

**DIE WERTIGKEIT DER FÄKALEN TUMOR
M2-PYRUVATKINASE ALS DIAGNOSTISCHER
MARKER BEI KOLOREKTALEN KARZINOMEN
UND POLYPEN**

MARKUS TOEPLER



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Die Wertigkeit der fäkalen Tumor M2-Pyruvatkinase als
diagnostischer Marker bei
kolorektalen Karzinomen und Polypen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Markus TOEPLER

aus Büdingen

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik und Poliklinik III,
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter Prof. Dr. Bretzel

Betreuer: PD Dr. med. P. Hardt
1. Gutachter: PD Dr. med. P. Hardt
2. Gutachter: PD Dr. med. S. Immenschuh
Tag der Disputation: 25.04.2008

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Mai 2007

Gewidmet meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

<i>Punkt</i>	<i>Thema</i>	<i>Seite</i>
1.0	Einleitung	7
2.0	Literaturübersicht	8
2.1	Das kolorektale Karzinom	8
2.1.1	Risikofaktoren	9
2.1.1.1	Exogene Noxen	9
2.1.1.2	Hereditäre Genese	10
2.1.1.3	Die Rolle chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	11
2.1.1.4	Das Auftreten von Polypen und die Adenom-Karzinom-Sequenz	11
2.2	Screeningmethoden	14
2.2.1	Die reale Koloskopie	14
2.2.2	Die virtuelle Koloskopie	15
2.2.3	Die Sigmoidoskopie	15
2.2.4	Traditionelle Tumormarker	16
2.2.5	Stuhluntersuchungen	17
2.2.5.1	Molekulares Screening	17
2.2.5.2	Test auf okkultes Blut	18
2.2.5.3	Nachweis von Tumor M2-Pyruvatkinase	18
2.3	Besonderheiten im Tumorstoffwechsel	19
2.3.1	Die Glycolyse	19
2.3.2	Die Rolle der Tumor M2-Pyruvatkinase (Tumor M2-PK) im Tumor-Stoffwechsel	22
3.0	Material und Methoden	31
3.1	Patienten	31
3.2	Stadieneinteilung und Grading	32
3.2.1	Die TNM-Klassifikation	33
3.2.2	Die Dukes-Klassifikation	34
3.2.3	Grading	35
3.2.4	Einteilung der Adenome	36

3.3	Probenmaterial und Test	37
3.3.1	Probengewinnung und –verarbeitung	37
3.3.2	Testprinzip	37
3.3.3	Testvorbereitungen und –durchführung	38
4.0	Statistik	41
5.0	Ergebnisse	42
6.0	Diskussion und Interpretation der Ergebnisse	50
7.0	Zusammenfassung	63
8.0	Literaturverzeichnis	67
9.0	Anhang	74
9.1	Verzeichnis der Abkürzungen	74
9.2	Verzeichnis der Tabellen	75
9.3	Verzeichnis der Abbildungen	76
9.4	Studienprotokoll	77
9.5	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	87
9.6	Originaltabellen	91
10.0	Danksagung	96
11.0	Lebenslauf	97

1.0 Einleitung

Eine frühzeitige Diagnosestellung des kolorektalen Karzinoms und seiner Vorstufen ist von erheblichem Interesse, da die Heilungschancen in diesem Fall bei nahezu 100% liegen.

Die Koloskopie ist bezüglich der aktuell zur Verfügung stehenden diagnostischen Mittel weiterhin Goldstandard, die Inanspruchnahme einer Durchführung im Rahmen des gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogrammes wird jedoch von der Bevölkerung leider nur unzureichend wahrgenommen. Der Screening-Test auf okkultes Blut im Stuhl wurde über viele Jahre trotz geringer Sensitivität und Spezifität genutzt, da es keine besseren Alternativen gab. Andere Untersuchungsmethoden sind wiederum mit einem erheblichen diagnostischen oder finanziellen Aufwand verbunden.

Vor einigen Jahren gelang nun der Nachweis der so genannten Tumor M2-Pyruvatkinase. Hierbei handelt es sich um ein Isoenzym der Pyruvatkinase, welches in einer aktiven tetrameren und auch in einer inaktiven dimeren Form existiert. Da besagte dimere Isoform gehäuft in Tumorgewebe vorkommt, verlieh man ihr den Namen Tumor M2-PK. Man kann sie sowohl im Blut, als auch im Stuhl nachweisen. Bezüglich der Stuhltestung ergeben sich für das kolorektale Karzinom eine Spezifität von 82% und eine Sensitivität von 79%.

Durch die Entwicklung eines kostengünstigen und nicht-invasiven Tests mit gleichzeitig hoher Sensitivität und Spezifität ist die Bestimmung der Tumor M2-Pyruvatkinase ein bedeutendes Diagnostikum in der Krebsfrüherkennung geworden.

Ziel dieser Arbeit ist es nun aufzuzeigen, ob eine Korrelation zwischen den in Stuhlproben bestimmten Tumor M2-Pyruvatkinase-Werten und den Tumorstadieneinteilungen gemäß TNM, bzw. Dukes bei Patienten mit kolorektalem Karzinom besteht.

2.0 Literaturübersicht

2.1 Das kolorektale Karzinom

Jährlich werden weltweit ungefähr 875.000 neue Fälle eines kolorektalen Karzinoms diagnostiziert und es hat somit in der Gruppe der malignen Erkrankungen die vierthöchste Inzidenz. Nordamerika, Australien und Europa gelten in diesem Zusammenhang als Regionen mit besonders hoher Inzidenz, da hier ca. 63% aller Fälle registriert werden. Nach Angaben der American Cancer Society werden jährlich alleine in den Vereinigten Staaten von Amerika 130.000 Neuerkrankungen und 55.000 Todesfälle vermeldet [1]. In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jedes Jahr ungefähr 57.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom, von denen etwa 30.000 an den Folgen dieser Erkrankung versterben [2].

Seit 1970 war insbesondere für das Kolonkarzinom und in etwas abgeschwächter Form auch bezüglich des Rektumkarzinoms eine Zunahme der Krebsfälle und der Neuerkrankungsrate festzustellen. Die Inzidenz des Kolonkarzinoms in Europa betrug bei Männern im Jahre 1970 noch 24/100.000 Einwohner und zeigte bis 1994 einen Anstieg auf 44/100.000 Einwohner, Frauen verzeichneten von 1970 bis 1993 einen Anstieg der Inzidenz von 20 auf 33/100.000 Einwohner. Seit Anfang der 1990er Jahre fand sich jedoch eine allmähliche Stagnation, bzw. leichte Rückläufigkeit dieser Werte auf eine Neuerkrankungsrate des Kolonkarzinoms von 42/100.000 Einwohner für Männer und 30/100.000 für Frauen. Während die Inzidenz für das Rektumkarzinom bei Männern 1970 noch 25/100.00 Einwohner betrug, zeigte sich im Vergleich zum Kolonkarzinom hier nur ein geringer Anstieg bis auf 29/100.000 Einwohner im Jahre 1999, bei Frauen stieg die Inzidenz von 14 auf 19 Fälle/100.000 Einwohner. Deutschland weist geschlechtsunabhängig im Vergleich zu den übrigen EU-Staaten und den USA die höchste Neuerkrankungsrate auf.

Das Lebenszeitrisiko für ein kolorektales Karzinom beträgt in Deutschland 4,3 Prozent für Männer und 2,8 Prozent für Frauen, wobei Männer mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren und Frauen mit einem Durchschnittsalter von 72 Jahren erkranken. Das kolorektale Karzinom ist bei der männlichen Bevölkerung mit knapp über 16% nach dem Prostata- und dem Bronchialkarzinom die dritthäufigste Krebsneuerkrankung, bei Frauen rangiert es mit 16,7% nach dem Mammakarzinom an zweiter Stelle [3].

Sowohl prozentual als auch absolut betrachtet ist das kolorektale Karzinom in Deutschland bei Männern und Frauen gleichermaßen die zweithäufigste Krebstodesursache geworden (häufigste Krebstodesursache bei Männern ist das Bronchialkarzinom, bei Frauen das Mammakarzinom).

Die schlechtesten Überlebensraten nach Diagnosestellung sind bei den über 70-jährigen Patienten zu verzeichnen, wobei der durchschnittliche Verlust an Lebenserwartung bei ungefähr 6 Jahren anzusiedeln ist. 6 Jahre nach Erstdiagnose finden sich keine Unterschiede mehr bezüglich der Überlebenschancen, bzw. der Sterblichkeit im Vergleich zur Normalbevölkerung. Entscheidend ist hierbei jedoch natürlich das Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Insgesamt hat sich die Lebenserwartung bei diesem Krankheitsbild im Verlauf der letzten Jahre deutlich verbessert. Schätzungen des Robert-Koch-Instituts zufolge stieg der Anteil geheilter Patienten für den Darmkrebs bei Vergleich von Patienten mit einer Diagnosestellung in den 1970er Jahren mit Patienten, welche Mitte der 1980er Jahre erstdiagnostiziert wurden, auf über 50%. Vergleichbar gestaltet es sich mit den 10-Jahres-Überlebensraten und den relativen 1-, bzw. 2-Jahres-Überlebensraten. Dies wird auf eine frühere Erkennung der Karzinompatienten in somit weniger weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien zurückgeführt [3].

2.1.1 Risikofaktoren

Das Auftreten kolorektaler Karzinome ist verbunden mit verschiedenen Risikofaktoren, welche man wie folgt unterteilen kann:

2.1.1.1 Exogene Noxen

Neben einer Altersabhängigkeit scheinen exogene Noxen eine erhebliche Rolle in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms zu spielen. Auffallend ist in diesem Zusammenhang eine im internationalen Vergleich recht hohe Neuerkrankungshäufigkeit in Ländern mit westlicher Kulturprägung. Es finden sich somit einige lebensstilassoziierte Risikofaktoren wie z.B. die Aufnahme eines hohen Anteils tierischen Fettes und dem häufigen Verzehr von sog. „rotem“ Fleisch wie Rind, Schwein und Lamm. Möglicherweise besteht hier auch ein Zusammenhang mit der Art der Zubereitung, also z.B. scharfes Anbraten oder starkes Erhitzen [3]. Protektiven Charakter scheint hingegen der regelmässige Konsum verschiedener Gemüse- oder Fruchtarten zu haben. Ein weiterer Risikofaktor ist geringe körperliche Aktivität, vor allem bei gleichzeitig erhöhtem Body-Mass-Index (etwa zweifach höheres

Risiko für übergewichtige Menschen im Vergleich zu Normalgewichtigen) und vermutlich erhöht auch langjähriger Nikotinabusus das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken [1].

2.1.1.2 Hereditäre Genese

Patienten, die in der familiären Vorgeschichte ein kolorektales Karzinom aufweisen, haben ein erhöhtes Risiko ein solches selber im Laufe ihres Lebens zu bekommen. Dies wird einerseits im Sinne einer um etwa das Zweieinhalbfache erhöhten Inzidenz gegenüber Patienten ohne entsprechende Vorgeschichte interpretiert, andererseits treten familiäre Häufungen auch erblich bedingt auf. Auf eine erbliche Genese lassen sich ca. 1-5% aller kolorektalen Karzinome zurückführen. Bei Genträgern der sehr seltenen familiären adenomatösen Polyposis (FAP) kommt es bereits im jungen Erwachsenenalter meist zwischen dem 1. und 3. Lebensjahrzehnt zur Entwicklung von hunderten Polypen im Darm, welche im Laufe der Zeit maligne entarten und ohne Therapie fast in 100% der Fälle in der Ausbildung eines Karzinoms münden. Zugrunde liegt hier eine Mutation des so genannten APC-Gens (Adenomatous Polyposis Coli) auf Chromosom 5q21, welche autosomal-dominant vererbt wird. In etwa einem Viertel der Fälle lässt sich keine eindeutige familiäre Häufung von Adenomen oder kolorektalen Karzinomen nachweisen, sodass man hier von einer Neumutation ausgehen muss [3]. Durch besagte Mutation ist die Entstehung von Kryptenhyperplasien und Adenomen deutlich gesteigert. Der Median der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms liegt hier im 36. Lebensjahr und man empfiehlt den Genträgern dieser Erkrankung zumeist eine prophylaktische Proktokolektomie [4]. Varianten der FAP stellen hier die attenuierte FAP (= < 100 Polypen, Beginn des Polypenwachstums jenseits des 2. Lebensjahrzehnts), das Turcot-Syndrom (= ebenfalls > 100 adenomatöse Polypen, jedoch in Kombination mit Medulloblastomen) und das Gardner-Syndrom (= zusätzlich Epidermoidzysten, Desmoidtumore, Osteome und Fibrome) [5].

Den grössten Anteil der genetisch bedingten kolorektalen Karzinome nimmt jedoch die ebenfalls autosomal-dominant vererbte HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) ein. Hier liegen Keimbahnmutationen in DNA-Mismatch-Reparaturgenen vor. Auch ohne massive Polypenbildung kommt es hier bei einem Median im 46. Lebensjahr v.a. im rechten Kolon zur Ausbildung eines Karzinoms. Diesen Patienten wird ab dem 25. Lebensjahr eine jährliche Koloskopiekontrolle angeraten. Bei ausschliesslichem Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms spricht man in Anlehnung an Henry Lynch auch vom „Lynch-Syndrom I“ [3,5],

beim Vorliegen extrakolonischer Tumoren vom „Lynch-Syndrom II“ (vergesellschaftet u.a. mit Endometrium-Ca, daneben Ovarial-, Magen-, Gallengangs- oder Dünndarmkarzinome), bzw. einem „Muir-Torre-Syndrom“ (hier zusätzlich Keratoakanthome, Talgdrüsentumoren seborrhische Adenome und Karzinome) [5].

Autosomal-dominant vererbt werden des Weiteren hamartomatöse Polypose-Syndrome, welche ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms einhergehen. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang das Peutz-Jeghers-Syndrom (= PJS; bedingt durch eine Mutation des Tumorsuppressorgens STK 11 auf Chromosom 19p13.3 kommt es neben vermehrten Melaninpigmentflecken zur Ausbildung von häufig dysplastischen Polypen in Magen und Kolon und entsprechend zu einem 50-fach erhöhten Risiko für die Ausbildung eines Karzinoms) und die Familiäre Juvenile Polypose (FJP; mit Mutation des Gens DPC4 auf Chromosom 18q21.1) zu nennen [5].

Sporadische kolorektale Karzinome zeigen keine positive Familienanamnese, weisen im Rahmen der Malignomentwicklung jedoch multiple genetische Veränderungen auf. Eine Entstehung aus Polypen ist nicht obligat und findet sich nur in 2/3 der Fälle. Zugrunde liegt hier in 80% der Erkrankungsfälle eine somatische APC-Mutation [4].

2.1.1.3 Die Rolle chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Findet sich in der Anamnese des Patienten eine langjährige Colitis ulcerosa, so geht auch dies mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Darmkrebserkrankung einher – besonders wenn sie mit einer hohen Entzündungsaktivität verbunden ist. Man geht davon aus, dass die Inzidenz nach einer länger als 10 Jahre bestehenden Krankheitsdauer ansteigt und das Risiko mit jeder weiteren Dekade um 10% ansteigt. Auch Patienten, die an einem Morbus Crohn leiden, scheinen ein leicht erhöhtes Risiko zu besitzen [3].

2.1.1.4 Das Auftreten von Polypen und die Adenom-Karzinom-Sequenz

Von großer prognostischer Bedeutung ist jedoch das Auftreten von Darmpolypen. Betrachtet man sich Autopsiebefunde über 60-jähriger Patienten, so finden sich in über 30% der Fälle Polypen [3]. Bezüglich der histologischen Subtypen des kolorektalen Karzinoms und ihrer Häufigkeiten zeigen sich die Adenokarzinome mit 85 – 90% an erster Stelle, gefolgt von muzinösen Adenokarzinomen mit 5 – 10%, Siegelringkarzinome machen etwa 1 – 2 % aus. Plattenepithel-, adenosquamöses, kleinzelliges und undifferenziertes Karzinom machen jedes

für sich < 1% aus. Der Mammutantanteil der Darmkrebsfälle wird somit mit bis zu 90% von den Adenokarzinomen eingenommen, welche sich aus Polypen entwickelt haben. In diesem Zusammenhang wurde 1975 durch Morson et al. aus dem St. Mark's Hospital in London der Begriff der Adenom-Karzinom-Frequenz geprägt.

Hierbei geht man bezüglich der Karzinogenese von einem mehrstufigen Prozess aus, in dessen Verlauf verschiedene genetische Veränderungen akkumulieren und resultierend hieraus ein stufenweiser Übergang von normaler Schleimhaut über gering- zu hochgradigen Dysplasien bis hin zum Karzinom stattfindet. Im Rahmen der Tumorentstehung durchläuft die sich teilende Zelle verschiedene Stufen, welche Immortalisierung und unkontrolliertes Wachstum einschließen.

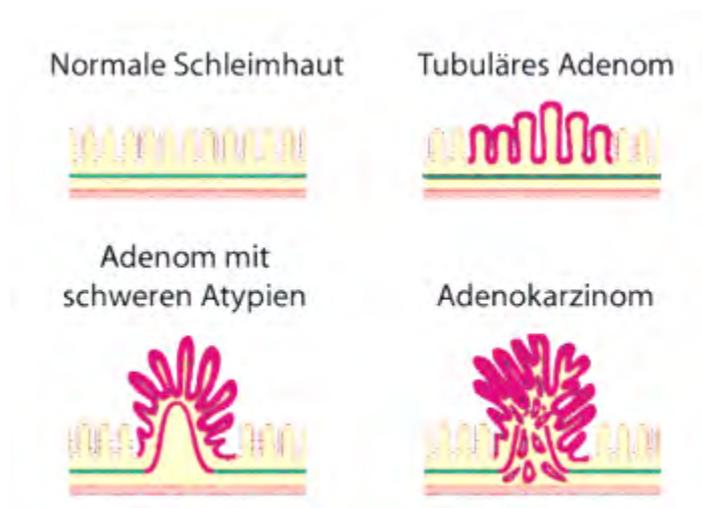


Abbildung 1:

Adenom-Karzinom-Sequenz

Dieser unkontrollierten Proliferation in Tumoren kommt bei der Karzinogenese eine bedeutende Rolle zu, da vermehrte Zellteilung die Zelle empfindlicher gegenüber primären Karzinogenen macht und durch die vermehrte DNA-Syntheserate die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Mutationen steigt. Letztere haben verschiedene Angriffspunkte: Zunächst die Proto-Onkogene, welche ein onkogenes Potential besitzen und zu Onkogenen aktiviert werden können. Hieraus resultiert eine vermehrte Zellteilung. Demgegenüber stehen die Tumorsuppressorgene, welche ein Tumorwachstum eindämmen wollen, indem sie Zellproliferation und Differenzierung hemmen. Im Falle einer Mutation oder eines Genverlustes ist eine sinnvolle Regulation innerhalb der Zelle nicht mehr möglich und es kommt zu unkontrollierbarem Wachstum [6]. So konnte beispielsweise in knapp 80% aller

untersuchten kolorektalen Karzinome das *c-myc*-Onkogen nachgewiesen werden. In bis zu 90% aller kolorektalen Karzinome fanden sich Mutationen des Tumorsuppressorgens APC, in 40 – 50% Mutationen des Onkogens *K-ras* und in 50 – 60% Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens [7]. Eine Mutation des APC-Gens führt zur Entstehung eines so genannten stop-codon, welches einen Abbruch der genetischen Information und folglich die Synthese eines funktionsunfähigen Proteins induziert. *ras*-Mutationen haben ihren Platz in den frühen Phasen der Karzinogenese, p53-Tumorsuppressorgenmutationen oder -verlust scheinen beim Übergang einer hochgradigen Dysplasie zum Karzinom eine tragende Rolle zu spielen [6].

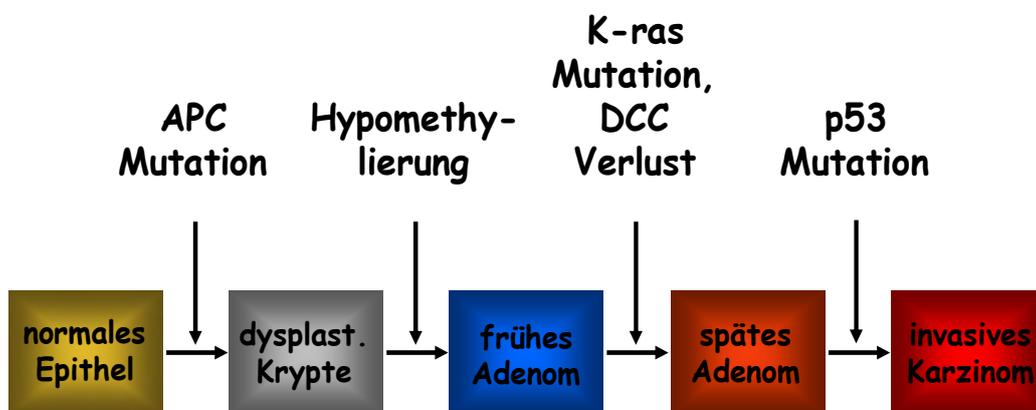


Abbildung 2:
Adenom-Karzinom-Sequenz

Vermutlich besteht eine Korrelation zwischen dem Risiko einer malignen Entartung und der Polypengröße, bzw. -anzahl, auch die Zeit, die nach Polypendiagnose ohne Intervention vergeht, scheint in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein. Im Vergleich zu polypenfreien Patienten bleibt selbst nach rechtzeitiger Entfernung der Polypen bei den Betroffenen das Karzinomrisiko auf niedrigem Niveau erhöht, weshalb man hier regelmässige koloskopische Nachkontrollen empfiehlt. Im Rahmen diverser Fall-Kontroll- und Kohortenstudien konnte aufgezeigt werden, dass bei Patienten, bei welchen sigmoidoskopisch oder koloskopisch entdeckte Polypen entfernt wurden, nach mehreren Jahren 50 – 90% weniger gehäuft kolorektale Karzinome diagnostiziert werden als bei Patienten ohne vorausgegangene Endoskopie [3].

2.2 Screeningmethoden

Wie man anhand all dieser Fakten erkennen kann, ist die Früherkennung und auch die regelmässige Kontrolle der Risikogruppen von immenser Bedeutung für die Prävention des kolorektalen Karzinoms. Aus diesem Grunde hat man vor vielen Jahren begonnen der Bevölkerung verschiedene Programme zur Sekundärprävention anzubieten. Als erstes Diagnostikum ist die rektal-digitale Untersuchung 1971 offiziell in den Katalog des Krebsfrüherkennungsprogrammes aufgenommen. Im Jahre 1977 wurde ein Stuhltest auf okkultes Blut – also der so genannte Hämoccult-Test - im Rahmen der gesetzlichen Krebsfrüherkennungsuntersuchung zugelassen. Neu hinzugekommen ist ergänzend seit dem 1. Oktober 2002 die Koloskopie [⁸].

Die verschiedenen Möglichkeiten, welche diagnostisch zur Verfügung stehen, seien hier im Einzelnen detailliert dargestellt:

2.2.1 Die reale Koloskopie

Diese endoskopische Methode stellte nach wie vor den Goldstandard bei der Früherkennung und Vermeidung des kolorektalen Karzinoms und seiner Vorstufen dar. Nach tags vor der Untersuchung begonnener Darmreinigung mittels Polyethylenelektrolyt- oder Natriumphosphatlösung kann bei erfolgreicher totaler Ileokoloskopie eine Beurteilung des gesamten Kolonrahmens inklusive des terminalen Ileums erfolgen. Nun können suspektere Areale biopsiert und im Anschluss histologisch untersucht werden. Finden sich Areale mit flüssigen Stuhlresten, so können diese mittels Spülung und grosslumigen Arbeitskanälen abgesaugt werden. Beim Auffinden von Adenomen ist eine Entfernung mittels Polypektomie möglich. Hierdurch kann somit nicht nur Diagnostik, sondern auch gleichzeitig Therapie vollzogen werden. Eine schmerzfreie Durchführung der Untersuchung ist in Analgosedierung möglich. Die Sensitivität der kompletten Ileokoloskopie liegt bei 95%, die Spezifität für die Erkennung eines kolorektalen Karzinoms, bzw. eines Adenoms liegt bei 100%. Seit dem 01.10.2002 ist die Koloskopie als sekundärpräventive Maßnahme Teil des gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogrammes. Somit hat jeder Bürger mit Vollendung des 55. Lebensjahres den Anspruch auf eine Koloskopie, welche bei unauffälligem Befund frühestens 10 Jahre nach der ersten Untersuchung ein weiteres Mal wiederholt werden kann [⁹].

Trotz all dieser geschilderten Vorteile wird das Angebot zur Vorsorgekoloskopie aktuell nur von ca. 3% der Berechtigten wahrgenommen. Gründe hierfür sind zumeist die Angst vor Schmerzen oder der Invasivität der Untersuchung[9].

2.2.2 Die virtuelle Koloskopie

Hierbei handelt es sich um radiologische Verfahren, in welchen eine computer-, bzw. kernspintomographische Kolographie durchgeführt wird. Beide benötigen zur Minimierung der Artefakte eine vollständige Darmreinigung und optimale Distension des Kolonrahmens (mittels Luft-/CO₂-Insufflation. bzw. Wasser-Gadolinium-Einlauf) während der Untersuchung. Die Untersuchungsmethoden setzen eine ausreichende Compliance des Patienten voraus, da hier zur Artefaktverminderung wiederholt Atempausen bis zu 30 Sekunden Dauer eingelegt werden müssen. Fehlerquellen können vor allem bei der MR-Kolographie endogene Bewegungsartefakte durch Peristaltik sein. Nachteil der CT-Technik ist eine hohe Strahlenbelastung, Nachteil der MR-Technik ein hoher Zeitaufwand für die Datenaquisition/–interpretation und bislang wenige zur Verfügung stehende Daten. Die Detektion von großen Polypen >1 cm ist gewährleistet, bei Adenomen mit einer Größe < 0,5 cm liegt die Sensitivität jedoch nur noch bei 50-60%. Hinzu kommt ein deutlich höherer Kostenaufwand. Gravierendster Nachteil ist jedoch der Fakt, dass eine Histologiegewinnung zur Dignitätsfestlegung im Rahmen dieser Prozeduren nicht möglich ist. Somit spielen virtuelle Koloskopien mittels CT- oder MR-Technik zum aktuellen Zeitpunkt als Darmkrebsscreening bei asymptomatischen Patienten keine Rolle [9].

2.2.3 Die Sigmoidoskopie

Durch diese Form des endoskopischen Screenings ist eine erhebliche Reduktion der Mortalität des kolorektalen Karzinoms zu erzielen. So konnte in mehreren Fall- und Kohortenstudien aufgezeigt werden, dass eine Risikoreduktion um 60% in den folgenden 10 Jahren erwartet werden kann. Im Rahmen einer 2002 von Atkins et al. mit über 170.000 Probanden durchgeführten kontroll-randomisierten Studie wurde die Wertigkeit der alleinigen flexiblen Sigmoidoskopie als Screeningmassnahme bei 55-60-jährigen Patienten untersucht. Hierbei fanden sich in 12% der Fälle distale Adenome und in 0,3% der Fälle ein Karzinom, was zu einer Inzidenzreduktion um 60% für das kolorektale Karzinom führte. Koloskopisch stellten sich in 18,8% der Fälle proximale Adenome und in 0,4% proximale Karzinome dar. Neben einer hohen Sensitivität und Spezifität für die Erkennung von Adenomen des Rektosigmoids

weist die flexible Sigmoidoskopie den weiteren Vorteil einer endoskopischen Abtragung und Histologiegewinnung auf und benötigt abgesehen von einer einmaligen Klysmaverabreichung keine größeren Vorbereitungen oder Abführmaßnahmen.

