu vereinfachen hat das Universitätsklinikum Düsseldorf eine Internetplattform etabliert, auf der alle Studiendaten hochgeladen werden konnten. Jeder Arzt, der an der Studie beteiligt war, konnte sich dort anmelden und die Daten aller Studienzentren einsehen. Die Bearbeitung der Plattform und das Hochladen von Ergebnissen war jedoch nur speziell ausgewählten und trainierten Personen möglich. So verhinderte man, dass falsche Informationen hochgeladen oder Daten zwischen den Zentren vertauscht wurden. Jedem Patienten wurde eine fünfstellige Nummer zugeordnet. Wobei die ersten drei Ziffern das Studienzentrum angaben und die letzten 2 Zahlen die fortlaufende Nummer des Studienteilnehmers war. Des Weiteren wurde noch das Geschlecht und das Alter des Patienten vermerkt. Durch diese Vorgehensweise wurde die Identität des Patienten so gut wie möglich geschützt. Der Zutritt zu dem Portal war nur von der Klinik möglich, um die Daten vor unbefugtem Zugriff zu schützen.

2.10 CTC Detektion

Zurzeit steht für das Urothelkarzinom noch kein Biomarker zur Verfügung, um den Erfolg einer Chemotherapie einzuschätzen oder zu kontrollieren um darauf basierend den weiteren Verlauf der Therapie zu planen. Beim Mamma-, Colon- und Prostatakarzinom wird zur Therapieüberwachung und Nachsorge das sogenannte

Cell-Search®-System (Veridex, Immunicom, PA, USA) zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen eingesetzt. Die FDA hat diese Untersuchungsmethode für die Überwachung von Patienten mit fortgeschrittenem Mamma-, Colon- und Prostatacarcinom 2004 zugelassen (Hayes et al., 2006; Cohen et al., 2008). Das Cell-Search®-System ist ein semi-automatisiertes und quantitatives System, welches zirkulierende Tumorzellen im peripheren venösen Vollblut nachweisen kann. Es ist eine minimal-invasive Methode, da für die Bestimmung der CTCs lediglich eine normale Blutentnahme in einem speziell dafür vorgesehenen Röhrchen nötig ist. Zirkulierende Tumorzellen sind sehr anfällig und zersetzen sich innerhalb von wenigen Stunden. Durch die Aufbewahrung der Blutprobe in einem *CellSavePreservativeTube*® werden die CTCs bei Raumtemperatur bis zu 96 Stunden stabilisiert (Eisenhauer et al., 2009). Jedes Röhrchen enthält 300 µl Na²EDTA, um die Gerinnung der Blutprobe zu verhindern und Konservierungsmittel, um die Zellmorphologie zu erhalten. Dies ermöglicht den problemlosen Transport der Blutproben über längere Strecken in ein zur weiteren Verarbeitung ausgestattetes Labor. Bei Ankunft der Blutprobe im Labor werden genau 7,5 ml Blut aus dem *CellSavePreservativeTube*® in ein Reagenzglas umgefüllt und für 10 Minuten zentrifugiert. Hierdurch werden die Zellen des Blutes vom Plasma getrennt. Nach der Zentrifuge wird das Röhrchen in das in Abbildung 7 dargestellte *CellTracks*® *AutoPrep*® System gegeben und von nun an voll automatisiert weiterverarbeitet. Als erstes wird das Plasma abgesaugt, sodass nur noch die Zellschicht im Röhrchen zurückbleibt. Danach wird sowohl ein Puffer, als auch 100 µl des mit Ferropartikeln beladenen EpCAM Antikörpers zur übrig gebliebenen Zellmasse hinzugegeben.

Das 40 kDa EpCAM („epithelial cell adhesion molecule“) Glykoprotein ist ein spezifischer epithelialer Antikörper und dient der immunomagnetischen Anreicherung der Tumorzellen. Er wird auf den meisten Tumor- und Gewebeoberflächen epithelialer, nicht aber mesenchymaler, Herkunft exprimiert (Thalgott et al., 2009). In einem weiteren Schritt werden Zytokeratin-Antikörper hinzugefügt. Zytokeratine haben diverse Aufgaben in Epithelzellen und sorgen unter anderem durch ihre Beteiligung an der interzellulären Filamentbildung zu einer Stabilisierung von Epithelzellen und werden auch von epithelialen Tumorzellen exprimiert. Durch die im Anschluss beigefügten CD 45 Antikörper kann man die in der Blutprobe vorhandenen Leukozyten von den Tumorzellen unterscheiden. CTCs haben keine CD 45 Antigene an der Zelloberfläche und werden somit auch nicht durch die Antikörper markiert. Als

Letztes wird noch 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in die Probe gegeben. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff und markiert die DNA der zirkulierenden Tumorzellen. Eine schematische Darstellung der markierten zirkulierenden Tumorzellen ist in Abbildung 6 dargestellt. Das nun entstandene Gemisch wird für 20 Minuten in Dunkelheit inkubiert. In dieser Zeit bewegen sich sowohl die gebundenen, als auch die ungebundenen Ferropartikel an die Oberfläche des Reagenzröhrchens. Nach Absaugen der ungebundenen Partikel wird dieser Vorgang erneut durchgeführt. Die so entstandene Probe wird anschließend in den in Abbildung 7 abgebildeten *CellTracks®Analyzer II* gegeben und dort durch ein Fluoreszenzmikroskop gescannt. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie werden dann auf einem Computer gespeichert und im Verlauf durch speziell dafür geschultes Personal in unserem Münchner Labor begutachtet und ausgewertet. Zirkulierende Tumorzellen werden als solche erkannt, weil sie EpCAM exprimieren, Zytokeratin Antigene haben, CD 45 negativ sind und sich mit der Nukleinsäurefärbung DAPI (Diamino-2-Phenylindol) anfärben lassen (Allard et al., 2004). Unter dem Fluoreszenzmikroskop sehen zirkulierende Tumorzellen wie in Abbildung 6 dargestellt aus. Die CTCs werden mit Hilfe des *CellTracks®Analyzer II* (Veridex) (Abb.: 7) gezählt. Das Cell-Search®System ist ein standardisiertes Verfahren und eignet sich aufgrund seiner einfachen Handhabung ideal für den klinischen Alltag.

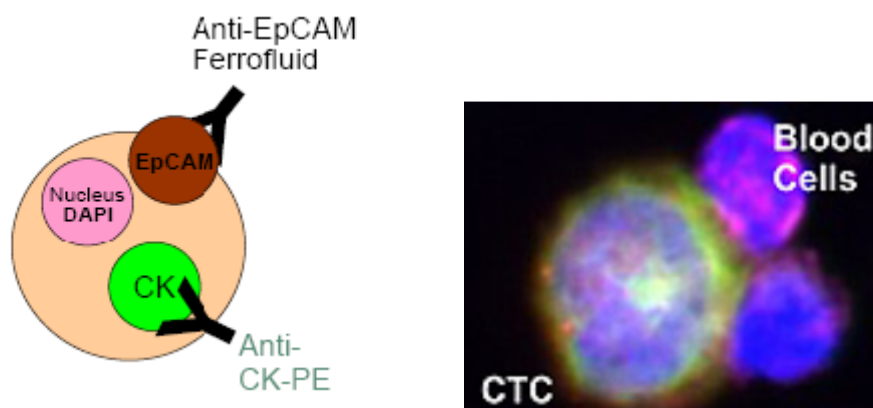


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer zirkulierenden Tumorzelle (links) und Darstellung einer zirkulierenden Tumorzelle unter dem Fluoreszenzmikroskop (rechts) (<https://www.cellsearchctc.com>)



Abbildung 7: CellTracks®AutoPrep®System (links) und CellTrack®Analyzer II (Veridex) (rechts) (<https://www.cellsearchctc.com>)

2.11 CTC Detektion in der CRAD001LDE17T Studie

Die Detektion der CTCs wurde als Begleitprogramm zur CRAD001LDE17T Studie von den Mitarbeitern des Klinikums rechts der Isar konzipiert und eigenständig durchgeführt. Bei der Entnahme des peripher venösen Vollblutes beteiligten sich alle Studienstandorte.

Im Rahmen unserer Studie wurden bei jedem Studienteilnehmer am Tag des Screenings, am Tag 1 des Zyklus 3 und 5, jeweils vor der Paclitaxel Gabe, und am Tag der Abschlussuntersuchung mindestens 7,5 ml peripheres Blut mit dem in Abbildung 8 dargestellten CellSavePreservative®Tube abgenommen. Dafür wurde durch das Studienzentrum in München nicht nur der CellSave®-Vacutainer, sondern auch ein zugehöriges Blutentnahme Set, bestehend aus Butterfly, Adapter für den Vacutainer und Vacutaineraufsatzglocke, an die jeweiligen Studienzentren verschickt. Die *CellSavePreservative®Tube* wurden zum Ausschluss von Verwechslungen der Proben im Labor und zur eindeutigen Zuordnung durch ein Etikett mit Patientenummer, Datum und Uhrzeit der Blutentnahme versehen. Um gewährleisten zu können, dass die Röhren während des Transportes nicht zerbrechen, wurden sie in speziell dafür vorgesehene Transportboxen mit einem Schaumstoffbezug verpackt. Dadurch wurde auch sichergestellt, dass alle am Transport und der Weiterverarbeitung der Proben beteiligte Personen vor Infektionen durch möglicherweise im Blut vorhandene übertragbare Krankheiten geschützt wurden. Nach Versiegeln der Transportbox mit einem roten Etikett mit der Aufschrift „infektiös“ und Kennzeichnung des Briefumschlages mit einem orangen „vertraulich“ Etikett wurden die Röhren dann, bei Raumtemperatur in unser Labor in München gebracht. Die entnommenen Blutproben aus München wurden durch das an der Studie beteiligte Personal direkt im Labor in München abgegeben. Alle anderen

Studienzentren nutzten durch uns vorfrankierte und adressierte Luftpolsterumschläge, um die Transportboxen samt *CellSavePreservative®Tube* noch am Entnahmetag per Post nach München zu schicken. Damit das gerade beschriebene Procedere an allen Studienzentren gleich ablief, wurde durch das Studienzentrum am rechts der Isar die im Anhang befindliche SOP verfasst und an alle an der Studie beteiligten Krankenhäuser im Vorfeld verteilt.

Im Labor wurden die Blutproben innerhalb von 96 Stunden nach Entnahme nach dem in 2.10 beschriebenen Prozedere weiterverarbeitet und hinsichtlich der CTCs ausgewertet. Die Auswertung der CTC-Proben erfolgte geblindet und unabhängig zu den erhobenen Befunden bzw. klinischen Verläufen.



Abbildung 8: CellSavePreservative®Tube (www.veridex.com)

2.12 Assoziation der CTC Zahl mit dem Therapieverlauf

Ziel unseres Begleitprogramms zur CRAD001LDE17T-Studie war es zu untersuchen, ob eine Assoziation bzw. Korrelation zwischen den zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem Therapieergebnis beobachtbar ist.

Hierfür wurde die Anzahl der gemessenen zirkulierenden Tumorzellen mit dem objektiven Ansprechen des Patienten auf die Chemotherapie verglichen. Hierzu wurden die Patienten anhand des Ergebnisses ihrer Bildgebung in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Die Klassifikation des objektiven Therapieansprechens erfolgte mit Hilfe der RECIST-Definition als: 1.) komplette Remission (CR); 2.) partielle Remission (PR); 3.) stabiler Verlauf (SD); 4.) Progress (PD). Sowohl die radiologische, als auch die nuklearmedizinische Auswertung erfolgte geblindet und unabhängig von den CTC Werten. Ebenso wurde die CTC Zahl unabhängig von dem objektiven Therapieansprechen bestimmt.

Ein weiteres Augenmerk lag, wie auch bei der Auswertung der erhobenen CTC Daten, auf deren prognostischer Nutzbarkeit für das Überleben der Patienten. Zum einen korrelierten wir die Anzahl der gemessenen zirkulierenden Tumorzellen im Blut zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem progressionsfreien Überleben der Studienteilnehmer, d. h. der Zeit zwischen Eintritt in die Studie und dem Fortschreiten der Erkrankung, die entweder anhand eines radiologischen Progresses nach den RECIST-Kriterien oder eines klinischen Progresses definiert wurde (Progression Free Survival, PFS). Zum anderen versuchten wir eine Verbindung zwischen der Höhe der CTCs und dem Zeitraum bis zum Tod des Patienten herzustellen, also dem Overall Survival (OS). Die Zeiträume wurden jeweils in Monaten angegeben. Bei Versterben der Patienten wurde Kontakt mit den Angehörigen aufgenommen, um zu erfahren, ob der Tod des Patienten mit der Erkrankung am Urothelkarzinom im Zusammenhang stand.

2.13 Statistische Auswertung

Primäres Ziel der Doktorarbeit war es herauszufinden, ob Zirkulierende Tumorzellen als prognostischer Marker für das Harnblasenkarzinom verwendet werden können. Die Ergebnisse der CTC Bestimmung im Blut der Studienteilnehmer wurden mit der Lokalisation und Ausbreitung von Metastasen, Routinelaborparametern, dem Überleben des Patienten und seiner Leistungsfähigkeit während der Erkrankung verglichen. Die angegebene Anzahl der CTCs bezieht sich immer auf ein Blutvolumen von 7,5 ml. Bei wie vielen Patienten mindestens eine zirkulierende Tumorzelle im peripher venösen Blut nachweisbar war wurde mit Hilfe der Detektionsrate in Prozent angegeben. Die Beschreibung der erhobenen Daten erfolgte deskriptiv mit Angabe von Mittelwert mit Standardabweichung (SD) und Median mit Range. Bei kategorialen Daten wurden die relativen Häufigkeiten in Prozent berechnet. Die Berechnung der Daten erfolgte mittels Excel (Version von 2007). Als statistisch signifikant wurden alle Ergebnisse ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ gewertet.

Mit Hilfe der Kaplan Maier Kurve werden die Überlebensraten und -zeiten der Studienteilnehmer dargestellt.

Zur statistischen Auswertung des Zusammenhangs zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem Progression Free Survival bzw. dem Overall Survival wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Zur Datenerfassung wurde die Microsoft-Tabellenkalkulation „Excel 2007“ genutzt. Die anonymisierte, statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels SPSS für Windows Version 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences Inc. Chicago, IL, USA). Zur Einarbeitung in die Thematik von SPSS wurde das Buch „SPSS 20- Einführung in die moderne Datenanalyse“ (13. Auflage, 2012) verwendet. Alle abgebildeten Diagramme wurden entweder mittels SPSS oder Excel angefertigt. Zur Erstellung der Abbildungen wurde mit Microsoft Office Power Point 2007 gearbeitet.

Die Literaturrecherche wurde vor allem mit der Onlinedatenbank „PubMed“ der U.S. Library of Medicine durchgeführt. Zur Ergänzung wurden aktuelle Lehrbücher, Fachzeitschriften, die Internetseite des Robert Koch Institutes und die S3 Leitlinie „Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms“ herangezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Demographie

Im Rahmen der CRAD001 Studie wurden im Zeitraum von Januar 2009 bis Dezember 2011 insgesamt 30 Patienten eingeschlossen. Drei der Studienteilnehmer zogen ihre Einverständniserklärung im Laufe der Studie zurück und nahmen somit nicht an der abschließenden Auswertung teil. Bei 26 der insgesamt 27 Studienteilnehmer konnte mindestens zu einem Zeitpunkt eine Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut erfolgen. Jeder Studienteilnehmer war an einem histologisch gesicherten Urothelkarzinom mit organüberschreitender Tumorausbreitung erkrankt. Zusätzlich versagte bei allen Patienten eine zuvor durchgeführte platinhaltige Chemotherapie. 18 Studienteilnehmer waren männlich (66,66 %) und 9 weiblich (33,33 %). Das Patientenalter reichte bei Studienbeginn von 35 bis 76 Jahren, wobei das mediane Alter bei 63 Jahren lag. Die Altersverteilung des Studienkollektivs ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

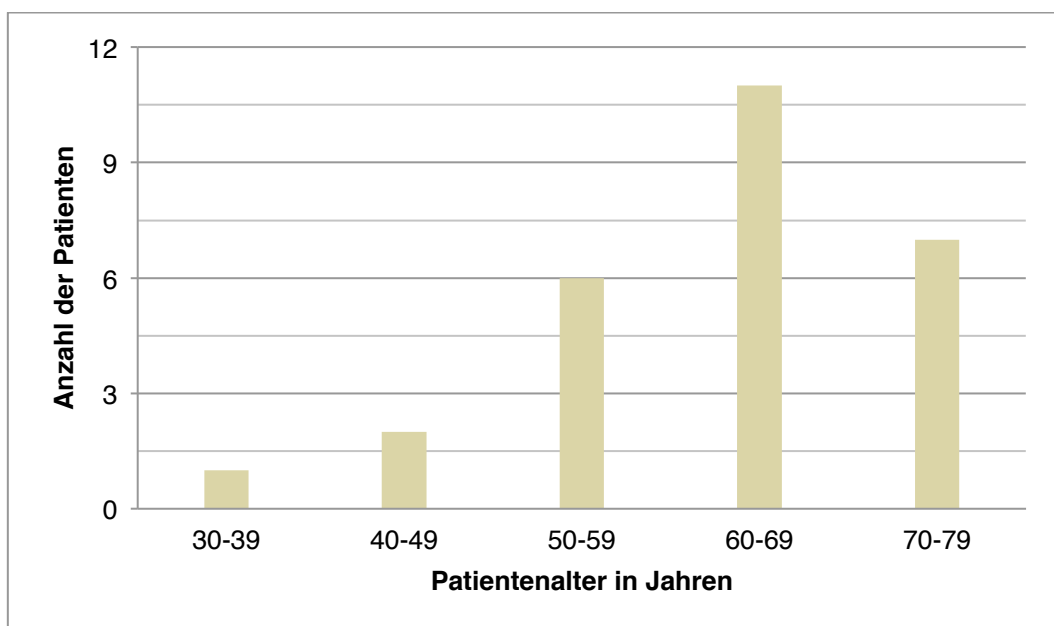


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Altersverteilung der Studienteilnehmer der CRAD001 Studie

Betrachtet man die Tumorlokalisation genauer, waren bei 8 Patienten (30 %) Tumore im oberen Harntrakt und bei 16 Patienten (59 %) Tumore im unteren Harntrakt nachweisbar. 3 der Patienten (11 %) hatten sowohl im oberen, als auch im unteren Harntrakt bösartige Raumforderungen. 19 Patienten (70 %) waren bei Diagnose bereits an high grade Tumoren erkrankt und bei lediglich 2 Studienteilnehmer (8 %) handelte es sich um low grade Tumore. Leider erfolgte bei 6 Patienten keine Differenzierung der Tumore zwischen low und high grade (22 %). Die weiteren erhobenen demographischen Daten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Demographische Daten und klinische Charakteristika der Studienteilnehmer bei Einschluss in die CRAD001 Studie (übernommen und adaptiert von Niegisch et al., 2015)

Medianes Patientenalter (Range), Jahre	63 (35-76)
Verhältnis männlich : weiblich	18:9
Lokalisation des Primärtumors	
Unterer Harntrakt/ Blase	16
Oberer Harntrakt	8
Beides	3
Behandlung	
Urethrektomie, Zystektomie	15
Nephrektomie, Urethrektomie, Nephroureterektomie	7
Biopsie/ TURB	5
Tumorstadium (WHO 2004) bei Diagnose	
High grade	19
Low grade	2
Fehlt	6
ECOG Performance Status	
0	16
1	8
2	3
Lokalisation der Metastasen	
Leber	13
Lunge	11
Knochen	9
Lymphknoten	18
Andere (inklusive lokale Rezidive)	7
Multiple Lokalisationen	22
Primäres Therapie Regime	
Gemcitabin/ Cisplatin	21
Gemcitabin/ Carboplatin	2
Andere	4
>1 Therapie	4
Indikation der vorherigen platin-basierten Therapie	
Palliativ	20
Perioperativ	7

Zur operativen Therapie des Primärtumors wurde bei insgesamt 13 Patienten (49 %) eine Zystektomie durchgeführt. Eine Nephrektomie wurde bei 5 Studienteilnehmern

im Vorfeld durchgeführt (19 %). 2 Patienten erhielten eine Urethrektomie und weitere 2 eine Nephroureterektomie (je 7 %). Eine transurethrale Resektion des Blasentumors (TURB) erfolgte bei 2 Studienteilnehmern (7 %). Lediglich eine Biopsie zur Sicherung der Diagnose wurde bei 11 % (3 Patienten) durchgeführt.

Um eine bessere und detailliertere Darstellung der Tumorcharakteristika der einzelnen eingeschlossenen Patienten zu ermöglichen wurden die tumorbezogenen Daten der jeweiligen Studienteilnehmer im Anhang aufgeführt.

3.1.2 Vortherapien

Entsprechend den Einschlusskriterien erhielt jeder Studienteilnehmer im Vorfeld dieser Studie eine Platin-basierte Chemotherapie. Die Mehrzahl der Patienten (n = 21, 78 %) unterzog sich einer Vortherapie mit Gemcitabin und Cisplatin. Lediglich 2 Patienten erhielten eine Chemotherapie mit Gemcitabin und Carboplatin (7 %). Weitere Chemotherapie Ansätze wurden bei den restlichen 4 Studienteilnehmern verfolgt. Dabei erhielten 2 Patienten (7 %) eine Kombination aus Cisplatin und 5-FU, 1 Patient (4 %) wurde mit Cisplatin und Vinflunin und 1 Patient (4 %) mit Cisplatin und Etoposid vorbehandelt. Insgesamt erhielten 4 Studienteilnehmer mehr als einen Therapieansatz vor Eintritt in die CRAD001 Studie (15 %). Zusätzlich zur Chemotherapie erfolgte bei 4 Patienten (15 %) eine Strahlentherapie des Primärtumors.

3.1.3 Metastasierungsmuster

Bei 81 % (n = 22) der 27 Studienteilnehmer wurde im Laufe der Studie eine multiple Metastasierung mittels CT und Knochenszintigraphie nachgewiesen. 5 Patienten zeigten lediglich Metastasen in einer Lokalisation (19 %). Am Häufigsten fand sich bei den Patienten eine lymphogene Metastasierung (n = 18; 67 %). Wobei bei 16 der lymphogen metastasierten Studienteilnehmern (60 %) auch Metastasen an anderen Organsystemen nachweisbar waren. Nur bei 7 % (n = 2) waren allein Lymphknotenmetastasen vorhanden. Lebermetastasen waren bei 13 Patienten nachweisbar (48 %), wobei hepatische Metastasen nie allein auftraten, sondern immer mit Metastasen in anderen Organsystemen kombiniert waren. 41 % (n = 11)

erkrankten insgesamt an pulmonalen Metastasen. 2 davon wiesen lediglich Metastasen im Bereich der Lunge auf (7 %), alle Anderen hatten zusätzliche Metastasen in anderen Körperbereichen (n = 9; 34 %). Mittels Knochenszintigraphie konnten bei insgesamt 9 Patienten (34 %) ossäre Metastasen nachgewiesen werden. Diese traten immer in Kombination mit Metastasen in weiteren Organsystemen auf. Im Bereich der Nebennieren fanden sich bei immerhin 6 Patienten (22 %) bösartige Neubildungen in der CT. Bei einem Patienten metastasierte der Tumor in das Pankreas (4 %).