Ein deutlicher Nachteil ist demgegenüber gestellt die Tatsache, dass nur in ungefähr einem Viertel der Untersuchungen die linke Flexur erreicht werden kann, was ein Übersehen von ca. 30% aller sigmoidoskopisch erreichbaren pathologischen Befunde zur Folge hat. Proximale Kolonabschnitte können ebenso wenig eingesehen werden. Dies ist insofern von Belang, da rund 35% aller Patienten mit distalen Polypen auch proximale Polypen im Kolon aufweisen. Liebermann et al. konnte für besagte Patienten mit fortgeschrittenen proximalen Adenomen in 50% der Untersuchungen ein Fehlen der so genannten distalen „Markerpolypen“ feststellen [8].

2.2.4 Traditionelle Tumormarker

Tumormarker sind per definitionem Stoffe, deren Auftreten oder erhöhte Konzentrationen in Körperflüssigkeiten einen Zusammenhang mit dem Vorhandensein und/oder Verlauf von (bösartigen) Tumoren aufweisen.

Bislang gelang es trotz weltweiter intensiver Forschung nicht, einen organ- und tumorspezifischen Marker für das kolorektale Karzinom zu finden. Für die Verlaufsbeobachtung des Darmkrebses hat sich jedoch seit nunmehr über 35 Jahren das carcinoembryonale Antigen (CEA) etabliert. Hierbei handelt es sich um ein Glycoprotein mit einer Halbwertszeit von 3-8 Tagen, welches mangels Spezifität und Sensitivität, bzw. aufgrund einer großen Überlappung bei verschiedensten malignen und benignen Erkrankungen keinen Stellenwert im Rahmen der Screeningdiagnostik hat. CEA findet sich regelmäßig im fetalen Gastrointestinaltrakt und Pankreas, ebenfalls in entodermalen Tumoren wie beispielsweise dem kolorektalen Adenokarzinom und auch niedrig konzentriert in normalem Darmgewebe. Im Blut nachweisbar ist es weiterhin bei malignen Erkrankungen wie dem Bronchial-, Mamma- und Magenkarzinom. Gleiches gilt für benigne Erkrankungen wie Pankreatitis, Hepatitis, Leberzirrhose, Pneumonie und viele mehr, wobei die Serumkonzentrationen hier eher im niedrigen Bereich liegen und sich bei klinischer Besserung oft normalisieren. Das CEA hat seine Aufgabe eher in der Möglichkeit einer Verlaufsbeobachtung. Fallende Spiegel zeigen postoperativ oder nach eingeleiteter Chemotherapie einen Therapieerfolg an, wohingegen ein erneutes Ansteigen für ein Rezidiv oder ein Therapieversagen spricht. Ebenso besteht eine deutliche Korrelation des prä-

operativen Spiegels zum postoperativen, rezidivfreien Intervall und der Überlebenszeit. Im Rahmen der Tumornachsorge wird derzeit bei potentiell kurativ operierten kolorektalen Karzinomen der Stadien II und III eine CEA-Bestimmung alle 6 Monate empfohlen. Einflussgrößen in vivo sind hierbei Tumormarkerexpression, -freisetzung, -synthese, Tumormasse und -blutversorgung, des Weiteren iatrogene Störfaktoren wie invasive diagnostische Maßnahmen (Koloskopie) oder gar Probiopsien [10]. Vergleichsstudien mit anderen Tumormarkern des Gastrointestinaltraktes wie CA 19-9 oder CA 72-4 zeigten, dass letztere eine noch geringere Spezifität und Sensitivität zur Detektion des kolorektalen Karzinoms aufweisen [11].

2.2.5 Stuhluntersuchungen

2.2.5.1 Molekulares Screening

Die heutzutage zur Verfügung stehenden molekularen Testverfahren basieren auf dem Nachweis genetisch veränderter Zellen, die von Adenomen oder Karzinomen abgeschilfert und ohne zirkadiane Rhythmik kontinuierlich mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Wie oben beschrieben lassen sich bei hereditären kolorektalen Karzinomen verschiedene Keimbahnmutationen und auch in Zusammenhang mit sporadischen Kolonkarzinomen entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz immer wieder Mutationen von Onkogenen, bzw. Tumorsuppressorgenen nachweisen. So finden sich in bis zu 90% aller kolorektalen Karzinome Mutationen des Tumorsuppressorgens APC, 40 – 50% Mutationen des Onkogens K-ras und 50 – 60% solche des Tumorsuppressorgens p-53 [7]. Traverso et al. gelang es, den Nachweis besagter Mutationen in fäkaler DNA zu tätigen. Hierzu konzentrierte er sich auf den Nachweis von Mutationen des APC-Gens, da dieses wie oben ersichtlich in nahezu 90% der Fälle mutiert und zu einer Verkürzung des Proteins führt. Mit Hilfe des so genannten Protein-Truncation-Tests gelang ein Nachweis dieser Verkürzung in 61% aller kolorektalen Karzinome, 50% aller Adenome und 0% aller Kontrollen. In Kombination mit anderen molekularen Markern lässt sich an kleinen Patientenkollektiven eine Sensitivität von bis zu 90% zur Erkennung kolorektaler Karzinome aufzeigen. Deutlicher Nachteil ist aktuell jedoch noch eine unzureichende Datenlage und ein mit knapp 400 US-Dollar pro Test sehr hoher Preis. Erhebliche Verluste in der DNA-Qualität resultieren aus einer mehr als zwölfstündigen Zeitspanne zwischen Probengewinnung und Weiterverarbeitung [12].

2.2.5.2 Test auf okkultes Blut

Hier ist in erster Linie der so genannte Hämoccult-Test zu nennen. Sein Testprinzip basiert auf der Tatsache, dass sowohl kolorektale Karzinome als auch Adenome häufiger bluten als normale Darmschleimhaut.

Auf Guaiakharz-beschichtetes Filterpapier werden je 2 Proben Stuhl auf 2 Testfelder aus 3 aufeinander folgenden Stuhlgängen aufgetragen. Ist okkultes Blut und somit Hämoglobin in der Probe enthalten, kommt es durch die Pseudoperoxidaseaktivität nach Zugabe von Wasserstoffperoxid zur Blaufärbung des Guaiakharzes [7]. Zwischen 1993 und 2002 wurden in den USA, Großbritannien, Dänemark und Schweden durch Mandel et al., Hardcastle et al., Kronberg et al. und Kewenter et al. vier kontrolliert-randomisierte Studien mit insgesamt fast 300.000 Probanden durchgeführt, in welchen eine Sensitivität von 25-50% bei einer Spezifität von 90% aufgezeigt werden konnte. Die metaanalytische Auswertung dieser Studien ergab, dass die Mortalität des kolorektalen Karzinoms durch den Test auf okkultes Blut bei Menschen zwischen dem 45. und 80. Lebensjahr um bis zu 25% gesenkt werden konnte [8]. Vorteil ist der geringe apparative und auch finanzielle Aufwand, Nachteil ist die Tatsache, dass nicht-blutende Prozesse hierbei nicht erfasst werden. Ein weiterer Guaiakharz-Test ist namentlich der weiterentwickelte „Hämoccult Sensa“, ebenso stehen selektive immunologische Nachweisverfahren für okkultes Blut im Stuhl zur Verfügung (z.B. der „HemeSelect-Test“). Nachteil sind hier ebenfalls deutlich höhere Kosten, eine spezielle Diät im Zeitraum der Testdurchführung, bzw. eine kompliziertere zentrale Auswertung [7].

1977 wurde der Hämoccult-Test in das gesetzliche Krebsfrüherkennungsprogramm aufgenommen. Die präventiven Okkultblutuntersuchungen dürfen in jährlichem Intervall ab dem 50. Lebensjahr in Anspruch genommen werden. Mit dem Beginn des Anspruchs auf eine Koloskopie besteht der Anspruch auf den Hämoccult-Test nur noch alle 2 Jahre. Die weibliche Bevölkerung nimmt diese Art der Krebsfrüherkennung meist im Rahmen ihrer gynäkologischen Vorsorgeuntersuchung zu etwa 35% in Anspruch, Männer etwa zu 18%. Die gesamte Inanspruchnahmerate der Berechtigten liegt momentan somit leider deutlich unter 30%^[13].

2.2.5.3 Nachweis von Tumor M2-Pyruvatkinase

Wie bereits eingangs erwähnt handelt es sich hierbei um ein existierendes Isoenzym der Pyruvatkinase, das sowohl in einer aktiven tetrameren und als auch in einer inaktiven dimeren Form existiert. Aufgrund des gehäuften Vorkommens der dimeren Isoform in

Tumorgewebe, bezeichnete man sie fortan als Tumor M2-PK. Ein Nachweis ist sowohl im Blut, als auch im Stuhl möglich [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. Bezüglich der Stuhltestung ergaben sich bei einem Cut-Off von 5 U/ml für das kolorektale Karzinom eine Spezifität von 83% und eine Sensitivität von 73% [19]. Dieser neuartige Test soll in den folgenden Kapiteln ausführlich erläutert werden.

2.3 Besonderheiten im Tumorstoffwechsel

Wenn es im Körper zur Entstehung eines Tumors kommt, so finden bei der Umwandlung von einer normalen Zelle in eine Tumorzelle erhebliche Veränderungen statt. Die biochemische Arbeitsgruppe um Prof. Eigenbrodt und Privat-Dozentin Sybille Mazurek der Justus-Liebig-Universität Giessen zeigten, dass bei der Tumorentstehung unabhängig von der Stoffwechsellage des Ursprungsgewebes, aus welchem sich die Tumorzellen entwickelt haben, bei bestimmten Parametern immer die gleichen Tumor-spezifischen Stoffwechselveränderungen auftreten. In Anlehnung an die Begriffe Genom (= sämtliche in einer Geschlechtszelle enthaltenen Erbinformationen) und Proteom (= die Gesamtheit aller innerhalb eines Organismus genetisch festgelegten Proteine) wurde dieser Tumor-spezifische Stoffwechsel-Phänotyp als Tumor-Metabolom [28] bezeichnet (Metabolismus = Stoffwechsel).

Voraussetzung für die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen ist das ausreichende Vorhandensein von Ausgangsstoffen, welche für die Synthese von Zellbausteinen vonnöten sind. Des Weiteren müssen die Tumorzellen befähigt sein, sich den wechselnden Sauerstoff- und Nährstoffversorgungen anzupassen.

Die Adaption an die neuen Stoffwechsellanforderungen innerhalb der Tumorzellen wird durch einen Wechsel im Isoenzymmuster ermöglicht. Isoenzyme stellen hierbei Enzyme dar, welche dieselbe Stoffwechselreaktion katalysieren, sich jedoch sowohl in ihrer Proteinstruktur, als auch in ihren physikalischen und kinetischen Eigenschaften unterscheiden und zudem noch unterschiedlich reguliert werden [2].

2.3.1 Die Glycolyse

Ein wichtiger Stoffwechselweg zur Energiegewinnung stellt in diesem Zusammenhang die Glycolyse dar - hier wird Glucose unter Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP) zu Pyruvat und Lactat abgebaut. Dieser Prozess kann sowohl mit als auch ohne Sauerstoff stattfinden [2].

Grundsätzlich sind sämtliche Zellen des Menschen in der Lage, über die Glycolyse Energie zu gewinnen. In vielen Geweben erfolgt die Regulation der Glycolyse über Insulin, welches für die Aufnahme der Glucose in die Zelle notwendig ist. In bestimmten Zellen (z.B. Erythrozyten, Leber, lymphatisches Gewebe) ist die Glucoseaufnahme jedoch auch insulinunabhängig möglich. 7 von 10 Reaktionen der Glycolyse sind umkehrbar, weshalb sie für die Gluconeogenese eine grosse Rolle spielen, sämtliche Teilschritte laufen im Zytoplasma ab^[29].

Das Prinzip der Glycolyse besteht darin, dass 1 mol Glucose in 2 mol Pyruvat gespalten werden, wobei 2 mol ATP und NADH-H entstehen. Unter anaeroben Bedingungen wird NAD durch Bildung von Lactat wieder regeneriert. Die Glycolyse ist unter anaeroben Bedingungen die einzige Möglichkeit zur Gewinnung von ATP aus ADP und Phosphat.

Im Detail betrachtet erfolgt nach der Aufnahme von Glucose in die Zelle durch die sehr aktive Hexokinase und etwas geringer aktive Glucokinase eine ATP-abhängige Phosphorylierung zu Glucose-6-Phosphat (- 1 ATP).

Durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kommt es zur Isomerisierung in Fructose-6-Phosphat und unter Verbrauch von 1 ATP erfolgt durch das Enzym Phosphofruktokinase eine weitere Phosphorylierung am C1-Atom der Fructose zu Fructose-1,6-Biphosphat. Diese Phosphorylierung ist irreversibel und stellt somit eine Schrittmacherreaktion der Glycolyse dar. Phosphofruktokinase wird durch hohe Spiegel von ATP und Citrat gehemmt und durch ADP und AMP aktiviert. Somit kann der Glucosedurchsatz dem ATP-Bedarf angepasst werden. Durch Aldolspaltung folgt nun eine Spaltung von Fructose-1,6-biphosphat in 2 Triosen: Glyceralphosphat und Glyceronphosphat, welche miteinander im Gleichgewicht stehen, wobei das Gleichgewicht weit auf der Seite von Glyceronphosphat liegt. Zum weiteren Ablauf der Glycolyse wird jedoch Glyceralphosphat benötigt. Die Einstellung des Gleichgewichtes erfährt eine Beschleunigung durch die Triosephosphatisomerase, welche eine sehr hohe Umsatzzahl aufweist und das nur in geringen Mengen vorliegende Glyceralphosphat sehr rasch nachliefern kann. Dieses wird am C1-Atom durch die 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase oxidiert. NAD dient bei dieser Reaktion als Wasserstoffakzeptor und Aktivator, NADH+H hemmt die Reaktion. Durch Fixierung von anorganischem Phosphat in energiereicher Säureanhydridbindung kommt es zur Substratkettenphosphorylierung und es entsteht 1,3-Biphosphoglycerinsäure, welche am C1-Atom eine energiereiche Säureanhydridbindung und am C3-Atom eine energiearme Phosphorsäureesterbindung besitzt. Durch die Phosphoglyceratkinase kann der Phosphatrest,

welcher energiereich am C1-Atom gebunden ist, direkt auf ADP übertragen werden, wodurch 3-Phosphoglycerat und 2 ATP entstehen. Der Phosphatrest am C3-Atom wird, bevor er auf ADP übertragen werden kann, durch Umlagerung (Phosphoglyceratmutase) und anschließende Wasserabspaltung (Enolase) aktiviert. Das nun entstandene Phosphoenolpyruvat kann seinen Phosphatrest auf ADP übertragen und unter Bildung von 2 mol ATP durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgewandelt werden. Dieser Schritt ist irreversibel. Ist nicht genügend Sauerstoff zur Weiteroxidation des Pyruvat vorhanden, kann es zu Lactat reduziert werden. Wasserstoffdonator ist hierbei NADH+H. Das entstehende NAD fördert somit wieder die Energiegewinnung durch die Glycolyse. Bei ausreichendem Sauerstoffangebot wird Pyruvat über Acetyl-CoA im Citratzyklus oxidiert (aerobe Glycolyse)[29].

Bereits 1926 beschrieb Otto Warburg, dass Tumorzellen auch in Gegenwart von Sauerstoff vermehrt Lactat bilden. Zunächst ging man davon aus, dass ursächlich hierfür ein Defekt in der mitochondrialen Atmungskette vorliegen müsse – ein solcher konnte jedoch nie nachgewiesen werden. Heutzutage geht man vielmehr davon aus, dass ein Wechsel im Isoenzymmuster der glycolytischen Enzyme die Hauptursache für die vermehrte aerobe Glycolyse in Tumorzellen ist. In diesem Falle werden pro mol Glucose 2 mol Lactat und 2 mol ATP gebildet. Normale Zellen nutzen diesen uneffektiven Weg der Energiegewinnung nur im Rahmen unzureichender Sauerstoffversorgung (sog. Pasteureffekt). In ausdifferenziertem Gewebe wird Glucose in Anwesenheit von Sauerstoff in Pyruvat umgesetzt und anschließend in der mitochondrialen Atmung in CO₂, H₂O und Energie umgewandelt. Hierbei kann entschieden mehr Energie gewonnen werden, nämlich 38 mol ATP pro mol Glucose [³⁰].

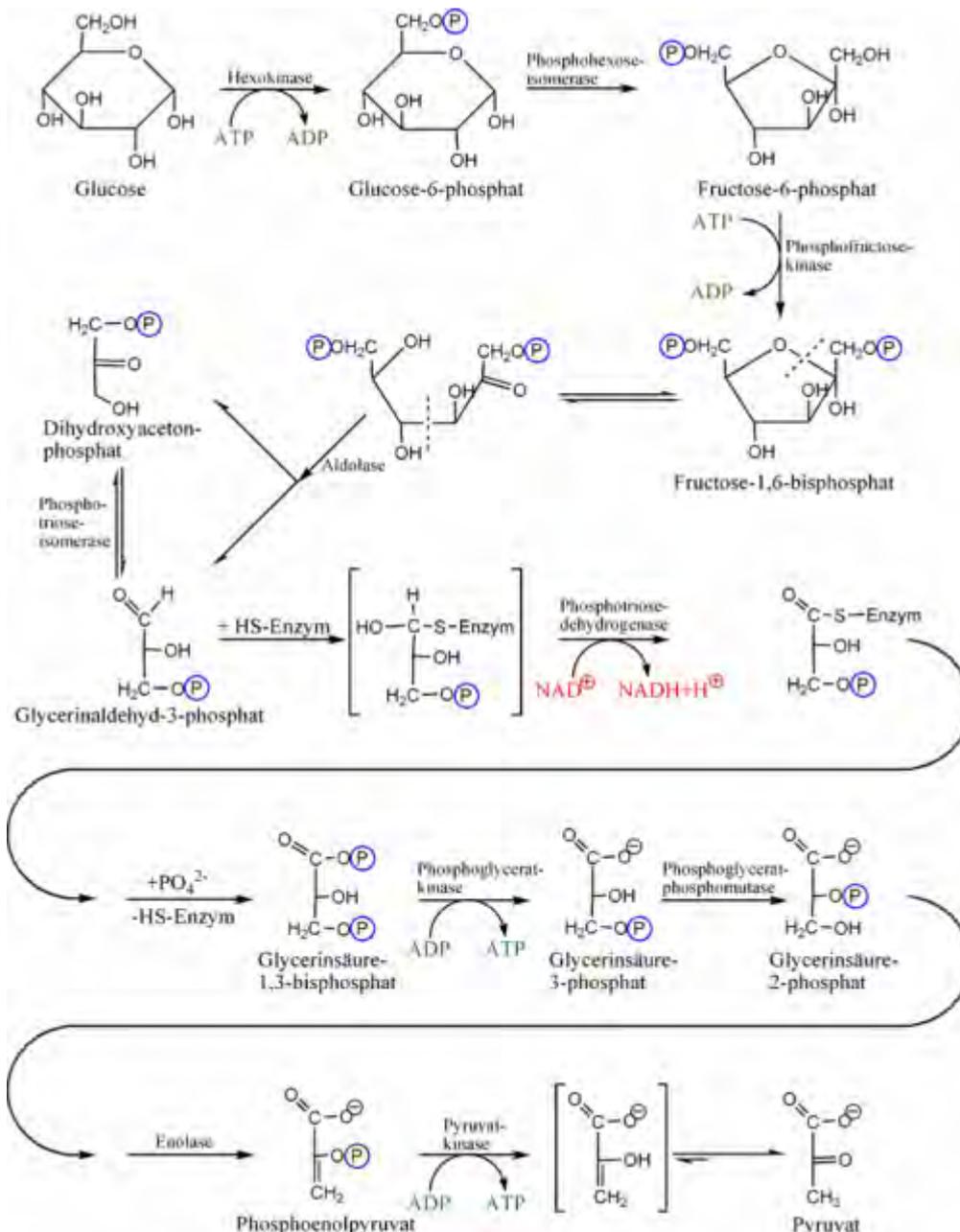


Abbildung 3:

Die Glycolyse

2.3.2 Die Rolle der Tumor M2-Pyruvatkinase (Tumor M2-PK) im Tumor-Stoffwechsel

Verschiedene Gewebearten unseres Körpers exprimieren verschiedene Isoenzymformen der Pyruvatkinase – also des Schlüsselenzyms des Glucosestoffwechsels, welches im Rahmen der Glycolyse den letzten Energie-liefernden Schritt katalysiert: nämlich die Umwandlung des Glycolyse-Zwischenproduktes Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat.

Gewebe, in welchen binnen kürzester Zeit grosse Mengen Energie benötigt werden, exprimieren das Pyruvatkinase-Isoenzym vom Typ M1 (M1-PK). Dieses findet sich z.B. in Gehirn und Muskel. Das Isoenzym vom Typ L (L-PK) lässt sich in der Leber und den proximalen Nierentubuli nachweisen. In diesen Organen wird Glucose nicht abgebaut, sondern wird aus anderen Stoffwechselprodukten neu gebildet (= Gluconeogenese). Der Typ R (R-PK) findet sich in Erythrozyten.

Der Isoenzym-Typ M2 (M2-PK) findet in der Lunge, jedoch auch in sämtlichen proliferierenden Zellen wie Embryonalzellen, Stammzellen, adulten normal proliferierenden Zellen und insbesondere in Tumorzellen.

Im Rahmen der Tumorentstehung kommt es zu einem Wechsel im Isoenzymmuster und hierbei zu einem Verschwinden der oben aufgelisteten gewebsspezifischen Isoenzyme. Gleichzeitig findet eine Überexprimierung des Typs M2 (M2-PK) statt[2].

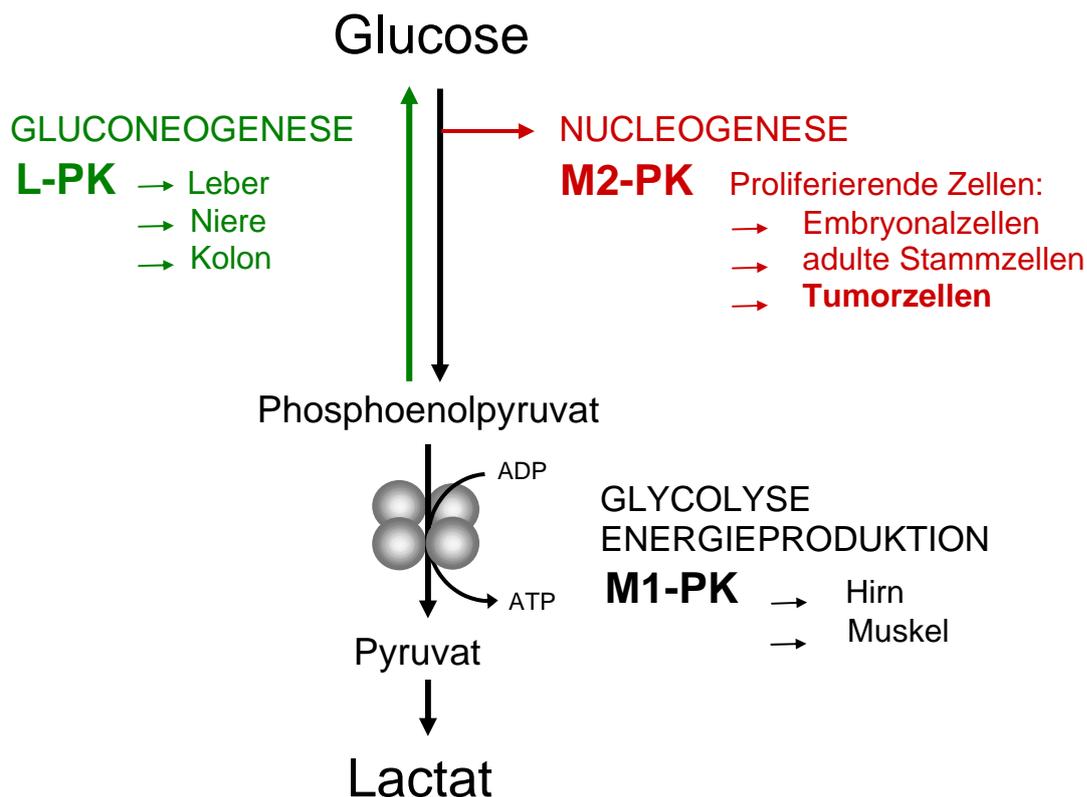


Abbildung 4:

Die Isoenzyme der Pyruvatkinase

Die M2-PK existiert in 2 verschiedenen Isoformen: in einer tetrameren Form, welche aus 4 identischen Untereinheiten zu je 60 kDA besteht und die biologisch hochaktive Form mit hoher Affinität zu PEP darstellt. Diese Isoform ist mit anderen Glycolyse-Enzymen (Hexokinase, Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase, Phosphoglyceromutase, Enolase, Lactatdehydrogenase, Nucleotidiphosphatkinase, Adenylatkinase, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und des weiteren Komponenten wie RAF, MEK und ERK) im so genannten Glycolyse-Enzym-Komplex assoziiert und gewährleistet eine effektive Umsetzung der Glucose. Liegt die M2-PK in dieser hochaktiven Form vor, so wird Glucose unter Produktion von Pyruvat und Lactat in Energie verwandelt. Die Konzentration von ADP und GDP (= Substrate der Pyruvatkinase) ist niedrig, gleiches gilt für die Konzentration von Phosphometaboliten (= Zwischenprodukte der Glycolyse), die Rate der Syntheseprozesse und die Konzentrationen von UTP und CTP, welche für die Nucleosynthese notwendig sind. Es lassen sich jedoch hohe Konzentrationen von ATP und GTP nachweisen, welche Stoffwechselprodukte der Pyruvatkinase-Reaktion darstellen. Das Verhältnis $(ATP+GTP) : (UTP+CTP)$ ist hoch [2,28,³¹].

Eine andere Isoform ist die dimere Form, welche lediglich aus zwei identischen Untereinheiten zu je 60 kDA besteht. Unter physiologischen Bedingungen weist sie bei niedriger Affinität zu PEP eine verschwindend geringe Aktivität auf und ist nicht im Glycolyse-Enzym-Komplex assoziiert. Dies führt umgekehrt zu niedrigen Konzentrationen von ATP und GTP und hohen Konzentrationen von ADP und GDP, Phosphometaboliten und vermehrten Syntheseprozessen, die Konzentrationen von UTP und CTP steigen. Das Verhältnis $(ATP+GTP) : (UTP+CTP)$ ist niedrig[2].

Somit hat die Quartärstruktur der Pyruvatkinase erhebliche Auswirkungen auf die Utilisation der Glucose. Letztere wird bei Vorliegen des hochaktiven Tetramers in normal proliferierenden Zellen unter Energiegewinnung zu Pyruvat und Lactat abgebaut. In Tumorzellen jedoch überwiegt die dimere und somit nahezu inaktive Isoform, weshalb man ihr den Namen „Tumor M2-PK“ verlieh[2].

Tetramere Form

Dimere Form

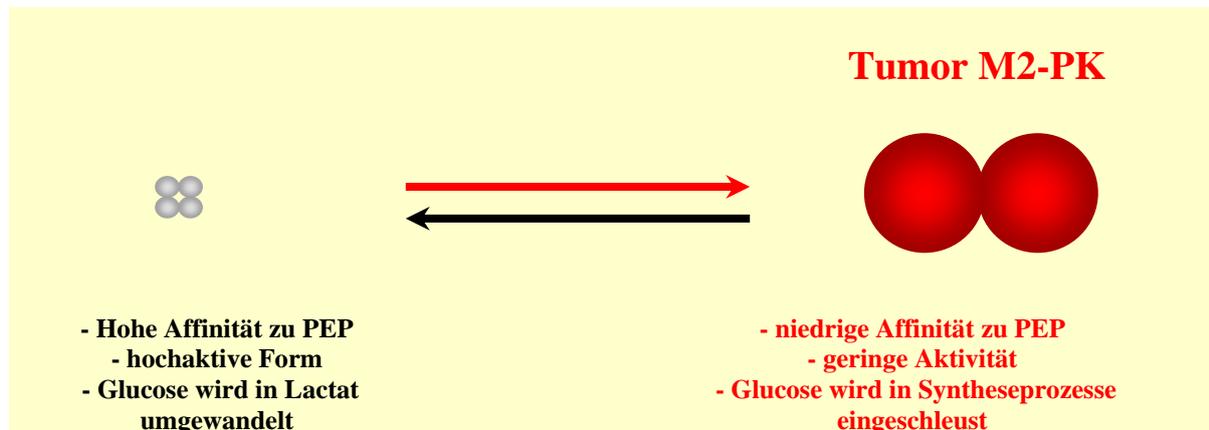


Abbildung 5:

Tetramer und Dimer der M2-Pyruvatkinase

Durch die Inaktivierung des letzten Enzyms der Glycolyse – nämlich der Pyruvatkinase – und einem Absinken der Enolase-Aktivität kommt es bei gleichzeitigem Anstieg der Enzymaktivität von Hexokinase und Phosphofruktokinase zwischen Glucose-6-Phosphat und Phosphoenolpyruvat zu einer Expansion sämtlicher Phosphometabolite wie Fructose-1,6-Biphosphat, Ribose-5-P, P-Ribose-P-P, NAD, GTP, CTO, UTP, UDP-Glucose und Glycerol-3-Phosphat. Dies machen sich die Tumorzellen zunutze, indem sie die angefallenen Zwischenprodukte als Ausgangsstoffe für die Synthese von RNS, DNS, Aminosäuren, Kohlenhydraten und Phospholipiden verwenden. Da die Akkumulation besagter Metabolite nicht nur den aktuellen Bedarf der Tumorzelle deckt, sondern auch eine Vorratsfunktion für einen gewissen Zeitraum gewährleistet, führte man hier den Begriff des „Metabolic Budget Systems“ ein[31].

Die Energiegewinnung findet über den alternativen Weg der Glutaminolyse statt – in Tumorzellen werden in Anwesenheit von Sauerstoff ca. 60% des Energiebedarfs aus der Umsetzung von der glucoplastischen Aminosäure Glutamin zu Lactat gedeckt. Hierbei wird Glutamin durch einen Aktivitätsanstieg der NADP-abhängigen glutaminolytischen Enzyme Isocitratdehydrogenase und Malatenzym unter der Produktion von NADPH über Pyruvat in Lactat umgewandelt[30].

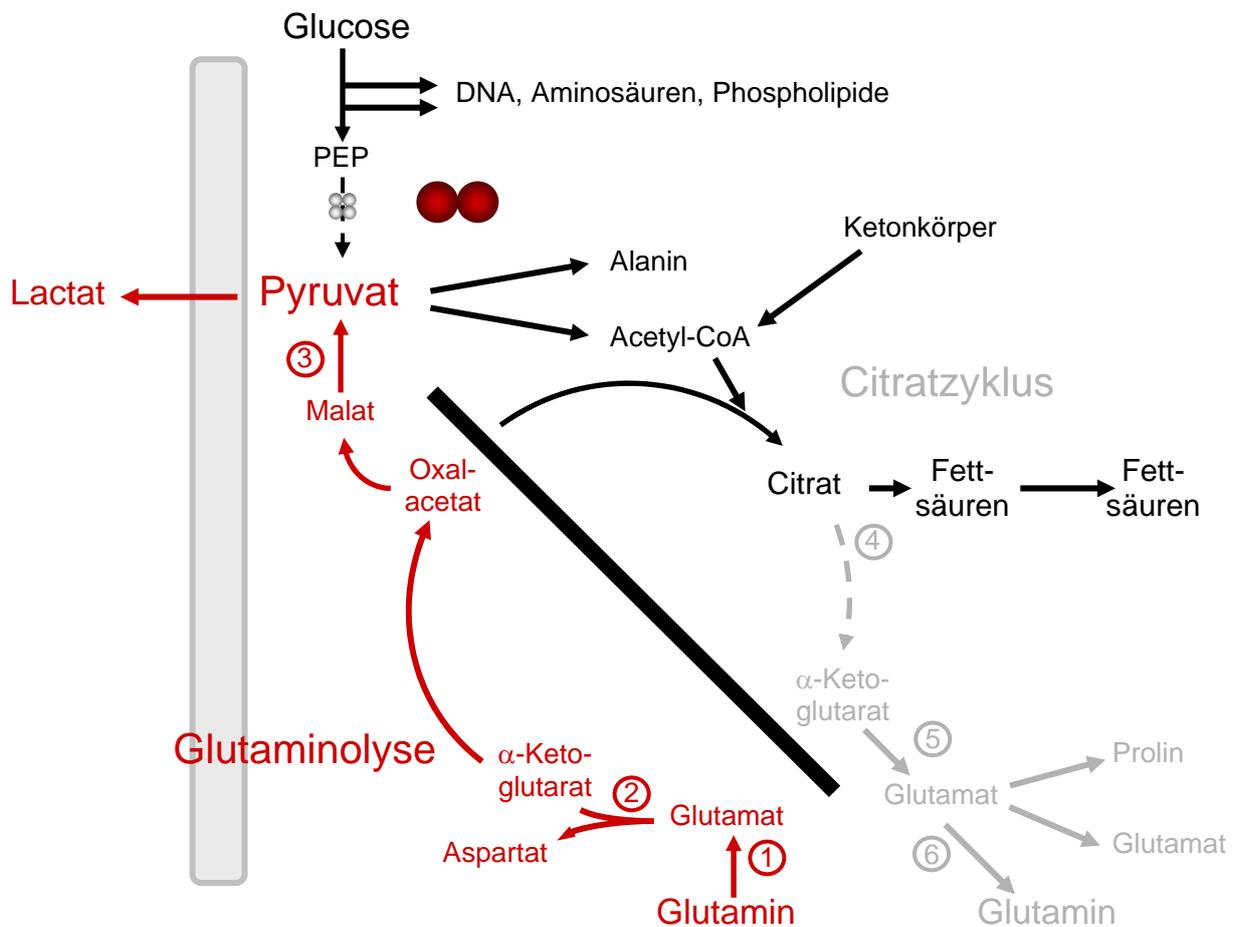


Abbildung 6:
Glutaminolyse

Die Glutaminolyse benötigt im Gegensatz zur Glycolyse Sauerstoff. Kommt es zu Sauerstoffmangelbedingungen, findet in den Tumorzellen eine Umstellung des Energiestoffwechsels statt. Die Glutaminolyse wird abgeschaltet und die Deckung des Energiebedarfs erfolgt ausschliesslich über die Glycolyse. Somit ist ein Überleben der Tumorzellen auch bei geringer Sauerstoffversorgung gewährleistet[30].

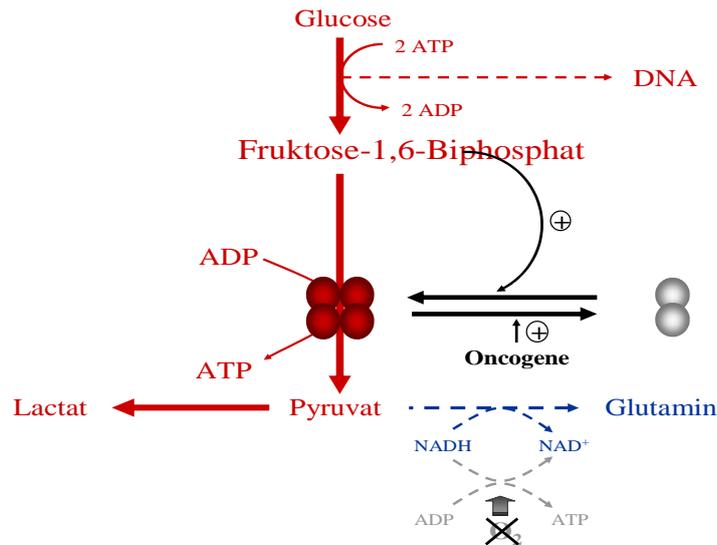


Abbildung 7:

Tumorzelle in Abwesenheit von Sauerstoff

Die inaktive Form der Pyruvatkinase kann binnen 5-10 Minuten in der Zelle erneut in die tetramere und somit aktive Form überführt werden. Bei zunächst inaktiver Pyruvatkinase und ausreichendem Glucose Angebot, kommt es in den Zellen zu einer Akkumulation von Fructose-1,6-Bisphosphat. Dies führt jedoch nicht zu einer negativen feedback-Hemmung des bildenden Enzyms Phosphofruktokinase, sondern zu einer weiterführenden Aktivierung und einem weiteren Anstieg des Fructose-1,6-Bisphosphatspiegels. Die Glycolyse ist somit von der Regulierung durch das in der mitochondrialen Atmung anfallende ATP entkoppelt und es kann trotz der Anwesenheit von Sauerstoff ein erhöhter Durchsatz durch die Glycolyse erfolgen (in normalen Zellen kommt es nur in Abwesenheit von Sauerstoff zu einem Anstieg von Fructose-1,6-Bisphosphat, da das in den Mitochondrien in Anwesenheit von Sauerstoff gebildete ATP die Phosphofruktokinase hemmt)[30].

Der erhöhte Fructose-1,6-Bisphosphatspiegel bewirkt eine Rückführung in die tetramere Form und einen Abbau des angestauten Fructose-1,6-Bisphosphates. Durch einen Abfall des Spiegels wird die Tumor M2-PK erneut in die inaktive Form zurückgeführt und der Zyklus beginnt von vorne[31].

Der Zerfall der tetrameren in die dimere Form wird Dimerisierung genannt und kann durch so genannte Oncoproteine induziert werden. Bei diesen handelt es sich um von Proto-Oncoproteinen abgeleitete Proteine, welche die Fähigkeit besitzen, eine Zelle in eine Tumorzelle umzuwandeln. Proto-Oncoproteine sind normale zelluläre Proteine, welche für

die Regulation der Zellteilung verantwortlich sind. Im Falle einer Mutation werden sie zu besagten Oncoproteinen und führen zu unkontrolliertem Wachstum[2].

Die Induktion einer Dimerisierung konnte für verschiedene Oncoproteine nachgewiesen werden. Hierzu zählt unter anderem das Oncoprotein des Rous Sarcoma-Virus - die pp60v-src-Kinase, welches die M2-Pyruvatkinase an der Aminosäure Tyrosin phosphoryliert[28].

Das E7-Oncoprotein der humanen Papillomaviren Typ 16 (HPV-16) wiederum bindet direkt an die M2-PK und führt hierüber zu einer Dimerisierung. A-raf-Kinase fungiert ebenfalls als Interaktionspartner der M2-PK und ist eine Komponente der Proteinkinasekaskade, also einer Kette von hintereinandergeschalteten Proteinkinasen, welche unabhängig von Wachstumshormonen die Zellteilung steuert und Enzyme aktiviert, welche für die Synthese von Proteinen, RNA und DNA notwendig sind[28].

normal proliferierende Zellen

Tumorzellen

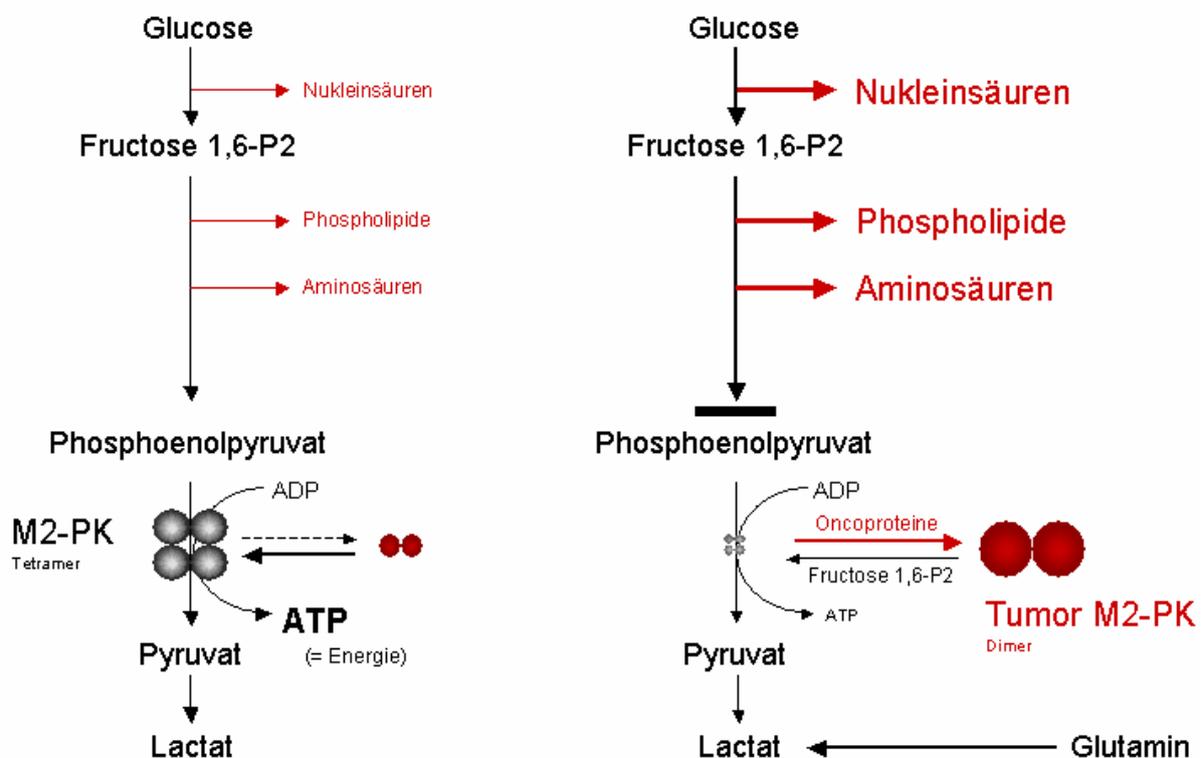


Abbildung 8:

Effekt der tetrameren und dimeren Form auf den Zellstoffwechsel

Des Weiteren wird der Aktivitätszustand der Tumor M2-PK durch diverse Aminosäuren reguliert. So findet durch Aminosäuren wie z.B. Serin, welche für die Synthese von Nukleinsäuren und Phospholipiden notwendig sind, eine Aktivierung der Tumor M2-PK statt, wohingegen andere Aminosäuren wie z.B. Alanin, Prolin, Phenylalanin, Leucin, Valin, Cystein und Isoleucin eine Inaktivierung induzieren. Wie oben beschrieben kann es durch eine Phosphorylierung an der Aminosäure Tyrosin durch die onkogen codierte pp60v-src Tyrosinkinase oder eine durch Wachstumsfaktoren induzierte Phosphorylierung an der Aminosäure Serin zu einer Dimerisierung und somit deutlicher Aktivitätsabnahme der Tumor M2-PK kommen[28].

Nekrose und Zelltod führen zu einem Übertritt der Tumor M2-Pyruvatkinase in das periphere Blut und andere Körperflüssigkeiten. Hier ist es in den vergangenen Jahren gelungen, das Enzym mittels eines kommerziell erhältlichen und auf 2 monoklonalen Antikörpern basierenden sandwich ELISA (= Enzyme-linked immunosorbent assay) Test Kits (ScheBo Biotech AG, Giessen, Deutschland) im peripheren Blut quantitativ nachzuweisen [15]. Als Untersuchungsmaterial verwendet wurde hierfür EDTA-Plasma, welches unter den typischen Klinik- und Laboralltagsbedingungen die am höchsten reproduzierbaren Ergebnisse zutage brachte. Im Gegensatz zu Heparin-Plasma und Serumproben entstanden hierbei z.B. durch Schütteln oder mehrstündige Aufbewahrung bei Raumtemperatur vor dem Zentrifugieren keine falsch hohen Werte^[32]. Die dimere Isoform konnte ebenso in geringen Mengen in normalen proliferierenden Zellen, wie z.B. Lymphozyten am Ende der G1-Phase detektiert werden. Um im Untersuchungsmaterial eine Zerstörung der Lymphozyten und somit einen Austritt der dimeren Form zu verhindern, musste das Probenmaterial zentrifugiert werden^[33]. Diverse klinische Studien haben ergeben, dass die Tumor M2-PK ein ausgesprochen tumorspezifisches Enzym ohne Organspezifität darstellt, welches Aussagen über die Stoffwechselaktivitäten eines Tumors geben kann und keine circadiane Rhythmik aufweist. Klinische Studien liegen aktuell für die Indikationen Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Pankreas- und Kolorektales Karzinom vor. Kombiniert man die Tumor M2-Pyruvatkinase mit traditionellen organspezifischen Tumormarkern wie CEA, CA19-9 oder CA72-4 ergeben sich deutlich höhere diagnostische Sensitivitäten bei Karzinomen von Ösophagus, Magen, Kolon und Rektum^[34].

Erhöhte Tumor M2-PK-Werte im EDTA-Plasma von Patienten ohne maligne Erkrankungen fielen bislang nur in vereinzelt Fällen auf. Nämlich im Rahmen schwerer/akuter oder chronischer Entzündungen wie z.B. im Rahmen einer chronischen Pankreatitis oder beim akuten Schub einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung mit starker intestinaler Zellproliferation [35]. Hier korrelierten die Werte jedoch nicht mit dem C-reaktiven Protein oder klinischen Aktivitätsscores wie dem SAI-Index. Ebenfalls bestanden erhöhte Tumor M2-PK-Werte nach Polytrauma, wobei dies am ehesten auf eine vermehrte Aktivierung der Granulozyten zurückzuführen ist, welche die Pyruvatkinasespiegel posttraumatisch bis zu 20-fach erhöhen können[36].

Neben einem neuen ergänzenden Diagnostikum im Rahmen der Krebserkennung, zeigte sich des Weiteren eine Eignung zur Überwachung von Krankheitsverläufen und Therapieerfolgen. Unter anderem konnten klinische Studien zum Erfolg einer Trastuzumabtherapie bei Mammakarzinom eine deutliche Korrelation zwischen dem Erfolg einer Chemotherapie und fallenden Tumor M2-PK-Spiegeln aufweisen[37]. Ein normaler oder rasch absinkender Plasmaspiegel scheint z.B. eine gute prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf eine Chemotherapie bei fortgeschrittenem Mammakarzinom zu haben[38]. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich im Rahmen von Untersuchungen an Patienten mit Bronchialkarzinom – auch hier konnte aufgezeigt werden, dass die Tumor M2-PK ein sehr sensibler Marker ist, der sich zur Verlaufsbeurteilung unter Chemotherapie eignet[39, 40].

Basierend auf dieser Datenlage und der Tatsache, dass ein Grossteil der gastrointestinalen Tumoren intraluminal wächst, stellte sich die Frage, ob ein Nachweis des besagten Enzyms auch in Stuhlproben von Tumorpatienten nachweisbar ist. Nach Modifikation des ELISA-Tests konnte Tumor M2-Pyruvatkinase tatsächlich im Stuhl nachgewiesen werden und es zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen Karzinompatienten und endoskopisch unauffälligen Kontrollpersonen, gleiches gilt für die Differenzierung zwischen Patienten mit Polypen und Kontrollpatienten[15]. Die höchsten Konzentrationen wurden bei kolorektalen Karzinomen beobachtet. Für Kolonkarzinome ergab sich bei einem Cut-Off von 4 U/ml eine Sensitivität von 83%, für Rektumkarzinome lag sie bei 73%. Die Gesamtspezifität für kolorektale Karzinome liegt somit bei 82%, die Gesamtsensitivität bei 79% und somit deutlich höher als bei dem bislang etablierten Screeningtest auf okkultes Blut im Stuhl, dessen Sensitivität deutlich unter 30% liegt[41].

3.0 Materialien und Methoden

3.1 Patienten

Insgesamt wurden 154 Patienten in die Studie eingeschlossen. Davon wiesen 28 Personen ein kolorektales Karzinom auf, 29 Probanden ein oder mehrere adenomatöse Polypen des Kolons/Rektums und 97 Teilnehmer fungierten als Kontrollgruppe. Von den insgesamt 154 Teilnehmern waren 62 Männer und 92 Frauen, das Durchschnittsalter betrug bei einer Spannweite von 22 Jahren bis 89 Jahren insgesamt 58,6 Jahre, bei den Frauen 58,3 Jahre, bei den Männern 59,2 Jahre.

In der Gruppe der 28 kolorektalen Karzinome fanden sich 16 Karzinome des Kolons (10 Männer und 6 Frauen, Durchschnittsalter 68,8 Jahre, Männer 66,7 Jahre, Frauen 72,3 Jahre) und 12 Karzinome des Rektums (8 Männer und 4 Frauen, Durchschnittsalter 67,6 Jahre, Männer 64,1 Jahre, Frauen 74,5 Jahre).

Metastasen fanden sich bei insgesamt 28 Karzinompatienten in 18 Fällen (13 Männer und 5 Frauen).

In Anlehnung an das TNM-System wurden 2 Patienten in Stufe I, 8 in Stufe II, 8 in Stufe III und 10 in Stufe IV eingruppiert.

In Anlehnung an die Dukes-Klassifikation befanden sich 2 Patienten im Stadium Dukes A, 8 im Stadium Dukes B, 8 im Stadium Dukes C und 10 Patienten im Stadium Dukes D.

Histologisch fanden sich in sämtlichen 28 Fällen Adenokarzinome.

In der Gruppe der 29 Adenompatienten waren 20 Männer und 9 Frauen (Durchschnittsalter insgesamt 62,6 Jahre, Männer 61,5 Jahre, Frauen 64,9 Jahre).

Bezüglich der Histologie zeigten sich 16 tubuläre Adenome (10 Männer und 6 Frauen, Durchschnittsalter 60,2 Jahre, Männer 58,1 Jahre, Frauen 63,7 Jahre), 12 tubulo-villöse Adenome (9 Männer und 3 Frauen, Durchschnittsalter 67,3 Jahre, Männer 67,3 Jahre, Frauen 67,3 Jahre) und 1 villöses Adenom (männlich, 43 Jahre).

In Anlehnung an die modifizierte Wien-Klassifikation fielen von den insgesamt 29 Adenompatienten 0 in Kategorie 1, 0 Patienten in Kategorie 2, 27 in Kategorie 3, 2 in Kategorie 4 und 0 Patienten in Kategorie 5.

15 von 29 Patienten wiesen eine Adenomgröße < 1 cm auf, 14 Personen zeigten Adenomgrößen von 1 cm oder mehr (multiple Adenome < 1 cm wurden ebenfalls in die Gruppe > 1 cm gerechnet).

In der Kontrollgruppe befanden sich insgesamt 97 Personen, davon 24 Männer und 73 Frauen, das Durchschnittsalter betrug allgemein 54,7 Jahre, bei Männern 52,5 Jahre, bei Frauen 55,4 Jahre.

Bei diesen Personen handelte es sich um Patienten aus einem internistisch-gynäkologischem Kollektiv, die zum Untersuchungszeitpunkt weder eine akute Entzündung noch ein Malignom aufwiesen, bei denen kein Karzinomverdacht bestand und auch im Verlauf bis dato unter follow-up-Kontrollen keine Entwicklung eines malignen Geschehens dokumentiert werden konnte.

Eine Genehmigung der Untersuchung wurde von der Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Giessen am 06.11.2000 (Antrag 93/00) erteilt.

Alle beteiligten Patienten gaben nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung in die Teilnahme an dieser Studie. Gleichzeitig wurden klinische Daten mit Standardfragebögen erhoben. Die personenbezogenen Daten wurden allesamt vertraulich und entsprechend den Datenschutzvorschriften behandelt.

Gemäß den Ein- und Ausschlusskriterien des Studienprotokolls lagen zum Abgabezeitpunkt der natürlich abgesetzten Stuhlproben keine bekannten Zweitkarzinome, Infekte oder akuten, bzw. chronischen Entzündungen vor.

3.2 Stadieneinteilung und Grading

Zur genauen Beschreibung der Tumorausbreitung und Differenzierungsgrade bedient man sich verschiedener Klassifikationssysteme.

3.2.1 Die TNM-Klassifikation

Die Anatomische Ausbreitung wird mittels folgender 3 Kriterien bestimmt:

- **T** (= Tumor); charakterisiert die kontinuierliche lokale Tumorausbreitung am Entstehungsort und gibt Größe / Ausdehnung an (welche Organteile sind betroffen, Organ Grenzen überschritten, angrenzende Strukturen infiltriert?)
- **N** (=Nodes); dient der Erfassung von Metastasen in regionären Lymphknoten, d.h. in denjenigen Lymphknoten, die dem Organ nächstgelegenen sind und bei einer Radikaloperation entfernt werden können.
- **M** (=Metastases); hierzu zählen Metastasen jenseits der regionären Lymphknoten, Metastasen in serösen Höhlen (Pleura-/Peritonealkarzinose) und hämatogene Filiae [6].

T-	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Gewebe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
N-	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenfiliae
N1	Metastasen in 1 – 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N3	Metastasen entlang eines benannten Gefäßstammes und/oder apikale Lymphknotenmetastasen
M-	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1:

Klinische TNM-Klassifikation kolorektaler Karzinome (gemäß UICC 1997)

Des Weiteren kann in Anlehnung an das TNM-System eine Stadieneinteilung erfolgen, welche sich wie folgt gestaltet [6]:

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Stadium II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	N1	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2:

Klinische TNM-Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome (gemäß UICC 1997)

Die zusätzliche Angabe der so genannten **R**-Klassifikation bezieht sich darauf, ob nach chirurgischer Therapie noch Resttumorgewebe vorhanden ist oder eine vollständige Entfernung möglich war. Sie basiert somit sowohl auf klinischen als auch auf histopathologischen Daten [6].

R0: Kein Resttumorgewebe diagnostizierbar, kein Hinweis auf Filiae, Therapie somit als kurativ zu betrachten

R1: Mikroskopischer Nachweis von Resttumorgewebe, beispielsweise an den Resektionsrändern

R2: Makroskopisch Resttumorgewebe erkennbar, beispielsweise bei nicht resezierbaren Lebermetastasen

3.2.2 Die Dukes-Klassifikation

1932 etablierte Cuthbert Dukes eine Einteilung des kolorektalen Karzinoms, welche sich maßgeblich an der Infiltrationstiefe in die Darmwand und die regionale lymphogene Metastasierung anlehnt^[42, 43].

Dukes A	Infiltration von Mukosa, Submukosa und Muscularis propria (= T1 und T2)
Dukes B	Infiltration von perirektalem Fettgewebe (= ab T3)
Dukes C	Regionale Lymphknotenmetastasen oder Infiltration der Umgebung (= ab N1)
Dukes D	Fernmetastasen (= ab M1)

Tabelle 3:

Tumorstadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach Dukes

3.2.3 Grading

Diese histopathologische Einteilung des kolorektalen Adenokarzinoms orientiert sich nach Vorschlägen der WHO an dem Ausmaß der Tumordifferenzierung. Man unterscheidet hoch, mittel, niedrig und undifferenzierte Karzinome. Der Malignitätsgrad findet seine Bestimmung in Anlehnung an Kriterien wie Drüsenbildung, Kernpolymorphien und Mitosen. Vom Malignitätsgrad 1 spricht man, wenn sich eine durchgehende Drüsenbildung mit überwiegend hohen Zylinderzellen ohne Kernpolymorphien zeigt. Malignitätsgrad 3 liegt vor, wenn starke Kernpolymorphie und reichlich Mitosen vorhanden sind oder aber wenn das Karzinom vorwiegend solides (nicht-drüsenbildendes) Wachstum aufweist. Grad 2 besteht, wenn weder Grad 1 noch Grad 3 vorliegt. Von Grad 4 spricht man, wenn undifferenziertes Tumorgewebe vorliegt. Die Malignitätsgrade 1 und 2 gelten als niedrig maligne (= low grade), Grad 3 und 4 hingegen als hochmaligne (= high grade) [6].