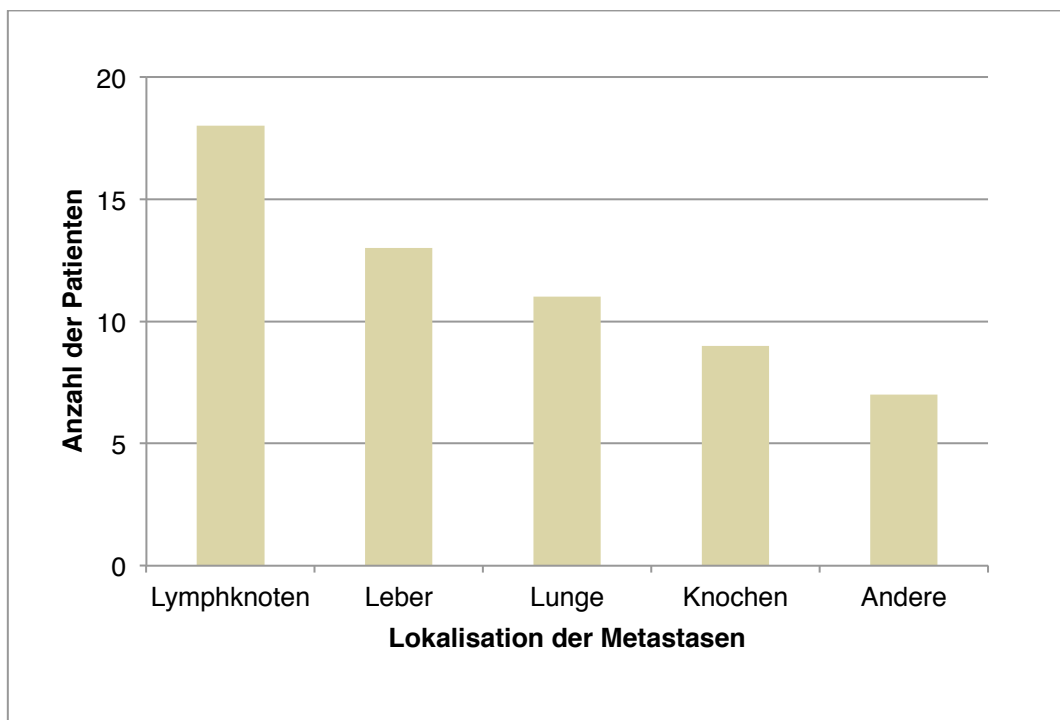


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Lokalisation von Metastasen im Studienkollektiv

3.1.4 Therapieverlauf

Acht Studienteilnehmer durchliefen alle 6 Zyklen der Chemotherapie und schlossen damit die komplette Therapie ab. Bei allen anderen Patienten trat im Laufe der Behandlung entweder ein Progress der Tumorerkrankung ein oder die Nebenwirkungen der Chemotherapie zwangen sie dazu die Studie vorzeitig zu beenden. Ein Abbruch der Studie nach bereits 5 durchlaufenen Zyklen erfolgte als Konsequenz eines Progresses der Erkrankung bei einem Patienten. Weitere 5 Studienteilnehmer verließen die Studie nach 4 Zyklen, einer davon wegen

Ergebnisse

Verschlechterung seines Gesundheitszustandes und die anderen 4 jeweils wegen des Fortschreitens der Tumorerkrankung. Nach 3 vollendeten Zyklen Chemotherapie verließ ein Patient die Therapie, da sein Gesundheitszustand keine weitere Teilnahme an der Studie erlaubte. 9 von 27 Studienteilnehmern schieden bereits nach 2 Zyklen aus der Studie aus, da es bereits zu einem Progress der Grunderkrankung kam. Bei einem Patienten führte ein fortbestehender Herpes zoster trotz 21 tägiger Unterbrechung der Studienmedikation und adäquater Therapie dazu, dass auch er nach Beendigung des 1. Zyklus die Studie verlassen musste. Zwei Studienteilnehmer zogen unmittelbar vor Beginn der Chemotherapie ihre Einwilligung zur Teilnahme zurück. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 11 graphisch dargestellt nach wie vielen Zyklen Chemotherapie der einzelne Studienteilnehmer die Studienteilnahme abgebrochen hat.

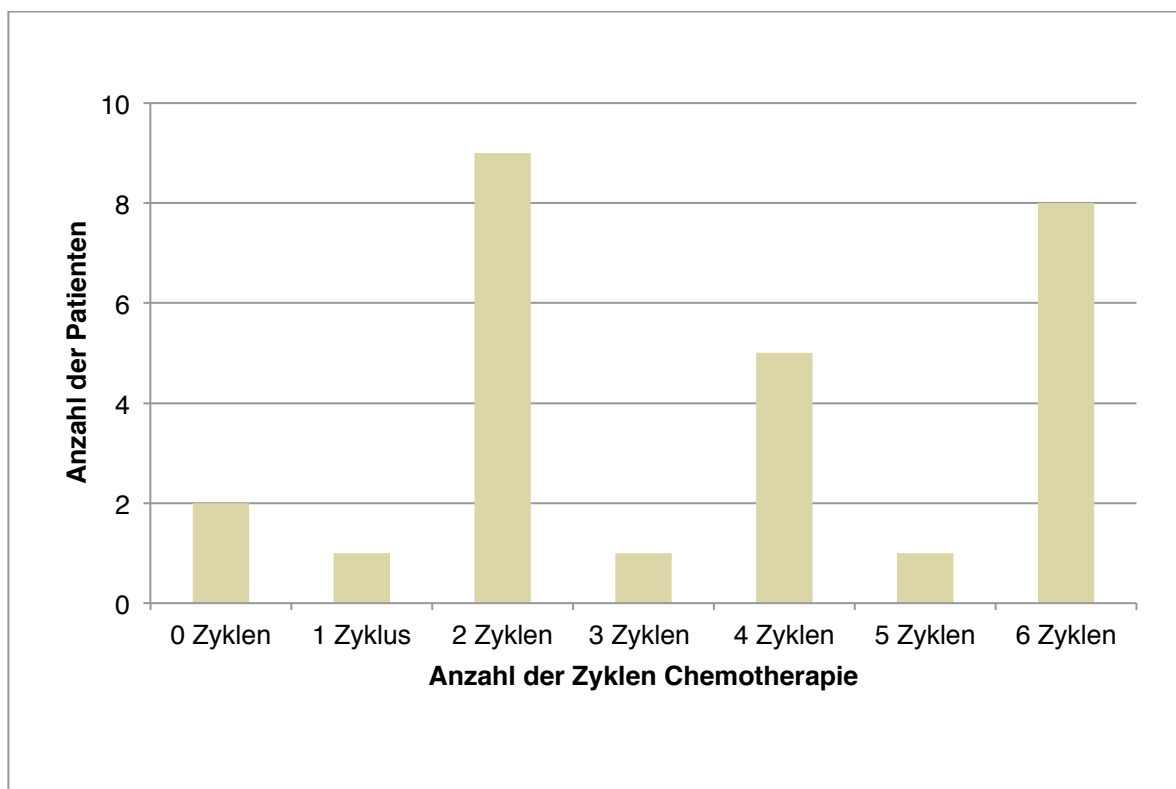


Abbildung 11: Graphische Darstellung der verabreichten Zyklen Chemotherapie vor Abbruch der Teilnahme an der CRAD001 Studie

3.2 CTC Detektion im Patientenkollektiv

3.2.1 CTC Zahl im gesamten Kollektiv im Therapieverlauf

Vor Therapiebeginn wurden bei 2 der 27 Studienteilnehmer keine CTC Zahlen bestimmt, da zu wenig Blut abgenommen wurde und somit nicht ausreichend Material zur weiteren Verarbeitung vorlag. Bei 12 Patienten ließen sich keine CTCs im Blut nachweisen. Die höchste gemessene Zahl an zirkulierenden Tumorzellen lag bei 18 CTCs/7,5 ml Blut. Somit wurden bei den auswertbaren Studienteilnehmern zwischen 0 und 18 CTCs/7,5 ml Blut nachgewiesen. Der Mittelwert lag bei 3,7 CTCs (SD: 5,8; Median: 1; Range: 0-18).

Nach Ende des 2. Zyklus der Chemotherapie wurde bei 18 Patienten erfolgreich Blut abgenommen. Zwei weitere Blutproben waren leider wegen eines mangelnden abgenommen Blutvolumen nicht verwertbar. 7 Patienten hatten zu diesem Zeitpunkt die Studie bereits verlassen. Die detektierten CTC Zahlen lagen zwischen 0 und 32/7,5 ml Blut. Somit lag der Mittelwert bei 4,7 CTCs/7,5 ml Blut (SD: 8,8; Median: 1; Range: 0-32).

Zum Ende des 4. Zyklus war die Zahl der verwertbaren Blutproben auf 13 gesunken. Eine weitere Probe konnte nicht ausgewertet werden, da zu wenig Material vorlag. Und die restlichen 13 Patienten hatten die Studienteilnahme zu diesem Zeitpunkt bereits beendet. Die detektierten Tumorzellen lagen zwischen 0 und 17/7,5 ml Blut. Dies ergibt einen Mittelwert von 3,1 CTCs/7,5 ml Blut (SD: 5,4; Median: 0; Range: 0-17).

Bei Therapieende konnten lediglich 6 der 8 entnommenen Blutproben ausgewertet werden, da 2 Entnahmeröhrchen zu wenig Blutvolumen beinhalteten. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten 6 weitere Patienten die Studie wegen gesundheitlichen Problemen verlassen. Die Anzahl der gefundenen CTCs lag zwischen 0 und 1. Der Mittelwert betrug somit 0,2 CTCs/7,5 ml Blut (SD: 0,4; Median: 0; Range: 0-1).

Zur besseren Übersicht erfolgt im Anschluss eine graphische (Abb. 12) und tabellarische Darstellung (Tabelle 5) der CTC Mittelwerte zu den unterschiedlichen Therapiezeitpunkten.

Ergebnisse

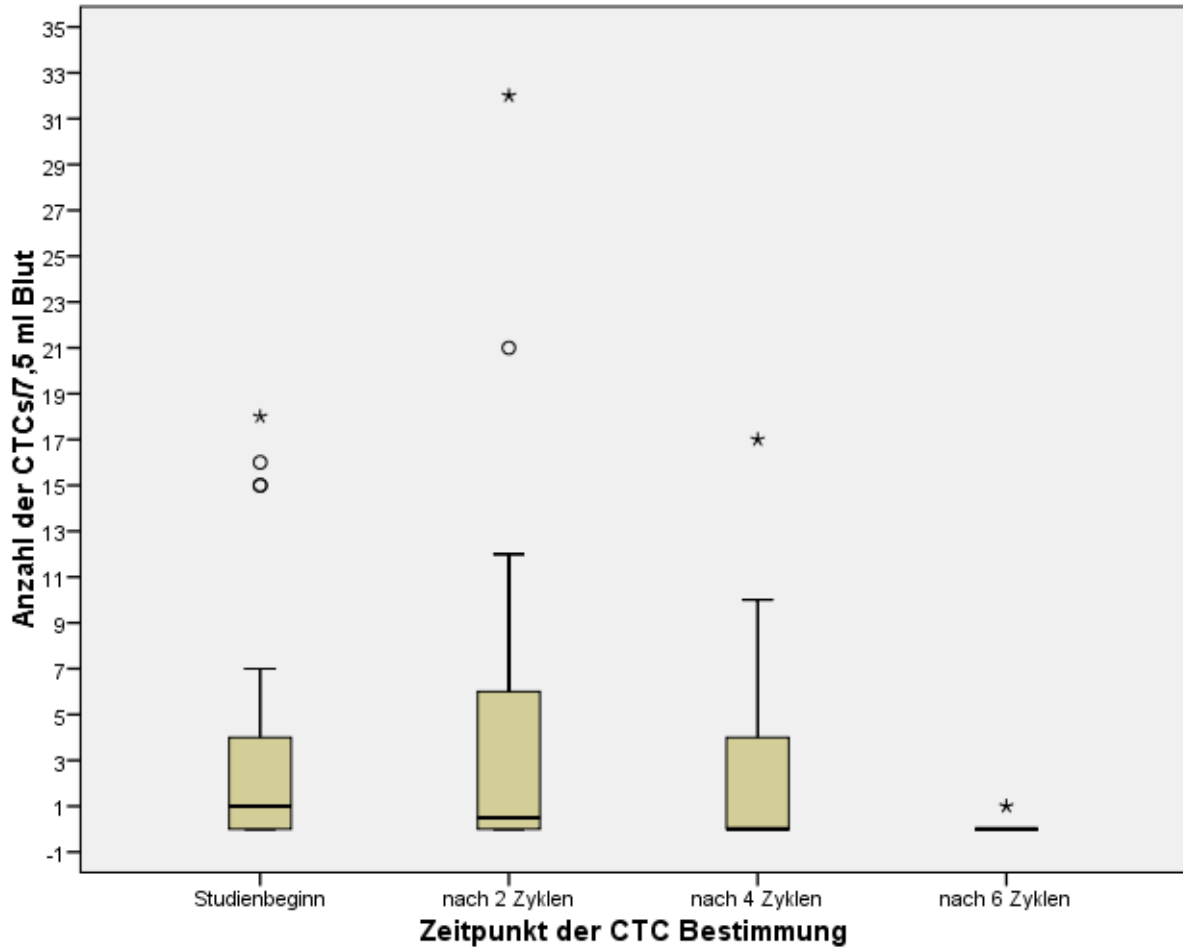


Abbildung 12: Darstellung der zirkulierenden Tumorzellen pro 7,5 ml Blut bei Studienbeginn, nach 2, 4 und 6 Zyklen Chemotherapie im Studienkollektiv (°: Ausreißer; ★: Extremwerte)

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der detektierten CTC Zahl zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten

	Baseline	q2	q4	q6
Patientenzahl	25	18	13	6
CTC				
Median	1	1	0	0
Range	0-18	0-32	0-17	0-1
Mittelwert	3,7	4,7	3,1	0,2
Standardabweichung	5,8	8,8	5,4	0,4

3.2.2 CTC Detektion bei den Studienteilnehmern mit 6 Zyklen Chemotherapie

Betrachtet man isoliert die zirkulierenden Tumorzellen im Blut derer Patienten, die alle 6 Zyklen Chemotherapie durchlaufen haben ($n = 6$), kommt man zu folgendem Ergebnis. Bei Studienbeginn lag der Mittelwert bei 4 CTCs/7,5 ml Blut (SD: 5,6). Es wurden zwischen 0 und 15 zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut der Patienten nachgewiesen (Median: 2,5). Nach 2 Zyklen Chemotherapie stieg der Mittelwert auf 4,8 CTCs/7,5 ml Blut an (SD: 3,3; Median: 1; Range: 0-21). Einen Mittelwert von 2,8 zirkulierenden Tumorzellen errechnete sich nach 4 abgeschlossenen Zyklen Chemotherapie (SD: 6,9). Zu diesem Zeitpunkt wurden zwischen 0 und 17 CTCs im Patientenblut nachgewiesen (Median: 0). Bei Studienabschluss, also nach 6 Zyklen Chemotherapie lag der Mittelwert bei 0,2 CTCs/7,5 ml Blut (SD: 0,4 CTCs). Im Patientenkollektiv wurden zwischen 0 und 1 zirkulierenden Tumorzelle im peripheren Blut detektiert (Median: 0). Somit scheint bei Patienten mit einer längerfristigen Therapie die CTC Zahl nach einem anfänglichen Anstieg deutlich abzufallen. Die Daten sind in Abbildung 13 zur besseren Übersicht graphisch dargestellt.

Ergebnisse

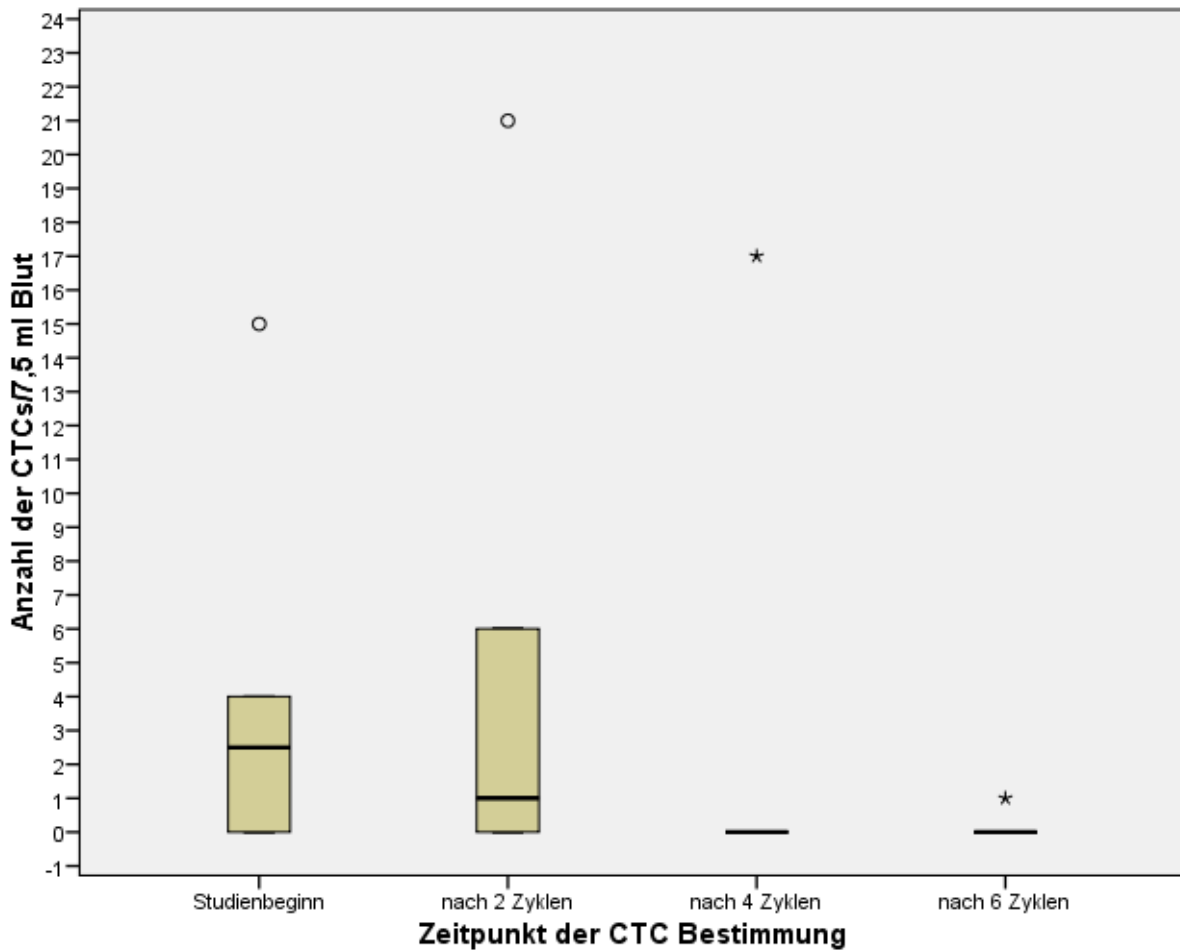


Abbildung 13: Darstellung der zirkulierenden Tumorzellen pro 7,5 ml Blut bei Patienten mit Abschluss aller 6 Zyklen Chemotherapie (n = 6) bei Studienbeginn, nach 2, 4 und 6 Zyklen (°: Ausreißer; ★: Extremwerte)

3.2.3 CTC Detektionsrate in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters

Wertet man die erhobenen Daten bei Studienbeginn bezüglich der Nachweisbarkeit von zirkulierenden Tumorzellen bei bestimmten Lokalisationen von Metastasen aus, so stellt man fest, dass bei manchen Metastasen das Auftreten von CTCs im peripheren Blut wahrscheinlicher ist, als bei Anderen. Auf Grund der kleinen Kohorte wurde zur Vereinfachung der Auswertung eine Einteilung in folgende Gruppen vorgenommen: alleinige lymphogene Metastasierung; viscerale Metastasierung mit und ohne lymphogenem Befall; ossäre Metastasierung mit und ohne lymphogenem Befall und ossäre und viscerale Metastasierung mit und ohne lymphogenem Befall.

3 der 27 Patienten litten bei Einschluss in die Studie sowohl an ossären, als auch an lymphogenen Metastasen. Bei 2 von ihnen waren zirkulierende Tumorzellen im Blut

nachweisbar (67 %). In die Gruppe der Studienteilnehmer mit ossären und visceralen Metastasen mit (n = 2) und ohne (n = 4) lymphogener Beteiligung wurden 6 Patienten eingeschlossen. Hier konnten bei 3 Patienten CTCs im Blut gefunden werden (50 %). Die Mehrzahl der Studienteilnehmer war visceral mit (n = 11) und ohne (n = 5) lymphogener Beteiligung metastasiert (n = 16). In der Hälfte der Fälle konnten hier zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut gefunden werden (50 %). 2 Patienten der CRAD001 Studie waren allein lymphogen metastasiert. Bei Beiden waren bei Aufnahme in die Studie im peripheren Blut keine CTCs nachweisbar (0 %). Zur besseren Übersicht sind die oben erwähnten Daten in Abbildung 14 veranschaulicht.

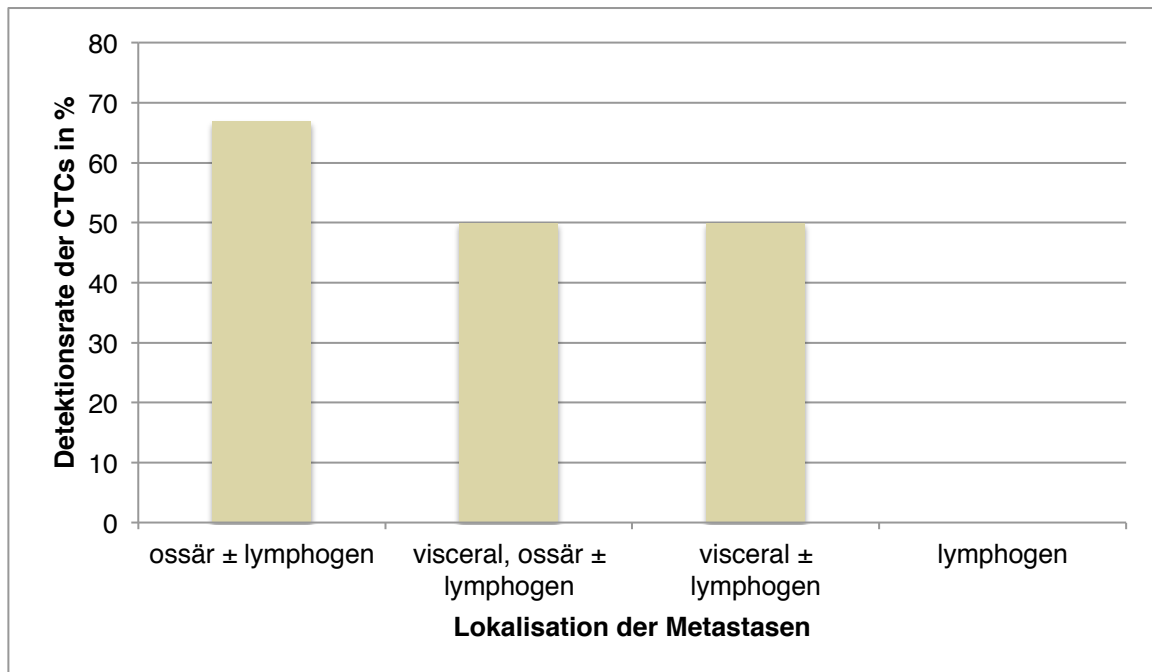


Abbildung 14: Graphische Darstellung der CTC Detektionsrate in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters

3.2.4 Höhe der CTC Zahl in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters

Wir behalten die unter 3.2.3 vorgestellte Gruppeneinteilung bei und überprüfen ob zusätzlich zur Detektionsrate die absolute Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut durch die Lokalisation der Metastasen beeinflusst wird. Dazu betrachten wir die gemessenen CTCs bei Baseline, da uns zu diesem Zeitpunkt die meisten verwertbaren Blutproben zur Verfügung stehen.