Differenzierung	Differenzierungsgrad	Malignitätsgrad
Hoch differenziert	G1 low grade	niedrig
Mittel differenziert	G2 low grade	niedrig-mittel
Niedrig differenziert	G3 high grade	hoch
Undifferenziert	G4 high grade	hoch

Tabelle 4:

Tumordifferenzierungsgrad (Grading)

Das Grading hat eine grosse klinische Relevanz, da es Hinweise auf die Prognose und auch auf die Tumorausbreitung zum Diagnosezeitpunkt gibt. So haben niedrig differenzierte Karzinome eine deutlich schlechtere Prognose als hoch differenzierte. Sie sind fast nie auf die Submukosa begrenzt, sondern haben in ca. 30% der Fälle die Serosa erreicht oder die Umgebung infiltriert. Bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom des Malignitätsgrades 1

finden sich in ca. 25% der Fälle lymphogene Metastasen, beim Malignitätsgrad 3 steigt dieser Prozentsatz auf ungefähr 80% [6].

3.2.4. Einteilung der Adenome

Die Einteilung der Adenome kann unter verschiedenen Gesichtspunkten vorgenommen werden.

a) Makroskopische Aspekte

Hierbei unterscheidet man verschiedene Arten des Wachstums

Adenomtyp	Wachstumsform	Häufigkeit	Adenomgröße	Karzinomrisiko
Tubulär	gestielt	70%	< 1cm	1%
			1 – 2 cm	10%
			> 2cm	10-50%
Villös	breitbasig	20%	größenabhängig	20-50%
Tubulo-villös	Mischform zwischen gestielt und breitbasig	10%	größenabhängig	20-50%

Tabelle 5:

Einteilung der Adenome nach makroskopischen Aspekten

b) Mikroskopische Aspekte

Die epithelialen Neoplasien des Gastrointestinaltraktes teilte man früher nach einem Vorschlag der WHO in niedrig-, mittel- und hochgradige Dysplasien ein.

Heutzutage verwendet man die so genannte:

„Modifizierte Wien-Klassifikation der gastrointestinalen epithelialen Neoplasien“

Kategorie 1	Keine Neoplasie
Kategorie 2	„indefinite“ für Neoplasie (d.h. fragliche Neoplasie)
Kategorie 3	geringgradige intraepitheliale Neoplasie (mucosal low grade intraepithelial neoplasia LGIN) (low-grade Adenom / leichte Dysplasie)
Kategorie 4	Hochgradige intraepitheliale Neoplasie (mucosal high grade intraepithelial neoplasia HGIN)
4.1	High grade Adenom / schwere Dysplasie

	(hochgradige intraepitheliale Neoplasie HGIN)
4.2	Nichtinvasives Karzinom (Carcinoma in situ)
4.3	Verdacht auf invasives Karzinom
4.4	Intramucosales Karzinom
Kategorie 5	Submucosales invasives Karzinom (d.h. Karzinom mit Invasion der Submucosa oder tieferer Schichten) Nach der Infiltrationstiefe in die Submucosa wird hier nach sm1, sm2 und sm3 unterschieden

Tabelle 6:

Modifizierte Wien-Klassifikation der gastrointestinalen Neoplasien

Adenome, welche früher in Anlehnung an die alte WHO-Klassifikation niedrig- bis mittelgradige Dysplasien aufwiesen, fallen nun in Kategorie 3. Solche mit hochgradigen Dysplasiegraden werden nun in die Kategorie 4 eingruppiert^[44].

3.3 Probenmaterial und Test

3.3.1 Probengewinnung und -verarbeitung

Ausreichend für die weitere Austestung ist eine ungefähr erbsengroße, geformte Stuhlprobe, welche direkt nach Gewinnung bis zur Verarbeitung im Labor einer lückenlosen Kühlkette zugeführt wurde. Die nativen Stuhlproben weisen bei 4 – 8 Grad Celsius eine Haltbarkeit von 24 Stunden auf, bei Temperaturen von -20 Grad Celsius liegt die Haltbarkeit bei bis zu 4 Wochen. Die Einhaltung einer besonderen Diät war für die Probanden nicht vonnöten. Die anschließende Probenverarbeitung erfolgte in Anlehnung an die Testanleitung des Herstellers [45].

3.3.2 Testprinzip

Der so genannte sandwich ELISA (= Enzyme-linked immunosorbent assay)-Test basiert auf 2 monoklonalen Antikörpern, welche hochspezifisch für die Tumor M2-PK sind und keine Kreuzreaktion mit anderen Isoenzymen der Pyruvatkinase (Typ L, R, M1 und M2) aufweisen. Die ELISA-Platte ist zunächst mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der nur das Isoenzym der humanen Pyruvatkinase vom Typ Tumor M2 erkennt. Tumor M2-PK wird nun durch Bindung an besagtem Antikörper immobilisiert und es erfolgt im Anschluss eine Inkubation mit einem zweiten monoklonalen Antikörper gegen die Tumor M2-PK. Dieser

Antikörper ist biotinyliert und reagiert in der nächsten Inkubation mit dem Konjugat von Streptavidin und Peroxidase. Letztere ist in der Lage, das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu oxidieren, welches anschließend photometrisch bestimmt werden kann. Der Testkit erlaubt die Bestimmung der Tumor M2-PK im Messbereich von 1 – 30 IU/ml. Die Intraassay-Varianz wurde durch 18-fache Bestimmung von 5 Proben (5-66 U/ml) ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient (VK) lag bei 7,9% (3,5-13,6). Die Interassay-Varianz wurde anhand von 5 Stuhlproben (4-73 U/ml), die an 10 verschiedenen Tagen bestimmt wurden, berechnet. Der mittlere VK lag bei 7,3% (3,8-12,6%)[⁴⁵].

3.3.3 Testvorbereitungen und -durchführung

Verwendung findet hier der kommerziell erhältliche Testkit der Firma ScheBo Biotech AG, Giessen, Deutschland. Des Weiteren benötigt werden Einwegröhrchen zur Proben- und Reagenzverdünnung (3 und 10 ml), ein 500 ml Messzylinder, Vortex-Mixer, verstellbare Präzisionspipetten für 0-50 µl, 50-200 µl und 200-1000 µl, Pipetten (2 ml, 5 ml und 10 ml), eine verstellbare 8-Kanal-Pipette 50-250 µl und ein Mikroplattenreader mit 450 nm Filter (Referenzwellenlänge 620 nm).

Im Rahmen der Vorbereitungen sollte zunächst der Proben-/Waschpuffer hergestellt werden, indem 100ml Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,2 mit Detergenz) mit 400 ml destilliertem H₂O vermischt werden. Die eingeschweißte ELISA-Platte weist 96 Vertiefungen auf und ist vor dem Öffnen auf Raumtemperatur zu bringen. Die Vorbereitung der Stuhlproben bietet 2 Möglichkeiten:

a) die Einwiegemethode; hierbei wird zunächst der Extraktionspuffer hergestellt, indem 100 ml Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,2 mit Detergenz und Natriumazid) mit 400 ml H₂O vermischt werden. Anschließend folgt das Einwiegen der Stuhlprobe. Ein ca. 12 ml umfassendes Einwegröhrchen und eine mikrobiologische Impföse werden mit einer empfindlichen digitalen Laborwaage auf Null austariert. Hinterher wird der Stuhl mit der Impföse eingewogen, indem man mit der Öse in die Stuhlprobe sticht und die an der Spitze verbleibende Stuhlmenge (ca. 100 mg) in das Einwegröhrchen einbringt. Entsprechend der gewogenen Stuhlprobenmasse werden die Volumina des zuzugebenden Extraktionspuffers variiert (z.B. 100 mg Stuhl + 10 ml Puffer oder 150 mg Stuhl und 15 ml Puffer). Die Stuhlprobensuspension wird bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt und mit einem Reagenzglasschüttelgerät gemixt. Die Stühle müssen gut homogenisiert sein, um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten. Nach mindestens 15 Minuten Extraktion wird noch einmal abschließend gemixt. Das Extrakt wird 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen

gelassen, der Überstand abgenommen um im Test verdünnt eingesetzt. Hierzu verwendet man 50 µl Stuhlprobenextrakt und 450 µl Proben-/Waschpufferlösung [45].

b) die Methode mittels Tumor M2-PK Quick-Prep (empfohlene Methode); hierbei handelt es sich um ein ebenfalls kommerziell erhältliches Probenvorbereitungssystem der Firma ScheBo Biotech AG. In diesem ist der Extraktionspuffer bereits gebrauchsfertig in einem Röhrchen enthalten und muss dementsprechend nicht angefertigt werden. Der Testanleitung folgend wird eine zuvor definierte Stuhlmenge mittels einer speziell entwickelten Dosierspitze in den Extraktionspuffer befördert und der Stuhlprobenextrakt im Verhältnis 1:3 verdünnt (100 µl Stuhlprobenextrakt + 200 µl Proben-/Waschpuffer)[45].

Zuletzt erfolgt als vorbereitender Schritt die Verdünnung des zweiten monoklonalen Antikörpers (namentlich: anti Tumor M2-PK bio).

Nun schließt sich die eigentliche Testdurchführung an. Hierzu werden die im Testkit enthaltenen Standards mit Mengen zu je 50 µl in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert (Standard 1=1,0 IU/ml; 2=3,5 IU/ml; 3=10 IU/ml; 4=30 IU/ml), gleiches gilt für die Kontrollen (=4,5 IU/ml). In die verbleibenden Vertiefungen können nun jeweils 50 µl der verdünnten Patientenstuhlproben pipettiert werden. Ein mögliches Pipettierschema wäre folgendes [45]:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
B	Std1	Std1	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
C	Std2	Std2	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37
D	Std3	Std3	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38
E	Std4	Std4	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39
F	Ko	Ko	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	P40	P40
G	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33	P41	P41
H	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34	P42	P42

Tabelle7:

Mögliches Pipettierschema

Std = Standards; Ko = Kontrolle; P1-42 = Patientenproben

Nach Inkubationszeit von 60 Minuten wird der Inhalt der Vertiefungen verworfen und dreimal eine Waschung mittels Proben-/Waschpuffer (250 µl/Vertiefung) vorgenommen. Einwirkzeit von jeweils mindestens 1 – 2 Minuten, Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf sauberen Papiertüchern vollständig entfernen.

Nun folgt die Inkubation mit dem biotinylierten zweiten monoklonalen Antikörper (50 µl pro Vertiefung) und eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Nach Ablauf dieser Zeitspanne erneutes Verwerfen des Inhaltes der Vertiefungen und dreimaliges Waschen mit je 250 µl Proben-/Waschpuffer.

In jede Vertiefung werden 50 µl gebrauchsfertige POD-Streptavidin-Lösung pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation im abgedunkeltem Raum erneutes Verwerfen der Flüssigkeitsreste und dreimaliges Waschen mit je 250 µl Proben/Waschpufferlösung.

Pro Vertiefung werden nun 100 µl der aus TMB bestehenden Substratlösung pipettiert, dann im abgedunkelten Raum 15 Minuten inkubieren lassen. Nach Abstoppen der Farbreaktion durch 100 µl wässrige saure Lösung kann nun die photometrische Messung der optischen Dichte vorgenommen werden. Diese erfolgt bei 450 nm zwischen 5 und 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung.

Die quantitative Auswertung kann entweder computergestützt mittels ELISA-Software oder manuell erfolgen. Hierfür wird nach Subtraktion des Blank-Mittelwertes der Mittelwert der Absorption der Doppelwerte berechnet. Die Konzentration der Standards (Abszisse) wird gegen ihre Absorption (Ordinate) aufgetragen und die Werte der Patientenproben direkt an dieser Standardkurve abgelesen.

Werte oberhalb 4 IU/ml gelten als erhöht; bei diesem Cut-Off beträgt die Sensitivität 85%, die Spezifität 83%.

Störfaktoren können bedingt durch einen Verdünnungseffekt wässrige Stühle sein [45].

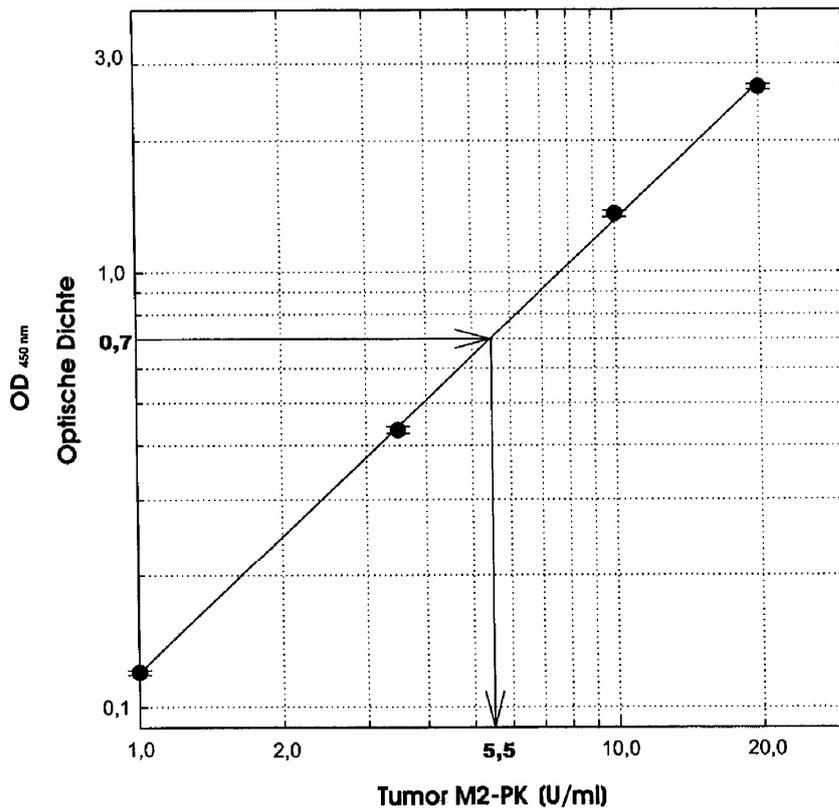


Abbildung 9:
Beispiel einer Standardkurve

4.0 Statistik

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden zunächst Fallzahl, Summe, Varianz, Mittelwert, Standardabweichung, kleinster und größter Wert, Spannweite sowie Median mit Interquartilsabstand als parametrische und nichtparametrische statistische Kenngrößen der spezifizierten Untersuchungsvariablen berechnet.

Zur Beurteilung von Gruppenunterschieden von nicht-normal verteilten Zielgrößen wurden nichtparametrische Tests verwendet.

Für den 2-Gruppenvergleich wurde deshalb der zweiseitige Wilcoxon-Test und für den Mehrgruppenvergleich der Kruskal-Wallis-Test herangezogen, letzterer ebenfalls zweiseitig. Statistische Signifikanz wurde bei einer zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angenommen.

5.0 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten von insgesamt 154 Patienten ausgewertet, davon befanden sich 28 Personen in der Gruppe der kolorektalen Karzinome, 29 Personen hatten einen oder mehrere adenomatöse Polypen des Kolons/Rektums und 97 Teilnehmer fungierten als karzinomfreie und unauffällige Kontrollgruppe.

Die insgesamt 154 Teilnehmer zeigten eine Aufteilung in 62 Männer und 92 Frauen, das Durchschnittsalter betrug bei einer Spannweite von 22 Jahren bis 89 Jahren im gesamten Kollektiv 58,6 Jahre, bei den Frauen 58,3 Jahre, bei den Männern 59,2 Jahre.

In der Gruppe der 28 kolorektalen Karzinome fanden wir 16 Karzinome des Kolons (10 Männer/6 Frauen, Durchschnittsalter gesamt betrachtet: 68,8 Jahre; Durchschnittsalter geschlechterspezifisch: Männer 66,7 Jahre/Frauen 72,3 Jahre) und 12 Karzinome des Rektums (8 Männer/4 Frauen, Durchschnittsalter gesamt betrachtet: 67,6 Jahre; Durchschnittsalter geschlechterspezifisch: Männer 64,1 Jahre/Frauen 74,5 Jahre).

Metastasen fanden sich bei insgesamt 28 Karzinompatienten in 18 Fällen (13 Männer und 5 Frauen).

In Anlehnung an das TNM-System wurden 2 Patienten in Stufe I, jeweils 8 in Stufe II + III und 10 Patienten in Stufe IV eingruppiert.

In Anlehnung an die Dukes-Klassifikation befanden sich 2 Patienten im Stadium Dukes A, 8 im Stadium Dukes B, 8 im Stadium Dukes C und 10 Patienten im Stadium Dukes D.

Histologisch fanden sich in sämtlichen 28 Fällen Adenokarzinome. Betrachtet man die Differenzierungsgrade, zeigte sich in lediglich einem Fall ein hochgradig-differenziertes Adenokarzinom, in den übrigen Fällen bot sich ein mindestens mittelgradig- differenziertes Adenokarzinom (20 Fälle) oder gar niedrig-differenziertes Adenokarzinom (5 Fälle). Ein Patient wies ein extraplasmatisch verschleimendes, ein weiterer ein muzinöses Adenokarzinom auf.

In der Gruppe der 29 Adenompatienten befanden sich 20 Männer und 9 Frauen (Durchschnittsalter gesamt betrachtet: 62,6 Jahre; Durchschnittsalter geschlechterspezifisch:

Männer 61,5 Jahre/Frauen 64,9 Jahre). Bei jedem der Patienten wurde eine totale Koloskopie nebst Polypektomie und histologischer Aufarbeitung der Biopsate durchgeführt.

Bezüglich der makroskopischen Aspekte zeigten sich 16 tubuläre Adenome (10 Männer/6 Frauen, Durchschnittsalter gesamt betrachtet: 60,2 Jahre; Durchschnittsalter geschlechterspezifisch: Männer 58,1 Jahre/Frauen 63,7 Jahre), 12 tubulo-villöse Adenome (9 Männer/3 Frauen, Durchschnittsalter gesamt betrachtet: 67,3 Jahre; Durchschnittsalter geschlechterspezifisch: Männer 67,3 Jahre/Frauen 67,3 Jahre) und 1 villöses Adenom (männlich, 43 Jahre).

In Anlehnung an die modifizierte Wien-Klassifikation konnten die meisten der insgesamt 29 Adenompatienten in Kategorie 3 eingruppiert werden (*Kategorie 1*: 0 Patienten; *Kategorie 2*: 0 Patienten; *Kategorie 3*: 27 Patienten; *Kategorie 4*: 2 Patienten; *Kategorie 5*: 0 Patienten).

15 von 29 Patienten wiesen eine Adenomgröße < 1 cm auf, 14 Personen zeigten Adenomgrößen von 1 cm oder mehr (multiple Adenome < 1 cm wurden ebenfalls in die Gruppe > 1 cm gerechnet).

In der Kontrollgruppe befanden sich insgesamt 97 Personen, davon 24 Männer und 73 Frauen, das Durchschnittsalter betrug gesamt betrachtet 54,7 Jahre (Durchschnittsalter geschlechterspezifisch: Männer 52,5 Jahre/Frauen 55,4 Jahre).

Bei diesen Probanden handelte es sich um Personen aus einem internistisch-gynäkologischem Kollektiv, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung und Stuhlprobengewinnung weder eine akute Entzündung noch ein Malignom aufwiesen. Bei gut einem Drittel der Patienten wurde aufgrund verschiedenster Beschwerden eine totale Koloskopie durchgeführt, in welcher keine Pathologika detektiert werden konnten. In keinem der Fälle bestand klinisch der Anhalt für ein Karzinom oder eine anderweitige konsumierende Erkrankung. Auch im weiteren Verlauf konnte bis dato unter follow-up-Kontrollen keine Entwicklung eines malignen Geschehens dokumentiert werden konnte.

Im Rahmen vorangegangener Untersuchungen und Studien haben wir auf diesem Forschungsgebiet mit die ersten existenten Daten erhoben und zu diesem Thema eine Reihe von Arbeiten publiziert. Im Rahmen der Datenauswertung konnte ein Cut-Off-Wert von 4 U/ml ermittelt werden, der dieser Arbeit zugrunde gelegt wurde. Eine Korrelation von Geschlecht oder Alter konnte in diesen Arbeiten nicht beobachtet werden [14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27].

Zunächst nahmen wir einen Vergleich der fäkalen Tumor M2-PK-Konzentration zwischen Karzinom- und Kontrollgruppe vor. Die resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

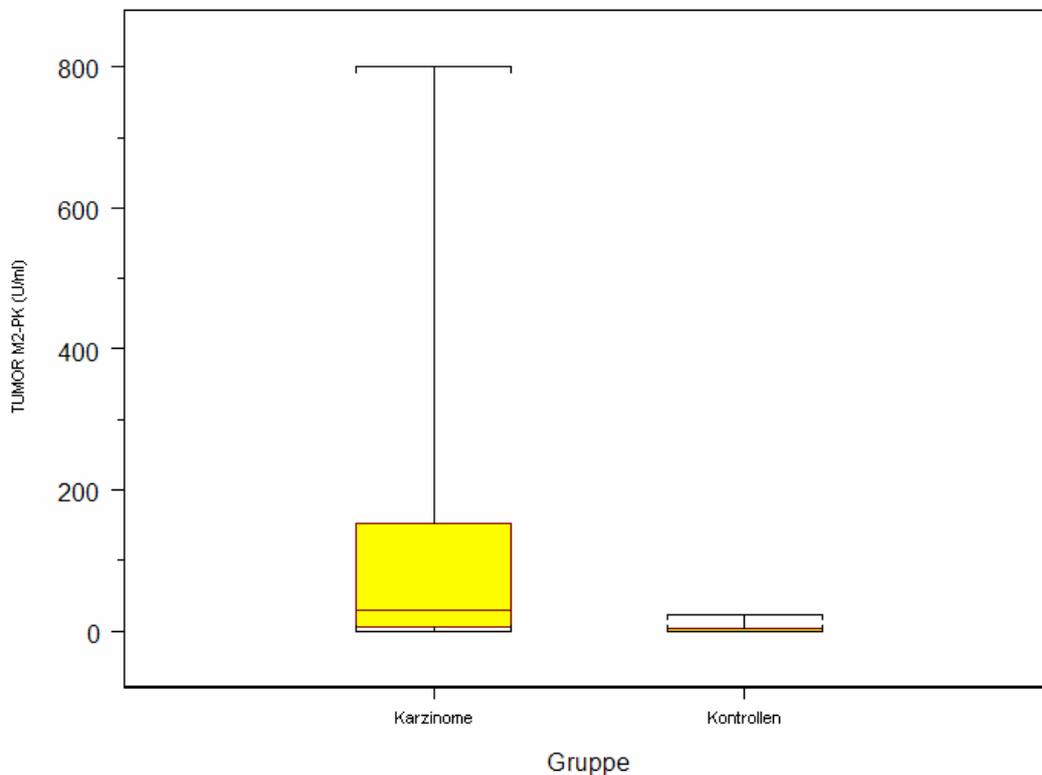


Abbildung 10:

Vergleich der Tumor M2-PK-Konzentration bei Karzinomen vs. Kontrollen

In der Karzinomgruppe konnte bei insgesamt 28 Patienten ein Median von 29,3 U/ml (Mittelwert 107,7 U/ml) ermittelt werden, Spannweite 0 – 800 U/ml, Standardabweichung 174,3 U/ml.

In der aus 97 gesunden Personen bestehenden Kontrollgruppe bot sich ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 2 U/ml), Spannweite 0 – 23,7 U/ml, Standardabweichung 4 U/ml.

Im Wilcoxon-Rangsummentest zeigte sich ein p-Wert von 0.

Bei dem angegebenen Cut-Off-Wert von 4 U/ml konnte aus den ermittelten Messwerten im Rahmen dieser Arbeit eine Gesamtsensitivität von 78,6 % bei einer Spezifität von 85,6 % ermittelt werden. Der positive prädiktive Wert betrug 61,1 %, der negative prädiktive Wert 93,3 %.

Wie oben beschrieben, ist über die Adenom-Karzinom-Sequenz jederzeit eine Umwandlung von zunächst benignen Adenomen in ein Karzinom möglich. Polypen sind in diesem Zusammenhang als frühe Neoplasien zu betrachten, die beim Übergang von gutartig zu bösartig einen entsprechend anderen Stoffwechsel annehmen. Unter der Annahme, dass der Proliferationsmarker Tumor M2-PK auch in diesem Falle erhöht sein könnte, untersuchten wir ebenso das Patientengut, welches Polypen aufwies.

Stellt man nun die Gruppe der gesamten 29 Polypenpatienten den 97 Personen der Kontrollgruppe gegenüber, finden sich die in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse.

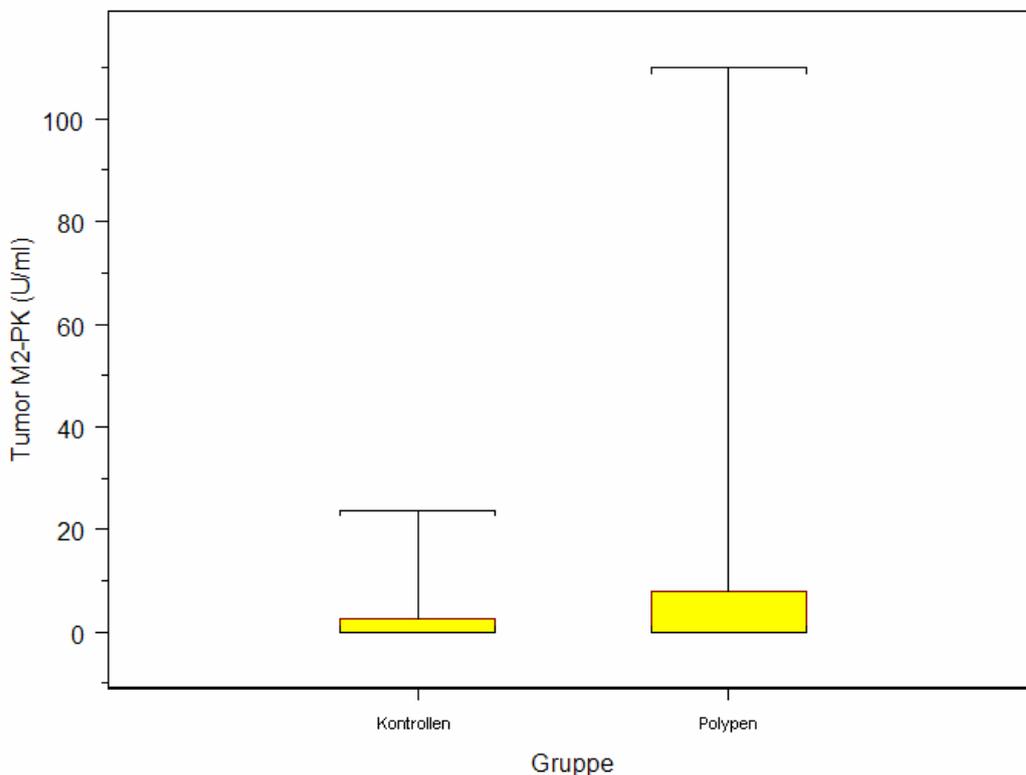


Abbildung 11:

Vergleich der Tumor M2-PK-Konzentration bei Kontrollen vs. Polypen

Auch in der Gruppe der Polypenpatienten konnte Tumor M2-PK quantifiziert werden. Bei insgesamt 29 Polypenpatienten konnte ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 9,5 U/ml) errechnet werden, Spannweite 0 – 110 U/ml, Standardabweichung 22,4 U/ml.

In der Kontrollgruppe konnte bei insgesamt 97 Personen ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 2 U/ml) ermittelt werden, Spannweite 0 – 23,7 U/ml, Standardabweichung 4 U/ml.

Im Wilcoxon-Rangsummentest konnte ein p-Wert von 0,1469 ermittelt werden.

Vergleicht man die Gruppe der Adenompatienten mit der Karzinomgruppe finden sich die in Abbildung 12 illustrierten Resultate.

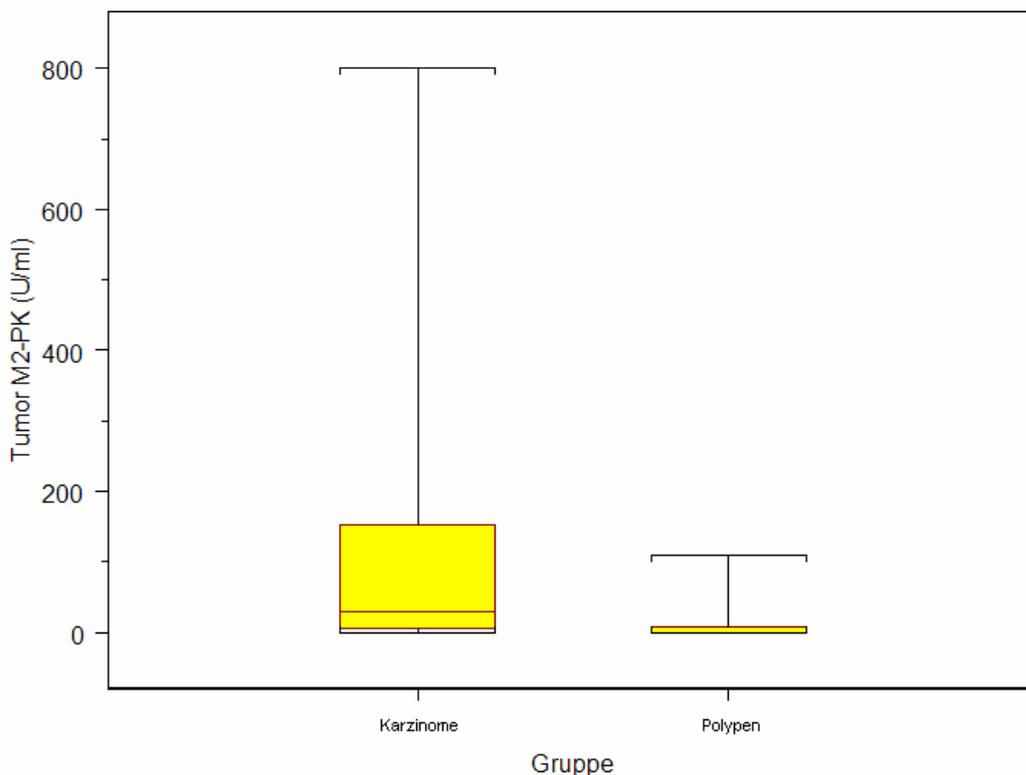


Abbildung 12:

Vergleich der Tumor M2-PK-Konzentration bei Karzinomen vs. Polypen

In der Karzinomgruppe befanden sich insgesamt 28 Patienten. Hier konnte ein Median von 29,3 U/ml (Mittelwert 107,7 U/ml) errechnet werden, Spannweite 0 – 800 U/ml, Standardabweichung 174,3 U/ml.

In der Gruppe der 29 Polypenpatienten konnte ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 9,5 U/ml) errechnet werden, Spannweite 0 – 110 U/ml, Standardabweichung 22,4 U/ml.

Im Wilcoxon-Rangsummentest konnte ein p-Wert von 0,0002 ermittelt werden.

Zur weiteren Differenzierung nahmen wir innerhalb der Adenomgruppe eine weitere Aufteilung in eine Gruppe mit Polypen $< 1\text{cm}$ und eine andere Gruppe mit Polypengrößen $\geq 1\text{cm}$ vor. Die resultierenden Ergebnisse seien in Abbildung 13 dargestellt.

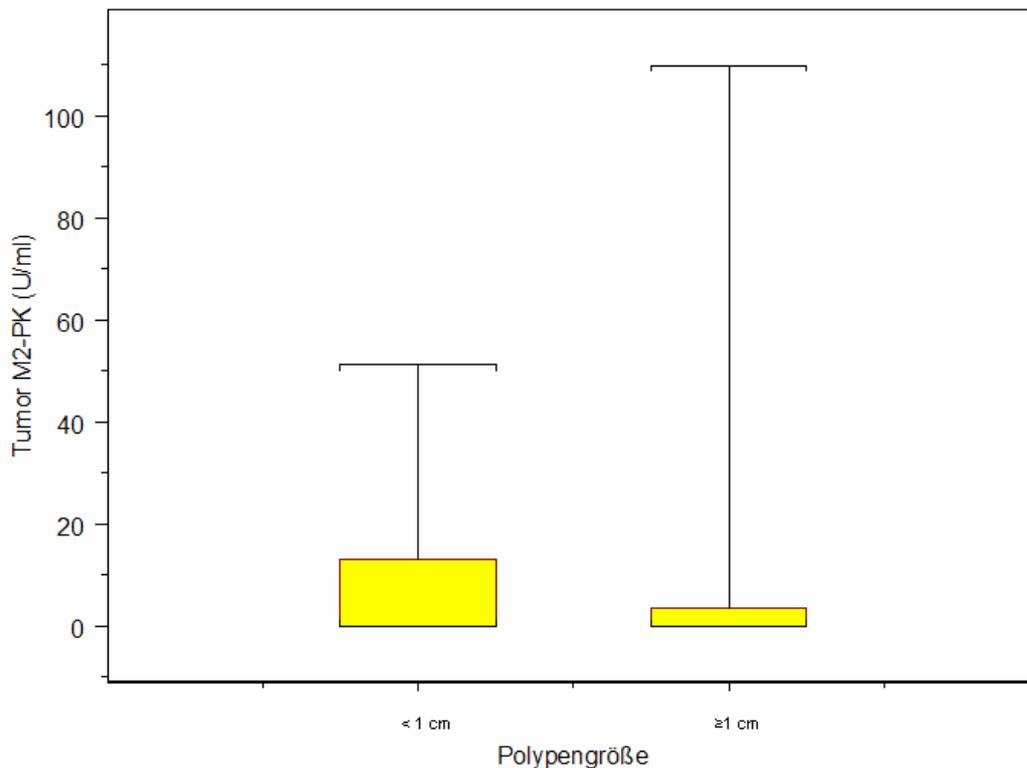


Abbildung 13:

Korrelation der Tumor M2-PK-Konzentration in Abhängigkeit von der Polypengröße;

Von insgesamt 29 Patienten boten 15 eine Polypengröße $< 1\text{cm}$. Der Median betrug 0 U/ml (Mittelwert 7,9 U/ml), Spannweite 0 – 51,3 U/ml, Standardabweichung 14,3 U/ml.

Die verbleibenden 14 Patienten zeigten Polypen mit einer Größe $\geq 1\text{ cm}$. Hier betrug der Median 0 U/ml (Mittelwert 11,3 U/ml), Spannweite 0 – 110 U/ml, Standardabweichung 29,3 U/ml.

Im Wilcoxon-Rangsummentest konnte ein p-Wert von 0,9222 ermittelt werden.

Betrachtet man nun ausschließlich das Klientel der Karzinompatienten und untersucht hierbei die Korrelation zwischen der Konzentration der fäkalen Tumor M2-PK und den entsprechenden TNM-Stadien, so stellten sich im Rahmen dieser Arbeit die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse dar.

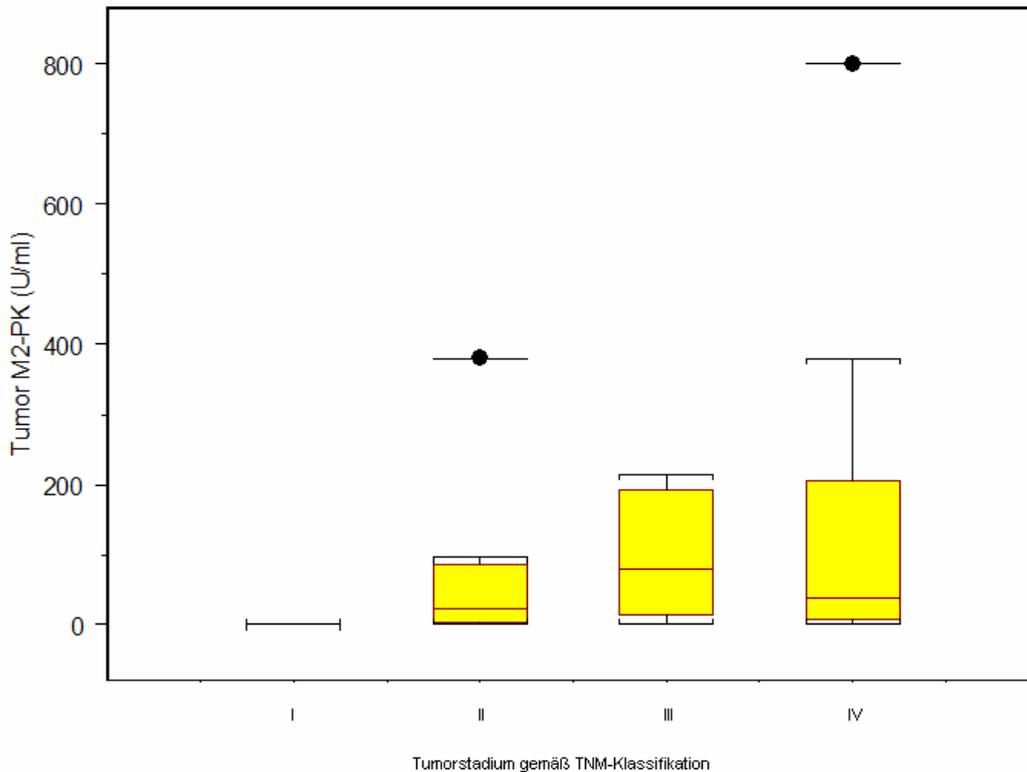


Abbildung 14:

Korrelation der Tumor M2-PK-Konzentration und Tumorstadium in Anlehnung an die TNM-Stadien I-IV

Im Stadium I befanden sich lediglich 2 Patienten, welche beide einen Wert von 0 U/ml aufwiesen, Median, Mittelwert und Standardabweichung waren hier entsprechend ebenfalls 0 U/ml.

Im Stadium II boten die 8 untersuchten Patienten einen Median von 23,3 U/ml (Mittelwert 75,3 U/ml), minimaler Wert 0 U/ml, maximaler Messwert 380 U/ml, Standardabweichung 128,4 U/ml.

Im Stadium III konnte bei den ebenfalls 8 untersuchten Patienten ein Median von 79,9 U/ml (Mittelwert 98,1 U/ml) ermittelt werden, der geringste gemessene Wert betrug 0 U/ml, der maximale Wert betrug 215 U/ml, Standardabweichung 90,6 U/ml.

In Stadium IV befanden sich 10 der untersuchten Patienten – diese boten einen Median von 37,2 U/ml (Mittelwert 162,7 U/ml), minimaler Wert hierbei 0 U/ml, maximal gemessen 800 U/ml, Standardabweichung 254,8 U/ml.

Im Kruskal-Wallis-Rangsummentest ergab sich ein p-Wert von 0,1552.

Aufgrund des oben genannten p-Wertes, nicht-statistischer Signifikanz und des sehr geringen Stichprobenumfangs der Patienten im Stadium I (2 Patienten; Messwert in beiden Fällen 0 U/ml) fassten wir die Stadien I + II in einer erneuten Berechnung zusammen und konnten die somit eingeschlossenen 10 Personen den 8 Personen des Stadiums III und den 10 Personen des Stadiums IV gegenüberstellen.

Hieraus ergab sich im Kruskal-Wallis-Rangsummentest ein p-Wert von 0,1943.

Abschließend untersuchten wir die Korrelation der fäkalen Tumor M2-PK zwischen den 3 Gruppen Karzinome – Polypen – Kontrollen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 zu ersehen.

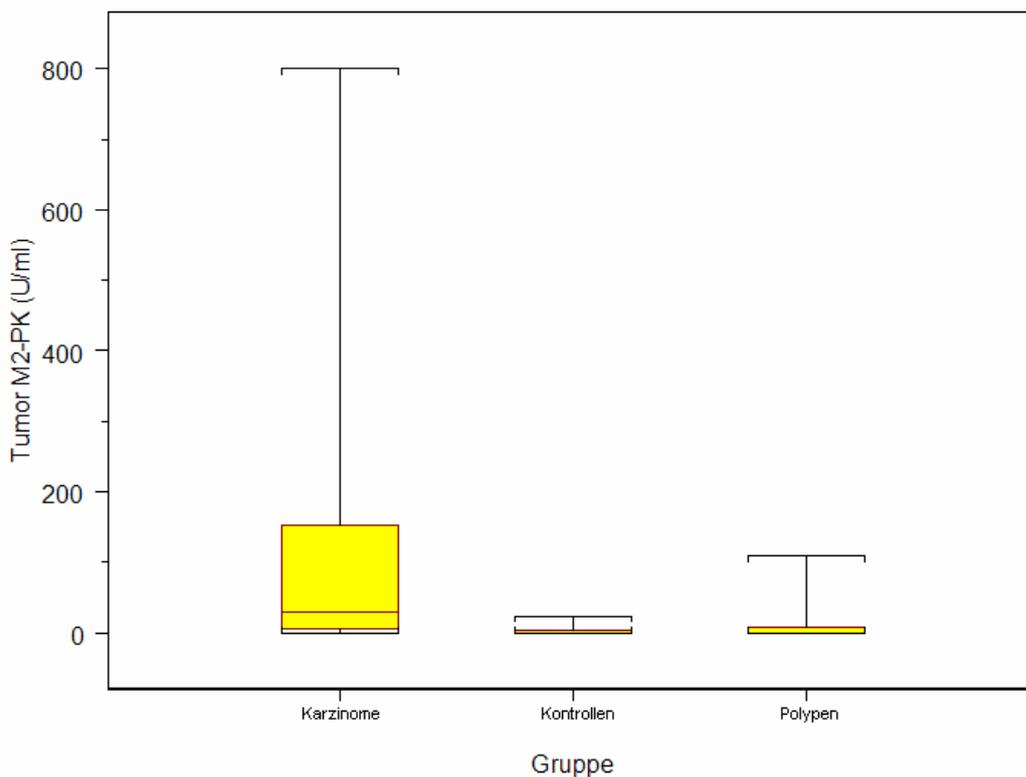


Abbildung 15:

Korrelation der Tumor M2-PK-Konzentration Karzinome vs. Polypen vs. Kontrollen

In der Karzinomgruppe konnte bei 28 Patienten ein Median von 29,3 U/ml (Mittelwert 107,7 U/ml) ermittelt werden, Spannweite 0 – 800 U/ml, Standardabweichung 174,3 U/ml.

In der 29 Personen umfassenden Polypengruppe zeigte sich ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 9,5 U/ml), Spannweite 0 – 110 U/ml, Standardabweichung 22,4 U/ml.

In der Kontrollgruppe bot sich bei 97 Personen ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 2 U/ml), Spannweite 0 – 23,7 U/ml, Standardabweichung 4 U/ml.

Im Kruskal-Wallis-Rangsummentest zeigte sich ein p-Wert von 0.

6.0 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Das kolorektale Karzinom spielt in unserer heutigen Zeit und Gesellschaft eine zunehmend große Rolle. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung mit besonders hoher Inzidenz in Nordamerika, Australien und Europa. Daten der American Cancer Society zeigen auf, dass alleine in den USA jährlich 130.000 Personen neu an einem kolorektalen Karzinom erkranken[1].

Hierzulande werden bundesweit jedes Jahr ca. 57.000 Neuerkrankungen vermeldet, von denen etwa 30.000 – also mehr als die Hälfte - an den Folgen dieser Erkrankung versterben[2].

Hinzu kommt, dass Deutschland geschlechtsunabhängig innerhalb Europas die höchste Neuerkrankungsrate aufweist.

Bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 67 Jahren ist das kolorektale Karzinom die dritthäufigste Krebserkrankung des Mannes; bei Frauen stellt diese Erkrankung bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 72 Jahren das zweithäufigste Malignom dar.

Darmkrebs ist in Deutschland weiterhin die zweithäufigste Krebstodesursache[3].

Verschiedene Risikofaktoren erhöhen das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Hier sind neben einer Altersabhängigkeit auch exogene Noxen wie fettes und scharfes Essen, Nikotinabusus und auch Adipositas zu nennen. Hinzu kommen erblich bedingte Risikofaktoren, wie man sie im Falle der familiären adenomatösen Polyposis, des Turcot-Syndroms, Gardner-Syndroms, HNPCC, Peutz-Jeghers-Syndroms und der Familiären Juvenilen Polypose beobachten kann [5]. Auch langjährig bestehende chronisch entzündliche Darmerkrankungen erhöhen das Risiko der Entstehung eines Malignoms[3].

Prognostisch bedeutsam ist jedoch vor allem das Auftreten von Darmpolypen, welche für die Entwicklung der – in 90 Prozent der Fälle histologisch bestehenden – Adenokarzinome

verantwortlich sind. Da man davon ausgeht, dass die Karzinogenese einen mehrstufigen Prozess darstellt, entstand Mitte der 70er Jahre der Begriff der „Adenom-Karzinom-Sequenz“. Dieser postuliert wie in Abbildung 1 und 2 dargestellt, dass bei der Entstehung eines Malignoms ein stufenweiser Übergang von normaler Schleimhaut zu hochgradigen Dysplasien bis hin zum Karzinom stattfindet, durch welchen unkontrollierbares Zellwachstum ermöglicht wird. Letzteres erhöht die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Mutationen (z. B. von Tumorsuppressorgenen) oder die Aktivierung von Onkogenen[6].

Verschiedene Studien konnten des Weiteren aufzeigen, dass bei Personen, bei welchen endoskopisch entdeckte Polypen entfernt wurden, nach mehreren Jahren bis zu 90% seltener kolorektale Karzinome auftraten als bei bis dato nicht endoskopierte Personen[3].

Hält man sich nun vor Augen, dass das kolorektale Karzinom bei früher Diagnosestellung oder rechtzeitiger Erkennung seiner Vorstufen ein potentiell kurables Krankheitsbild darstellt, kommt der Früherkennung eine immense Bedeutung zu. Entsprechend versucht man seit vielen Jahren ein gegen äußere Störfaktoren unempfindliches, in der Bevölkerung akzeptiertes, kostengünstiges, alltagstaugliches und verlässliches Diagnostikum zu entwickeln.

Als Screeningmethoden stehen bis dato verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. So zum Beispiel die reale Koloskopie, welche weiterhin den Goldstandard darstellt, die Möglichkeit der Biopsie suspekter Areale bietet und eine hohe Sensitivität / Spezifität aufweist. Trotz Anspruch auf eine Vorsorgekoloskopie wird dieses Angebot aus Scham und Angst vor Schmerzen gerade einmal von 3% der Bevölkerung wahrgenommen[9].

Im Rahmen einer virtuellen Koloskopie wird die Bildgebung mittels Computertomographie oder Kernspintomographie erzielt – nachteilig sind hierbei jedoch Strahlenbelastung (CT), hoher Zeit- und Kostenaufwand (MRT), Bewegungsartefakte und die Unmöglichkeit einer Histologiegewinnung zu nennen[9].

Durch die alleinige Sigmoidoskopie kann bei hoher Sensitivität und Spezifität eine erhebliche Reduktion der Mortalität bewirkt werden. Sie bietet ebenso die Möglichkeit einer Biopsie und benötigt keine größeren Abführmaßnahmen. Nachteilig ist jedoch die fehlende Einsehbarkeit einiger Kolonabschnitte; hier sind vor allem die proximalen Darmabschnitte kranial der linken Flexur zu nennen[8].

Traditionelle Tumormarker, wie beispielsweise CEA, CA 19-9 oder CA 72-4 sind zwar oft im Blut nachweisbar, jedoch leider nicht organ- / tumorspezifisch und werden aktuell vielmehr

zur postoperativen Verlaufskontrolle verwendet. Als alleinige Screeningmarker sind sie nicht geeignet[11].

Im Rahmen molekularer Screeninguntersuchungen macht man sich zunutze, dass genetisch veränderte Zellen von Adenomen oder Karzinomen abgeschilfert werden und im Stuhl nachgewiesen werden können. Wie bereits erwähnt lassen sich bei hereditären kolorektalen Karzinomen verschiedene Keimbahnmutationen und auch in Zusammenhang mit sporadischen Kolonkarzinomen entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz immer wieder Mutationen von Onkogenen, bzw. Tumorsuppressorgenen nachweisen. Bei 90% aller kolorektalen Karzinome lassen sich Mutationen des Tumorsuppressorgens APC nachweisen, in weiteren 40 – 50% der Fälle bestehen Mutationen des Onkogens *K-ras*. Auch eine Mutation des Tumorsuppressorgens p-53 wird in 50-60% der Fälle beschrieben[7].

Traverso et al. gelang der Nachweis dieser Mutationen in fäkaler DNA und man konzentrierte sich vor allem auf den Nachweis von Mutationen des Tumorsuppressorgens APC, da dieses in nahezu 90% der Fälle mutiert und zu einer Verkürzung des Proteins führt. Diese Verkürzung konnte mit Hilfe des so genannten Protein-Truncation-Tests in 61% aller kolorektalen Karzinome, 50% aller Adenome und 0% aller Kontrollen nachgewiesen werden. In Kombination mit anderen molekularen Markern lässt sich an kleinen Patientenkollektiven eine Sensitivität von bis zu 90% zur Erkennung kolorektaler Karzinome aufzeigen. Negativ hervorzuheben ist hierbei jedoch der insbesondere für den klinischen Gebrauch limitierende erhebliche finanzielle Aufwand von bis zu 400 US-Dollar pro Test und DNA-Qualitätsverluste bei langen Transportwegen oder zeitlicher Verzögerung der Probenweiterverarbeitung[12,46].

Unter der Annahme, dass Adenome und kolorektale Karzinome häufiger bluten als normale Schleimhaut, etablierten sich im Laufe der letzten 30 Jahre verschiedene fäkale okkulte Bluttests (FOBT). Am weitesten verbreitet und 1977 in das Krebsfrüherkennungsprogramm aufgenommen, ist hierbei der so genannte Hämoccult-Test. Bei Nachweis von Hämoglobin im Stuhl kommt es zu einer Blaufärbung des Guaiakharz-beschichteten Filterpapiers[7]. Bei guter Spezifität von 90% zeigte sie Sensitivität in 4 großen Studien von Mandel et al., Hardcastle et al., Kronberg et al. und Kewenter et al. eine Spannweite von 25-50%[8]. Bei minimalem apparativem Aufwand und geringen Kosten besteht der eindeutige Nachteil jedoch im Verkennen von nicht-blutenden Prozessen[7].

Neben den eben beschriebenen chemischen Stuhltests auf okkultes Blut existieren ebenso immunologische Stuhltests, welche auf dem Nachweis einer Antigen-Antikörper-Reaktion basieren. Als bekanntestes Funktionsprinzip ist hier der auf ausschliesslich menschliches Hämoglobin ausgerichtete ELISA zu nennen. Das freie humane Hämoglobin bindet an spezifische Antikörper; nach einer Waschung wird ein weiterer Enzym-markierter Antikörper zugegeben, dem nach neuerlichem Waschung ein farbloses Substrat beigelegt wird. Beim Vorhandensein von menschlichem Hämoglobin kommt es zu einem Farbumschlag, dessen Intensität proportional zur Hämoglobinkonzentration in der Stuhlprobe ist. Eindeutiger Vorteil gegenüber den chemischen Stuhltests ist eine mit ca. 95% deutliche höhere Spezifität und Sensitivität – dies jedoch bezogen auf blutende Prozesse! Hieraus ergibt sich entsprechend der ein Nachteil: nicht-blutende Prozesse oder frühe Vorstufen werden hierdurch nicht detektiert^[46].

Insgesamt bestehen verschiedene Programme zur Sekundärprävention, wie z.B. der Anspruch auf eine rektal-digitale Untersuchung, ein Stuhltest auf okkultes Blut (FOBT) und seit 2002 eine Koloskopie[8]. Die Gesamtinanspruchnahme liegt mit < 30% jedoch deutlich unter der angestrebten Rate.

Zur Optimierung der Früherkennung von Darmkrebs oder Detektion seiner Vorstufen suchte man nach alternativen Screeningmethoden – hierüber gelang der Nachweis der Tumor M2-Pyruvatkinase. Es handelt sich hierbei um ein Isoenzym der Pyruvatkinase, welches sowohl als aktives Tetramer als auch in einer dimeren Form existiert. Da die deutlich weniger aktive dimere Isoform gehäuft in Tumorgewebe nachgewiesen werden kann, gab man ihr den Namen Tumor M2-PK. Ein quantitativer Nachweis gelang bis dato in Blut und Stuhl. Die Pyruvatkinase ist ein Schlüsselenzym der Glycolyse, welches den letzten Energie-liefernden Schritt bewirkt, nämlich die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat[14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27].

Im Rahmen der Grundlagenforschung beschrieben Eigenbrodt und Mazurek et al., dass sich im Rahmen der Karzinogenese vollkommen unabhängig von der Stoffwechsellage des ursprünglichen Gewebe unter bestimmten Parametern stets die gleichen Tumor-spezifischen Stoffwechselveränderungen nachweisen ließen – diesem Stoffwechsel-Phänotyp verlieh man die Bezeichnung Tumor-Metabolom[28].

Voraussetzung für die hohe Proliferationsrate der Tumorzelle ist ein ausreichendes Angebot an Synthesebausteinen und eine Anpassung an die Umgebungsbedingungen – dies wird gewährleistet durch einen Wechsel im Isoenzymmuster. Wie oben bereits beschrieben, existieren verschiedene Isoenzymformen, wie z.B. der Typ M1 in Hirn und Muskel, der Typ L in Leber und Niere, Typ R in Erythrozyten und der in dieser Arbeit im Vordergrund stehende Typ M2 in Lunge und Gewebearten mit hoher Proliferationsrate (Embryonalzellen, Stammzellen und Tumorzellen). Im Rahmen der Karzinogenese kommt es zum Verschwinden der organspezifischen Enzyme und einer Dominanz des Typ M2[2].

Wie bereits ausführlich beschrieben liegt diese sowohl als Tetramer, als auch als Dimer vor. Erstgenannte weist biologisch hochaktiv eine hohe Affinität zu PEP auf und verwandelt Glucose unter Pyruvat- und Lactatproduktion in Energie. Die Konzentrationen der anfallenden Phosphometabolite sind hierbei niedrig.

Die dimere Form – wegen ihres Vorkommens in Tumorgewebe „Tumor M2-PK“ genannt - bewirkt biologisch nahezu inaktiv einen Konzentrationsanstieg der Stoffwechselzwischenprodukte der Glycolyse, Glucose wird vermehrt in Syntheseprozesse eingeschleust und die anfallenden Phosphometaboliten werden zur RNS-, DNS-, Phospholipid- und Aminosäuresynthese verwendet[2,31].