Ergebnisse

Bei ossärer und lymphogener Metastasierung (n = 3; Detektionsrate 67 %) lag der Mittelwert der CTCs bei 6,3/7,5 ml Blut (SD: 8,5; Median: 3; Range: 0-16). In der Patientengruppe mit visceralen und ossären Metastasen mit oder ohne lymphogener Beteiligung (n = 6; Detektionsrate 50 %) errechnete sich ein Mittelwert von 5,3/7,5 ml Blut (SD: 7,5; Median: 1; Range 0-15). Die Mehrzahl der Patienten war an visceralen Metastasen mit oder ohne lymphogener Beteiligung erkrankt (n = 16; Detektionsrate: 50 %). In dieser Gruppe lag der Mittelwert der zirkulierenden Tumorzellen pro 7,5 ml Blut bei 2,7 (SD: 4,8; Median: 1; Range: 0-18). Rein lymphogen metastasiert waren 2 der Studienteilnehmer, aber nur einem der Beiden wurde genug Blutvolumen zur Auswertung abgenommen. Hier konnte jedoch keine zirkulierende Tumorzelle im peripheren Blut nachgewiesen werden (Detektionsrate 0 %).

In Abbildung 15 sind die Mittelwerte der CTCs der einzelnen Gruppen zur besseren Übersicht graphisch dargestellt.

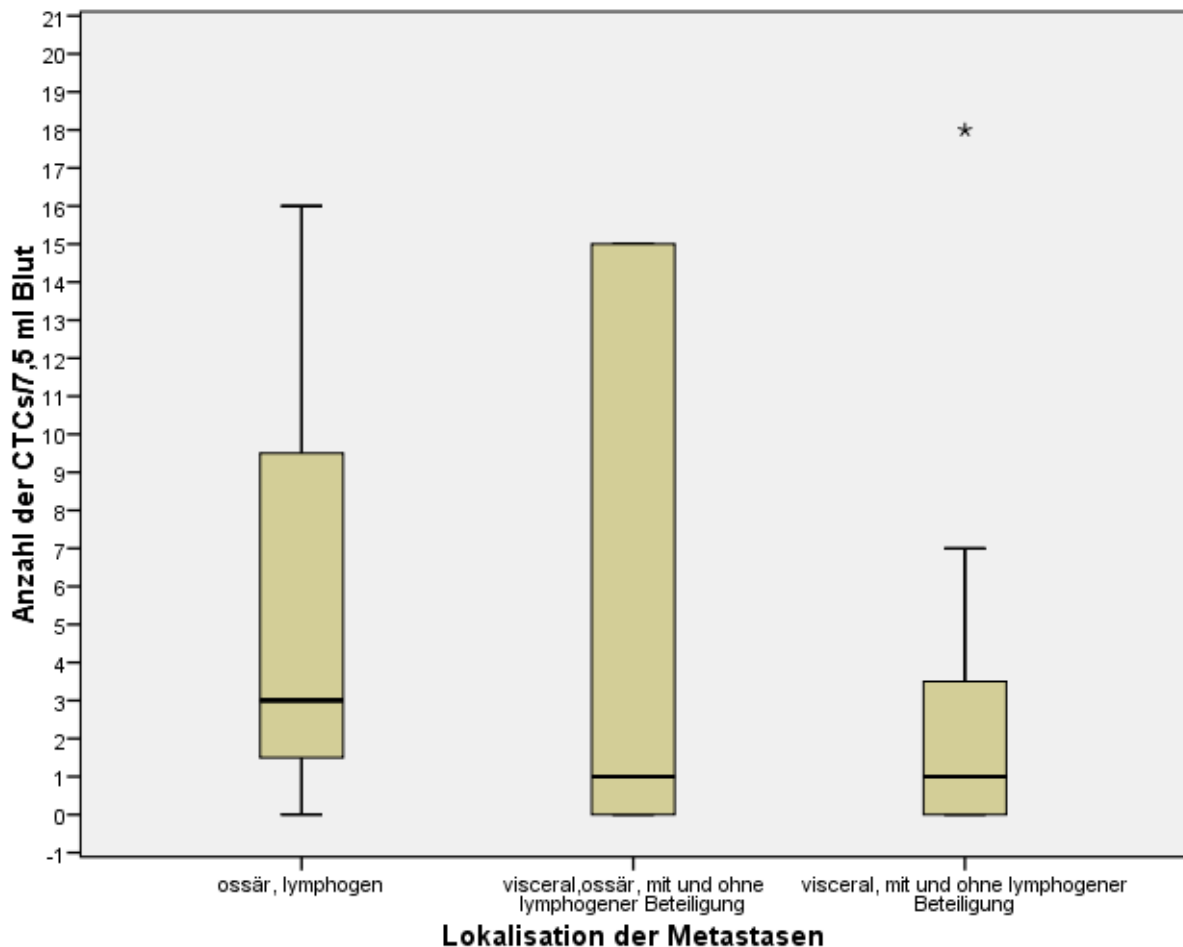


Abbildung 15: Darstellung der zirkulierenden Tumorzellen pro 7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters (★: Extremwerte)

3.3 Assoziation der CTC Zahl mit Routinelaborparametern

Im Verlauf der Studie wurde zusätzlich zur regelmäßigen Bestimmung der zirkulierenden Tumorzellen im Blut ein Routinelabor abgenommen. Die Laborkontrollen erfolgten beim Studieneinschluss (Screening), an Tag 1, 8 und 15 des jeweiligen Zyklus, bei der Abschlussuntersuchung und bei jeder Follow-Up Untersuchung des Patienten. In unserer Auswertung betrachteten wir den Hämoglobin-Wert als Hinweis auf ein Vorliegen einer Tumoranämie. Die Laktatdehydrogenase diente als unspezifischer Tumormarker. Und schließlich wurde die Alkalische Phosphatase als Marker für das Vorliegen von Knochenmetastasen genutzt. Für die Assoziationsuntersuchung der CTC Zahl mit den Routinelaborparametern haben wir uns auf den Zeitpunkt vor Therapiebeginn beschränkt, um eventuelle Einflüsse durch die Therapie auszuschließen.

3.3.1 Assoziation der CTC Zahl mit dem Hämoglobin-Wert

Im Rahmen der Studie wurden alle Patienten mit einem Hb <10 g/dl als anämisch bezeichnet. Zur Auswertung wurde das Blut von 25 Patienten untersucht, da bei ihnen sowohl ein Routinelabor abgenommen wurde und gleichzeitig die Bestimmung der CTCs durchgeführt wurde. Betrachtet man die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut bei gleichzeitigem Vorliegen einer Anämie (n = 15) lag der Mittelwert bei 5,3/7,5 ml Blut (SD: 6,9; Median: 2; Range: 0-18). Die höchste gemessene Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen lag bei 18/7,5 ml Blut. Bei den 10 Studienteilnehmern deren Hämoglobin im Normbereich war, lag der Mittelwert der CTCs bei 1,2/7,5 ml Blut (SD: 2,3; Median: 0; Range: 0-7). Hier lag die maximale Anzahl an detektierten zirkulierenden Tumorzellen bei 7/7,5 ml Blut. Dies lässt lediglich vermuten, dass eine Anämie umso wahrscheinlicher ist, je höher die gemessenen CTCs im Blut sind. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Ergebnisse

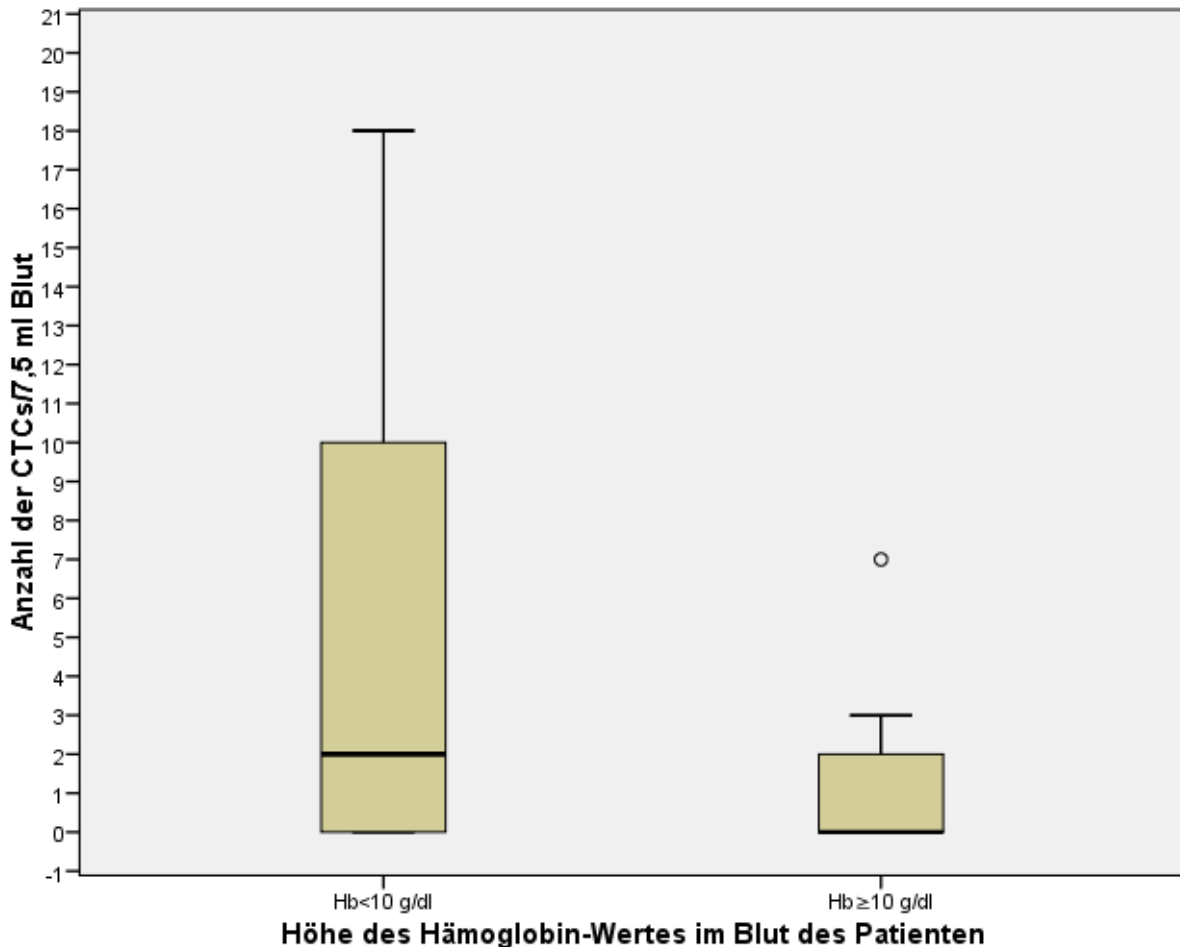


Abbildung 16: Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit der Höhe des Hämoglobin-Wertes im Blut des Patienten (°: Ausreißer)

3.3.2 Assoziation der CTC Zahl mit der Laktatdehydrogenase

Die Laktatdehydrogenase (LDH) spielt auch beim metastasierten Harnblasenkarzinom eine Rolle als unspezifischer Tumormarker. Ab einem Wert von >250 E/l wird von einer Erhöhung der LDH ausgegangen. Lag die LDH bei den Patienten im Normbereich (n = 11), d.h. ≤ 250 E/l, errechnete sich ein Mittelwert von 1,4 CTCs/7,5 ml Blut (SD: 2,3; Median: 0; Range: 0-7). Die höchste Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut, die bei einem Patienten in dieser Gruppe nachweisbar war, lag bei 7/7,5 ml Blut. Bei 13 Studienteilnehmern lag zum Untersuchungszeitpunkt eine Erhöhung der Laktatdehydrogenase vor. Hier ergab sich ein Mittelwert an CTCs von 5,9/7,5 ml Blut (SD: 7,2; Median: 2; Range: 0-18). Auch hier lässt sich somit vermuten, dass die Wahrscheinlichkeit zirkulierende Tumorzellen im Blut nachweisen zu können zunimmt, sobald die LDH erhöht ist. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 17 erfolgt.

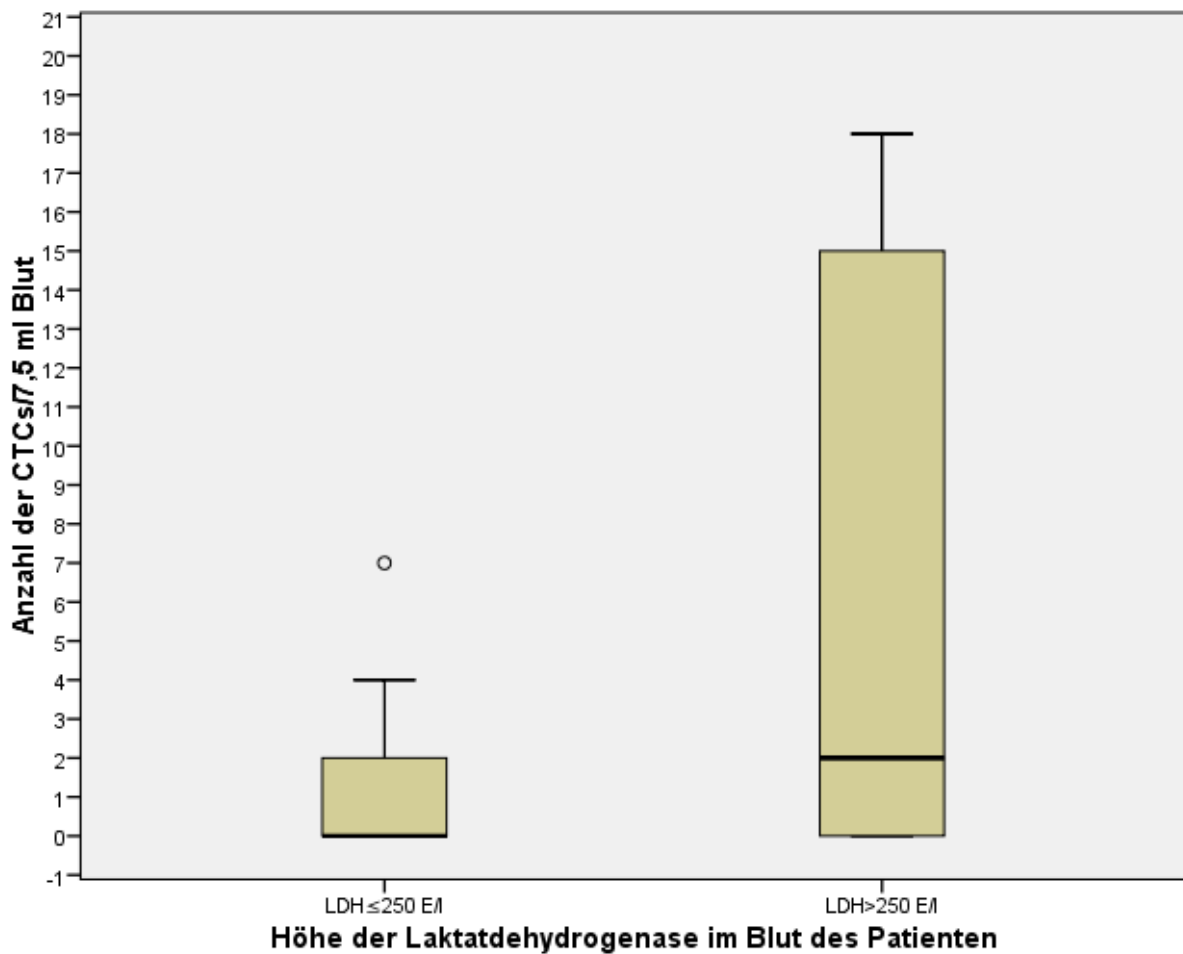


Abbildung 17: Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit der Höhe der Laktatdehydrogenase im Blut des Patienten (°: Ausreißer)

3.3.3 Assoziation der CTC Zahl mit der Alkalischen Phosphatase

Als Hinweis auf das Vorliegen von Knochenmetastasen spielt die Alkalische Phosphatase (AP) eine bedeutende Rolle. Zusätzlich kann die AP auch erhöht sein, wenn es zu einem Befall der Leber durch den Tumor gekommen ist. Der Normwert der Alkalischen Phosphatase im Blut liegt bei <120 U/l. Für den Vergleich zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen und der Höhe der Alkalischen Phosphatase standen 20 Patientenproben zur Verfügung. Die restlichen Studienteilnehmer konnten nicht an der Auswertung teilnehmen, da keine CTC oder AP Bestimmung zum Untersuchungszeitpunkt erfolgt ist. 6 Patienten waren an Lebermetastasen, 5 an Knochenmetastasen und 2 sowohl an Leber-, als auch an Knochenmetastasen erkrankt (n = 13).

Unterteilt man das Patientenkollektiv unabhängig von der Metastasierung anhand der Höhe der AP in 2 Gruppen, war bei 11 Patienten die Alkalische Phosphatase normwertig und bei 9 Patienten erhöht. In der Gruppe mit der AP im Normbereich lag der Mittelwert bei 3,2 CTCs/7,5 ml Blut (SD: 5,9; Median: 0; Range: 0-15). War eine AP von ≥ 120 U/l nachweisbar, lag der CTC-Mittelwert bei 5,6/ 7,5 ml Blut (SD:6,9; Median: 3; Range: 0-18).

Betrachtet man nur die Patienten mit Lebermetastasen (n = 6), so war bei 5 eine Erhöhung der AP im Labor sichtbar. Hier lag der Mittelwert der CTCs bei 6/7,5 ml Blut (SD: 7,3; Median: 4; Range: 0-18). Bei dem Patienten mit normwertiger AP waren keine zirkulierenden Tumorzellen im Blut nachweisbar.

Unter den verwertbaren Blutproben waren 5 von Studienteilnehmern mit Knochenmetastasen. Bei 2 Patienten lag eine Erhöhung der Alkalischen Phosphatase vor. Hier ergab sich ein Mittelwert der CTCs von 8/7,5 ml Blut (SD: 11,3; Median: 8; Range: 0-16). Bei normwertiger AP lag der Mittelwert der zirkulierenden Tumorzellen bei 6/7,5 ml Blut (SD: 7,9; Median: 3; Range: 0-15).

2 der 20 in dieser Auswertung berücksichtigten Patienten waren sowohl an Leber, als auch an Knochenmetastasen erkrankt. Bei Beiden lag die Alkalische Phosphatase im Normbereich. Der Mittelwert der gleichzeitig bestimmten CTCs lag bei 7,5/7,5 ml Blut (SD: 10,6; Median: 7,5; Range: 0-15). In Abbildung 18 sind die Daten graphisch dargestellt.

Ergebnisse



Abbildung 18: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit der Höhe der Alkalischen Phosphatase im Blut des Patienten (°: Ausreißer; ★: Extremwerte)

3.4 Assoziation der CTC Zahl mit der Leistungsfähigkeit des Patienten

Um die Lebensqualität und Leistungsfähigkeit von Patienten objektivieren zu können, wurden der ECOG Performance Status genutzt. Der ECOG Status wurde vor Beginn der Chemotherapie, vor jedem neuen Zyklus und bei der Abschlussuntersuchung erhoben. Ziel der Auswertung war zu untersuchen, ob eine Assoziation des ECOG Status mit der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut der Patienten vorliegen könnte.

3.4.1 Assoziation der CTC Zahl mit dem ECOG-Status bei Studienbeginn

Vor Studienbeginn wurde bei allen Probanden (n = 27) der ECOG Status erhoben. Bei 19 Patienten erfolgte gleichzeitig auch die Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut und somit können diese auch zur weiteren Auswertung verwendet werden. Die Mehrheit der Studienteilnehmer (n = 13; 69 %) ließen sich in die Gruppe ECOG 0, ohne Einschränkungen der Leistungsfähigkeit, einordnen. 5 Patienten (26 %) gaben leichte Einschränkungen bei körperlicher Aktivität an und bekamen somit einen ECOG 1 Status zugeordnet. Lediglich ein Patient (5 %) war nicht mehr arbeitsfähig und zeigte somit einen ECOG Status von 2. Vergleicht man nun die errechneten CTC Mittelwerte der jeweiligen Gruppen untereinander, kommt man zu folgendem Ergebnis: Die Patienten mit ECOG Status 0 hatten einen CTC Mittelwert von 3/7,5 ml Blut (SD: 6,3; Median: 0; Range: 0-18). Bei einem ECOG-Status 1 ließ sich ein CTC Mittelwert von 5,6/7,5 ml Blut errechnen (SD: 5,8; Median: 4; Range: 1-15). Im Blut des Patienten mit ECOG-Status 2 ließen sich keine zirkulierenden Tumorzellen nachweisen. In Abbildung 19 findet sich eine graphische Darstellung der oben erwähnten Ergebnisse.