Zur Energiegewinnung bedient sich die Tumorzelle der Glutaminolyse und kann somit in Anwesenheit von Sauerstoff 60% des Energiebedarfs durch eine Umsetzung zu Lactat decken. Bei Sauerstoffmangelzuständen kann eine Umstellung auf die Sauerstoff-unabhängige Glycolyse erfolgen. Bei ausreichendem Glucoseangebot akkumuliert der Phosphometabolit Fructose-1,6-Biphosphat, ohne dass eine negative feedback-Hemmung einsetzt, die Glycolyse ist somit von der Regulierung durch das in der mitochondrialen Atmung anfallende ATP entkoppelt und es kann trotz Anwesenheit von Sauerstoff ein hoher Durchsatz gewährleistet werden[30].

Ein Wechsel von der dimeren zur aktiveren tetrameren Form ist bei z.B. erhöhten Fructose-1,6-Biphosphonatspiegeln in einem Zeitraum von 5 Minuten möglich. Nach Abbau des Phosphometaboliten und Konzentrationsabfall erfolgt erneut ein Switch in die inaktive Dimerform[31].

Besagter Wandel von Tetramer zu Dimer wird Dimerisierung genannt, kann ebenso durch Oncoproteine bewirkt werden und hierüber unkontrollierbares Zellwachstum mit sich bringen.

Namentlich sind in diesem Zusammenhang z.B. das Oncoprotein des Rous-Sarcom-Virus (pp60v-src-Kinase) und das E7-Oncoprotein des humanen Papillomavirus Typ 16 zu nennen[28].

Bedingt durch Zelluntergang und Nekrosen kommt es zu einem Übertritt der Tumor-M2-PK in benachbarte Areale, das periphere Blut oder andere Körperflüssigkeiten, wo sie mit Hilfe eines kommerziell durch die Firma ScheBo®.Biotech AG; Giessen, Deutschland vertriebenen Tests (auf 2 monoklonalen Antikörpern basierender sandwich ELISA) quantitativ nachgewiesen werden kann. Zum Nachweis im peripheren Blut eignete sich letztendlich EDTA-Plasma am besten. Aufgrund eines geringen Vorkommens der dimeren Form in Lymphozyten war hierbei zur Verhinderung von Lymphozytenzerstörung und Übertritt der dimeren Form ein Zentrifugieren notwendig[15,32,33].

Klinische Studien für das Bronchial-, Mamma-, Nierenzell-, Ösophagus-, Magen-, Pankreas- und kolorektales Karzinom belegten, dass die Tumor M2-PK ein ausgesprochen tumorspezifisches Enzym darstellt, welches jedoch keine Organspezifität aufweist[34].

Erste Studien zeigten auf, dass sich die Plasma-Konzentrationen ebenso zur Verlaufs- und Therapieerfolgskontrolle unter Chemotherapie bei Mamma- und Bronchialkarzinom bewährten[37,38,39,40].

Pathologisch erhöhte Tumor-M2-PK-Konzentrationen ließen sich ebenfalls bei Personen ohne maligne Erkrankung nachweisen. Zu nennen seien hier beispielsweise akute Schübe einer chronischen Pankreatitis oder einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung mit massiver intestinaler Zellproliferation. Auffallend hierbei war jedoch eine deutliche Erhöhung anderweitiger Entzündungsparameter. Eine postpolytraumatische Konzentrationserhöhung wird auf eine vermehrte Aktivierung der Granulozyten zurückgeführt[36].

Unter dem Gedankenkonstrukt, dass im Falle des kolorektalen Karzinoms ein intraluminales Tumorstadium besteht, tumorbedingt unkontrollierbare Zellproliferationen stattfinden und Nekrose und Zelltod konsekutiv einen Übertritt der initial intrazellulären Tumor M2-PK in das benachbarte Gewebe und den im Darmlumen passierenden Faeces bewirken müssten, etablierten wir die ersten Studien zum Nachweis dieses Proliferationsmarkers im Stuhl[41].

Nach Modifizierung des kommerziell vertriebenen ELISA-Tests der Firma ScheBo Biotech gelang dies schließlich und erbrachte die ersten durchaus erfreulichen Resultate.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine monozentrische Studie mit einer relativ langen Sammeldauer von ca. 2 1/2 Jahren und einem im Vergleich zu anderen Studien kleinem Stichprobenumfang. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten von insgesamt 154 Patienten ausgewertet, hiervon befanden sich 28 Personen in der Gruppe der kolorektalen Karzinome, 29 Personen hatten einen oder mehrere adenomatöse Polypen des Kolons/Rektums und 97 Teilnehmer fungierten als karzinomfreie und unauffällige Kontrollgruppe. Die 154 Teilnehmer ließen sich in 62 Männer und 92 Frauen aufteilen, das Durchschnittsalter betrug 58,6 Jahre (Frauen 58,3 Jahre/ Männern 59,2 Jahre).

Innerhalb der Karzinomgruppe zeigten sich 16 Karzinome des Kolons (10 Männer/6 Frauen, Durchschnittsalter 68,8 Jahre) und 12 Karzinome des Rektums (8 Männer/4 Frauen, Durchschnittsalter 67,6 Jahre). Eine Metastasierung fand sich in 18/28 Fällen (13 Männer/5 Frauen). In Anlehnung an das TNM-System wurden 2 Patienten in Stufe I, jeweils 8 in Stufe II + III und 10 Patienten in Stufe IV eingruppiert. Histologisch fanden sich in sämtlichen 28 Fällen Adenokarzinome, bezüglich des Differenzierungsgrades dominierten mittelgradig-differenzierte Adenokarzinome (20/28) gefolgt von niedriggradig-differenzierten Adenokarzinomen (5/28).

Bei jedem der teilnehmenden 29 Adenompatienten (20 Männer/9 Frauen, Durchschnittsalter 62,6 Jahre) wurde eine totale Koloskopie nebst Polypektomie und histologischer Aufarbeitung der Biopsate durchgeführt (Histologie: 16 tubuläre Adenome, 12 tubulo-villöse Adenome und 1 villöses Adenom. Gemäß der modifizierten Wien-Klassifikation fielen insgesamt 27/29 der Adenompatienten unter Kategorie 3, die verbleibenden 2 Patienten wurden in Kategorie 4 eingruppiert. 15/29 Patienten boten eine Adenomgröße < 1 cm, 14/29 Personen zeigten Adenomgrößen von 1 cm oder mehr.

In der Kontrollgruppe befanden sich insgesamt 97 Personen (24 Männer/73 Frauen, Durchschnittsalter 54,7 Jahre). Bei ca. einem Drittel dieser Gruppe wurde eine totale Koloskopie durchgeführt – hier boten sich keine wegweisenden Pathologika. Die restlichen Personen boten zum Zeitpunkt der Untersuchung weder Hinweise auf eine tumoröse Erkrankung/akute Entzündung noch ergaben sich bis zum jetzigen Zeitpunkt in follow-up-Kontrollen Hinweise auf ein malignes Geschehen.

Weitere Details und Eingruppierungen der Studienteilnehmer sind in Kapitel 3 und 5 ersichtlich.

Die Ergebnisse einer durchgeführten direkten Gegenüberstellung von Karzinompatienten und Kontrollen sind in Abbildung 10 zu sehen.

Die Karzinomgruppe umfasste 28 Patienten, bei welchen ein Median von 29,3 U/ml ermittelt werden konnte, in der aus 97 gesunden Personen bestehenden zeigte sich ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 2 U/ml) und somit ein signifikanter Unterschied ($p=0,00$). Diese Ergebnisse unterstreichen und bestätigen bereits in früheren Untersuchungen erzielte Ergebnisse [27,47,48].

Bei einem Cut-Off von 4 U/ml konnte aus den ermittelten Messwerten im Rahmen dieser Arbeit eine Gesamtsensitivität von 78,6 % ermittelt werden, die Spezifität beläuft sich auf 85,6 %. Der positive prädiktive Wert betrug 61,1 %, der negative prädiktive Wert 93,3 %. Sensitivität und Spezifität sind hierbei sogar noch höher als in früheren Studien, wo sich eine Sensitivität von 73% bei einer Spezifität von 78% berechnen ließ[27].

Vergleichbare Resultate werden ebenso von Ewald et al. beschrieben. Hier handelt es sich um eine Sensitivität von 77,9% bei einer Spezifität von 83,3% für anamnestisch Gesunde, bzw. 74,3% für endoskopierte Kontrollen. In besagter Arbeit wurde die relativ niedrigere Spezifität in der Gruppe der endoskopierten Kontrollen hierüber erklärt, dass bei diesem Personenkreis aufgrund von nicht näher bezeichneten Beschwerden die Indikation zur Koloskopie gestellt wurde. Bei blander Dickdarmspiegelung könne jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht diagnostizierte maligne Erkrankung des oberen Gastrointestinaltraktes vorliegt[52].

Unter der Überlegung, ob die fäkale Tumor M2-PK-Konzentration eine Abhängigkeit vom histologischen Befund, bzw. des Tumordifferenzierungsgrad aufweist, betrachteten wir die Histologien der Karzinome und deren Grading. Bei ausnahmslos vorliegenden Adenokarzinomen und kleinem Kollektiv ($n=28$) fiel hier jedoch keine Korrelation auf.

Histologisch fanden sich in sämtlichen 28 Fällen Adenokarzinome. Betrachtet man die Differenzierungsgrade, zeigte sich in lediglich einem Fall ein hochgradig-differenziertes Adenokarzinom, in den übrigen Fällen bot sich ein mindestens mittelgradig- differenziertes

(20 Fälle) oder gar niedrig-differenziertes Adenokarzinom (5 Fälle). Ein Patient wies ein extraplasmatisch verschleimendes, ein weiterer ein muzinöses Adenokarzinom auf.

Da adenomatöse Polypen im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz über die Fähigkeit zur potentiell malignen Entartung verfügen, ist der Proliferationsmarker Tumor M2-PK auch in diesen Fällen quantitativ nachweisbar.

Bei insgesamt 29 Patienten mit adenomatösen Polypen konnte ein Median von 0 U/ml (Mittelwert 9,5 U/ml) errechnet werden, in der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich bei den eingeschlossenen 97 Probanden ebenfalls ein Median von 0 U/ml (Abbildung 11), mathematisch beweisend ist dies bei einem p-Wert von 0,1469 nicht. Bei der isolierten Betrachtung des Mittelwertes kann man jedoch eine numerische Tendenz erkennen (Mittelwert der Kontrollgruppe: 2,0 U/ml; Mittelwert der Polypengruppe: 9,5 U/ml) – zu berücksichtigen ist hierbei der leider kleine Stichprobenumfang (n=29).

Um herauszufinden, ob durch Anwendung des Stuhltests eine Unterscheidung zwischen Karzinom- und Polypenpatienten möglich ist, stellten wir diese beiden Gruppen einander gegenüber (Abbildung 12). Hier konnte ein deutlicher und signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen herausgearbeitet werden (p=0,0002).

Bei 28 sich in der Karzinomgruppe befindenden Patienten ergab sich ein Median von 29,3 U/ml, in der Gruppe der 29 Polypenpatienten wurde ein Median von 0 U/ml errechnet werden.

Unter der Überlegung, ob größere Polypen potentiell auch höhere fäkale Tumor M2-PK-Konzentrationen bewirken, teilten wir die Gruppe der 29 Polypenpatienten auf in 15 Patienten mit Polypen < 1cm und stellten sie 14 Personen mit Polypen \geq 1 cm gegenüber. 27 von 29 Polypen wurden gemäß der modifizierten Wien-Klassifikation (Tabelle 6) in Kategorie 3 eingestuft, die 2 verbliebenen Patienten fielen in Kategorie 4. Unter makroskopischen Gesichtspunkten wiesen 16/29 Patienten tubuläre Adenome, 12/29 tubulovillöse Adenome und 1/29 Personen ein villöses Adenom auf.

In der Gruppe der Polypen < 1 cm betrug der Median 0 U/ml (Mittelwert 7,9 U/ml), in der Gruppe der Polypen \geq 1 cm betrug er ebenfalls 0 U/ml. Betrachtet man erneut den Mittelwert, so sind wie im Falle der Gegenüberstellung Polypen vs. Kontrollen zumindest numerische Tendenzen zu erkennen (Mittelwert bei < 1 cm: 7,9 U/ml; \geq 1 cm: 11,3 U/ml). Einen

mathematischen Beweis konnten wir bei einem p-Wert von 0,9222 für diese Fragestellung nicht erbringen.

Komplizierend ist hierbei erneut der leider nur geringe Stichprobenumfang (n=29), der weiterführende multizentrische Studien und ein deutlich größeres Kollektiv notwendig macht. Hinzu kommt, dass bis dato nur sehr wenige Arbeiten zur Problematik der Tumor M2-PK-Konzentration vorliegen. Koss et al. zum Beispiel berichten in einer Arbeit über deutlich höher gemessene Tumor M2-PK-Werte bei Polypengrößen ≥ 1 cm (n=5; Mittelwert 9,18 U/ml), konnten jedoch keine signifikante Differenz zwischen der Kontrollgruppe und Polypengrößen < 1 cm nachweisen (Mittelwert bei Polypen[n=5] < 1 cm: 2,42 U/ml; Mittelwert der Kontrollgruppe[n=13]: 1,81 U/ml). Die Sensitivität für Polypen ≥ 1 cm wird mit 60% , die für Polypen < 1 cm mit 25% angegeben. Ewald et al. beschreiben in einem Review bisheriger Studien für Polypen < 1 cm eine Sensitivität von 35,7% (n=14) und für Polypen ≥ 1 cm (n=18) eine Zunahme der Sensitivität auf 61,1%. In beiden Fällen findet sich mit 10, bzw. 32 Probanden erneut ein sehr kleiner Stichprobenumfang^[47, 48, 49].

Unter der Annahme, dass bei zunehmendem Tumorstadium in den meisten Fällen auch ein größerer Primarius und somit auch eine entsprechend höhere Tumor M2-PK-Konzentration vorliegen müsste, betrachteten wir des Weiteren ausschließlich innerhalb der Karzinomgruppe die Korrelation der fäkalen Tumor M2-PK-Konzentration in Abhängigkeit vom Tumorstadium gemäß TNM (Abbildung 14).

Ein Anstieg der fäkalen Tumor M2-PK-Konzentration konnte hier korrespondierend bis hin zum Tumorstadium III beobachtet werden (Stadium T I: Median 0 U/ml; Stadium T II: Median 23,3 U/ml; Stadium T III: Median 79,9 U/ml; Stadium T IV: Median 37,2 U/ml). Im Tumorstadium IV hingegen kam es zu einem erneuten Abfall der Konzentration. Dies korreliert mit anderen Studien, in welchen ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Konzentration bis in das Stadium III beobachtet werden konnte und im Stadium T IV ebenso ein Konzentrationsabfall detektierbar war^[50, 51]. In den erwähnten Arbeiten ist der Stichprobenumfang jedoch deutlich höher als in der hier vorliegenden Arbeit (147, bzw. 130 Karzinompatienten im Vergleich zu hier vorliegenden 28 Personen).

Diskrepanz zu dem beschriebenen Tumor M2-PK-Konzentrationsabfall im Stadium T IV sind jedoch andere Arbeiten, in welchen es im Stadium T IV zu einem deutlichen Anstieg der

Tumor M2-PK-Konzentration kommt. Hierbei handelt es sich jedoch um multizentrische Studien mit ebenfalls höherem Stichprobenumfang (54, bzw. 60 Karzinome)[27,⁵²]

Eine mögliche Erklärung für das primär nicht erwartete Absinken der fäkalen Tumor M2-PK-Konzentration ist möglicherweise die Definition des Tumorstadiums IV. Definitionsgemäß liegt zu diesem Zeitpunkt bei den betroffenen Patienten bereits eine Fernmetastasierung vor. Eine Aussage über die Größe des intraluminal wachsenden und Tumor M2-PK absondernden Primarius kann hierüber nicht abgeleitet werden. Somit ist denkbar, das in den vorliegenden Fällen oftmals trotz fortgeschrittenem Tumorstadium ein in Relation betrachtet kleiner Primarius vorgelegen hat.

Den mathematischen Beweis für eine direkte Abhängigkeit der fäkalen Tumor M2-PK-Konzentration vom Tumorstadium konnten wir bei einem p-Wert von 0,1552 nicht erbringen. Auch der Versuch, die beiden Tumorstadien I und II zusammenzufassen (=10 Patienten) und sie zur besseren Vergleichbarkeit den Tumorstadien III (=8 Patienten) und IV (=10 Patienten) gegenüberzustellen, erbrachte keine Verbesserung des p-Wertes (p=0,1943). Zu berücksichtigen ist jedoch der bereits oben erwähnte deutliche geringe Stichprobenumfang mit entsprechend größerer Störanfälligkeit.

Auch in der abschließenden Gegenüberstellung aller 3 Gruppen (Karzinome vs. Polypen vs. Kontrollen) stellte sich wie aus Abbildung 15 ersichtlich ein signifikanter Unterschied dar (p=0,000).

Um unter Alltagsbedingungen optimale und verlässliche Messwerte zu erzielen ist jedoch auf eine optimale Verkettung von Probengewinnung, Lagerung, Transport und Verarbeitung zu achten. Wie bereits oben ausführlich beschrieben existieren andere Tests, wie z.B. molekulare Tests für den Nachweis genetischer Veränderungen, die zwar gute Ergebnisse liefern, aber sehr stöempfindlich gegen äußere Einflüsse wie z.B. Lagerung > 12 Stunden sind. Ein alltagstauglicher Test muss einer Reihe von Beanspruchungen gerecht werden. Dies beginnt schon mit der initialen Gewinnung einer natürlich abgesetzten Stuhlprobe. Im klinischen Alltag ist hier die Hilfe von Pflegekräften gewährleistet. Im häuslichen Bereich hingegen kann dies insbesondere bei älteren Menschen ein Problem darstellen (z.B. aufgeweichter Stuhl in der WC-Schüssel, sehr wässrige und somit stark verdünnt Stühle, ...).

Als weitere potentielle Fehlermöglichkeit ist eine falsche Lagerung, bzw. eine Unterbrechung der Kühlkette zu nennen. Laut Herstellerinformation weisen die nativen Stuhlproben bei 4 – 8 Grad Celsius eine Haltbarkeit von 24 Stunden auf, bei Temperaturen von -20 Grad Celsius liegt die Haltbarkeit bei bis zu 4 Wochen. Zu gewährleisten ist jedoch eine lückenlose Kühlkette vom Zeitpunkt der Gewinnung bis zur Verarbeitung im Labor[45].

Eine Arbeit von Haug et al. beschäftigte sich mit eben dieser Problematik und untersuchte das Verhalten von Spezifität und Sensitivität nach Unterbrechung der Kühlkette. Hierzu wurden von 20 Patienten mit histologisch gesicherten kolorektalen Karzinomen Stuhl gewonnen, 13/20 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien (= Tumor M2-PK \geq 4 U/ml).

Die betreffenden Stuhlproben wurden 5 Tage bei Raumtemperatur gelagert und zu verschiedenen Zeitpunkten (sofort, nach 1 Tag, 2 Tagen ..., 5 Tagen) ihre Tumor M2-PK-Konzentration gemessen. In diesem Zusammenhang fiel die Sensitivität bei Raumtemperatur mit jedem weiteren Tag (Tag 0: 67,8%; Tag 1: 61,5%; Tag 2: 56,9%; Tag 3: 52,3%; Tag 4: 47,7%; Tag 5: 36,9%), wohingegen die Spezifität anstieg (Tag 0: 72,8%; Tag 1: 77,0%; Tag 2: 80,0%; Tag 3: 83,4%; Tag 4: 86,5%; Tag 5: 89,4%)[⁵³]. Dies macht deutlich, dass optimale Messergebnisse nur erzielt werden können, wenn die Probe binnen 24 Std. zur Verarbeitung im Labor vorliegt oder aber ständig gekühlt bleibt. Beides sollte unter hausärztlichen und insbesondere unter klinischen Bedingungen kein Problem darstellen und umsetzbar sein.

Weitere entscheidende Vorteile des fäkalen Tumor M2-PK-Tests liegen in seiner einfachen Handhabung (eine ungefähr erbsengroße, geformte Stuhlprobe ist vollkommen ausreichend), im Gegensatz zum Hämoccult-Test müssen hier nicht 3, sondern nur eine einzige Stuhlprobe gewonnen werden, die Einhaltung einer bestimmten Diät ist nicht notwendig, die einfache Analytik, die Erfassung nicht-blutender Tumoren und die im Vergleich zu molekularen Untersuchungen geringen Kosten. Hervorzuheben ist aber insbesondere die im direkten Vergleich zum Hämoccult-Test deutlich bessere Sensitivität. Eine Reduktion der Mortalität um 15-33% konnte in mehreren großen Studien nachgewiesen werden[^{54, 55}]. Liebermann et al.[⁵⁶] und Koss et al[⁵⁷] postulieren eine Sensitivität < 30% für kolorektale Karzinome und < 15% für fortgeschrittene Adenome.

In Zusammenschau all der genannten Aspekte steht mit dem Stuhltest zur Bestimmung der fäkalen Tumor M2-PK-Konzentration momentan ein viel versprechender, innovativer und weltweit erster Proliferations-/ Biomarker zur Verfügung. Würde man Patienten, welche im Rahmen eines bundesweiten Screenings oder über die Aufnahme in das

Krebsvorsorgeprogramm erhöhte Werte aufweisen, einer Koloskopie unterziehen, könnte die Mortalität des kolorektalen Karzinoms vermutlich weiter deutlich gesenkt werden. Eine weitere potentielle Einsatzmöglichkeit oder Zukunftsperspektive wäre eine Bestimmung der fäkalen Tumor M2-PK zur Verlaufskontrolle nach stattgehabter Operation als Hinweis auf ein Rezidiv, bzw. eine Therapieerfolgskontrolle unter Chemotherapie. Vergleichbare Daten finden sich zumindest in Bezugnahme auf die Tumor M2-PK-Plasma-Konzentration bei Bronchial- und Mammakarzinom[37,38,39,40].

Ohne jeden Zweifel müssen in diesem Bereich noch viele und vor allem deutlich größere Studien durchgeführt werden. Dies gilt insbesondere für das momentan noch spärlich erforschte Gebiet der Polypen, da diese als potentiell kurable Karzinomvorstufen über eine frühere Detektion zu einer weiteren Reduktion der Mortalität führen könnten.

7.0 Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich ca. 57.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom, die Hälfte dieser Patienten stirbt an den Folgen dieser Erkrankung und es ist somit hierzulande die zweithäufigste Krebstodesursache. Da sich das kolorektale Karzinom im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz über mehrere Jahre entwickelt, ist diese Erkrankung bei effektivem Screening und frühzeitiger Diagnosestellung, bzw. Detektion ihrer Vorstufen heilbar. Die Koloskopie steht als Goldstandard seit 2002 zur Verfügung, wird jedoch nur in geringem Umfang von der Bevölkerung genutzt. Alternative Stuhltests zum Nachweis okkulten Blutes weisen eine geringe Sensitivität auf und verkennen nicht-blutende Prozesse, anderweitige Testverfahren sind oft mit erheblichem apparativem oder finanziellem Aufwand verbunden. Somit besteht die Notwendigkeit einer breit akzeptierten, alltagstauglichen, aussagekräftigen, kostengünstigen Screeningmethode.

Die Pyruvatkinase stellt ein Schlüsselenzym der Glycolyse dar, welches in verschiedenen Isoformen existiert. Im Rahmen der Tumorgenese kommt es zum Verlust der jeweiligen gewebespezifischen Isoform und zur Expression des Isoenzym Typ M2. Das initial biologisch hochaktive, tetramere Isoenzym zerfällt hierbei in eine nahezu inaktive dimere Form – die „Tumor M2-Pyruvatkinase“. Diese kann mittels eines ELISA (ScheBo®Biotech AG; Giessen, Deutschland) in EDTA-Plasma und Stuhl nachgewiesen werden. Erhöhte Tumor M2-PK-Werte in EDTA-Plasma sind für Patienten mit verschiedensten Karzinomen vorbeschrieben. Eine Bestimmung der fäkalen Tumor-M2-PK-Konzentration zeigte auf, dass dieses Isoenzym ein sensitiver Marker für kolorektale Karzinome ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden monozentrisch insgesamt 154 Personen eingeschlossen (28 Karzinompatienten, 29 Polypenträger, 97 gesunde Kontrollen). Aus natürlich abgesetzten Stuhlproben wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA die fäkale Tumor M2-PK-Konzentration quantitativ bestimmt.

Hochsignifikante Unterschiede konnten hierbei zwischen kolorektalen Karzinomen vs. Kontrollen, Karzinomen vs. Polypen und auch bei einem Vergleich von Karzinomen vs. Polypen vs. Kontrollen ermittelt werden. Bei einem Cut-Off von 4 U/ml betrug die Gesamtsensitivität für das kolorektale Karzinom 78,6%, die Gesamtspezifität 85,6%.

Ein signifikanter Unterschied für eine Abgrenzung zwischen Polypen- und Kontrollgruppe konnte bei Betrachtung des nicht aufgezeigt werden. Bei leider kleinem Stichprobenumfang erkannte man jedoch numerische Tendenzen der Mittelwerte.

Ein Anstieg der fäkalen Tumor M2-PK-Konzentration bei zunehmender Polypengröße konnte nicht eruiert werden. Störfaktor hierbei ist erneut der geringe Stichprobenumfang. Zudem liegen bis dato wenige Arbeiten zu diesem Thema vor.

Betrachtet man innerhalb der Karzinomgruppe die fäkale Tumor M2-PK-Konzentration bei steigendem Tumorstadium, erkennt man einen Anstieg in Stadium T I - III, der von einem Abfall im Stadium IV gefolgt wird. Ursächlich könnte hier neben sehr geringem Stichprobenumfang die Definition dieses Tumorstadiums sein, das sich dieses nicht über einen maximal großen, intraluminalen Primarius, sondern vielmehr über das Vorliegen von Fernmetastasen definiert.

Die fäkale Tumor M2-PK ist somit ein innovativer Tumormarker, der preisgünstig, alltagstauglich, non-invasiv und relativ störungsempfindlich ist, keine bestimmte Diät erfordert, blutende und nicht-blutende Prozesse erkennt und dessen Sensitivität und Spezifität die der FOBTs deutlich übertrifft. Kommt man der Forderung nach größeren, multizentrischen Studien nach, hat dieser Test das Potential, zu einer weiteren Mortalitätsreduktion des kolorektalen Karzinoms beizutragen, indem man beispielsweise positive Testbefunde einer Kontrollkoloskopie unterziehen würde.

Summary:

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cause for tumor-associated death in Germany. Each year almost 57.000 people are newly diagnosed with CRC, more than the half of these patients will die from CRC and its consequences.

The development of CRC takes place over several years and early stages – like for example adenomas – and can easily be treated or cured by endoscopic polypectomy or endoscopic resection of the mucosa. Although colonoscopy has a very high specificity/sensitivity and is currently supposed to be the best screening tool for CRC, less than 3 % of the people above 55 years participate in the free German colonoscopy screening program. The reason seems to be its inconvenience and invasiveness. Other screening tools like e.g. the faecal occult blood test (FOBT) has a poor sensitivity and is not able to detect non-bleeding tumors. Alternative methods like molecular testing is very expensive. Therefore, it is of great interest to find other screening markers.

Proliferating cells, especially tumor cells, express a special isoenzyme of pyruvate kinase – an enzyme, that plays an very important role in the glycolytic pathway. Different isoforms of this enzyme exist tissue-specific, but they disappear during cancerogenesis. The conventional form of pyruvate kinase occurs in a tetrameric form with high affinity to its substrate phosphoenolpyruvate. In tumor cells, however, the tetrameric molecule is disrupted and is present in a biologically nearly inactive dimeric form – for that reasons it is termed Tumor M2-PK. This special kind of isoenzyme is over-expressed by a wide range of different tumors (oesophageal, gastric, colonic and rectal carcinomas) and can be quantified in patients EDTA-plasma samples. In the same way Tumor M2-PK can be found in feces of patients with CRC. It can be measured with a commercially available quantitative ELISA (ScheBo®.Biotech AG; Giessen, Germany), which is based on two monoclonal antibodies.

The present study includes 154 patients. 28 of them suffered from CRC, 29 people showed adenomas of the colon and the remaining 97 persons served as controls with no pathological findings at all. In the carcinoma and adenoma group, all patients underwent complete colonoscopy and histology was obtained.

There is a highly significant difference between tumor patients and controls and as well between tumors and adenomas.

At a cut-off-point of 4 U/ml, the calculated overall sensitivity for CRC is 78,6 %, specificity is 85,6 %.

Comparing adenomas and controls we could not figure out a statistic significance concerning the median between these two groups. Observing the mean we could describe numeric tendencies, but the sample size was very small.

Concerning adenomas and their size there was no increase of Tumor M2-PK levels in patients with adenomas ≥ 1 cm compared to adenomas < 1 cm. We found just the opposite: small adenomas showed higher levels than bigger adenomas, however there was no statistic significance. Once more the problem might be the small sample size of only 29 people and there are only a few rare studies concerning the size of adenomas and Tumor M2-PK levels.

Fecal Tumor M2-PK levels of patients with CRC were correlated with tumor staging according to TNM classification. Tumor M2-PK levels were rising up to TNM stadium III, in stadium IV levels decreased. A potential explanation for that might be the fact, that TNM stadium IV is defined by the existence of distant metastases and not by the size of the primary tumor. Therefore, it is possible that some patients have a very advanced tumor stadium, but the intraluminal tumor itself is not that big. Similar results could be shown in earlier studies, but there are as well studies who proclaim rising levels up to TNM stadium IV.

Concerning this topic, in our study no statistic significance could be shown ($p=0,1552$) – a possible reason for that might be the small sample size.

This study shows that the determination of Tumor M2-PK in the stool is supposed to be a valuable tool for the early detection of colorectal cancer. To avoid a loss of sensitivity it is of great importance not to interrupt the cold chain. Concerning effectiveness, costs, sensitivity, specificity, handling and simple analysis Tumor M2-PK seems to be a good possibility for large scale screening of colorectal cancer. Combining this stool test with colonoscopy in cases of raised levels might help to reduce the mortality of CRC.

For this purpose it is necessary to extend the studies, particularly in the case of adenomas there is a need of bigger multicenter studies.

8.0 Literaturverzeichnis

¹ Köhne C.-H., Harstrick A. (2001) Epidemiologie und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms. In: Köhne C.-H., Harstrick A.(Hrsg) Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms (1 Auflage) 2001 UNI-MED Verlag AG Bremen-London-Boston:15-24

² Hardt P.H., Mazurek S., Klör H.U., Eigenbrodt E. (2004) Neuer Test zum Nachweis von Darmkrebs. Spiegel der Forschung 2004; 21(1/2):14-19

³ Knöpnadel J., Altenhofen L., Brenner G. (2003) Epidemiologie und gesundheitsökonomische Bedeutung des Darmkrebses in Deutschland. Internist 2003;44:268-277

⁴ Köhne C.-H., Harstrick A. (2001). Genetische Grundlagen und klinische Relevanz. In: Köhne C.-H., Harstrick A.(Hrsg) Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms (1 Auflage) 2001 UNI-MED Verlag AG Bremen-London-Boston:35-42

⁵ Kullmann F.(2003) Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome. Internist 2003;44:254-267

⁶ Köhne C.-H., Harstrick A. (2001). Pathologie und Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome. In: Köhne C.-H., Harstrick A.(Hrsg) Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms (1 Auflage) 2001 UNI-MED Verlag AG Bremen-London-Boston:25-34

⁷ Pox C., Schulmann K., Schmiegel W. (2003) Konventionelles und molekulares Screening (Stuhltests). Internist 2003;44:287-293

⁸ Eickhoff A., Maar C., Birkner B., Rienmann J.F. (2003) Dickdarmkrebs in Deutschland. Internist 2003;44:278-286

⁹ Ell C., Rabenstein T. (2003) Reale und virtuelle Koloskopie. Internist 2003;44:294-301

¹⁰ Lau-Werner U., Stieber P.(2003) Tumormarker beim kolorektalen Karzinom. J Lab Med 2003; 27(1/2):20-25

¹¹ Schneider J., Schulze G. (2003) Comparison of Tumor M2-Pyruvate Kinase (Tumor M2-PK), Carcinoembryonic Antigen (CEA), Carbohydrate Antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the Diagnosis of Gastrointestinal Cancer. *Anticancer Research* 23:2059-5094

¹² Traverso et al. (2002) Detection of *APC* Mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002; 346:311-320

¹³ Riemann J.F., Classen M. (2002) Darmkrebsfrüherkennung. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 99 (11):542-543

¹⁴ Eigenbrodt E., Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Klör H.U (2003) Tumor M2-PK: A new tool for metabolic profiling of gastrointestinal tumors; Poster from the 31st Meeting of the international Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM), 30. August-04. September 2003, Edinburgh, UK

¹⁵ Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Klör H.U. (2003) Measurement of fecal Pyruvate Kinase Type M2 (Tumor M2-PK) Concentrations in Patients with Gastric Cancer, Colorectal Cancer, Colorectal Adenomas and Controls, *Anticancer Research* 23: 851-854 (2003)

¹⁶ Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Klör H.U. (2003) Fecal Pyruvate kinase Concentrations (ELISA based on a Combination of Clone 1 and Clone 3 Antibodies) for Gastric Cancer Screening; *Anticancer Research* 23:855-858 (2003)

¹⁷ Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Klör H.U. (2002) Measurement of Fecal Pyruvate Kinase Type M2 (Tumor M2-PK) Concentrations in Patients with Gastric Cancer, Colorectal Cancer, Colorectal Adenomas and Controls, Poster from Perspectives in Colorectal Cancers: A Consensus Meeting, Barcelona, Spain, 19.-21. June, 2002

¹⁸ Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Klör H.U. (2002) Measurement of Fecal Pyruvate Kinase Type M2 (Tumor M2-PK) Concentrations in Patients with Gastric Cancer, Colorectal Cancer, Colorectal Adenomas and Controls, Poster from the 2nd Colorectal cancer Conference, Rome, Italy, 24.-25. October 2002

-
- ¹⁹ Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Kröger R.M., Klör H.U. (2002) Measurement of fecal tumor M2-PK concentrations in patients with gastrointestinal cancer, Kongress für Laboratoriumsmedizin 2002, 18.-20. November 2002, Düsseldorf, Germany
- ²⁰ Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Ngoumou B., Rupp J., Nalop J., Klör H.U. (2003) Messung der Tumor M2-Pyruvatkinase im Stuhl als Screening Marker für kolorektale Karzinome; Beitrag zur 109. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden, 26.-30. April, 2003
- ²¹ Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Ngoumou B., Rupp J., Nalop J., Klör H.U. (2003) Messung der Tumor M2-Pyruvatkinase im Stuhl als Screening Marker für kolorektale Karzinome, Med Review 2003;05: 14-16
- ²² Mazurek S., Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Bretzel R.G., Eigenbrodt E., Klör H.U. (2003) Tumor M2-PK Stool Test: A new tool for colorectal cancer screening, Poster from the 2nd Biebrich Interdisciplinary Conference Colon and Rectal Cancer, 2.-4. October 2003, Wiesbaden-Biebrich, Germany
- ²³ Toepler M., Schlierbach P., Hardt P.D., Bretzel R.G., Klör H.U. (2003) Tumor M2-PK: A screening tool for colorectal cancer, Poster from the 12. Hamburger Symposium on Tumor Markers, 30. November – 02. December 2003, Hamburg, Germany
- ²⁴ Toepler M., Schlierbach P., Hardt P.D., Bretzel R.G., Klör H.U. (2004) Tumor M2-PK Stool Test: A screening tool for colorectal cancer, Poster from the 32nd Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM), 19.-23 June 2004, Helsinki, Finland
- ²⁵ Eigenbrodt E., Schulze G., Hardt P.D., Toepler M., Klör H.U. (2004) Tumor M2-pyruvate kinase – anew tool for in vivo metabolic profiling of gastrointestinal tumors; Abstract for the 31st Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM), 30. August – 04. September 2004, Edinburgh, UK

-
- ²⁶ Hardt P.D., Schlierbach P., Toepler M., Bretzel R.G., Klör H.U. (2004) Tumor M2-PK in stool: a screening tool for colorectal cancer, Abstract from the World Congress on Gastrointestinal Cancer, 16 – 19 June 2004, Barcelona, Spain
- ²⁷ Hardt P.D., Mazurek S., Toepler M., Schlierbach P., Bretzel R.G., Eigenbrodt E., Klör H.U. (2004) Faecal tumor M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer; British Journal of Cancer 2004;91(5):980-984
- ²⁸ Zitiert nach Mazurek / Eigenbrodt „Das Tumormetabolom“; www.metabolic-database.com
- ²⁹ Kreutzig T. (1994) Glycolyse. In: Kreutzig T. (Hrsg) Biochemie. Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm: 128-137
- ³⁰ Mazurek S., Scheefers-Borchel U., Scheefers H., Michel A., Basenau D., Dahlmann N., Laumen R., Eigenbrodt E. (1993) Die Bedeutung der Pyruvatkinase in der Onkologie, notabene medici (1993); 23 (3): 97-104
- ³¹ Eigenbrodt E., Reinacher M., Scheefers-Borchel U., Scheefers H., Friis R. (1992) Double role for Pyruvate Kinase Type M2 in Expansion of Phosphometabolite Pools Found in Tumor Cells, Critical Reviews in Oncogenesis (1992) 3(1,2):91-115
- ³² Hugo F., Fischer G., Eigenbrodt E. (1999) Quantitative Detection of Tumor M2-PK in Serum and Plasma, Anticancer Research (1999) 23:991-998
- ³³ Wechsel H.W., Petri E., Bichler K-H., Feil G., (1999) Marker for Renal Cell carcinoma(RCC): The Dimeric Form of Pyruvate Kinase Type M2 (Tumor M2-PK); Anticancer Research (1999);19: 2583-2590
- ³⁴ Eigenbrodt E., (2001) Die Rolle der Tumor M2-PK im Tumorstoffwechsel und in der Therapiekontrolle; Abstract anlässlich der DELAB-Fachtagung am 22.06.2001 in Mainz, Germany

-
- ³⁵ Hardt P.D., Ngoumou B., Rupp J., Schnell-Kretschmer H., Klör H.U. (2000) Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer, *Anticancer Research* (2000); 20:4965-4968
- ³⁶ Mazurek S., Lüftner D., Wechsel H.W., Schneider J., Eigenbrodt E. (2002) Tumor M2-PK: A Marker of the Tumor Metabolome; in: *Tumor Markers: Physiology; Technology an Clinical Applications*; Eleftherios, P. Diamandis et al (Hrsg) ACACC Press 2002:471-475
- ³⁷ Hoopmann M., Warm M., Mallmann P., Thomas A., Göhring U.-J., Schöndorf Th. (2002) Tumor M2 pyruvate kinase – determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy, *Cancer Letters* 2002; 187:223-228
- ³⁸ Lüftner D., Akrivakis C., Müller A., Mesterharm J., Geppert R., Teigelkamp S., Wernecke KD, Kreienberg R., Possinger K. (2000) Die prädiktive Bedeutung des Isoenzym TuM2-PK der Pyruvatkinase in der Therapie des Mammakarzinoms; Abstract aus einer Vortragsreihe auf Vorschlag der Deutschen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie für die *Medica* 2000
- ³⁹ Schneider J., Velcovsky H.-G., Morr H., Katz N., Neu K., Eigenbrodt E (2000) Sensitivität von Tumor M2-PK, CEA und CYFRA -21 in Abhängigkeit vom Tumorstadium bei Lungenkrebspatienten; Posterabstract/Pneumologie; Sonderheft 2000;54:35
- ⁴⁰ Schneider J., Neu K., Grimm H., Velcovsky H.-G., Weisse G., Eigenbrodt E (2002) Tumor M2-Pyruvate Kinase in Lung Cancer Patients: Immunohistochemical Detection and Disease Monitoring; *Anticancer Research* 2002; 22:311-318
- ⁴¹ Hardt PD., Schlierbach P., Toepler M., Bretzel R.G., Klör H.U. (2004) Tumor M2-PK Stool Test: A screening tool for colorectal cancer; Poster from the Kongress für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 22.-24.11.2004, Düsseldorf, Germany
- ⁴² Herold G. (1999) *Gastroenterologie* . In: Herold G. (Hrsg) *Innere Medizin* 1999:392

⁴³ Müller M. (1998/1999) Bauprinzip des GI-Traktes und Tumorklassifikation. In: Müller M. (Hrsg) Chirurgie für Studium und Praxis (4. Auflage) 1998/1999 Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach:174

⁴⁴ Zitiert nach Wagner S., Bartho S., Zels K.; www.webbefunde.pathologie-kwh.de

⁴⁵ Testanleitung (2004). Quantitative Bestimmung der Tumor M2-PK™. Stuhltest. ScheBo Tumor M2-PK Elisa Stuhltest, Hrsg. ScheBo Biotech, Giessen

⁴⁶ Landauer N., Heldwein W., Klör H.-U. (2006) Zertifizierte Fortbildung Darmkrebs Früherkennung IGeL aktiv 2006;2:18-25

⁴⁷ Kloer H.U., Hardt P.D., Schlierbach P., Toepler M. (2005) The tumor metabolic marker Tumor M2-PK in stool: a new biomarker for colorectal cancer; Poster from the ASCO 41st Annual Meeting, May 13-17, 2005 Orlando/Florida

⁴⁸ Toepler m., Schlierbach P., Klör H.U., Hardt PD (2005) Tumor M2-PK im Stuhl bei kolorektalen Tumoren in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium; Abstract für den 111. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin; Wiesbaden 2005

⁴⁹ Tonus C., Neupert G., Sellinger M. (2006) Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK World J Gastroenterol 2006;12(43):7007-7011

⁵⁰ Koss K., Maxton D., Jankowski JAZ (2005) The potential use of fecal dimeric M2 pyruvate kinase (Tumor M2-PK) in screening for colorectal cancer (CRC) Poster from the digestive Disease Week (DDW), 14.-19 May 2005, Chicago/USA

⁵¹ Koss K., Maxton D., Jankowski JAZ (2005) The potential use of fecal dimeric M2 pyruvate kinase (tumor M2PK) in screening for colorectal cancer. Gut 2005;54:20

⁵² Ewald N., Toepler M., Akinci A., Kloer H.U., Bretzel R.G., Hardt P.D. (2005) Pyruvatkinase M2 (Tumor M2-PK) im Stuhl als Screeningparameter für kolorektale Neoplasien. Eine Übersicht über bisher publizierte Daten. Z Gastroenterol 2005;43:1313-1317

⁵³ Haug U., Wente M., Seiler C., Rothenbacher D., Büchler M., Brenner H. (2006) Tumor M2 Pyruvate Kinase as a Stool Marker for Colorectal Cancer; Stability at Room Temperature and Implication for Application in the Screening Setting. *Clinical Chemistry* 2006;52(4):782-784

⁵⁴ Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, James PD, Mangham CM. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348:1472-1477

⁵⁵ Mandel JS, Church TR, Ederer F, Bond JH, Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:434-437

⁵⁶ Liebermann DA, Weiss DG. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *N Engl J Med* 2001;345:555-560

⁵⁷ Koss K, Maxton D, Jankowski JAZ. The potential use of fecal dimeric M2 pyruvate kinase (Tumour M2-PK) in screening for colorectal cancer (CRC). In: *Poster Abstracts and Trade Exhibition Book: NCRI Cancer Conference; 2005 Oct 2-5; Birmingham, UK.* London:Callisto, 2005:199

9.0 Anhang

9.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzungen

Abb.	-	Abbildung
ADP	-	Adenosindiphosphat
AMP	-	Adenosinmonophosphat
APC	-	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	-	Adenosintriphosphat
bzw.	-	beziehungsweise
ca.	-	circa
CTP	-	Cytidintriphosphat
d.h.	-	das heißt
DNS	-	Desoxiribonucleinsäure
ELISA	-	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAP	-	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FOBT	-	Fäkaler Okkultter Bluttest
GDP	-	Guanosindiphosphat
ggf.	-	gegebenenfalls
GTP	-	Guanosintriphosphat
IU	-	International Units
kg	-	Kilogramm
NAD	-	Nicotinamidadenindinucleotid
PEP	-	Phosphoenolpyruvat
PK	-	Pyruvatkinase
RNS	-	Ribonucleinsäure
sog.	-	sogenannte
Tab.	-	Tabelle
TMB	-	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
u.a.	-	unter anderem
UDP	-	Uridindiphosphat
UTP	-	Uridintriphosphat

v.a.	-	vor allem
VK	-	Variationskoeffizient
z.B.	-	zum Beispiel

9.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Klinische TNM-Klassifikation kolorektaler Karzinome (gemäß UICC 1997); Modifiziert nach „Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms“ (2001). Hrsg. Köhne/Harstrick, Bremen
Tabelle 2	Klinische TNM-Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome (gemäß UICC 1997) aus „Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms“ (2001) Hrsg. Köhne/Harstrick, Bremen
Tabelle 3	Tumorstadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach Dukes; aus Herold, G. (2005) Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Hrsg Herold, G., Köln
Tabelle 4	Tumordifferenzierungsgrad (Grading); aus „Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms“ (2001) Hrsg. Köhne/Harstrick, Bremen
Tabelle 5	Einteilung der Adenome nach makroskopischen Aspekten; Modifiziert nach Herold, G. (2005) Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Hrsg Herold, G., Köln
Tabelle 6	Modifizierte Wien-Klassifikation der gastrointestinalen Neoplasien; aus www. webbefunde.pathologie-kwh.de/Service/wienklassifikation.htm
Tabelle 7	Mögliches Pipettierschema; aus Testanleitung (2004). Quantitative Bestimmung der Tumor M2-PK™. Stuhltest. ScheBo Tumor M2-PK Elisa Stuhltest, Hrsg. ScheBo Biotech, Giessen
Tabelle 8	Originaltabelle der Kontrollgruppe
Tabelle 9	Originaltabelle der Polypengruppe
Tabelle 10	Originaltabelle der Karzinomgruppe I
Tabelle 11	Originaltabelle der Karzinomgruppe II mit histologischen Befunden

9.3 Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 1 Adenom-Karzinom-Sequenz; aus www.wikipedia.org
- Abbildung 2 Adenom-Karzinom-Sequenz; aus www.pathologie.med.uni-erlangen.de;
- Abbildung 3 Die Glycolyse; aus www.wikipedia.org
- Abbildung 4 Die Isoenzyme der Pyruvatkinase; modifiziert nach www.metabolic-database.com; mit freundlicher Genehmigung durch Frau PD Dr. med. Mazureck
- Abbildung 5 Tetramer und Dimer der M2-Pyruvatkinase; modifiziert nach www.metabolic-database.com; mit freundlicher Genehmigung durch Frau PD Dr. med. Mazureck
- Abbildung 6 Glutaminolyse; modifiziert nach www.metabolic-database.com; mit freundlicher Genehmigung durch Frau PD Dr. med. Mazureck
- Abbildung 7 Tumorzelle in Abwesenheit von Sauerstoff; modifiziert nach www.metabolic-database.com; mit freundlicher Genehmigung durch Frau PD Dr. med. Mazureck
- Abbildung 8 Effekt der tetrameren und dimeren Form auf den Zellstoffwechsel; modifiziert nach www.metabolic-database.com; mit freundlicher Genehmigung durch Frau PD Dr. med. Mazureck
- Abbildung 9 Beispiel einer Standardkurve; aus Testanleitung (2004). Quantitative Bestimmung der Tumor M2-PK™. Stuhltest. ScheBo Tumor M2-PK Elisa Stuhltest, Hrsg. ScheBo Biotech, Giessen
- Abbildung 10 Vergleich der Tumor M2-PK-Konzentration bei Karzinomen vs. Kontrollen
- Abbildung 11 Vergleich der Tumor M2-PK-Konzentration bei Kontrollen vs. Polypen
- Abbildung 12 Vergleich der Tumor M2-PK-Konzentration bei Karzinomen vs. Polypen
- Abbildung 13 Korrelation der Tumor M2-PK-Konzentration in Abhängigkeit von der Polypengröße; 1 = < 1 cm; 2 = ≥ 1 cm
- Abbildung 14 Korrelation der Tumor M2-PK-Konzentration und Tumorstadium in Anlehnung an die TNM-Stadien I-IV
- Abbildung 15 Korrelation der Tumor M2-PK-Konzentration Karzinome vs. Polypen vs. Kontrollen

9.4 Studienprotokoll

Kooperationspartner: Firma ScheBo[®]•Biotech AG
Netanyastr. 3-5
35395 Giessen

1. Hintergrund

Jährlich erkranken in der Bundesrepublik Deutschland schätzungsweise 23.000 Männer und 29.000 Frauen an einem kolorektalen Karzinom. Bis heute gibt es keinen zuverlässigen Labortest zur Früherkennung kolorektaler Tumoren. Die aussagefähigste Untersuchung ist die totale Koloskopie. Als Screening-Test dient bisher die Bestimmung von okkultem Blut im Stuhl. Dieser Test hat eine geringe Sensitivität und Spezifität, wird aber trotzdem benutzt, da es keine besseren Alternativen gibt.

2. Die Rolle der Tumor M2-Pyruvatkinase im Tumor-Stoffwechsel

Die Pyruvatkinase ist ein Schlüssel-Enzym des Glucose-Stoffwechsels und existiert in verschiedenen Isoformen, die gewebspezifisch exprimiert werden. So findet man Pyruvatkinase Typ L in der Leber und den proximalen Nierentubuli, Pyruvatkinase Typ R in den Erythrozyten, Pyruvatkinase Typ M1 in Muskeln und im Gehirn und Pyruvatkinase Typ M2 in der Lunge. In ihrer aktiven Form bestehen alle Isoformen aus vier gleichen Untereinheiten (Tetramer). Bei der Tumorentstehung kommt es zum Verlust des jeweiligen gewebspezifischen Isoenzymes und zur Expression des Isoenzymes Typ M2. Dabei nimmt die Menge an M2-PK zu, und das ursprünglich aus vier Untereinheiten bestehende Isoenzym zerfällt in die wenig aktive Form aus zwei Untereinheiten. Die dimere Form der M2-PK wird »*Tumor M2-PK*« genannt und ist generell in großen Mengen in Tumorzellen nachweisbar. Der höchste Gehalt an Tumor M2-PK findet sich in metastasierenden Tumorzellen.

Die Dimerisierung der M2-PK erfolgt entweder durch Phosphorylierung, zum Beispiel durch die pp60^{v-src} Kinase in Tyrosin oder durch direkte Bindung eines Oncoproteins, wie es für das E7-Oncoprotein des HPV-16 Virus gezeigt wurde. Die Dimerisierung der M2-PK führt zur einer Verringerung der Enzym-Aktivität und zu einer Kanalisierung der Glucose zur Synthese von Nukleinsäuren, Phospholipiden und Aminosäuren. Glucose-Metabolite werden nicht zu Pyruvat und Lactat abgebaut. Liegt die M2-PK in der dimeren Form vor, erfolgt die Gewinnung von Energie über die Umwandlung der Aminosäure Glutamin zu Lactat (Glutaminolyse). Die Glutaminolyse benötigt im Gegensatz zur Glycolyse Sauerstoff. Die

inaktive Form der Pyruvatkinase kann wieder in die aktive Form überführt werden. Diese Reaktivierung erfolgt über Fructose 1,6-diphosphat, einem Zwischenmetabolit der Glycolyse. Die dimere Form der M2-PK reduziert die Energiegewinnung aus Glucose. Dies führt dazu, dass der Energie-Stoffwechsel von Tumorzellen mit einem hohen Tumor M2-PK-Gehalt sehr empfindlich auf einen Abfall der zellulären Spiegel des Wasserstoff transportierenden Coenzyms NAD reagiert. NAD wird bei der Reparatur der DNA nach Gaben von Tumor-Chemotherapeutika verbraucht. Dies ist vermutlich der Grund, warum der Gehalt an Tumor M2-PK im Gegensatz zu anderen Tumormarkern sehr schnell den Erfolg einer Tumorthherapie anzeigt.

Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass sich die **Tumor M2-PK** als ausgesprochen tumorspezifisches Enzym ohne Organspezifität als Marker **im EDTA-Plasma** für eine Vielzahl von Tumoren eignet. Klinische Studien zur Bestimmung der Tumor M2-PK im EDTA-Plasma liegen für die Indikationen Lungenkrebs, Brustkrebs, Nierenzellkarzinom, Ösophagus-, Magen-, Pankreas- und Kolorektales Karzinom vor. Die Bestimmung der Tumor M2-PK in Kombination mit mehr organspezifischen traditionellen Markern wie CEA, CA-19-9 und CA 72-4 führt zu deutlich höheren diagnostischen Sensitivitäten bei Ösophagus-, Magen- und Kolorektal-Karzinomen. Die Bestimmung der Tumor-M2-PK im EDTA-Plasma eignet sich zur Ergänzung der Krebs-Diagnose, zur Überwachung von Krankheitsverläufen und Krebstherapie.

Erste Bestimmungen der **Tumor M2-PK im Stuhl** deuten darauf hin, dass sich dieser Tumorstoffwechselmarker dazu eignet Patienten mit kolorektalen Tumoren zu identifizieren.

3. Ziele

- Ermittlung der Eignung des ScheBo[®] • Tumor M2-PK Stuhltests zum Nachweis kolorektaler Tumoren.
- Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des ScheBo[®] • Tumor M2-PK Stuhltests.
- Vergleich des ScheBo[®] • Tumor M2-PK Stuhltests mit dem Hämoccult-Test.