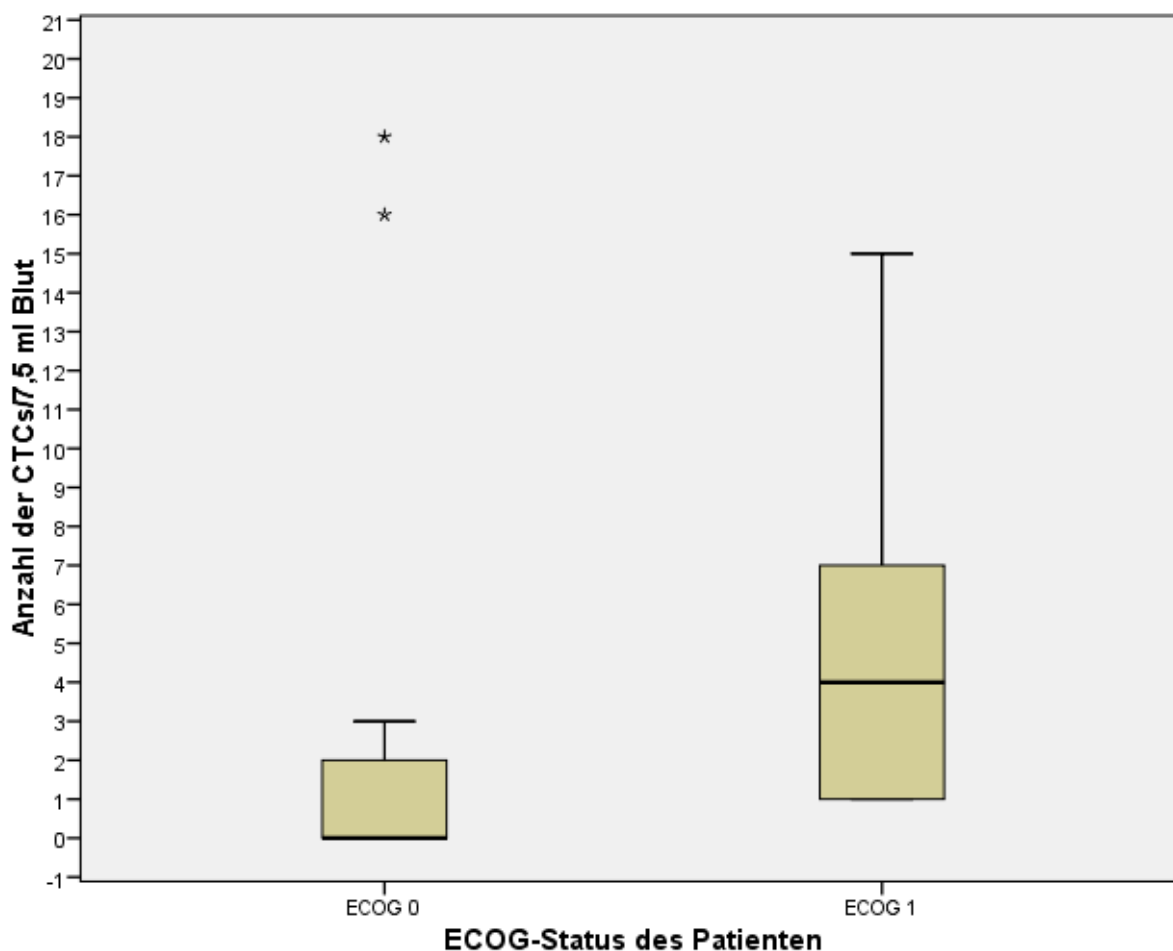


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit des ECOG-Status des Patienten (★: Extremwerte)

3.5 Assoziation der CTC Zahl mit dem objektiven Therapieansprechen

Eines der Ziele der Studie war es herauszufinden, ob sich das Fortschreiten der Erkrankung durch den neuen Therapieansatz hinauszögern oder aufhalten lässt. Hierfür wurde bei 24 Studienteilnehmern ($n = 24$) das objektive Therapieansprechen mit Hilfe der RECIST Kriterien beurteilt. Bei 3 Studienteilnehmern (12 %) konnte eine kurzzeitige partielle Remission der Tumorerkrankung beobachtet werden (partial response). Bei weiteren 11 Patienten (46 %) konnte zumindest zeitweise eine stabile Erkrankungsphase (stable disease) erzielt werden. Bei 10 Studienteilnehmern (42 %) zeigte sich durchgängig eine Progression der Erkrankung (progressive disease). Drei Patienten haben die Teilnahme an der Studie beendet bevor eine erneute Evaluierung des Tumorbefalls erfolgen konnte. Eine komplette Remission konnte

nicht beobachtet werden (complete remission). Das beste Therapieansprechen (best response) der Studienteilnehmer ist in Abbildung 20 graphisch dargestellt.

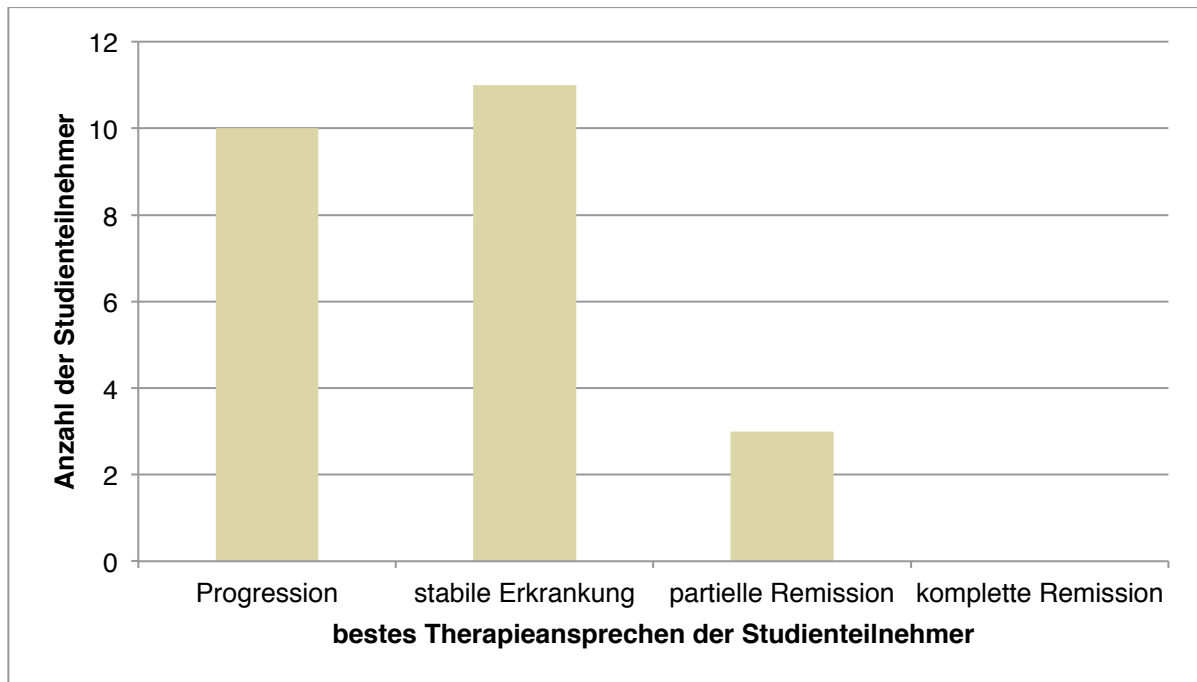


Abbildung 20: Graphische Darstellung des besten Therapieansprechens im Studienkollektiv

Unterteilt man die Studienteilnehmer, wie oben beschrieben, nach ihrem besten Ansprechen auf die Chemotherapie in die Gruppen partielle Remission, stabile Erkrankung und Progression und vergleicht man die Mittelwerte der am höchsten gemessenen CTC Werte im Verlauf der Studie zwischen den Gruppen, so kommt man zu folgendem Ergebnis. In der Gruppe der Patienten mit partieller Remission ($n = 3$), ergibt sich ein CTC Mittelwert von $7,7/7,5$ ml Blut (SD: 11,6; Median: 2; Range: 0-21). In der Gruppe der Patienten mit einer zumindest zeitweise stabilen Erkrankung (stable disease; $n = 11$) zeigte sich ein CTC Mittelwert von $7/7,5$ ml Blut (SD: 10,1; Median: 2; Range: 0-32). In der Gruppe der 10 Patienten, bei denen es nie zu einer Verbesserung oder einem stabilen Krankheitsverlauf kam, zeigte sich ein CTC Mittelwert von $4,6/7,5$ ml Blut (SD: 6,3; Median: 1; Range: 0-16). Somit lässt sich kein eindeutiger Zusammenhang der höchsten erhobenen CTC Zahl mit dem objektiven Therapieansprechen beobachten (s. Abb. 21).

Ergebnisse

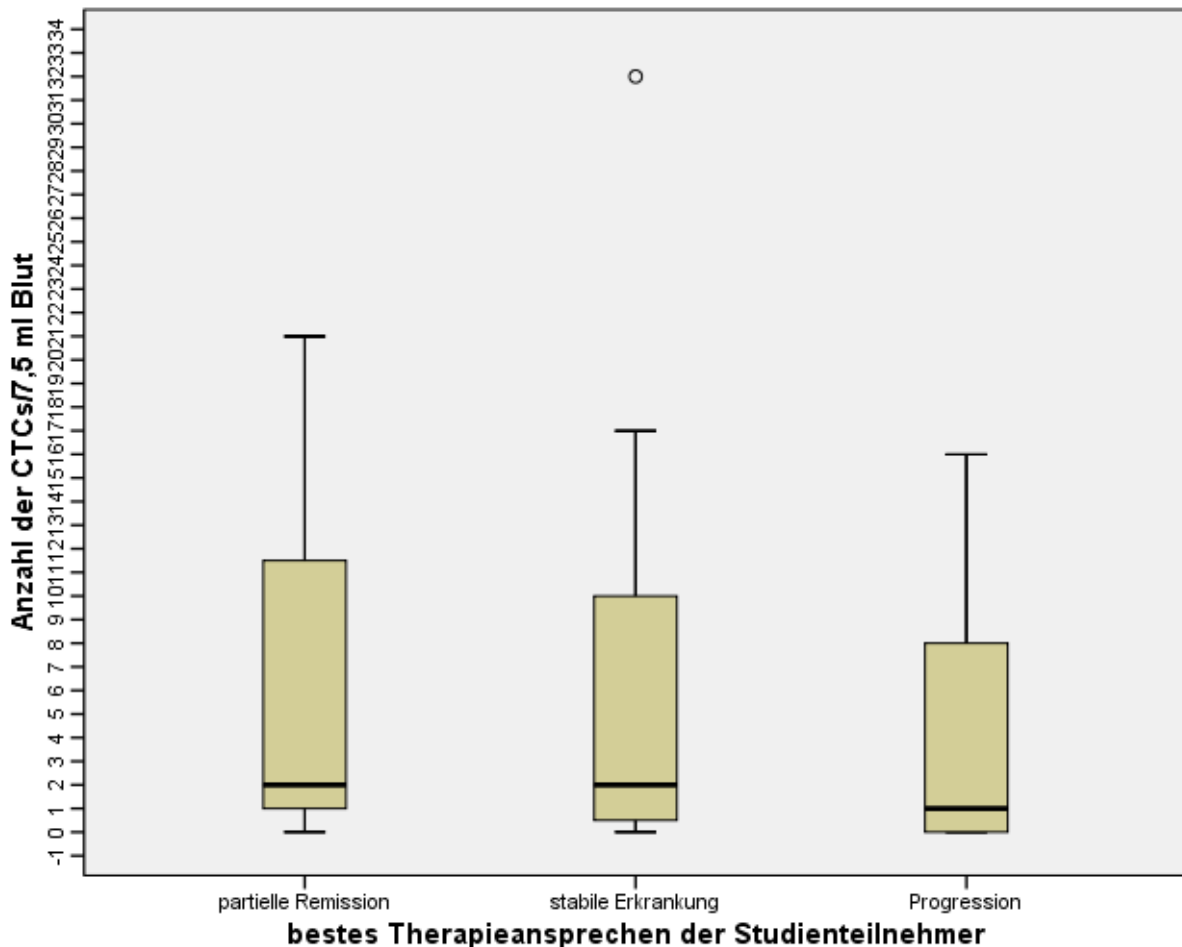


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut in Abhängigkeit des besten Therapieansprechens im Patientenkollektiv (°: Ausreißer)

Unterteilt man die Studienteilnehmer, wie oben beschrieben, nach ihrem besten Ansprechen auf die Chemotherapie in die Gruppen partielle Remission, stabile Erkrankung und Progression und vergleicht man dann die gemessenen Mittelwerte der CTCs bei Studienbeginn kommt man zu folgendem Ergebnis. In der Gruppe der Patienten mit partieller Remission ($n = 3$) ergibt sich eine CTC Mittelwert von 1,7/7,5 ml Blut (SD: 1,5; Median: 2; Range: 0-3). In der Gruppe mit einer zumindest zeitweise stabilen Erkrankung ($n = 11$) zeigte sich ein CTC Mittelwert von 4,9/7,5 ml Blut (SD: 7,4; Median: 0,5; Range: 0-18). Und in der Gruppe der 10 Patienten, bei denen es nie zu einer partiellen Remission oder einem zwischenzeitlichen stabilen Erkrankungsverlauf kam, lag der CTC Mittelwert bei 0,3/7,5 ml Blut (SD: 0,8; Median: 0; Range: 0-2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 graphisch dargestellt.

Ergebnisse

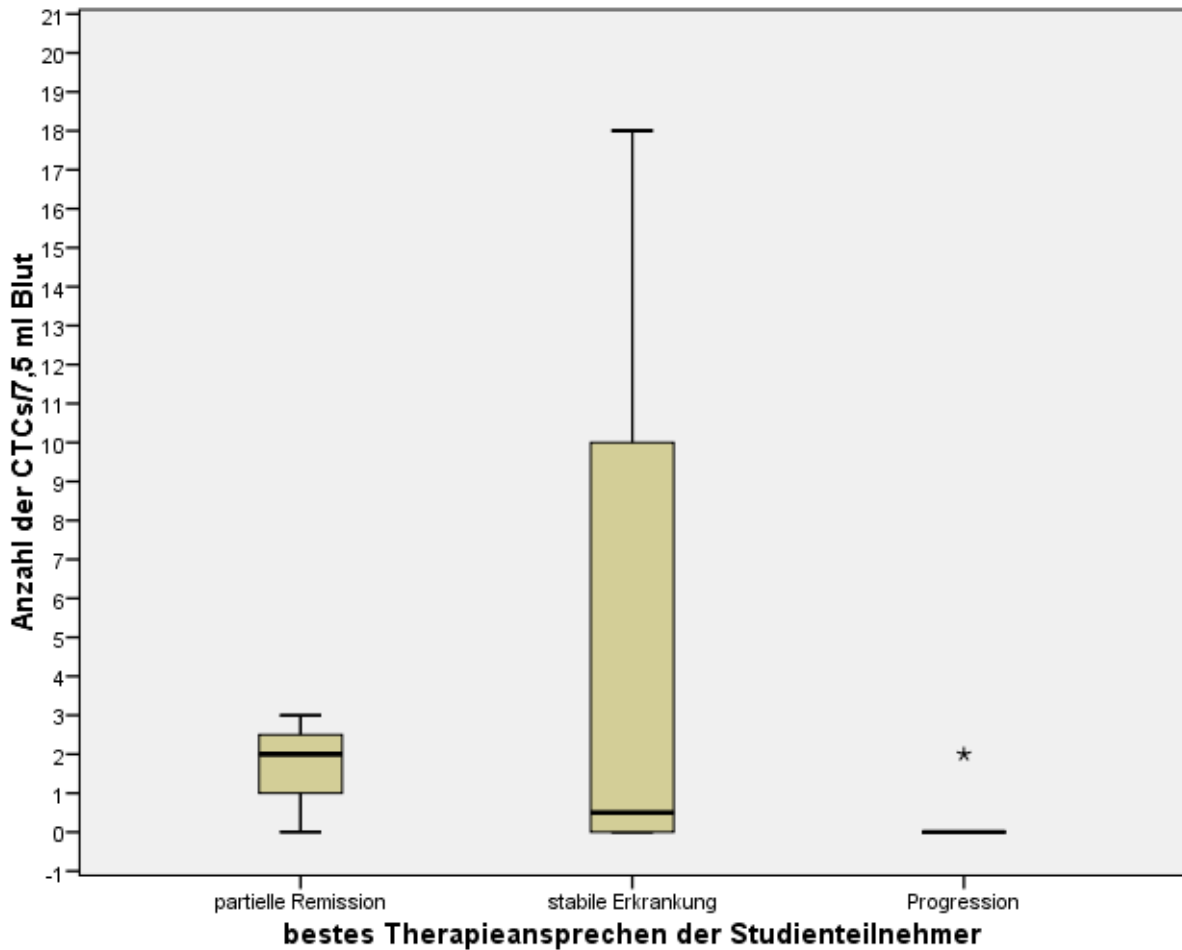


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Studienbeginn in Abhängigkeit des besten Therapieansprechens im Patientenkollektiv (★: Extremwerte)

3.5.1 CTC Zahl in Abhängigkeit des frühen objektiven Therapieansprechens

Um die Zahl der zirkulierenden Tumorzellen in Abhängigkeit des besten Ansprechens des Tumors auf die Chemotherapie zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen, haben wir uns auf die CTC Zahl bei Studieneinschluss, d. h. vor dem Therapiebeginn und nach Ende des zweiten Zyklus fokussiert. Nach Ende des zweiten Zyklus befanden sich die Patienten in einer partiellen Remission ($n = 3$), einer stabilen Erkrankung ($n = 11$) oder einer Progression ($n = 10$). Von diesen Patienten waren 17 bezüglich der CTCs auswertbar. In der Gruppe der Patienten mit partieller Remission zeigte sich ein CTC Mittelwert von 1,7/7,5 ml Blut (SD: 1,5; Median: 2; Range: 0-3) bei Studienbeginn. Nach Ende des zweiten Zyklus stieg der CTC Mittelwert auf 7,7/7,5 ml Blut (SD: 11,6; Median: 2; Range: 0-21).

Ergebnisse

In der Untergruppe der Patienten mit stabilem Krankheitsverlauf waren 8 Blutproben zu beiden Zeitpunkten verwertbar. Hier zeigte sich bei Aufnahme in die Studie ein Mittelwert der zirkulierenden Tumorzellen von 4,9/7,5 ml Blut (SD: 7,4; Median: 0,5; Range: 0-18). Nach Durchlaufen von 2 Zyklen Chemotherapie kam es zu einem Anstieg des Mittelwertes auf 6,5/7,5 ml Blut (SD: 11,1; Median: 1; Range: 0-32).

Bei den Patienten mit einer Progression (n = 6), betrug der Mittelwert der gemessenen Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen 0,3/7,5 ml Blut (SD: 0,8; Median: 0; Range: 0-2) bei Studienbeginn. Hier konnte nach Ablauf des 2. Zyklus ein Anstieg des Mittelwertes auf 1,7/7,5 ml Blut verzeichnet werden (SD: 3,1; Median: 0,5; Range: 0-8). In Abbildung 23, 24 und 25 sind die erhobenen Ergebnisse zur besseren Übersicht graphisch zusammengefasst.

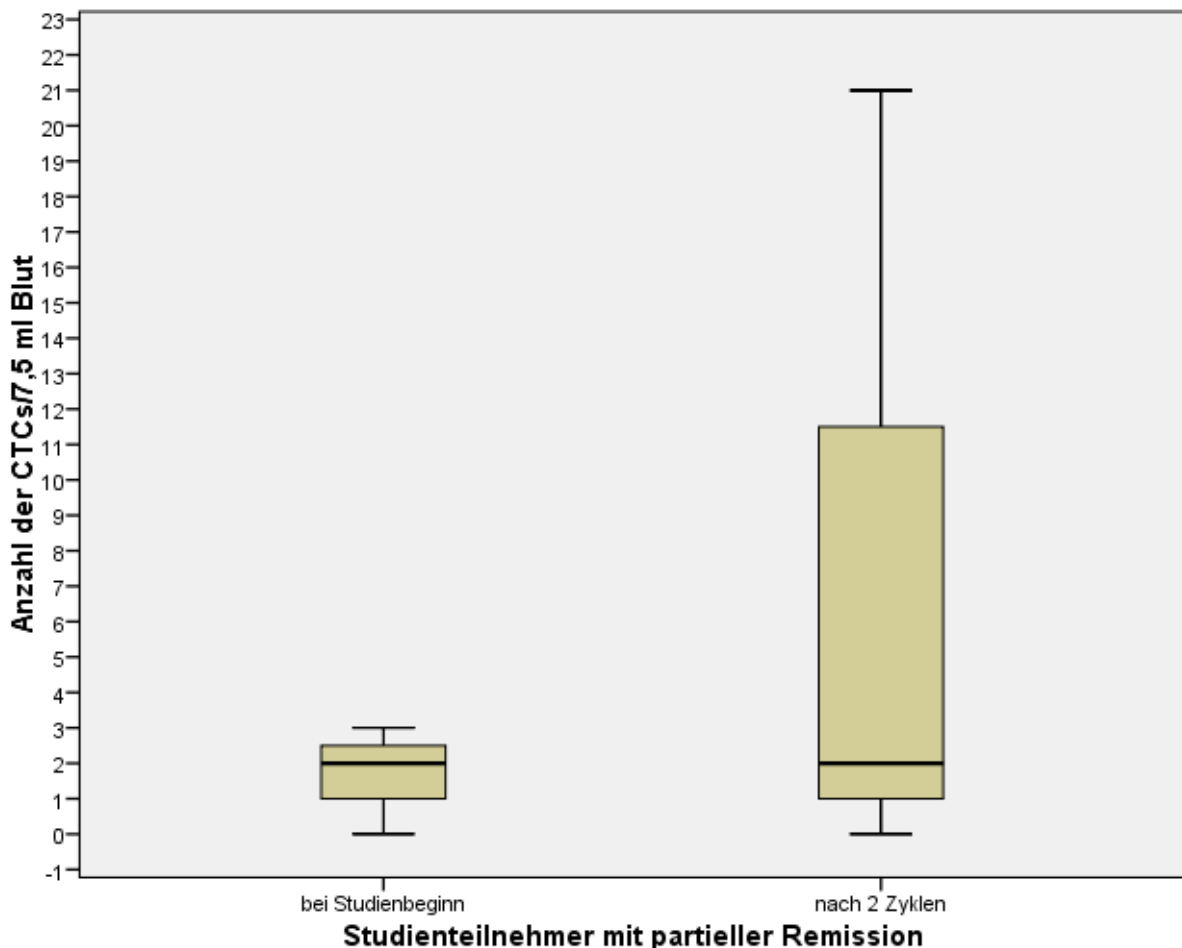


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline und nach 2 Zyklen Chemotherapie bei Studienteilnehmern mit partieller Remission

Ergebnisse

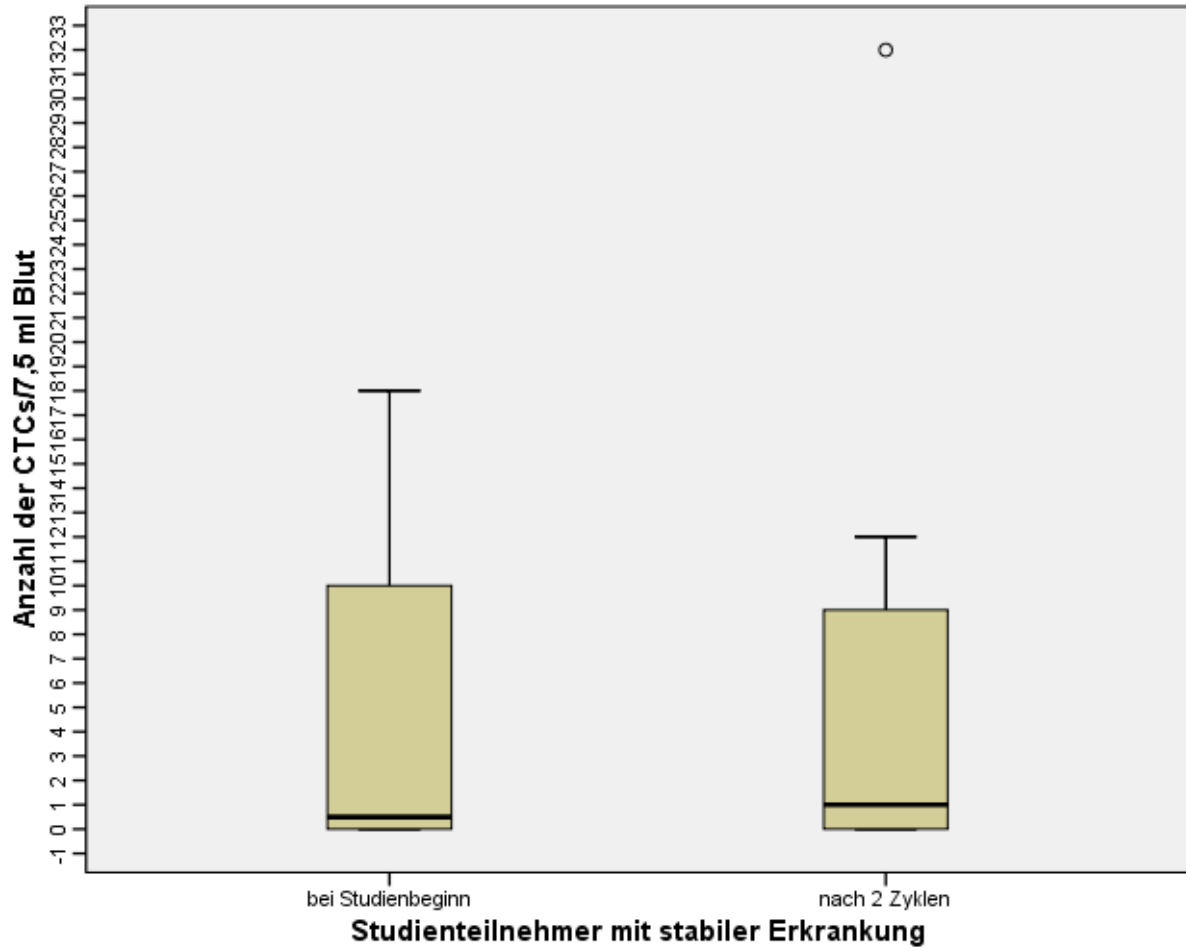


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline und nach 2 Zyklen Chemotherapie bei Studienteilnehmern mit stabiler Erkrankung (°: Ausreißer)

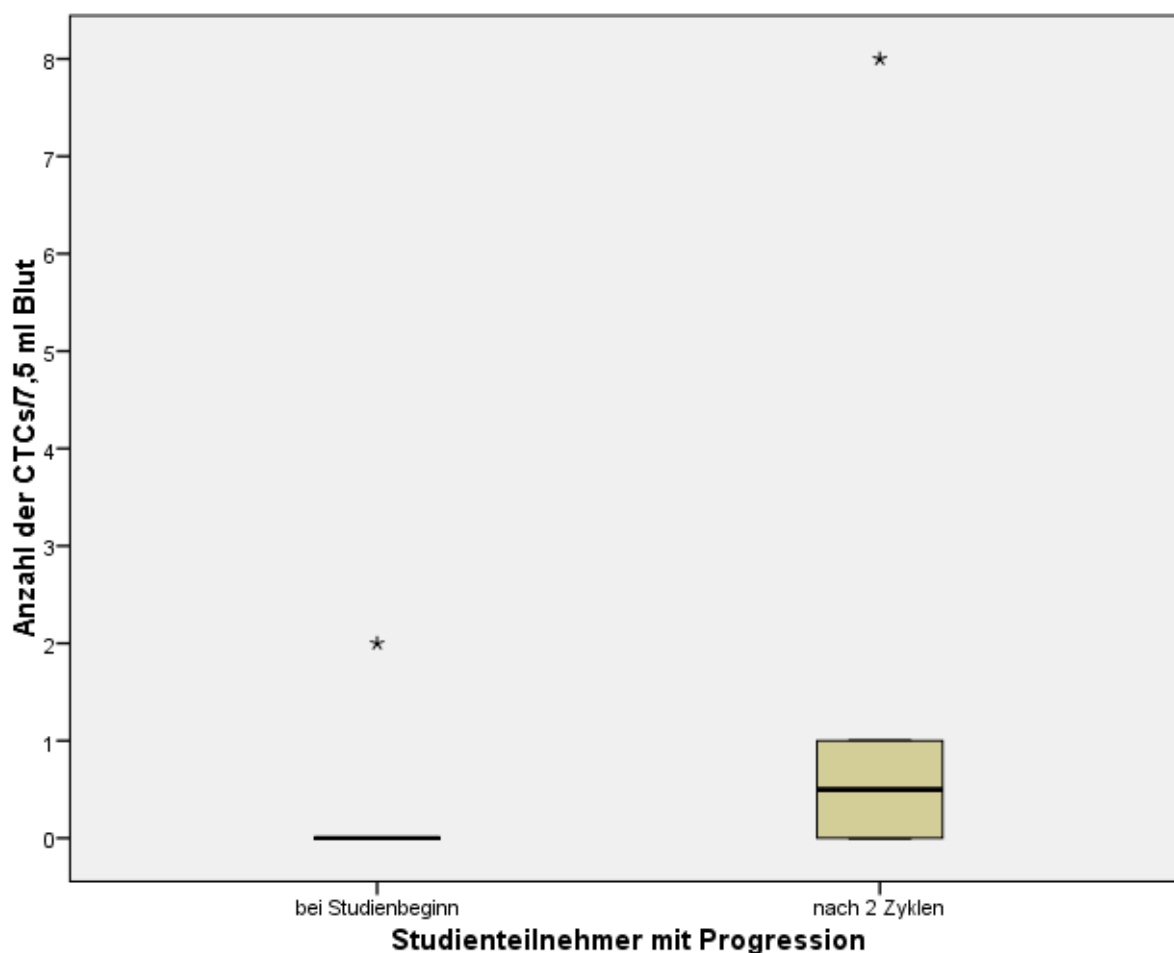


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline und nach 2 Zyklen Chemotherapie bei Studienteilnehmern mit Progression (★: Extremwerte)

3.5.2 Assoziation der CTC Zahl mit dem Therapieansprechen im Studienverlauf

Von 27 Studienteilnehmern erlitten 18 Patienten (67 %) im Verlauf der Studie laut Bildgebung (CT oder MRT) eine Progression der Erkrankung. Bei 4 Patienten (15 %) kam es bis zum Abschluss der Studie zu einer stabilen Erkrankung und 5 Patientendaten (18 %) konnten in der anschließenden Auswertung nicht berücksichtigt werden, da die Daten unvollständig waren. Zur weiteren Auswertung werden die Patienten in folgende 3 Gruppen eingeteilt: Progression nach 1-2 Zyklen Chemotherapie, Progression nach 3-4 Zyklen Chemotherapie und Progression nach 5-6 Zyklen Chemotherapie. In der ersten Gruppe (n = 8) kam es bereits nach 1-2 Zyklen der Chemotherapie zu einer Progression. Betrachtet man die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen bei diesen Patienten bei Studienbeginn, so liegt der CTC

Mittelwert bei Studienbeginn bei 4,1/7,5 ml Blut (SD: 7,1; Median: 0; Range: 0-16). Bei Feststellung der Progression, also nach 1-2 Zyklen Chemotherapie, lag der CTC Mittelwert bei 2/7,5 ml Blut (SD: 3,4; Median: 1; Range: 0-8). In der zweiten Gruppe (n = 5) kam es nach 3-4 Zyklen Chemotherapie zu einer Progression. Bei Studienbeginn lag der Mittelwert der CTCs bei 1/7,5 ml Blut (SD: 2,5; Median: 0; Range: 0-5). Nach 2 Zyklen Chemotherapie lag der Mittelwert der zirkulierenden Tumorzellen bei 2,8/7,5 ml Blut (SD: 5,2; Median: 0; Range: 0-12). Und bei Progression, also nach 3-4 Zyklen Chemotherapie lag der CTC Mittelwert bei 3,7/7,5 ml Blut (SD: 5,5; Median: 1; Range: 0-10). In der dritten Gruppe (n = 5) kam es nach 5-6 Zyklen der Chemotherapie zu einer Progression. Hier lag der Mittelwert der zirkulierenden Tumorzellen bei Studienbeginn bei 0,4 (SD: 1,9; Median: 0; Range: 0-4). Nach 2 Zyklen Chemotherapie lag der CTC Mittelwert bei 0/7,5 ml Blut (SD: 0; Median: 0; Range: 0). Nach 4 Zyklen Chemotherapie lag der Mittelwert der CTCs bei 1,6/7,5 ml Blut (SD: 3,6; Median: 0; Range: 0-8). Bei Progression, also nach 5-6 Zyklen Chemotherapie, lag der Mittelwert der zirkulierenden Tumorzellen bei 0,3/7,5 ml Blut (SD: 0,6; Median: 0; Range: 0-1). In Abbildung 26 sind die CTC Mittelwerte der Gruppen 1-3 zum Zeitpunkt der Feststellung der Progression graphisch dargestellt.

Ergebnisse

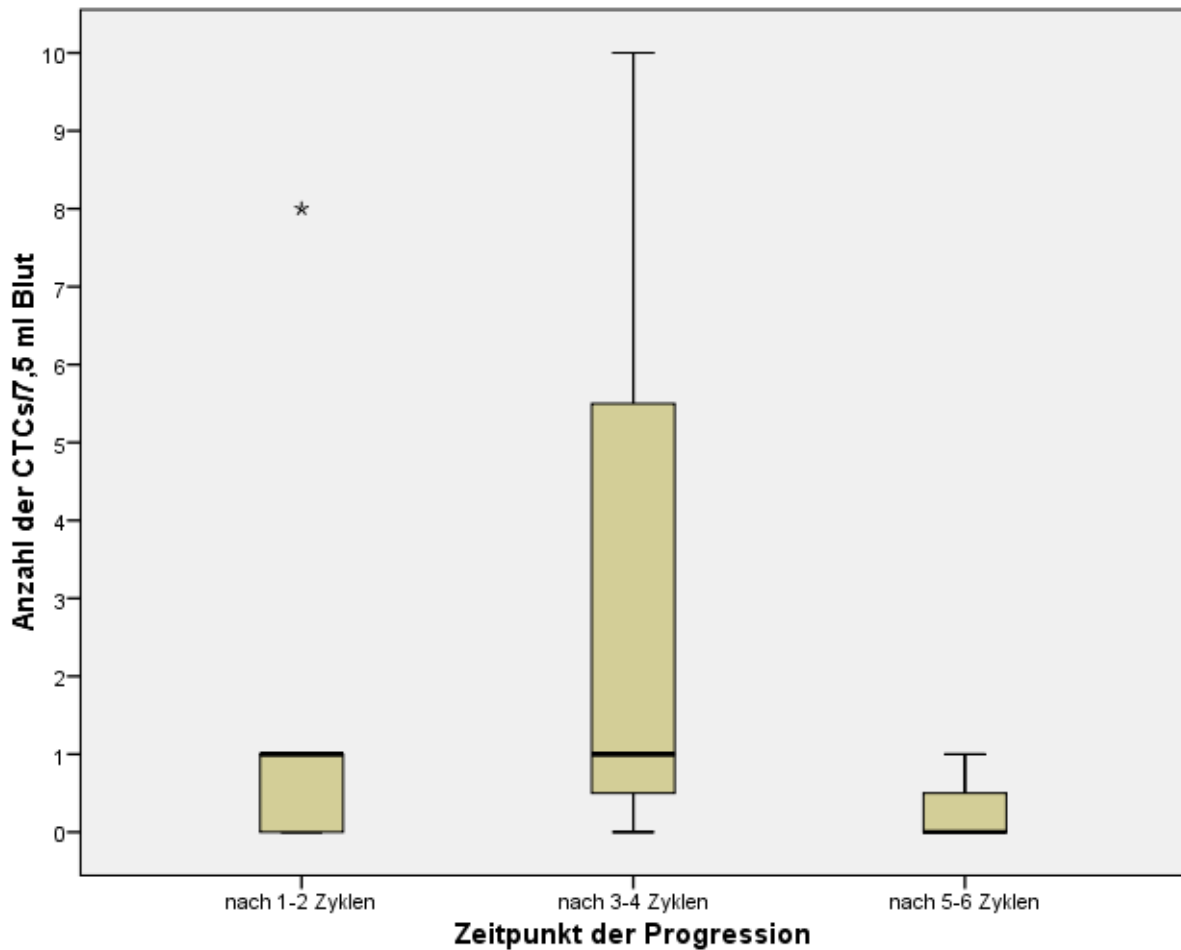


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut der Gruppen 1-3 zum Zeitpunkt der Progression (★: Extremwerte)

3.6 Assoziation der CTC Zahl mit dem PFS und dem OS

Bis zum Ende der Studie bzw. innerhalb von 12 Monaten nach Therapieende sind 22 der 24 auswertbaren Patienten an den Folgen der Tumorerkrankung verstorben. Das im Rahmen der Studie erhobene mediane PFS (progression free survival) lag bei 2,9 Monaten (95% KI 1,9-4,2 Monate) und das mediane OS (overall survival) bei 5,6 Monaten (95% KI 4,8-10,2 Monate) (Niegisch et al., 2015). Die Daten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode erhoben und sind in Abbildung 27 graphisch dargestellt. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Patienten mit einem Primärtumor im Unteren Harntrakt ein kürzeres PFS aufwiesen als Patienten mit Primärtumor im Oberen Harntrakt. Bezüglich des overall survivals wurde hier kein Unterschied festgestellt (Niegisch et al., 2015).

Ergebnisse

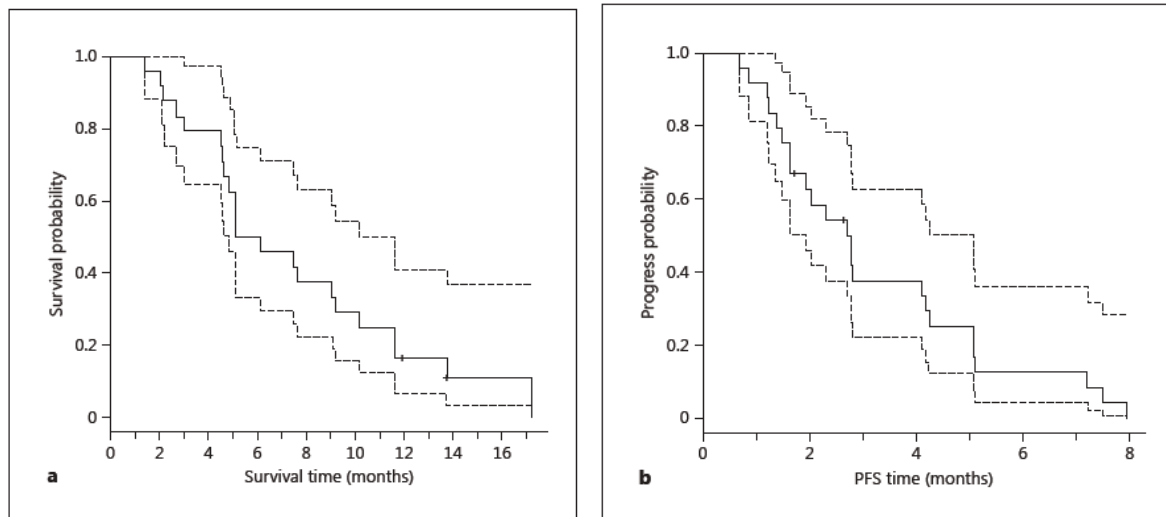


Abbildung 27: Graphische Darstellung des OS und des PFS im Gesamtkollektiv (n = 24). Die Kaplan-Meier Methode wurde genutzt, um das OS und PFS darzustellen. Die Kaplan-Meier Schätzungen sind als durchgezogene Linie dargestellt, das 95 % Konfidenzintervall als gestrichelte Linie. a: das mediane OS lag bei 5,6 Monaten (95% KI 4,8-10,2); b: das mediane PFS lag bei 2,9 Monaten (95% KI 1,9-4,2). (Graphiken übernommen aus Niegisch et al., 2015)

3.6.1 Assoziation der CTC Zahl mit dem progressionsfreien Überleben

Ein weiteres Studienziel war es herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der CTC Zahl und dem Zeitraum bis zum Progress der Erkrankung hergestellt werden kann. Dazu wurden die Studienteilnehmer je nach Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut in 2 Gruppen unterteilt. In der einen Gruppe lag die Anzahl der CTCs bei $<5/7,5$ ml Blut und in der anderen Gruppe bei $\geq 5/7,5$ ml Blut. Um für die Auswertung möglichst viele Patientendaten zur Verfügung zu haben, betrachteten wir die Höhe der CTCs bei Studienbeginn und nach 2 Zyklen Chemotherapie. Da bei allen Studienteilnehmern im Verlauf ein Progress der Erkrankung verzeichnet wurde gab es keine Kontrollgruppe zum Vergleich. Betrachtet man zuerst die Gruppe der Patienten mit einer Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen von $<5/7,5$ ml Blut, so errechnet sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 2,7 Monaten (95%-KI: 1,9-3,5) bei Studienbeginn (n = 17). Nach 2 Zyklen Chemotherapie zeigte sich ein identisches medianes progressionsfreies Überleben von 2,7 Monaten (95%-KI: 1,8-3,6; n = 13). In der Gruppe der Patienten mit einer Anzahl an CTCs von $\geq 5/7,5$ ml Blut zeigte sich ein medianes progressionsfreies Überleben von 1,7 Monaten (95 %-KI: 0,4-3,0) bei Studienbeginn (n = 4). Und nach 2 Zyklen Chemotherapie wurde ein Anstieg des progressionsfreien

Ergebnisse

Überlebens auf 2,7 Monate (95%-KI: 0,4-5,1) verzeichnet (n=4). Der Zeitraum bis zum Progress der Erkrankung ist in Abbildung 28 mit Hilfe einer Kaplan-Meier-Kurve graphisch dargestellt.

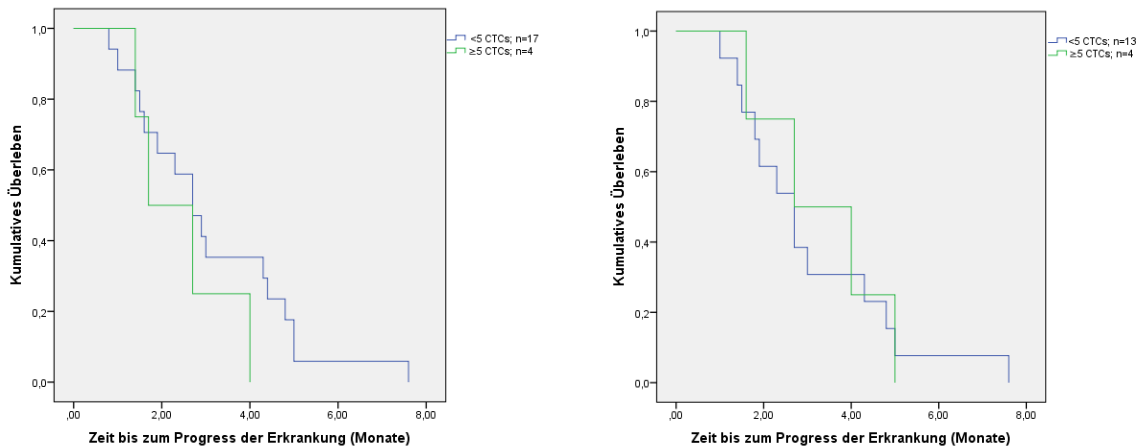


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen (CTCs $< 5/7,5$ ml Blut und CTCs $\geq 5/7,5$ ml Blut) bei Studienbeginn (links) und nach 2 Zyklen Chemotherapie (rechts)

Bei der Berechnung des Spearman Korrelation zeigt sich mit $-0,153$ ein schwach negativer linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen und dem Progression Free Survival. Dies bedeutet, dass je mehr zirkulierende Tumorzellen im Blut eines Patienten nachweisbar sind, desto kürzer ist das progressionsfreie Überleben. Das Ergebnis ist mit $0,497$ nicht statistisch signifikant. Die Daten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Spearman Korrelation zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem progressionsfreien Überleben

Korrelationen			
		progression_free _survival	CTCs
Spearman-Rho	Korrelationskoeffizient	1,000	-,153
	progression_free_survival		Sig. (2-seitig)
		.	,497
	N	22	22
	Korrelationskoeffizient	-,153	1,000
	CTCs		Sig. (2-seitig)
		,497	.
	N	22	22

3.6.2 Assoziation der CTC Zahl mit dem Gesamtüberleben

Um Herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut gibt wurden die Studienteilnehmer erneut in 2 Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe wurden alle Patienten mit zirkulierenden Tumorzellen von $<5/7,5$ ml Blut und in der zweiten Gruppe mit $\geq 5/7,5$ ml Blut zusammengefasst. Die Auswertung wurde bei Studienbeginn und nach 2 Zyklen Chemotherapie durchgeführt. Betrachtet man zuerst die Patienten mit einer Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen von $<5/7,5$ ml Blut, so ergab sich ein medianes Gesamtüberleben von 6,3 Monaten (95%-KI: 3,7-9,0) bei Studienbeginn (n = 18). Nach 2 Zyklen Chemotherapie sank das mediane Gesamtüberleben auf 4,3 Monate (95%-KI: 1,2-7,4; n = 6). In der Gruppe der Studienteilnehmer mit einer Anzahl an CTCs von $\geq 5/7,5$ ml Blut errechnete sich ein medianes Gesamtüberleben von 8 Monaten (95%-KI: 3,3-12,7) bei Studienbeginn (n = 13). Nach 2 Zyklen Chemotherapie sank das mediane Gesamtüberleben auf 4,8 Monate (95%-KI: 0,9-8,7) (n=5). Die Daten sind in Abbildung 29 mit einer Kaplan-Meier-Kurve graphisch dargestellt.

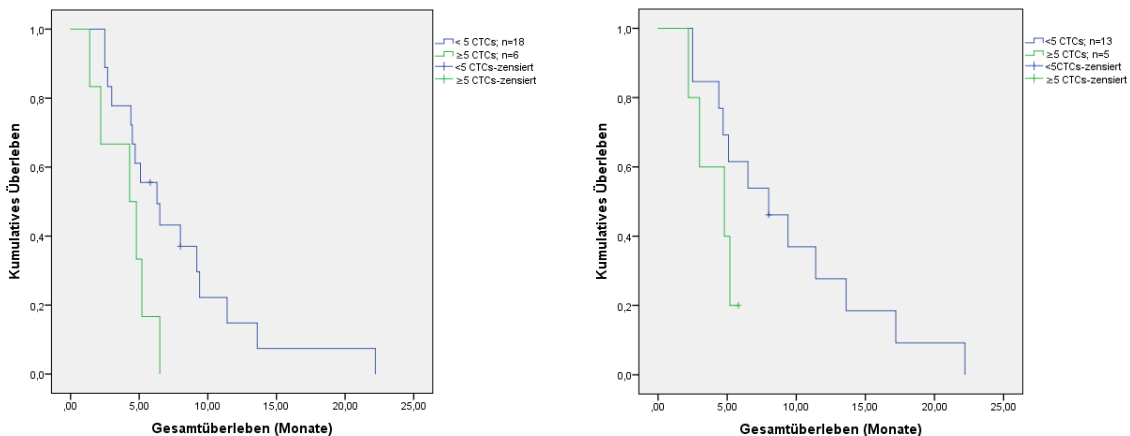


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen (CTCs $<5/7,5$ ml Blut und CTCs $\geq 5/7,5$ ml Blut) bei Studienbeginn (links) und nach 2 Zyklen Chemotherapie (rechts)

Mit $-0,349$ zeigt sich bei der Berechnung des Spearman Korrelationskoeffizienten ein schwach negativ linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der im Blut vorhandenen zirkulierenden Tumorzellen und dem Overall Survival. Dies zeigt, dass sich die Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut entgegengesetzt zur Dauer des

Ergebnisse

Überlebens verhält. Das Ergebnis ist mit 0.095 leider nicht statistisch signifikant. Die Daten sind in der Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Spearman Korrelation zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem Gesamtüberleben

Korrelationen			overall survival	CTCs
Spearman-Rho	overall_survival	Korrelationskoeffizient	1,000	-,349
		Sig. (2-seitig)	.	,095
		N	24	24
	CTCs	Korrelationskoeffizient	-,349	1,000
		Sig. (2-seitig)	,095	.
		N	24	24

4. Diskussion

4.1 Detektion zirkulierender Tumorzellen beim metastasierten Urothelkarzinom

In die CRAD001 Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die bereits an einem lokal progredienten oder metastasierten Urothelkarzinom des Urogenitaltraktes erkrankt waren. D. h. alle Studienteilnehmer waren bereits in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium und hatten im Vorfeld bereits mindestens einen Therapieansatz mit einer platin-basierten Chemotherapie.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob in diesem Kollektiv zirkulierende Tumorzellen im peripheren venösen Vollblut nachweisbar sind. Im Zuge dessen wurde die Assoziation der CTCs mit dem Metastasierungsmuster, ebenso wie deren prognostische Nutzbarkeit, untersucht.

In der Literatur wird ein CTC Wert von ≥ 5 pro 7,5 ml Blut als prognostisch ungünstig angesehen (Naoe et al., 2007). Bei der Auswertung unserer Patientendaten konnten wir nur in der Gruppe der Patienten welche insgesamt 6 Zyklen Chemotherapie erhalten hatten, nach Abschluss von 2 Zyklen, einen CTC Mittelwert von $\geq 5/7,5$ ml Blut nachweisen. An allen anderen Auswertungszeitpunkten lag der Mittelwert zum Teil sogar deutlich unter den in der Literatur als ungünstig angegebenen Werten. Somit konnten wir in unserer Studie trotz Nutzung des gleichen Systems zur Detektion der CTCs mit dem Cell-Search®-System die hohen Detektionszahlen anderer Studien nicht bestätigen (Allard et al., 2004; Naoe et al., 2007; Rink et al., 2010). Einer der möglichen Gründe für diese Ergebnisse ist sicherlich das kleine Kollektiv und dass sich die Anzahl der verwertbaren Blutproben im Verlauf der Studie deutlich dezimiert hat. Über 50 % der Patienten haben die Studie aus gesundheitlichen Gründen vorzeitig beendet. Dies bedeutet, dass wir genau von den Patienten, deren Tumorwachstum und Metastasierung vorangeschritten ist und zu einer erheblichen gesundheitlichen Einschränkung geführt hat, keine abschließenden Blutproben zur Analyse erhalten haben. Durch den weiten Einzugsradius der Patienten waren der logistische Aufwand und die Anfahrt zur jeweiligen Klinik zu weit, um in diesem gesundheitlichen Zustand noch bewältigt werden zu können.

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit anderen Studien zur Detektion von CTCs bei Vorliegen eines Urothelkarzinoms zeigen sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Guzzo et al. und Rink et al. fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTCs im Blut und klinisch- pathologischen Korrelaten (Guzzo et al., 2012; Rink et al., 2012). Wohingegen zahlreiche andere Studien, wie zum Beispiel die von Naoe et al. und Okegawa et al., zumindest beim Vorliegen von Fernmetastasen CTCs nachweisen konnten (Naoe et al., 2007; Okegawa et al., 2010). Naoe et al. zeigte, dass bei 57,1 % der Patienten im metastasierten Stadium CTCs nachweisbar waren. Doch auch in diesem Patientenkollektiv ($n = 14$) lag die Breite der detektierten CTCs zwischen 0 und 79/7,5 ml Blut und war somit breit gefächert (Mittelwert: 9,2; Median: 2). Bei 4 von 14 Patienten waren trotz Metastasierung keine zirkulierenden Tumorzellen im Blut nachweisbar. Des Weiteren lag der CTC Wert bei 9 Studienteilnehmern trotz Fernmetastasierung unter dem in der Literatur erwähnten prognostisch ungünstigen Wert von $\geq 5/7,5$ ml Blut (Naoe et al., 2007).

In unserer Studie waren bereits bei allen Patienten Metastasen nachweisbar, bei 81 % ($n = 22$) sogar an mehreren Lokalisationen. Die Detektionsrate von CTCs war bei Patienten mit ossärer und lymphogener Metastasierung mit 67 % am Höchsten. Der errechnete Mittelwert von 6,3 CTCs/7,5 ml Blut lag im prognostisch ungünstigen Bereich. Auch bei Patienten mit visceralen und ossären Metastasen mit und ohne lymphogenem Befall waren prognostisch ungünstige Werte nachweisbar (Mittelwert: 5,3 CTCs/7,5 ml Blut; SD: 7,5; Detektionsrate: 50 %).

Die durch Rink et al. festgelegte Grenze an zirkulierenden Tumorzellen von $\geq 1/7,5$ ml Blut, um als CTC positiv betrachtet zu werden, muss in zukünftigen Studien sicherlich kritisch hinterfragt werden, da mehrere Arbeiten zeigen, dass auch metastasierte Patienten oft unter diesem Wert liegen (Rink et al., 2012). Vor allem Studien hinsichtlich der Relevanz von CTCs beim Mamma- und Prostatakarzinom postulieren zunehmend, dass das Vorliegen einer Tumorzelle im peripheren Blut ausreicht, um von einer ungünstigen Prognose auszugehen (Bidard et al., 2010).

In die Beurteilung der Ergebnisse fließt weiterhin mit ein, dass bis jetzt nur eine Studie zu dieser Thematik existiert, die mehr als 100 Patienten eingeschlossen hat (Okegawa et al., 2010). Bei kleinen Fallzahlen können schon einzelne Ausreißer maßgeblich das Ergebnis der kompletten Studie beeinflussen und zu Abweichungen von den in der Literatur genannten Grenzwerten führen.

4.1.1 Assoziation der CTC Zahl und dem Metastasierungsmuster

Berücksichtigt man die aktuelle Literatur kann man davon ausgehen, dass zirkulierende Tumorzellen im Blut nur bei zusätzlich zum Primärtumor vorhandenen Metastasen nachweisbar sind (Naoe et al., 2007). Deshalb war es für uns von besonderem Interesse, ob gewisse Lokalisationen von Metastasen mit erhöhten CTC Werten einhergehen. Der Tatsache geschuldet, dass fast beim kompletten Patientenkollektiv zeitgleich Metastasen an mehreren Organsystemen vorlagen (n = 22; 81 %), war es uns unmöglich zu eruieren, welche Lokalisation im Einzelnen mit der höchsten Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen einhergeht. Wir haben deshalb das Patientenkollektiv in unterschiedlichen Gruppen zusammengefasst. Beim Vorliegen von visceralen Metastasen mit und ohne Lymphknotenbefall lag der CTC Mittelwert bei 2,7/7,5 ml Blut (SD: 4,8) und damit unterhalb der etablierten Grenze von $\geq 5/7,5$ ml Blut als Hinweis für einen prognostisch ungünstigen Verlauf. Bei Patienten mit visceralen und ossären Metastasen mit und ohne lymphogener Beteiligung lag der Mittelwert der CTCs bei 5,3/7,5 ml Blut (SD: 7,5). Und in der Gruppe der Studienteilnehmer mit ossären und lymphogenen Metastasen lag der Mittelwert der zirkulierenden Tumorzellen sogar bei 6,3/7,5 ml Blut (SD: 8,5). Damit lagen die Mittelwerte der zirkulierenden Tumorzellen in beiden Gruppen mit Knochenmetastasen über den als prognostisch ungünstig definierten Werten. Somit scheint ebenso wie bei anderen Tumorentitäten, wie z. B. dem Mamma- und Prostatakarzinom, die ossäre Metastasierung mit einer gesteigerten CTC Zahl bzw. Detektionsrate assoziiert zu sein (Thalgott et al., 2013; Danila et al., 2011; De Bono et al., 2008; Hayes et al., 2006).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur zum Urothelkarzinom, stellt man fest, dass sich bis jetzt kaum Studien mit der expliziten Korrelation von Metastasierungsorten und der Anzahl der detektierten CTCs beim Urothelkarzinom beschäftigt haben. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich bei den meisten Patienten multiple Metastasen in der angefertigten Bildgebung zeigen und somit keine eindeutige Zuordnung der CTCs zu einer Lokalisation von Metastasen möglich ist. Bis heute ist es nicht sicher gelungen die zirkulierenden Tumorzellen ihrem Ursprungsort zuzuordnen oder zu belegen, ob alle zirkulierenden Tumorzellen durch das Cell-Search®-System detektiert werden können (Balzar et al., 1999). Betrachtet man die Detektionsrate von zirkulierenden Tumorzellen bei Patienten mit

in der Bildgebung nachweisbaren Metastasen, so liegt diese in unserer Studie zwischen 0 und 100 % und ist somit deutlichen Schwankungen unterworfen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Ergebnissen von Flaig et al. und Rink et al. wieder (Flaig et al., 2011; Rink et al., 2012).

Wirft man einen Blick auf Publikationen über CTC Detektionen mittels CSS bei anderen Tumoren, so lässt sich feststellen, dass auch hier keine eindeutige Tendenz erkennbar ist. Beim Prostatakarzinom stellten unter anderem Olmos et al. fest, dass sich vor allem bei ossärer Metastasierung gehäuft zirkulierende Tumorzellen im Blut nachweisen lassen (Olmos et al., 2009). Und auch andere Arbeitsgruppen untermauern diese Feststellung (Danila et al., 2007; Goodman et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Helo et al. belegte diese Erkenntnis beim Prostatakarzinom sogar durch Detektion von zirkulierenden Tumorzellen mit Hilfe der PCR Methode (Helo et al., 2009).

Warum zirkulierende Tumorzellen hauptsächlich bei ossären Metastasen nachweisbar sind, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Da CTCs durch das CCS nur erkannt werden können, wenn sie Ep-CAM positiv sind, ist eine Überlegung hierzu, dass hauptsächlich ossäre Metastasen die Charakteristika aufweisen Ep-CAM positive zirkulierende Tumorzellen zu produzieren.

Olmos et al. postulierten beim Prostatakarzinom, dass bei Patienten mit alleiniger lymphogener Metastasierung keine CTCs nachweisbar seien, da die Metastasierung hier nicht über das Blut, sondern einzig über die Lymphabflusswege erfolgt (Olmos et al., 2009). Dies deckt sich mit den Ergebnissen in unserem Patientenkollektiv. Und auch Naoe et al. und Rink et al. wiesen ähnliche Zahlen nach (Naoe et al., 2007; Rink et al., 2012).

Warum jedoch auch bei alleiniger visceraler Metastasierung kaum CTCs nachweisbar sind ist noch offen. Hierzu stellten Goodman et al. bei Untersuchungen zum Prostatakarzinom die These auf, dass Weichgewebismetastasen eventuell in der Lage sind zirkulierende Tumorzellen zu filtern und diese dann nicht an das hämatogene System abgeben (Goodman et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorhandensein von zirkulierenden Tumorzellen im Blut keine Rückschlüsse auf die genaue Lokalisation der Metastasen zulässt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass beim Auftreten von ossären Metastasen auch CTCs nachweisbar sein werden. Des Weiteren kann man bei Abwesenheit von

CTCs im Blut nicht davon ausgehen, dass sich der Patient noch in einem lokal begrenzten Stadium der Tumorerkrankung befindet.

4.1.2 Assoziation der CTC Zahl und dem besten Therapieansprechen

Sowohl zu Beginn der Studie, als auch an Tag eins von Zyklus 3 und 5 und bei Therapieende erfolgte eine Computertomographie des Thorax und des Abdomens zur Detektion von Metastasen. Alternativ wurde eine MRT angefertigt. Zusätzlich erhielten alle Patienten während des Screenings eine Knochenszintigraphie. Diese wurde bei Verdacht auf Knochenmetastasen im weiteren Studienverlauf wiederholt. Anhand der Bildgebung ermittelten wir in Zusammenarbeit mit der Radiologischen Abteilung das beste Therapieansprechen mit Hilfe der RECIST Kriterien. Diese Daten wurden dann mit den Ergebnissen der zum selben Zeitpunkt gewonnenen CTCs verglichen.

In unserem Patientenkollektiv zeigten sich bei partieller Remission höhere CTC Mittelwerte, als bei Vorhandensein einer Stable Disease oder sogar einer Progressive Disease. Und auch bei Patienten mit stabilem Krankheitsverlauf konnte man höhere CTC Mittelwerte nachweisen, als bei Studienteilnehmern mit fortschreitender Erkrankung. Somit zeigt sich auch in unserem Kollektiv eine inkonstante Detektion von CTCs, die keine Aussage über den weiteren Therapieverlauf erlaubt.

In der Literatur gibt es keine vergleichbaren veröffentlichten Daten beim Urothelkarzinom. Eine Ursache für die erhöhten CTC Werte beim Vorliegen einer Stable Disease oder Partial Remission könnte sein, dass auch diese Patienten bereits inapparente Metastasen aufwiesen, die in der Bildgebung noch nicht erkannt wurden. Des Weiteren könnte auch hier die Lokalisation der Metastasen das Ergebnis maßgeblich beeinflusst haben. Denn ein direkter Vergleich zwischen dem Metastasierungsmuster und dem Therapieansprechen fand nicht statt. Hier wären also durchaus Spekulationen möglich, dass vielleicht gerade bei Patienten mit Progression Metastasen an Organsystemen vorhanden waren, welche Ep-CAM negative zirkulierende Tumorzellen ans Blut abgeben haben oder wir aus einem der anderen, bereits oben genannten Gründe, keine CTCs nachweisen konnten. Nicht zuletzt bleibt auch das kleine Studienkollektiv ein limitierender Faktor.

4.1.3 Rückschlüsse auf die prognostische Bedeutung von CTCs

Eines der wichtigsten Ziele dieser Studie war es herauszufinden, ob zirkulierende Tumorzellen eine Vorhersage über die Prognose des Patienten zulassen würden. Wir verglichen dazu die Höhe der gemessenen CTCs mit dem progressionsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben. Bezüglich des progressionsfreien Überlebens lässt sich keine einheitliche Aussage treffen. Patienten mit dem kürzesten Intervall bis zum Progress wiesen deutlich niedrigere CTC Mittelwerte auf, als Patienten mit einer Progression der Erkrankung nach 3-4 Zyklen Chemotherapie. Dahingegen waren die Mittelwerte der zirkulierenden Tumorzellen bei Vergleich mit dem Gesamtüberleben schon aussagekräftiger. Sobald die Studienteilnehmer mehr als 6 Monate überlebten, waren die Mittelwerte der detektierten zirkulierenden Tumorzellen im Blut deutlich niedriger, als bei einem Überlebenszeitraum von unter einem halben Jahr.

Betrachtet man dahingehend die Literatur, so stellt man fest, dass unter Anderem laut der Ergebnisse von Rink et al. das Vorhandensein von Tumorzellen im Blut mit einem erhöhten Risiko zu sterben einhergeht (Guzzo et al., 2012; Okegawa et al., 2010; Rink et al., 2012). Naoe et al. untersuchte diese Idee nicht näher, legte sich aber fest, dass der Nachweis von CTCs im Blut mit einer schlechten Prognose einhergeht (Naoe et al., 2007). Die FDA hat sich bei der Zulassung des CSS als ungünstigen Prognoseparameter auf einen Schwellenwert von ≥ 5 CTCs pro 7,5ml Blut festgelegt (Naoe et al., 2007). Dieser Wert konnte durch unsere Studie weder bestätigt noch widerlegt werden. Dafür waren die Ergebnisse der erhobenen Daten zu breit gefächert. Auch eine Zuordnung zu bestimmten Zeiträumen des progressionsfreien Überlebens und dem Gesamtüberleben waren nicht möglich. Es lässt sich folgern, dass beim Urothelkarzinom die Detektion von CTCs weniger konstant ist als bei anderen Tumorentitäten wie z. B. dem Prostata- oder Mammakarzinom (Thalgott et al., 2013; Danila et al., 2011; DeBono et al., 2008; Hayes et al., 2006). Bei diesen Entitäten konnten bereits kleine Studien die prognostische Wertigkeit der CTCs sowohl für das progressionsfreie, als auch für das Gesamtüberleben zeigen (Thalgott et al., 2013; Hayes et al., 2006).

Betrachtet man die veröffentlichte Literatur beim Urothelkarzinom zur prognostischen und prädiktiven Wertigkeit der CTCs muss man leider feststellen, dass kaum

nennenswerte Ergebnisse beim Urothelkarzinom publiziert wurden. Rink et al. stellten lediglich fest, dass der Nachweis von CTCs auf die frühe systemische Ausbreitung des Urothelkarzinoms hinweisen könnte (Rink et al., 2010).

Die meisten Veröffentlichungen beschäftigen sich auch weiterhin mit dem Prostata-, Mamma oder Kolonkarzinom. Eine mögliche Erklärung könnte die inkonstante Detektion von CTCs beim Urothelkarzinom mit dem daraus resultierenden Bedarf an großen Kollektiven sein und dass das Urothelkarzinom im Verhältnis eine seltenere Tumorentität darstellt.

4.1.4 Assoziation der CTC Zahl mit Routinelaborparametern

Zum Zeitpunkt der Probeentnahme für die Detektion der zirkulierenden Tumorzellen wurde bei allen Patienten auch eine Kontrolle der Routinelaborparameter durchgeführt. Zur Auswertung haben wir sowohl den Hämoglobin-Wert, als auch die Laktatdehydrogenase und die Alkalische Phosphatase herangezogen.

Häufig wird eine Anämie als Ausdruck einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung gewertet (Steinmetz et al., 2007). In unserem Patientenkollektiv war trotz deutlich fortgeschrittenem Tumorstadium nur ein Teil der Patienten anämisch. Bei den Studienteilnehmern mit Nachweis einer Anämie lagen die detektierten Tumorzellen mit einem Mittelwert von 5,3 (SD: 6,9) über dem in der Literatur als prognostisch ungünstig angegebenen Wert von $\geq 5/7,5$ ml Blut. Bei den Patienten ohne nachweisbare Erniedrigung des Hämoglobin-Wertes lag die Zahl der CTCs mit einem Mittelwert von 1,2 (SD: 2,3) tendenziell deutlich niedriger.

Die Alkalische Phosphatase ist ein guter Parameter zur Bestimmung der osteoblastischen Aktivität und kann damit indirekt mit der ossären Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Paul et al., 2008). Sowohl bei normwertigen, als auch bei erhöhten Werten der AP lag bei den Studienteilnehmern mit Knochenmetastasen der Mittelwert der CTCs bei $\geq 5/7,5$ ml Blut.

Für einen Zellzerfall spricht eine Erhöhung der sonst nur intrazellulär vorkommenden Laktatdehydrogenase. Diese tritt zum Beispiel beim Vorliegen einer malignen Erkrankung auf (Bruhn et al., 2011). Bei den von uns untersuchten Patienten lag bei einer Erhöhung der LDH auch der Mittelwert der CTCs bei $\geq 5/7,5$ ml Blut. War die LDH im Normbereich waren auch die CTC Mittelwerte deutlich niedriger. Somit kann ein Zusammenhang zwischen beiden Werten vermutet werden.

In der vorhandenen Literatur gibt es beim Urothelkarzinom bis jetzt leider keine vergleichbaren Publikationen. Beim Prostatakarzinom beschreiben bereits mehrere Publikationen einen Zusammenhang zwischen Routinelaborparametern und zirkulierenden Tumorzellen. Sowohl Chen et al., Goodman et al. und auch Thalgott et al. stellten eine signifikante Korrelation zwischen der LDH, der AP, dem Hb-Wert und der Anzahl der CTCs im peripheren Blut her (Chen et al., 2005; Goodman et al., 2009; Thalgott et al., 2013). In unserer Studie konnten wir hier keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen, jedoch lagen die CTC Mittelwerte im prognostisch ungünstigen Bereich von ≥ 5 CTCs pro 7,5ml Blut, wenn die LDH und die AP erhöht und der Hb-Wert erniedrigt waren.

Die zum Vergleich ausgewählten Routinelaborparameter werden in der Medizin als unspezifische Parameter zur additiven Betrachtung bei malignen Erkrankungen herangezogen, um den Zustand des Patienten besser einschätzen zu können. Sie sind nicht spezifisch für eine bestimmte Tumorerkrankung (Bruhn et al., 2011). Deshalb ist es durchaus möglich, aufgrund der schwachen Datenlage beim Harnblasenkarzinom, auch Studien anderer maligner Erkrankungen zur Beurteilung heranzuziehen. Somit fügen sich die Ergebnisse unserer Studie in die bereits veröffentlichten Daten bei anderen malignen Erkrankungen ein.

4.1.5 Assoziation der CTC Zahl und dem ECOG-Status des Patienten

Zur objektiven Einschätzung der Leistungsfähigkeit wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme zur CTC Detektion durch den Studienarzt der ECOG Performance Status erhoben. In unserem Kollektiv zeigten Patienten mit einem ECOG-Status von 1 tendenziell höhere CTC Werte, als Patienten mit einem ECOG-Status von 0, so dass ein Zusammenhang zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut und der Leistungsfähigkeit des Patienten vermutet werden kann. Um die potentielle Verfälschung der Ergebnisse durch die Nebenwirkungen der Chemotherapie zu vermeiden, haben wir die Interpretation des ECOG-Status auf den Zeitpunkt bei Studienbeginn beschränkt.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Publikationen, die sich mit dieser Fragestellung beim Urothelkarzinom befasst haben. Versucht man einen solchen Vergleich bei anderen Karzinomen zu finden, stößt man auch da schnell an seine Grenzen. Lediglich Olmos et al. betrachteten diese Möglichkeit näher, fanden jedoch keinen signifikanten Zusammenhang heraus (Olmos et al., 2009). Obwohl die Herstellung einer Assoziation zwischen diesen zwei Variablen im Vergleich zu anderen noch offenen Fragen von untergeordneter Bedeutung ist, wäre es trotzdem interessant weitere Ergebnisse diesbezüglich zu erhalten. Da sowohl die Leistungsfähigkeit, als auch die Lebensqualität von Patienten maßgeblich durch die Schwere der Erkrankung beeinflusst werden, kann man davon ausgehen, dass bei Fortschreiten der Erkrankung und damit steigenden CTC Zahlen auch die Leistungsfähigkeit des Patienten abnimmt. In unserem Kollektiv konnten wir einen Anstieg des CTC Mittelwertes von 3,0 auf 5,6/7,5 ml Blut (SD: 6,3 vs. 5,8) nachweisen, wenn sich der ECOG-Status von 0 auf 1 verschlechterte. Der Tatsache geschuldet, dass unser Kollektiv aus einer geringen Anzahl von Patienten bestand, konnten wir dies nicht mit signifikanten Werten untermauern.

4.2 Kritische Betrachtung des CellSearch® Systems

Zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen wurde in der CRAD001 Studie das CellSearch®-System der Firma Veridex verwendet. Bereits 2004 wurde dieses System von der FDA beim fortgeschrittenen Mamma- und Kolonkarzinom zur Detektion von CTCs zugelassen. Später erfolgte die Zulassung für das Prostatakarzinom. Die Probengewinnung ist minimal invasiv, da dazu lediglich eine peripher venöse Blutentnahme nötig ist und beinhaltet somit keinen großen Mehraufwand, denn jeder Patient erhält vor Beginn der Chemotherapie routinemäßig eine Laborentnahme. Der Prozess der Probenbearbeitung läuft semi-automatisiert ab, das heißt das Gerät ist nur intermittierend auf menschliche Mitarbeit angewiesen. So können Fehler bei der Bearbeitung der Blutproben minimiert werden und der Prozess der Ergebniserhebung wird standardisiert. Diese Eigenschaften zeichnet das CSS mit hoher Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den einzelnen Laboren aus (Allard et al., 2004).

Um Tumorzellen im Blut von anderen Zellen und Zellbestandteilen sicher unterscheiden zu können, braucht man ein Oberflächenmolekül, welches nur auf

Tumorzellen exprimiert wird und auf physiologischen Blutbestandteilen nicht zu finden ist. So erreicht man eine hohe Detektionsrate und minimiert die Anzahl an falsch positiven Ergebnissen. Um vom CellSearch®-System als Tumorzelle erkannt zu werden, muss diese Ep-CAM positiv sein. Dies ist einer der Kritikpunkte, denn laut Literatur wird dieses Adhäsionsmolekül erstens nicht von allen CTCs exprimiert und ist zweitens auch nicht in allen Stadien der Erkrankung auf Tumorzellen vorhanden (Balzar et al., 1999). Vor allem entdifferenzierte CTCs verlieren im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Umwandlung das Ep-CAM Adhäsionsmolekül und sind somit nicht mehr durch das CSS zu detektieren (Pantel et al., 2013). Damit fällt sowohl die Detektionsrate, als auch die absolute Zahl der bestimmten Tumorzellen falsch niedrig aus. Auch der Verlust von zirkulierenden Tumorzellen während der Anreicherung aus der Blutprobe könnte eine Ursache für die geringe Anzahl an detektierten CTCs sein (Panteleakou et al., 2009). Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum bei Patienten mit multipler Metastasierung trotzdem keine oder nur eine relativ geringe Anzahl an Tumorzellen nachweisbar waren.

Ein weiterer Schwachpunkt des Systems könnte das geringe untersuchte Blutvolumen von lediglich 7,5 ml darstellen. Bei einem 70 kg schweren Menschen untersucht man damit nur ca. 0,15 % seines Blutvolumens (Allard et al., 2004). Ein hierdurch erlangtes Ergebnis wäre somit nur repräsentativ, wenn sich CTCs im kompletten Blutvolumen gleichmäßig verteilen und nicht durch Reservoirbildung in bestimmten Bereichen gehäuft vorkommen würden (Pantel et al., 2008).

Als alternative Methode besteht die Möglichkeit mittels RT-PCR zirkulierende Tumorzellen im Blut zu bestimmen. Bei dieser Methode werden Tumorzellen dadurch identifiziert, dass einzelne Genabschnitte ihrer DNA erkannt, repliziert und somit nachweisbar gemacht werden. Der Nachteil bei diesem Nachweisverfahren besteht darin, dass auch nicht maligne Zellen vereinzelt dieselbe Gensequenz in ihrem Erbgut tragen, diese Information jedoch nicht nutzen um daraus ein Antigen zu bilden und somit auch keine klinische Relevanz haben. Die Gefahr eines falsch positiven Ergebnisses besteht laut Peck et al. im Durchschnitt bei jeder 500. bis 1000. nicht malignen Zelle. Dafür erreicht man mittels PCR eine extrem hohe Sensitivität (Peck et al., 1998).

Trotz aller Kritikpunkte beschrieben unter anderem Sun et al. in ihrer kritischen Beurteilung des CellSearch®- Systems eine hohe Spezifität, Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate (Sun et al., 2011). Hinzu kommt, dass das CSS zurzeit die

einzigste Technik ist, die durch die Food and Drug Administration offiziell zur Detektion von CTCs zugelassen ist (Alix-Panabières et al., 2014). Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass diese Methode der Auswertung zwar aufwendig und teuer ist, jedoch vor allem auf Grund ihrer Reproduzierbarkeit im klinischen Alltag durchaus geeignet ist Tumorzellen im Blut zu detektieren (Riethdorf et al., 2007).

4.3 Patientenkollektiv

Eine ausreichend große Anzahl an Patienten in die Studie einzuschließen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, stellte sich als große Herausforderung dar. Obwohl es sich um eine multizentrische Studie handelte, an der deutschlandweit 6 Unikliniken beteiligt waren, kamen wir nur auf 27 in der Auswertung zu berücksichtigende Studienteilnehmer. Die Größe unserer Studienpopulation deckt sich jedoch durchaus mit anderen vergleichbaren Studien. Naoe et al. schloss zwar 26 Patienten ein, davon waren aber nur 53,8 % bereits in einem metastasierten Stadium der Erkrankung angekommen (Naoe et al., 2007). Gallagher et al. wies ein Patientenkollektiv mit 33 Teilnehmer und 100 % Metastasierungsrate vor (Gallagher et al., 2009). Lediglich Rink et al. konnten bis jetzt deutlich höheren Fallzahlen vorzeigen (n = 100) (Rink et al., 2012). Davon befanden sich 46 % der Studienteilnehmer in einem organüberschreitenden Erkrankungsstadium. Die Geschlechterverteilung war in anderen Vergleichsstudien annähernd identisch. Die überwiegende Anzahl der Patienten waren Männer. Naoe et al. kamen auf 71 % männliche Beteiligung und Rink et al. auf sogar 85 % (Naoe et al., 2007; Rink et al., 2012). In der CRAD001 Studie nahmen 67 % Männer und 33 % Frauen teil. Diese Ergebnisse spiegeln auch die aktuellen epidemiologischen Daten wieder, welche bestätigen, dass Männer öfter an Urothelkarzinomen erkranken als Frauen. Laut RKI liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter für Männer bei 69,1 Jahren und für Frauen bei 73,4 Jahren. Sowohl in unserer Studie, als auch in den von mir zur Diskussion herangezogenen Studien erfolgte lediglich eine Bestimmung des durchschnittlichen Alters aller Studienteilnehmer. Rink et al. gab ein durchschnittliches Alter von 66 Jahren an und Gallagher et al. von 68 Jahren (Rink et al., 2012; Gallagher et al., 2009). Also auch in diesem Punkt lassen sich die in die CRAD001 Studie eingeschlossenen Patienten mit der Literatur vergleichen. Insgesamt lässt sich jedoch schlussfolgern, dass für das Urothelkarzinom unser

Studienkollektiv viel zu klein war, um sichere Aussagen treffen zu können. In einigen Untersuchungspunkten ließen sich jedoch durchaus Tendenzen für eine Assoziation von klinischen Parametern mit CTCs verzeichnen.

4.4 Kritische Betrachtung der Studie

Bereits bei der kritischen Betrachtung des Patientenkollektivs fiel auf, dass die Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten gering ist und sich deshalb bereits minimale Abweichungen bei den Ergebnissen deutlich bemerkbar machen. Dadurch hatte auch eine vorzeitige Beendigung der Studienteilnahme große Auswirkung auf unsere Auswertung.

Auch die Tatsache, dass es sich um eine multizentrische Studie handelt, bringt nicht nur Vorteile mit sich. Zwar wird dadurch die Anzahl der Patienten erhöht und ein repräsentativeres Ergebnis erzielt. Andererseits liegt damit die Durchführung der Studie aber auch in mehreren Händen. Obwohl sich alle Zentren streng an das Protokoll hielten, gibt es trotzdem Abweichungen im Ablauf und der Sorgfältigkeit bzw. Konsequenz der Probenentnahme.

Weiterhin wird zur Beurteilung der Progression der Erkrankung bei allen Patienten dieselbe Bildgebung durchgeführt. Doch die Geräte sind nicht dieselben und auch der Radiologe, der die Bildgebung befundet hat, wechselte mehrmals im Verlauf der Studie.

Die Bestimmung der Routinelaborparameter erfolgte im Labor der jeweiligen Universitätsklinik und es wurden somit auch unterschiedliche Geräte zur Befundung verwendet und auch die Einheiten variierten oft. Dadurch verursacht man minimale Abweichungen, die vielleicht vermeidbar wären, wenn nur ein Studienzentrum mit der Befunderhebung beauftragt worden wäre.

Laut Hersteller können Blutproben in den CellSavePreservative®Tubes bis zu 96 Stunden problemlos aufbewahrt werden, ohne dass die darin befindlichen zirkulierenden Tumorzellen einen Schaden davon nehmen. Trotzdem stellt sich die Frage, ob variierende Transportzeiten nicht doch einen Einfluss auf das Ergebnis haben könnten. Auch dies ist dem multizentrischen Aufbau der Studie geschuldet. Blutproben, welche am rechts der Isar in München entnommen wurden, gelangten schneller in unser Labor, als Proben, die erst per Post von Hamburg oder einem der anderen Zentren nach München geschickt werden mussten. Obwohl die

Blutröhrchen während des Transportes in einer speziell dafür vorgesehenen Transportbox gelagert wurden, waren die Proben doch unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und könnten somit die CTC Zahl beeinflusst haben.

Bei Betrachtung aller Kritikpunkte lässt sich feststellen, dass die größte Beeinträchtigung des Ergebnisses durch die kleine Anzahl der Studienteilnehmer zustande kam und alle anderen Punkte rein spekulativ und deshalb wahrscheinlich vernachlässigbar sind.

4.5 Ausblick

In der heutigen Gesellschaft spielen Tumorerkrankungen eine große Rolle. Durch medizinische Fortschritte in den letzten Jahrzehnten und durch die gesellschaftliche Weiterentwicklung erreichen immer mehr Menschen ein Alter, in dem Tumorerkrankungen gehäuft auftreten. 2 % aller Tumorpatienten leiden laut Statistik des RKI an einem Urothelkarzinom (Robert Koch Institut, 2010). Damit bringt diese Erkrankung nicht nur eine erhebliche Belastung und Einschränkung der betroffenen Patienten mit sich, sondern stellt auch Kliniken und Krankenversicherungen sowohl vor eine medizinische Herausforderung, als auch eine finanzielle Belastung.

Obwohl die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen beim Urothelkarzinom bis zum Abschluss meiner Doktorarbeit noch keinen Stellenwert im Rahmen der Behandlung eingenommen hat, könnte sich dies in Zukunft noch ändern. Nach heutigem Erkenntnisstand werden sich CTCs wahrscheinlich nicht beim Screening oder Staging einsetzen lassen, könnten aber bei der weiteren Therapieentscheidung und zur Abschätzung der weiteren Prognose durchaus hilfreich sein. Um dieses Verfahren jedoch im klinischen Alltag zu integrieren sind noch weitere Studien nötig.

Das Verfahren, welches durch das CSS genutzt wird, arbeitet zur Isolation und Detektion der zirkulierenden Tumorzellen an der Nachweisgrenze und hat deshalb teilweise auch sehr hohe Abweichungen der positiven Detektionsrate. Das System kann nur Ep-CAM positive Zellen detektieren. Damit fallen all die Zellen durchs Raster, welche nie Ep-CAM positiv waren und all diejenigen Zellen, welche durch epithelial-mesenchymale Transition Ep-CAM verloren haben. Studien werden zeigen, in wieweit der Ansatz der Liquid-biopsy-Analyse in Zukunft das CSS sinnvoll unterstützen und erweitern kann. Dieser Ansatz untersucht nicht die Tumorzellen an sich, sondern die zellfreie DNA (cfDNA) im Blut (Dahl et al., 2015) und hat daher eine völlig unterschiedliche Herangehensweise der Detektion.

Welche Resultate die Forschung auf diesem Teilgebiet der Medizin darüber hinaus noch liefern kann und wie die gewonnenen Ergebnisse sinnvoll in den klinischen Alltag integriert werden können, bleibt also weiterhin spannend und lohnt sich verfolgt zu werden.

5. Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich ca. 15 500 Menschen an einem Karzinom der Harnblase. 95 % der Betroffenen leiden dabei an einem Urothelkarzinom. Laut Krebsregister des Robert Koch Institutes von 2012 ist das Harnblasenkarzinom nach dem Prostatakarzinom die 2. häufigste Tumorentität im Urogenitaltrakt. Aufgrund der geringen Symptomatik wird die Erkrankung oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt und stellt deshalb eine große Herausforderung für alle Beteiligten dar. Zur Einschätzung der Prognose und zur Entscheidung der weiteren Therapie stehen nur wenige objektive Parameter zur Verfügung. In den letzten Jahren beschäftigen sich immer mehr Studien damit neue objektive Beurteilungskriterien in die Therapieentscheidung des Urothelkarzinoms zu integrieren. Bei einem dieser Parameter handelt es sich um die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut des Patienten. Sowohl beim Kolon-, als auch beim Mammakarzinom haben CTCs bereits einen Stellenwert bezüglich der Vorhersage der Prognose und der Entscheidung zur weiteren Therapieplanung. Und auch beim Prostatakarzinom beschäftigen sich immer mehr Studien damit herauszufinden, wie die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen in das bestehende Prozedere sinnvoll mit einbezogen werden kann. Ob auch beim Urothelkarzinom anhand der Höhe der CTCs Vorhersagen über die Prognose des Patienten getroffen werden können und ob die Anzahl der Tumorzellen im peripheren Blut einen entscheidenden Beitrag zur Therapieplanung leisten kann, wollten wir in einem Nebenarm der CRAD001 Studie herausfinden. Das Thema der Studie ist die Detektion von zirkulierenden Tumorzellen mit dem CellSearch®-System im venösen Vollblut von Patienten mit fortgeschrittenem Urothelkarzinom während der Kombinationstherapie von Paclitaxel und RAD001 nach vorausgegangener platinhaltiger Chemotherapie. Die 27 eingeschlossenen Studienteilnehmer wurden an 6 Universitätskliniken in ganz Deutschland nach einem standardisierten Schema behandelt und betreut. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach einem einheitlichen standardisierten Konzept. Ziel meiner Doktorarbeit war es herauszufinden, ob und bei welchen Patienten zirkulierende Tumorzellen im Blut nachweisbar sind und ob diese Ergebnisse in irgendeinem Zusammenhang zu anderen Parametern, wie der Lokalisation der Metastasen, Routinelaborparametern, der Prognose oder der

Leistungsfähigkeit der Patienten stehen. Die Detektion zirkulierender Tumorzellen im Blut der Studienteilnehmer erfolgte mit Hilfe des CellSearch®-Systems der Firma Veridex. Dieses Verfahren wurde bereits seit 2004 für die CTC Detektion beim Kolon- und Mammakarzinom und später auch beim Prostatakarzinom zugelassen und findet seitdem klinische Anwendung.

Bei der Auswertung unserer Ergebnisse viel auf, dass obwohl sich alle Patienten bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung befanden und fast alle in der durchgeführten Bildgebung Metastasen an mehreren Organen aufwiesen, nicht immer CTCs nachweisbar waren. Und auch die Spannweite der Anzahl der Tumorzellen im Blut war groß. Wir konnten des Weiteren keine signifikante Korrelation, jedoch teilweise tendenzielle Zusammenhänge, zwischen der Anzahl der Tumorzellen im Blut und dem Metastasierungsmuster, routinemäßig mitbestimmten Laborparametern, der Prognose und der Leistungsfähigkeit herstellen. Lediglich die Annahme kann bestätigt werden, dass der Nachweis von CTCs an sich schon eine schlechte Prognose impliziert. Dieses Ergebnis reiht sich in die Erkenntnisse anderer Studien mit ein. Aufgrund der geringen Anzahl der eingeschlossenen Patienten ist es jedoch schwer, verlässliche Aussagen zu treffen. Und auch die bereits vorhandene Literatur ist entweder nicht aussagekräftig oder widerspricht sich.

Ziel zukünftiger Studien könnte es daher sein, größere Patientengruppen zu untersuchen und den Fokus nicht nur auf die Detektion von Tumorzellen allein zu legen, sondern diese auch in Korrelation zu anderen Parametern zu setzen. Dann gelingt es hoffentlich durch die gewonnenen Ergebnisse individuelle Therapieansätze für das Urothelkarzinom zu entwickeln und damit sowohl die Heilungschancen, als auch die Lebensqualität betroffener Menschen weiter zu verbessern.

Literaturverzeichnis

Ahirwar, D., Kesarwani, P., Manchanda, P. K., Mandhani, A., Mittal, R.D. (2008). Anti- and proinflammatory cytokine gene polymorphism and genetic predisposition: Association with smoking, tumor stage and grade, and bacillus calmette-guerin immunotherapy in bladder cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*, 184, 1-8.

Al Hussain, T. O., Akhtar, M. (2013). Molecular basis of urinary bladder cancer. *Advances in anatomic pathology*, 20, 53-60.

Alix-Panabières, C., Pantel, K. (2014). Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*, 14(1), 57-62.

Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., Tibbe, A. G., Uhr, J. W., Terstappen, L. W. (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*, 10(20), 6897-904.

Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., Litvinov, S. V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)*, 77(10), 669-712.

Bidard, F.C., Mathiot, C., Delaloge, S., Brain, E., Giachetti, S., de Cremoux, P., Marty, M., Pierga, J. Y. (2010). Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol*, 21(4), 729-733.

Bi, W., Rao, J. Y., Hemstreet, G. P., Fang, P., Asal, N. R., Zang, M., Min, K. W., Ma, Z., Lee, E., Li, G. (1993). Field molecular epidemiology. Feasibility of monitoring for the malignant bladder cell phenotype in a benzidine-exposed occupational cohort. *Journal of occupational medicine. official publication of the Industrial Medical Association*, 35, 20-27.

Bruhn, H. D., Junker, R., Schäfer, H., Schreiber, S. (2011) *Labormedizin, Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik*. pp. 91-92. Stuttgart: Schattauer.

Bruyninckx, R., Buntinx, F., Aertgeerts, B., Van Casteren, V. (2003). The diagnostic value of macroscopic haematuria for the diagnosis of urological cancer in general practice. *Br J Gen Pract*, 53(486), 31-5.

Burger, M., Catto, J. W. F., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., Kiemeny, L. A., La Vecchia, C., Shariat, S., Lotan, Y. (2012). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European urology*, doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.033.

<https://www.cellsearchctc.com>

Chen, B. T., Loberg, R. D., Neeley, C. K., O'Hara, S. M., Gross, S., Doyle, G., Dunn, R. L., Kalikin, L. M., Pienta, K. J. (2005). Preliminary study of immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with advanced disease. *Urology*, 65(3), 616-21.

Cohen, S. J., Punt, C. J., Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M. C., Doyle, G. V., Tissing, H., Terstappen, L. W. M. M., Meropol, N. J. (2008). Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology. official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26, 3213-3221.

Dahl, E., Jung, A., Fassunke, J., Hummel, M., Penzel, R., Dietmaier, W., Laßmann, S. (2015). Chancen und Risiken der blutbasierten molekularpathologischen Analytik zirkulierender Tumorzellen (CTC) und zellfreier DNA (cfDNA) in der personalisierten Krebstherapie: Eine Stellungnahme des Arbeitskreises „Liquid Biopsy“ der AG Molekularpathologie in der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP). *Pathologe*, 36(1), 92-7.

Dahm, P., Gschwend, J. E. (2003). Malignant non-urothelial neoplasms of the urinary bladder: A review. *European urology*, 44, 672-681.

Danila, D. C., Heller, G., Gignac, G. A., Gonzalez-Espinoza, R., Anand, A., Tanaka, E., Lilja, H., Schwarzt, L., Larson, S., Fleisher, M., Scher, H. I. (2007). Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 13(23), 7053-8.

Danila, D. C., Fleisher, M., Scher, H. I. (2011). Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 17(12), 3903-12.

De Bono, J. S., Scher, H. I., Montgomery, R. B., Parker, C., Miller, M. C., Tissing, H., Doyle, G. V., Terstappen, L. W. W. M., Kenneth, J. P., Raghavan, D. (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14, 6302-6309.

Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 45(2), 228-47.

FDA – Food And Drug Administration. Veridex, LLC CellSearch™ Circulating Tumor Cell Kit Premarket Notification - Expanded Indications for Use. 26.02.2008 (URL: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/K073338.pdf, vom 08.07.2015) 28.

Flaig, T. W., Wilson, S., van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Wolfe, P., Maroni, P., Genova, E. E., Morales, D., Lucia, M. S. (2011). Detection of circulating tumor cells in metastatic and clinically localized urothelial carcinoma. *Urology*, 78(4), 863-7.

Gallagher, D. J., Milowsky, M. I., Ishill, N., Trout, A., Boyle, M. G., Riches, J., Fleisher, M., Bajorin, D. F. (2009). Detection of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer. *Ann Oncol*, 20(2), 305-8.

Gallagher, D. J., Milowsky, M. I., Bajorin, D. F. (2008). Advanced bladder cancer: status of first-line chemotherapy and the search for active agents in the second-line setting. *Cancer*, 113(6), 1284-93. doi: 10.1002/cncr.23692.

Gazdar, A. F., Czerniak, B. (2001). Filling the void: Urinary markers for bladder cancer risk and diagnosis. *J Natl Cancer Inst*, 93(6), 413-415.

Goodman, O. B. Jr., Fink, L.M., Symanowski, J. T., Wong, B., Grobaski, B., Pomerantz, D., Ma, Y., Ward, D. C., Vogelzang, N. J. (2009). Circulating tumor cells in patients with castration-resistant prostate cancer baseline values and correlation with prognostic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(6), 1904-13.

Griffiths, T. R. (2013) Action on Bladder Cancer. Current perspectives in bladder cancer management. *Int J Clin Pract*, 67(5), 435-48. doi: 10.1111/ijcp.12075.

Guzzo, T., McNeil, B., Bivalacqua, T., Elliott, D., Sokoll, L., Schoenberg, M. (2012). The presence of circulating tumor cell does not predict extravesical disease in bladder cancer patients prior to radical cystectomy. *Urol Oncol*, 30(1), 44-8.

Hayes, D. F., Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Miller, M.C., Matera, J., Allard, W. J., Doyle, G. V., Terstappen, L.W. (2006). Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients

predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*, 12(14 Pt 1), 4218-4224.

Helo, P., Cronin, A.M., Danila, D. C., Wenske, S., Gonzalez-Espinoza, R., Anand, A., Koscuizska, M., Väänänen, R. M., Pettersson, K., Chun, F. K., Steuber, T., Huland, H., Guillonneau, B. D., Eastham, J.A., Scardino, P.T., Fleisher, M., Scher, H.I., Lilja, H. (2009). Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with CellSearch assay and association with bone metastases and survival. *Clin Chem*, 55(4), 765-73.

Horn, T., Simon, J., Gschwend, J. E. (2014). Urothelkarzinom der Harnblase. In: H. U. Schmelz, C. Sparwasser, W. Weidner (Eds.), *Facharztwissen Urologie* (pp. 175-195). Berlin: Springer.

Kamat, A. M., Hegarty, P. K., Gee, J. R., Clark, P. E., Svatek, R. S, Hegarty, N., Shariat, S. F., Xylinas, E., Schmitz-Dräger, B. J., Lotan, Y., Jenkins, L. C., Droller, M., van Rhijn, B. W., Karakiewicz, P. I. (2013). International consultation on Urologic Disease-European Association of Urology Consultation on Bladder Cancer 2012. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol*, 63(1), 4-15. doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.057.Epub 2012 Oct 4.

Kausch, I., Jocham, D. (2007). Maligne Tumore der Harnblase. In: D. Jocham, K. Miller (Eds.), *Praxis der Urologie* (pp. 63-120). Stuttgart: Thieme.

Leissner, J., Ghoneim, M. A., Abol-Enein, H., Thüroff, J. W., Franzaring, L., Fisch, M., Schulze, H., Managadze, G., Allhoff, E. P., el-Baz, M. A., Kastendieck, H., Buhtz, P., Kropf, S., Hohenfellner, R., Wolf, H. K. (2004). Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J Urol*, 171(1), 139-44. doi: 10.1097/01.ju.0000102302.26806.fb.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.1, 2016, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>, (Stand: 23.08.2019).

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0, 2020, AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>, (Stand: 27.12.2020).

Librenjak, D., Novakovic, Z. S., Milostic, K. (2012). Carcinoma in situ of urinary bladder: incidence, treatment and clinical outcomes during ten-year follow-up. *Acta Clin Croat*, 51(2), 201-7. PMID: 23115943.

Loberg, R. D., Fridman, Y., Pienta, B. A., Keller, E. T., McCauley, L.K., Taichman, R. S., Pienta, K. J. (2004). Detection and isolation of circulating tumor cells in urologic cancers: a review. *Neoplasia*, 6(4), 302-9.

Majewski, T., Spiess, P. E., Bondaruk, J., Black, P., Clarke, C., Benedict, W., Dinney, C. P., Grossman, H. B., Tang, K. S., Czerniak, B. (2012). Detection of bladder cancer using proteomic profiling of urine sediments. *PloS One*, 7(8), e42452.

Matsubara, N., Mukai, H., Naito, Y., Nezu, M., Itoh, K. (2013). Comparison between neoadjuvant and adjuvant gemcitabine plus cisplatin chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*, 9(4), 310-7.

Meola, M., Petrucci, I., Giovannini, L., Colombini, E., Villa, A. (2012). L'ecografia e il color Doppler in nefrologia. Tumori del rene e delle vie urinarie [Ultrasound and color Doppler imaging for kidney and urinary tract tumors]. *G Ital Nefrol*, 29(4), 452-66.

Mink, P. J., Alexander, D. D., Barraji, L. M., Kelsh, M. A., Tsuji, J. S. (2008). Low-level arsenic exposure in drinking water and bladder cancer: A review and meta-analysis. *Regul Toxicol Pharmacol*, 52(3), 299-310.

Moreno, J. G., Miller, M. C., Gross, S., Allard, W. J., Gomella, L. G., Terstappen, L. W. (2005). Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology*, 65(4), 713-8.

Naoe, M., Ogawa, Y., Morita, J., Omori, K., Takeshita, K., Shichijyo, T., Okumura, T., Igarashi, A., Yanaihara, A., Iwamoto, S., Fukagai, T., Miyazaki, A., Yoshida, H. (2007). Detection of circulating urothelial cancer cells in the blood using the cellsearch system. *Cancer*, 109(7), 1439-45.

Nashan, B., Citterio, F. (2012). Wound healing complications and the use of mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplantation: a critical review of the literature. *Transplantation*, 94(6), 547-61.

Niegisch, G., Retz, M., Thalgott, M., Balabanov, S., Honecker, F., Ohlmann, C. H., Stöckle, M., Bögemann, M., Von Dorp, F., Gschwend, J. E., Hartmann, A., Ohmann, C., Albers, P. (2015). Second-Line Treatment of Advanced Urothelial Cancer with

Paclitaxel and Everolimus in a German Phase II Trial (AUO Trial AB 35/09). *Oncology*, 89(2), 70-8.

Olmos, D., Arkenau, H. T., Ang, J. E., Ledaki, I., Attard, G., Carden, C. P., Reid, A. H., A'Hern, R., Fong, P. C., Oomen, N. B., Molife, R., Dearnaley, D., Parker, C., Terstappen, L. W., de Bono, J. S. (2009). Circulating tumour cell (CTC) counts as intermediate end points in castration-resistant prostate cancer (CRPC): a single-center experience. *Ann Oncol*, 20(1), 27-33.

Okegawa, T., Hayashi, K., Hara, H., Nutahara, K., Higashihara, E. (2010). Immunomagnetic quantification of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer. *Int J Urol*, 17(3), 254-8.

Oken, M. M., Creech, R. H., Tormey, D. C., Horton, J., Davis, T. E., McFadden, E. T., Carbone, P. P. (1982). Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5(6), 649-55.

Pantel, K., Brakenhoff, R. H., Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumor cells. *Nat Rev Cancer*, 8(5), 329-40.

Pantel, K., Alix-Panabières, C. (2013). Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res*, 73(21), 6384-8.

Panteleakou, Z., Lembessis, P., Sourla, A., Pissimissis, N., Polyzos, A., Deliveliotis, C., Koutsilieris, M. (2009). Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance. *Mol Med*, 15(3-4), 101-14.

Paul, R., Zimmermann, F., Dettmar, P., Adam, M., van Randenborgh, H., Alschibaja, M., Herkommer, K., Seitz, M. (2008). *Urogenitale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (p. 28). München:Zuckschwerdt.

Peck, K., Sher, Y. P., Shih, J. Y., Roffler, S. R., Wu, C. W., Yang, P. C. (1998). Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res*, 58(13), 2761-5.

Philip, J., Manikandan, R., Venugopal, S., Desouza, J., Javlé, P. M. (2009). Orthotopic neobladder versus ileal conduit urinary diversion after cystectomy--a quality-of-life based comparison. *Ann R Coll Surg Engl*, 91(7), 565-9.

Purysko, A. S., Leao Filho, H. M., Herts, B. R. (2012). Radiologic imaging of patients with bladder cancer. *Semin Oncol*, 39(5), 543-58.

Putz, R., Pabst, R. (2007). Beckenorgane und Retroperitoneum. In: Sobotta - Anatomie des Menschen. München: Urban und Fischer.

Riethdorf, S., Fritsche, H., Müller, V., Rau, T., Schindlbeck, C., Rack, B., Janni, W., Coith, C., Beck, K., Jänicke, F., Jackson, S., Gornet, T., Cristofanilli, M., Pantel, K. (2007). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch System. *Clin Cancer Res*, 13(3), 920-8.

Rink, M., Cha, E., Green, D., Hansen, J., Robinson, B. D., Lotan, Y., Sagalowsky, A. I., Chun, F. K., Karakiewicz, P. I., Fisch, M., Scherr, D. S., Shariat, S. F. (2012). Biomolecular predictors of urothelial cancer behavior and treatment outcomes. *Curr Urol Rep*, 13(2), 122-35. <https://doi.org/10.1007/s11934-012-0237-1>.

Rink, M., Chun, F. K., Dahlem, R., Soave, A., Minner, S., Hansen, J., Stoupiec, M., Coith, C., Kluth, L. A., Ahyai, S. A., Friedrich, M. G., Shariat, S. F., Fisch, M., Pantel, K., Riethdorf, S. (2012). Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: a prospective study. *Eur Urol*, 61(4), 810-7.

Rink, M., Chun, F. K., Minner, S., Friedrich, M., Mauermann, O., Heinzer, H., Huland, H., Fisch, M., Pantel, K., Riethdorf, S. (2010). Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU Int*, 107(10), 1668-75.

Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends. 7. Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2010. doi: 10.25646/3152.

Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). P. 106-110. Berlin, 2015. doi: 10.17886/rkipubl-2015-004.

Robert Koch Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, p. 49-52. Berlin Nov 2016. <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-014>.

Roupret, M., Guillotreau, J., Irani, J., Zerbib, M. (2010). Prise en charge des tumeurs vésicales non-infiltrant le muscle vésical. TaG1: intérêt de l'IPOP? [Management of

non invasive bladder cancers. T1Ga urothelial cell carcinoma: benefit of immediate post operative instillation?]. *Prog Urol*, 20 Suppl 1, S46-9.

Schmid, S., Gschwend, J. E., Kausch, I., Jocham, D. (2020). Klinisch-pathologische Klassifikation der malignen Blasen Tumoren (TNM-Klassifikation). In: D. Jocham, K. Miller, M. Burger (Eds.), *Praxis der Urologie*. Stuttgart: Thieme.

Schneider, D., Richling, F. (2021). Hrsg. *Datenbank Arzneimittel*. Stuttgart: Thieme.

Stein, J. P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A. C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D., Skinner, D. G. (2001). Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: Long-term results in 1,054 patients. *Journal of clinical oncology. official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19, 666-675.

Steinmetz, T., Bokemeyer, C. (2007). Tumoranämie – Diagnostik, Therapie und Leitlinien. *Best practice onkology*, 1, 46-59.

Sun, Y. F., Yang, X. R., Zhou, J., Qiu, S. J., Fan, J., Xu, Y. (2011). Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137(8), 1151-73.

Sylvester, R. J., van der Meijden, A. P., Lamm, D. L. (2002). Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials, *J Urol*, 168(5), 1964-70.

Thalgott, M. K., Nawroth, R., Gschwend, J. E., Retz, M. (2009). Wissenschaftliches Begleitprogramm zur einarmigen, multizentrischen Phase-II Studie zur Evaluation der Therapie mit Paclitaxel plus RAD001 der Urothelkarzinoms nach Versagen einer vorhergehender platinhaltigen Chemotherapie.

Thalgott, M. K., Rack, B., Maurer, T., Souvatzoglou, M., Eiber, M., Kreß, V., Heck, M. M., Andergassen, U., Nawroth, R., Gschwend, J. E., Retz, M. (2013). Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139(5), 755-63.

Therasse, P., Arbuck, S. G., Eisenhauer, E. A., Wanders, J., Kaplan, R. S., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, A. T., Christian, M. C., Gwyther, S. G. (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*, 92(3), 205-16.

von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J. T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Zimmermann, A., Arning, M. (2005). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *Journal of clinical oncology. official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23, 4602-4608. doi: 10.1200/JCO.2005.07.757.

Voss, M. H., Molina, A. M., Motzer, R.J. (2011). mTOR inhibitors in advanced renal cell carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 25(4), 835-52. doi: 10.1016/j.hoc.2011.04.008.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, 93(9), 2325-7. doi: 10.1021/ja00738a045.

Zeegers, M. P., Tan, F. E., Dorant, E., van Den Brandt, P. A. (2000). The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*, 89(3), 630-9.

Zeegers, M. P., Kellen, E., Buntinx, F., van den Brandt, P. A. (2004). The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol*, 21(6), 392-401.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Harnblase von ventral (Putz/Pabst, Sobotta, 2007)	9
Abbildung 2: T-Stadien des Harnblasenkarzinoms (gemäß TNM-Klassifikation der UICC von 2017) (Schmid et al., 2018).....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Studiendesigns der CRAD001LDE17T Studie	21
Abbildung 4: Angriffsmechanismus des mTOR Inhibitors Everolimus (Facharztwissen Urologie, 2014)	27
Abbildung 5: Studiendesign mit Darstellung der Zeitpunkte für die CTC Detektion und des Therapieverlaufes	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer zirkulierenden Tumorzelle (links) und Darstellung einer zirkulierenden Tumorzelle unter dem Fluoreszenzmikroskop (rechts) (www.veridex.com)	35
Abbildung 7: CellTracks®AutoPrep®System (links) und CellTrack®Analyzer II (Veridex) (rechts) (www.veridex.com).....	36
Abbildung 8: CellSavePreservative®Tube (www.veridex.com)	37
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Altersverteilung der Studienteilnehmer der CRAD001 Studie.....	40
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Lokalisation von Metastasen im Studienkollektiv	43
Abbildung 11: Graphische Darstellung der verabreichten Zyklen Chemotherapie vor Abbruch der Teilnahme an der CRAD001 Studie	44
Abbildung 12: Darstellung der zirkulierenden Tumorzellen pro 7,5 ml Blut bei Studienbeginn, nach 2, 4 und 6 Zyklen Chemotherapie im Studienkollektiv	46
Abbildung 13: Darstellung der zirkulierenden Tumorzellen pro 7,5 ml Blut bei Patienten mit Abschluss aller 6 Zyklen Chemotherapie (n = 6) bei Studienbeginn, nach 2, 4 und 6 Zyklen	48
Abbildung 14: Graphische Darstellung der CTC Detektionsrate in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters.....	49

Abbildung 15: Darstellung der zirkulierenden Tumorzellen pro 7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit des Metastasierungsmusters	50
Abbildung 16: Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit der Höhe des Hämoglobin-Wertes im Blut des Patienten	52
Abbildung 17: Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit der Höhe der Laktatdehydrogenase im Blut des Patienten	53
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit der Höhe der Alkalischen Phosphatase im Blut des Patienten	55
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline in Abhängigkeit des ECOG-Status des Patienten.....	57
Abbildung 20: Graphische Darstellung des besten Therapieansprechens im Studienkollektiv	58
Abbildung 21: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut in Abhängigkeit des besten Therapieansprechens im Patientenkollektiv	59
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Studienbeginn in Abhängigkeit des besten Therapieansprechens im Patientenkollektiv	60
Abbildung 23: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline und nach 2 Zyklen Chemotherapie bei Studienteilnehmern mit partieller Remission	61
Abbildung 24: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline und nach 2 Zyklen Chemotherapie bei Studienteilnehmern mit stabiler Erkrankung	62
Abbildung 25: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut bei Baseline und nach 2 Zyklen Chemotherapie bei Studienteilnehmern mit Progression	63
Abbildung 26: Graphische Darstellung der Anzahl der CTCs/7,5 ml Blut der Gruppen 1-3 zum Zeitpunkt der Progression	65
Abbildung 27: Graphische Darstellung des OS und des PFS im Gesamtkollektiv (n = 24)	66
Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen (CTCs <5/7,5 ml Blut und CTCs ≥ 5/7,5 ml Blut) bei Studienbeginn (links) und nach 2 Zyklen Chemotherapie (rechts)	67

Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben nach Einteilung der Patienten in zwei Gruppen (CTCs $<5/7,5$ ml Blut und CTCs $\geq 5/7,5$ ml Blut) bei Studienbeginn (links) und nach 2 Zyklen Chemotherapie (rechts) 68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren Harnblasenkarzinom (Facharztwissen Urologie, 2014)....	11
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (Facharztwissen Urologie, 2014).....	12
Tabelle 3: ECOG Performance Status (Oken et al., 1982)	33
Tabelle 4: Demographische Daten und klinische Charakteristika der Studienteilnehmer bei Einschluss in die CRAD001 Studie (übernommen und adaptiert von Niegisch et al., 2015)	41
Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der detektierten CTC Zahl zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten	46
Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Spearman Korrelation zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem progressionsfreien Überleben	67
Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Spearman Korrelation zwischen der Höhe der zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem Gesamtüberleben	69

Anhang



Urologische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München

Anstalt des öffentlichen Rechts

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen E. Gschwend



CRAD001L DE17T

SOP: Detektion zirkulierender Tumorzellen (CTC) mit dem CellSearch®-System

1. Zeitpunkt der CTC-Abnahme

Die CTC-Abnahme erfolgt nach Möglichkeit unmittelbar vor Durchführung der bildgebenden Verfahren (CT/MRT) gemeinsam mit den zu erhebenden Laborproben

- 1. CTC-Abnahme: **Screening-Phase**
- 2. CTC-Abnahme: **nach dem 2. Zyklus**
- 3. CTC-Abnahme: **nach dem 4. Zyklus**
- 4. CTC-Abnahme: **nach dem 6. Zyklus**

2. Gestellte Materialien

- Transportbox (lila) mit:
 - CellSave®-Vacutainer und zugehörigem Blutentnahme-Set (Butterfly mit Adapter für Vacutainer, Vacutainer-Aufsatzglocke, Ersatzbutterflies)
 - Etiketten zum Beschriften und Versiegeln von Proben und Briefumschlag
- Frankierter und rückadressierter Briefumschlag

3. Durchführung

- Blutentnahme mit geliefertem Vacutainer-System = 1 x 10ml Vollblut
Cave: Es ist keine weitere Probenbearbeitung notwendig
- Bekleben der Röhrchen mit ausgefülltem lila Etikett (Patient, Datum, Uhrzeit)
- Das Röhrchen in der Transportbox in dem vorgesehenen Steckplatz bruch sicher verstauen
- Versiegeln der Box mit dem roten Etikett „Infektiös“
- Die lila Box in den Briefumschlag legen, der frankiert und adressiert beiliegt

Anhang

- Briefumschlag mit Absender versehen
- Den Umschlag mit dem orangen Etikett „Vertraulich“ versiegeln
- Die Proben noch **am gleichen Tag** über den Postweg versenden!!

Verantwortlicher bei Rückfragen	Versandadresse der Proben
Mark Thalgott Klinikum Rechts der Isar München Tel.-Zentrale: 089/4140-0 Funk: 11-2546 Fax: 089/41404843 Notfall: 0179/5330195 E-Mail: mark.thalgott@lrz.tu-muenchen.de	Fr. Dr. B. Rack Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde Tumorimmunologisches Labor Zi.: 123 Maistrasse 11 80337 München

Anhang

Tabellarische Darstellung der demographischen Patientendaten der CRAD001 Studie:

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Lokalisation des Primärtumors	Metastasierung	Operationen	Vortherapie
1	w	58	Unterer Harntrakt	Knochen, Lymphknoten	Zystektomie	Cisplatin/ Etoposid
2	w	49	Unterer Harntrakt	Lunge	Urethrektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
3	m	55	Oberer Harntrakt	Leber, Lunge, Knochen, Nebenniere	Nephroureterektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
4	m	69	Oberer Harntrakt	Knochen, Lymphknoten	Nephrektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
5	m	63	Unterer Harntrakt	Leber, Lymphknoten	TURB	Gemcitabin/ Cisplatin
6	w	72	Unterer Harntrakt	Lymphknoten	Zystektomie	Cisplatin/ 5 FU
7	w	35	Oberer und Unterer Harntrakt	Lymphknoten, Leber	Nephroureterektomie	Gemcitabin/ Cisplatin; Radiatio
8	m	67	Oberer Harntrakt	Knochen, Lunge	Nephrektomie	Gemcitabin/ Carboplatin; Radiatio
9	w	52	Unterer Harntrakt	Lymphknoten, Lunge	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin; Gemcitabin/ Carboplatin; Radiatio
10	m	67	Oberer und Unterer Harntrakt	Lymphknoten, Leber	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
11	w	54	Unterer Harntrakt	Lunge, Lymphknoten	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
12	m	52	Unterer Harntrakt	Knochen, Lymphknoten	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
13	m	63	Unterer Harntrakt	Leber, Lunge	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
14	m	48	Oberer Harntrakt	Lunge, Lymphknoten	Nephrektomie	Gemcitabin/ Carboplatin
15	m	62	Unterer Harntrakt	Leber, Lymphknoten	TURB	Gemcitabin/ Cisplatin
16	m	65	Unterer Harntrakt	Leber, Lymphknoten	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin

Anhang

17	w	73	Oberer Harntrakt	Pankreas, Leber, Lymphknoten, Nebenniere	Biopsie	Gemcitabin/ Cisplatin
18	m	69	Unterer Harntrakt	Lymphknoten	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
19	m	69	Unterer Harntrakt	Leber, Lunge, Nebenniere	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
20	m	52	Unterer Harntrakt	Lunge	Urthrektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
21	m	54	Oberer Harntrakt	Nebenniere, Knochen	Biopsie	Gemcitabin/ Cisplatin
22	w	71	Oberer Harntrakt	Nebenniere	Nephrektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
23	m	62	Unterer Harntrakt	Leber, Knochen, Lymphknoten	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
24	m	72	Unterer Harntrakt	Leber, Lunge, Lymphknoten	Zystektomie	Cisplatin; Vinflunin; Radiatio
25	w	63	Unterer Harntrakt	Leber, Lunge, Knochen, Lymphknoten	Zystektomie	Gemcitabin/ Cisplatin
26	w	73	Oberer und Unterer Harntrakt	Leber, Lymphknoten	Biopsie	Gemcitabin/ Cisplatin
27	m	71	Oberer Harntrakt	Knochen, Nebenniere	Nephrektomie	Cisplatin/ 5 FU

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsarbeit nie zustande gekommen wäre:

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen E. Gschwend, Direktor der Urologischen Klinik am Rechts der Isar in München, für die Möglichkeit die Promotion unter seiner Leitung durchzuführen.

Frau Prof. Dr. med. Retz, meiner Doktormutter, für die Zuweisung der anspruchsvollen und interessanten Promotionsthematik und für ihre konstruktive Kritik.

Meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. M. Thalgott, Facharzt für Urologie am Urologischen Zentrum in Landshut, für die hervorragende Betreuung, die vielen fruchtbaren Gespräche und Anregungen, die Unterstützung während dem klinischen Teil der Studie, die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens und seine stete Hilfsbereitschaft.

Dem Team der Urologischen Klinik am Rechts der Isar in München für die Zusammenarbeit bei der Patientenbetreuung, die Datenerhebung und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn PD Dr. rer. nat. R. Nawroth, Leiter Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar, für die Unterstützung bei der Durchführung der Studie und die freundliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. B. Rack und ihrem Team des Tumorimmunologischen Labors, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde in München, für die Auswertung der Proben und die freundliche Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. med. G. Niegisch, Oberarzt Endourologie Universitätsklinikum Düsseldorf, für die freundliche Zusammenarbeit während der Studie, die Zurverfügungstellung seiner Daten und stete Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich mich hiermit bei allen anderen Studienzentren für die Zusammenarbeit bei der Datenerhebung und – auswertung bedanken:

- Prof. Dr. med. P. Albers, Universitätsklinikum Düsseldorf
- Prof. Dr. med. H. Rübber, Universitätsklinikum Essen
- Prof. Dr. med. M. Fisch, Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf

Danksagung

- Prof. Dr. med. M. Kuczyk, Medizinische Hochschule Hannover
- Dr. med. C. Wülfing, Universitätsklinikum Münster
- Prof. Dr. med. M. Stöckle, Universitätsklinikum des Saarlandes

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung in den letzten Jahren, die mir entgegengebrachte Geduld und das Vertrauen in meine Arbeit bedanken.