4. Patientenauswahl

4.1 Kontrollgruppe

4.1.1 Einschlusskriterien

- Asymptomatische Probanden im Alter zwischen 18 und 85 Jahren im Rahmen der Krebsvorsorge

-
- Obligate Untersuchungen (siehe 4.4)
 - Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

4.1.2 Ausschlusskriterien

- Maligne Tumoren in der Vorgeschichte und aktuell
- Symptome oder Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts
- Erkrankungen, die eine Koloskopie unmöglich machen
- Fehlen der Einschlusskriterien

4.2 Patienten mit Symptomen oder Erkrankungen des Kolons

4.2.1 Einschlusskriterien

- Symptomatische Patienten im Alter zwischen 18 und 85 Jahren: Änderung der Stuhlgewohnheiten ohne äußeren Anlass (Wechsel Obstipation mit Diarrhoe, Flatulenz), Blut- und Schleimbeimengung im Stuhl, oder schwarz verfärbter Stuhl, Gewichtsverlust oder bekannte Polypen
- Obligate Untersuchungen (siehe 4.4)
- Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

4.2.2 Ausschlusskriterien

- Bekannte maligne Tumoren in der Vorgeschichte und aktuell
- Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
- Erkrankungen, die eine Koloskopie unmöglich machen
- Fehlen der Einschlusskriterien

4.3 Tumorpatienten

4.3.1 Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 85 Jahren
- Patienten mit kolorektalem Karzinom vor OP/Radio-/Chemo-/Immuntherapie
- Obligate Untersuchungen (siehe 4.3)
- Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

4.3.2 Ausschlusskriterien

- Patienten mit Zweitmalignom
- Patienten mit lokalem Rezidiv
- Patienten nach Entfernen des kolorektalen Primärtumors

-
- Patienten mit präoperativer Chemo-/Radio-/Immuntherapie
 - Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
 - Fehlende Einwilligungserklärung

4.4 Obligate Untersuchungen aller Studienteilnehmer

- Totale Koloskopie gegebenenfalls mit Biopsie/Ektomie des/der Polypen (Adenome) und histopathologischer Untersuchung
- Tumor M2-PK im Stuhl
- Hämoccult-Test

4.5 Fakultative Untersuchungen bei Tumorpatienten

- Klinisches Staging des Rektumkarzinoms nach Mason (1975, siehe Anhang)
- Präoperatives Staging:
 - Sonographie des Abdomens/Endosonographie
 - Röntgen-Thorax
 - Sklettszintigraphie
 - Computertomographie (Abdomen, Becken, Thorax, Hals)
- Laboruntersuchungen:
 - CEA
 - CA 19-9
 - Tumor M2-PK im EDTA-Plasma
 - Blutbild
 - Gerinnungsparameter
 - Nierenwerte
 - Transaminasen
 - Alkal. Phosphatase
 - Bilirubin
 - LDH
- Urologische Untersuchungen (falls erforderlich): Urogramm/Cystoskopie
- Gynäkologische Untersuchungen (falls erforderlich)

4.6 Makroskopische Befundung der Polypen

- Größe des Polypen (Kuppe, Stiel)

-
- Lokalisation des Polypen
 - Anzahl der Partikel
 - Form des Polypen (gestielt, tailliert, sessil, flach, mit zentraler Eindellung)
 - Makroskopische Einschätzung der Entfernung im Gesunden

4.7 Histopathologische Befundung der Polypen

- Histopathologische Befundung nach der WHO-Klassifikation (siehe Anhang)
- Dysplasiegrad (bei Adenomen)
- Angaben über Entfernung im Gesunden
- Bei Karzinom im Adenom Angaben über das Grading sowie den Differenzierungsgrad (high risk und low risk, siehe Anhang)

4.8 Postoperative Untersuchungen der Tumoren

- Tumorgröße und –ausbreitung
- Klassifikation der Operationsradikalität (R-Klassifikation, UICC 1997, siehe Anhang)
- Tumor Typisierung (nach WHO-Klassifikation 1976, siehe Anhang)
- Histopathologisches Tumor-Grading (UICC 1997, siehe Anhang)
- Tumor-Stadieneinteilung nach pTNM-Klassifikation einschließlich L- und V-Klassifikation (UICC 1997, siehe Anhang)
- Stadieneinteilung nach Dukes (siehe Anhang)

5. Pathologische Untersuchungen

Alle Resektate/ektomierte Polypen wurden histopathologisch untersucht

6. Untersuchungen bei erhöhtem Tumor M2-PK-Wert und negativem Koloskopiebefund

Weiterführende Untersuchungen zur Feststellung anderer gastrointestinaler Tumoren, die zur erhöhten Tumor M2-PK-Werten führen könnten, sind noch festzulegen.

7. Fallzahlbestimmung und zeitlicher Rahmen der Studie

Ist noch festzulegen.

8. Patientenaufklärung

Nachdem festgestellt wurde, dass ein Patient für die vorliegende Studie in Betracht kommt, wird ihm durch den behandelnden Arzt die Möglichkeit der Teilnahme erläutert. Die schriftlich Einwilligung des Patienten wird erst eingeholt nach entsprechender Information und ausführlicher Aufklärung über:

- Erkrankung
- Hintergrund des vorliegenden Studienprotokolls
- Datenerhebung und Datenverarbeitung zu wissenschaftlichen Zwecken
- Notwendigkeit von Untersuchungen
- Entscheidungsfreiheit zur Teilnahme und Möglichkeit die Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen zurückzuziehen.

Die Aufklärung erfolgt mündlich und schriftlich. Neben den im jeweiligen Zentrum routinemäßig eingesetzten Aufklärungsmaterial wird ein speziell für das Protokoll zusammengestellter Bogen benutzt. Die Aufklärungsunterlagen werden entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen in der Krankenakte abgeheftet. Nach Aufklärung und Einverständnis dokumentiert der Patient sein Einverständnis schriftlich auf dem vorgesehenen Bogen.

9. Auswertungskategorien der Patienten

Patienten, bei denen ein grober Verstoß gegen die Aufnahmekriterien vorliegt („non-eligible“), werden von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Über diese Fälle wird lediglich kasuistisch berichtet.

10. Datenmanagement

Die Daten werden zentral per EDV erfasst und ausgewertet. Die Dateneingabe erfolgt doppelt durch mindestens zwei Personen unabhängig voneinander mit anschließendem Datenvergleich per EDV.

Die folgende Software wird verwendet:

Sigmaplot der Fa. SPSS Science Software, Erkrath, Excel der Fa. Microsoft® (München), Statistica

Die Patienten werden darüber informiert, dass krankheitsbezogene Daten in anonymer Form gespeichert werden. Der Patient hat das Recht, Informationen darüber zu verlangen, welche

Informationen gespeichert sind.

11. Statistische Verfahren

Arithmetische Mittel, Standardabweichung, Spezifität und Sensitivität, nichtparametrische Auswertung Kruskal-Wallis

12. Überwachung und Abbruch der Studie

Die planmäßige Durchführung der Studie kann abgebrochen werden

- wenn die Patientenrekrutierung unzureichend ist.
- wenn infolge unerwarteter Erkenntnisse die Weiterführung der Studie aus ethischen und/oder medizinischen Gründen unvertretbar ist.

13. Monitoring

Die Vollständigkeit, Korrektheit und Plausibilität der eingehenden Dokumentationsbögen wird von der Datenkoordinationsstelle in regelmäßigen Abständen überprüft. Falls Bögen ausbleiben bzw. Rückfragen erforderlich sind, erfolgt in der Regel eine schriftliche oder telefonische Benachrichtigung.

14. Publikationen

Die Erstpublikation der Studiendaten erfolgt durch die Studienleitung nach Abschluss der Studie. Sämtliche Manuskripte sollen medizinischen Fachzeitschriften mit peer review vorgelegt werden.

Anhang

Präoperative Stadieneinteilung des Rektumkarzinoms nach Mason (1975):

<u>Stadium:</u>	<u>Definition:</u>	<u>Korrelation zur Tiefeninfiltration:</u>
CS I	gut beweglich	Submucosa
CS II	beweglich	Muscularis propria
CS III	wenig beweglich	mäßig ausgedehnt periproktal
CS IV	fixiert	ausgedehnt periproktal, Infiltration der Umgebung

Neben der Mobilität des Tumors wird bei der digitalen-rektalen Untersuchung die Höhenlokalisation, die Tumorgröße, die zirkumferente Ausdehnung, die Konsistenz und die Wachstumsform beurteilt.

Klassifizierung der Operationsradikalität (R-Klassifikation (UICC 1997)):

R0:	Kein Residualtumor
R1:	Histologisch Residualtumor
R2:	Makroskopisch Residualtumor

Tumor-Typisierung

Allgemein verbindlich ist die WHO-Klassifikation (1976), die gleichermaßen für Kolon- und Rektumkarzinome gilt und sechs Karzinomtypen unterscheidet:

1. Adenokarzinom
2. Muzinöses Adenokarzinom (Gallertkarzinom)
3. Siegelringzellkarzinom
4. Plattenepithelkarzinom
5. Adeno-squamöses Karzinom
6. Undifferenziertes Karzinom

Tumor-Grading

Differenzierungsgrade geben insofern Hinweise auf die biologische Qualität von Karzinomen, als niedrig differenzierte im allgemeinen eine höhere Progressionsneigung zeigen. Es werden vier Differenzierungsgrade (G) unterschieden, wobei im Falle von G4 (undifferenziert) eine Unterscheidung der unter Tumor Typisierung angegebenen Karzinomtypen 1. - 5. nicht mehr möglich ist. Beim Siegelringzellkarzinom erübrigt sich ein Grading, da dieser Tumortyp mindestens G3 impliziert. Wenn innerhalb eines Tumors oder seiner Metastasen unterschiedliche Differenzierungsgrade entwickelt sind, sind die Zonen mit geringster Differenzierung für die Bewertung maßgeblich. Alternativ können auch zwei Grade angegeben werden, um das örtlich wechselnde Differenzierungsverfahren zu charakterisieren. Histopathologisches Grading (UICC 1997):

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert

G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tumor-Stadieneinteilungen

TNM-System und Stadieneinteilung der UICC, TNM / pTNM-Klassifikation (UICC 1997):

T Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum oder infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

N Regionäre Lymphknoten

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen nach regionärer Lymphadenektomie von mindestens 12 Lymphknoten
N1	Metastasen in 1 - 3 perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten

M Fernmetastasen

MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms (UICC 1997)

Stadium 0	Tis	N0	M0	
Stadium I	T1	N0	M0	} Dukes A
	T2	N0	M0	
Stadium II	T3	N0	M0	} Dukes B
	T4	N0	M0	
Stadium III	jedes T	N1	M0	} Dukes C
	jedes T	N2	M0	
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	

Stadieneinteilung nach Dukes

Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach Dukes

Stadium A	Tumor reicht maximal in die Muscularis propria; keine Lymphknotenmetastasen
Stadium B	Tumor breitet sich über die Muscularis propria hinaus aus; keine Lymphknotenmetastasen
Stadium C1	Lymphknotenmetastasen liegen vor, aber nicht an der Grenze des Resektates (Grenzlymphknoten negativ)
Stadium C2	Lymphknotenmetastasen liegen vor, Grenzlymphknoten positiv

9.5 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Kloer H.U.

“Measurement of fecal pyruvate-kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls”

Abstract für 11. Hamburger Symposium über Tumormarker 2002

Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Kloer H.U.

“Fecal pyruvate kinase for gastric cancer screening”

Abstract für 11. Hamburger Symposium über Tumormarker 2002

Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Kröger R.M., Kloer H.U.

“Measurement of fecal tumor M2-PK concentrations in patients with gastrointestinal cancer”

Abstract für Kongress für Laboratoriumsmedizin 2002 in Düsseldorf

Toepler M., Hardt P.D., Ngoumou B., Rupp J., Schlierbach P., Kloer H.U.

“Measurement of fecal pyruvate-kinase type M2 (Tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls”

Abstract für Consensus meeting / Barcelona 2002

Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Kloer H.U.

“Measurement of fecal pyruvate-kinase type M2 (Tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls”

Abstract für 2nd Colorectal Cancer Conference / Rom 2002

Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Ngoumou B., Rupp J., Nalop J., Kloer H.U.

“Messung der Tumor M2-Pyruvatkinase im Stuhl als Screening Marker für kolorektale Karzinome”

Abstract für 109. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin/

Wiesbaden 2003

Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Kloer H.U.

“Measurement of fecal pyruvate-kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls”

Publikation in Anticancer Research (2003); 23: 851-854

Hardt P.D., Toepler M., Ngoumou B., Rupp J., Kloer H.U.

“Fecal pyruvate kinase concentrations (ELISA based on a combination of clone 1 and clone 3 antibodies) for gastric cancer screening”

Publikation in *Anticancer Research* (2003); 23: 855-858

Mazurek S., Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Bretzel R.G., Eigenbrodt E., Kloer H.G.

“Tumor M2-PK Stool Test: A new tool for colorectal cancer screening”

Abstract für 2nd Biebrich Interdisciplinary Conference Colon and Rectal Cancer /
Wiesbaden 2004

Toepler M., Schlierbach P., Hardt P.D., Bretzel R.G., Kloer H.G.

“Tumor M2-PK: A screening tool for colorectal cancer“

Abstract für 12. Hamburger Symposium über Tumormarker 2003

Eigenbrodt E., Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Kloer H.G.

“Tumor M2-PK: A new tool for metabolic profiling of gastrointestinal tumors”

Abstract für Meeting of International Society for Oncodevelopmental Biology and
Medicine / Edinburgh 2003

Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Ngoumou B., Rupp J., Nalop J., Kloer H.G.

“Messung der Tumor M2-Pyruvatkinase im Stuhl als Screening-Marker für kolorektale
Karzinome“

Abstract in “Med Review” Ausgabe 05/2003

Hardt P.D., Mazurek S., Toepler M., Schlierbach P., Bretzel R.G., Eigenbrodt E., Kloer H.G.

“ Faecal tumor M2 pyruvate kinase: A new, sensitive screening tool for colorectal cancer”

Publikation in *British Journal of Cancer* (2004); 91: 980-984

Hardt P.D., Toepler M., Schlierbach P., Nalop J., Bretzel R.G., Kloer H.G.

“Tumor M2-PK im Stuhl als Screening-Marker für kolorektale Karzinome: Neue Ergebnisse“

Abstract für 110. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin/

Wiesbaden 2004

Hardt P.D., Schlierbach P., Toepler M., Bretzel R.G., Kloer H.G.

“Tumor M2-PK Stool Test: A Screening tool for colorectal cancer”

Abstract für Kongress für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin 2004/Düsseldorf

Eigenbrodt E., Schulze G., Hardt P.D., Toepler M., Kloer H.G.

“Tumor M2-pyruvate kinase - a new tool for in vivo metabolic profiling of gastrointestinal tumors”

Abstract für Meeting of International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine / Edinburgh 2004

Hardt P.D., Schlierbach P., Toepler M., Bretzel R.G., Kloer H.G.

“Tumor M2-PK in stool: a screening tool for colorectal cancer”

Abstract für World Congress on Gastrointestinal Cancer / Barcelona 2004

Toepler M., Schlierbach P., Hardt P.D., Bretzel R.G., Kloer H.G.

“Tumor M2-PK Stool Test: A screening tool for colorectal cancer”

Abstract für Meeting of International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine / Helsinki 2004

Toepler M., Schlierbach P., Kloer H.G., Hardt P.D.

”Tumor M2-PK im Stuhl bei kolorektalen Tumoren in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium“

Abstract für 111. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin / Wiesbaden 2005

Kloer H.U., Hardt P.D., Schlierbach P., Toepler M.,

“The tumor metabolic marker Tumor M2-PK in stool: a new biomarker for colorectal cancer”

Abstract für ASCO 41st Annual Meeting / Orlando 2005

Kloer H.U., Hardt P.D., Schlierbach P., Toepler M.,

“The tumor metabolic marker M2-PK in stool: a new biomarker for colorectal cancer”

Abstract für Meeting of International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine / Edinburgh 2005

9.6 Originaltabellen

Patienten- code	Geschlecht	Alter	M2-PK Stuhl	Hämoccult- test	Tumorart
H 25	2	74	0,00	neg.	K
H 27	2	61	0,00	neg.	K
H 40	2	46	2,72	neg.	K
H 43	2	53	0,00	neg.	K
H 50	2	59	0,00	neg.	K
H 51	1	59	0,00	neg.	K
H 70	2	44	0,00	neg.	K
H 72	2	60	0,00	neg.	K
H 73	2	66	0,00	neg.	K
H 74	2	67	0,00	neg.	K
H 75	2	50	0,00	neg.	K
H 76	2	52	0,00	neg.	K
H 77	2	46	4,28	neg.	K
H 78	2	53	0,00	neg.	K
H 79	2	64	0,00	neg.	K
H 80	2	42	0,00	neg.	K
H 82	2	46	0,00	neg.	K
H 83	2	81	0,00	neg.	K
H 84	2	73	0,00	neg.	K
H 85	2	57	0,00	neg.	K
H 86	2	65	3,07	neg.	K
H 87	2	64	2,74	neg.	K
H 88	2	45	2,35	neg.	K
H 89	2	79	0,00	neg.	K
H 90	2	32	0,00	neg.	K
H 91	2	50	0,00	neg.	K
H 92	2	58	2,67	neg.	K
H 93	2	67	0,00	neg.	K
H 94	2	30	2,30	neg.	K
H 98	2	50	0,00	neg.	K
H 99	2	47	0,00	neg.	K
H 100	2	24	0,00	neg.	K
H 101	2	71	0,00	neg.	K
H 102	2	53	0,00	neg.	K
H 103	2	89	0,00	neg.	K
H 105	2	48	0,00	neg.	K
H 107	2	51	0,00	neg.	K
H 108	2	51	0,00	neg.	K
H 109	2	44	0,00	neg.	K
H 111	2	59	0,00	neg.	K
H 112	2	72	0,00	neg.	K
H 114	2	64	0,00	neg.	K
H 116	2	64	3,60	neg.	K
H 117	2	46	0,00	neg.	K
H 119	1	28	0,00	neg.	K
H 120	1	74	6,44	neg.	K
H 121	1	84	2,21	neg.	K
H 122	2	57	0,00	pos.	K
H 123	2	53	0,00		K
H 124	2	43	6,70		K
H 126	1	67	0,00		K
H 127	1	37	0,00		K
H 128	1	41	0,00		K
H 129	2	77	12,60	pos.	K

H 130	1	48	0,00	pos.	K
H 131	2	53	0,00	neg.	K
H 132	1	56	0,00	pos.	K
H 133	2	54	0,00	neg.	K
H 134	2	41	2,37		K
H 135	2	65	6,61	neg.	K
H 136	1	53	0,00		K
H 137	2	73	2,47	neg.	K
H 138	1	59	5,52	neg.	K
H 139	2	66	3,85		K
H 140	1	35	16,67		K
H 141	1	68	3,01		K
H 500	1	63	9,20	neg.	K
H 501	1	59	3,02	neg.	K
H 502	2	63	0,00	neg.	K
H 503	2	68	0,00	neg.	K
H 504	2	51	0,00	neg.	K
H 505	1	63	12,28	neg.	K
H 506	2	61	3,71	neg.	K
H 507	2	41	3,28	neg.	K
H 508	2	42	8,70	neg.	K
H 509	2	68	0,00	neg.	K
H 510	2	22	0,00	pos.	K
H 511	2	41	2,30	neg.	K
H 512	2	54	14,02	neg.	K
H 514	1	45	0,00	pos.	K
H 515	2	53	23,72	neg.	K
H 516	1	62	5,97	pos.	K
H 517	2	45	0,00	neg.	K
H 518	2	66	8,61	neg.	K
H 519	1	37	0,00	neg.	K
H 520	1	30	0,00	neg.	K
H 521	2	37	0,00	neg.	K
H 522	2	67	0,00	pos.	K
H 523	1	42	0,00	neg.	K
H 524	2	42	0,00	neg.	K
H 525	2	38	0,00	neg.	K
H 526	2	54	0,00	neg.	K
H 527	2	68	0,00	neg.	K
H 528	1	35	0,00	neg.	K
H 529	1	49	0,00	pos.	K
H 530	1	66	3,14	neg.	K
H 531	2	67	3,24	neg.	K

Tabelle 8: Originaltabelle der Kontrollgruppe

Legende/Fortsetzung Tabelle 8:

Geschlecht: 1 = männlich; 2 = weiblich; Alter = x in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme; M2-PK-Konzentration im Stuhl in U/ml; Tumorart K = Kontrollen

Patienten-code	Geschlecht	Alter	M2-PK Stuhl	Tumorart	Wien Klassifikation	Histologie	Polypengröße
Pol - 001 - 1	1	76	0,00	P	3	tubuläres Adenom	2
Pol - 002 - 1	2	87	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 003 - 1	2	64	24,30	P	3	tubuläres Adenom	2
Pol - 004 - 1	1	87	0,00	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 005 - 1	1	69	15,20	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 006 - 1	2	62	0,00	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 007 - 1	1	62	0,00	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 008 - 1	1	75	13,20	P	4	tubulo-villöses Adenom	1
Pol - 009 - 1	2	56	24,80	P	3	tubulo-villöses Adenom	1
Pol - 010 - 1	2	67	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 011 - 1	1	61	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 012 - 1	1	43	51,30	P	3	villöses Adenom	1
Pol - 013 - 1	1	64	0,00	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 014 - 1	1	42	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 015 - 1	2	61	8,01	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 016 - 1	1	72	3,12	P	4	tub.-vill. + tub. Adenome	2
Pol - 017 - 1	2	84	17,13	P	3	tubulo-villöses Adenom	1
Pol - 018 - 1	1	73	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 019 - 1	1	69	109,93	P	3	tubuläres Adenom	2
Pol - 200 - 1	1	59	2,20	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 501 - 1	2	47	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 502 - 1	1	58	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 503 - 1	1	39	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 504 - 1	1	46	0,00	P	3	tubuläres Adenom	2
Pol - 505 - 1	1	57	0,00	P	3	tubuläres Adenom	2
Pol - 506 - 1	1	55	3,43	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 507 - 1	1	63	0,00	P	3	tubulo-villöses Adenom	2
Pol - 508 - 1	1	60	0,00	P	3	tubuläres Adenom	1
Pol - 509 - 1	2	56	4,28	P	3	tubuläres Adenom	1

Tabelle 9:

Originaltabelle der Polypengruppe

Geschlecht: 1 = männlich; 2 = weiblich; Alter = x in Jahren zum Zeitpunkt der

Probenentnahme; M2-PK-Konzentration im Stuhl in U/ml; Tumorart P = Polypen;

Dysplasiegrade gemäß Wien-Klassifikation (siehe Tabelle 6); Polypengröße: 1 = < 1 cm;

2 = ≥ 1 cm;

Patienten-code	Geschlecht	Alter	M2-PK Stuhl	Hämoccult-test	Tumor-art	TNM-Klassifikation	TNM-Stadium	Dukes
Ca - 084 - 1	1	72	6,40	pos.	SC	T4N2M1G2	4	D
Ca - 085 - 1	1	66	134,60	pos.	RC	T3N2M1G2	4	D
Ca - 096 - 1	1	62	8,50	pos.	RC	T3N1M1 G3	4	D
Ca - 098 - 1	1	68	215,00	pos.	RC	T3N1Mx G2	3	C
Ca - 101 - 1	2	68	0,00	pos.	RC	T2N0Mx G2	1	A
Ca - 103 - 1	1	54	212,80	pos.	SC	T3N2Mx G2	3	C
Ca - 104 - 1	2	73	206,60	pos.	SC	T4N2M1R0 G2-3	4	D
Ca - 105 - 1	2	76	380,00	pos.	CC	T3N0M0 G2	2	B
Ca - 107 - 1	1	50	16,60	pos.	CC	T3N1M1 G1-2	4	D
Ca - 111 - 1	2	81	0,00	pos.	SC	T4N1M0R0 G2	3	C
Ca - 112 - 1	2	82	5,60	pos.	RC	T4N0M0 G2-3	2	B
Ca - 113 - 1	2	73	171,30	pos.	RC	T3N1MxG2	3	C
Ca - 115 - 1	2	76	380,00	pos.	SC	T3N1M1 G2	4	D
Ca - 117 - 1	1	69	63,50	pos.	CC	T3N1M0R0 G2	3	C
Ca - 119 - 1	2	79	800,00	pos.	SC	T4N1M1 G2	4	D
Ca - 121 - 1	1	72	11,70	pos.	RC	T3N2MxL1 G2	3	C
Ca - 125 - 1	1	67	6,01	neg.	RC	T3N0MxR0 G2	2	B
Ca - 144 - 1	1	69	96,20		CC	T3N1MxL1 G2-3	3	C
Ca - 200 - 1	1	76	14,67	neg.	RC	T3N2M0G3	3	C
Ca - 201 - 1	1	54	18,16	pos.	RC	T4N2M1G3	4	D
Ca - 203 - 1	1	70	56,21	neg.	CC	T3N1M1	4	D
Ca - 206 - 1	1	59	0,00	pos.	SC	T4N1M1	4	D
Ca - 207 - 1	1	65	0,00	neg.	SC	T3N0M0G2	2	B
Ca - 208 - 1	2	75	40,50	neg.	RC	T3N0M0R0G1-2	2	B
Ca - 209 - 1	1	81	0,00	pos.	CC	T3N0M0	2	B
Ca - 210 - 1	1	48	0,00	pos.	RC	T2N0M0R0G2	1	A
Ca - 211 - 1	2	49	74,40	neg.	CC	T3N0M0G2-3	2	B
Ca - 212 - 1	1	77	95,90	neg.	CC	T3N0M0R0G2	2	B

Tabelle 10:

Originaltabelle der Karzinomgruppe I

Geschlecht: 1 = männlich; 2 = weiblich; Alter = x in Jahren zum Zeitpunkt der

Probenentnahme; M2-PK-Konzentration im Stuhl in U/ml; Tumorart SC = Sigma-Karzinom;

RC = Rektum-Karzinom; CC = Kolon-Karzinom;

Patienten- code	Histologie
Ca - 084 - 1	ulcer. mittelgrad.-diff. invas. Adeno-Ca
Ca - 085 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 096 - 1	niedrig-diff. Adeno-Ca
Ca - 098 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 101 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 103 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 104 - 1	mittel-/niedr.grad.-diff. Adeno-Ca
Ca - 105 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 107 - 1	hoch-mittelgrad.-diff. Adeno-Ca
Ca - 111 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 112 - 1	mittel-/niedr.grad.-diff. Adeno-Ca
Ca - 113 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 115 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 117 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 119 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 121 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 125 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 144 - 1	mittel-niedr.-diff. Invas. Adeno-Ca
Ca - 200 - 1	muzinöses Adeno-Ca des Rectums
Ca - 201 - 1	ulcer. mittelgrad.-diff. invas. Adeno-Ca
Ca - 203 - 1	extraplasmat.- verschl. Adeno-Ca
Ca - 206 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 207 - 1	hoch-diff. Adeno-Ca
Ca - 208 - 1	hoch-mittelgrad.-diff. invas. Adeno-Ca
Ca - 209 - 1	mittelgradig-diff. Adeno-Ca
Ca - 210 - 1	mittelgradig-diff. invas. Adeno-Ca
Ca - 211 - 1	niedr.-mittelgradig diff. Invas. Adeno-Ca
Ca - 212 - 1	ulcer. mittelgrad.-diff. invas. Adeno-Ca

Tabelle 11:

Originaltabelle der Karzinomgruppe II mit histologischen Befunden

10.0 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all denen Menschen, die mit dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte.

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Philip Hardt danken, der mir über all die Jahre eine exzellente Betreuung zukommen ließ und jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön an meinen ehemaligen Chef Prof. Dr. med. Goubeaud und die Mitarbeiter der Asklepios Klinik in Lich, die es mir ermöglichten, Patienten für diese Arbeit zu akquirieren.

Der Firma ScheBo BioTech in Gießen sei für die labormedizinische und –diagnostische Unterstützung gedankt; insbesondere Frau Dr. Decker und Frau PD Dr. Mazureck waren hier nicht wegzudenkende Anlaufadressen und stets hilfsbereite Ansprechpartnerinnen, die mich mit Bildmaterial, Textmaterial und Ideen unterstützten.

Grossen Dank an Herrn Frank Langer für seine statistische Hilfe und seine unbeschreibliche Geduld bezüglich meiner Fragen.

Danke, Nina, für Deine moralische Unterstützung, den Ansporn, Deine Rückendeckung und Geduld mit mir.

Besonderer Dank gilt letztendlich meiner Mutter, die mich im Laufe meiner Laufbahn uneingeschränkt unterstützte und nie aufhörte, an mich zu glauben – ohne sie hätte ich dies hier alles nie geschafft!

Herzlichen Dank allen Patienten und Probanden, welche die Entstehung dieser Arbeit mit Ihrer Teilnahme an dieser Studie überhaupt erst ermöglichten.

11.0 Lebenslauf

Name: Markus Toepler
Anschrift: Vogelsbergstrasse 88
63654 Büdingen
Geburtsdatum: 05.07.1973
Geburtsort: Büdingen
Konfession: römisch-katholisch
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1979 – 1983 Grundschule Büdingen
1983 – 1992 Wolfgang-Ernst-Gymnasium Büdingen
mit Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Tätigkeiten vor dem / während des Studium/s:

08/92 – 10/93 Zivildienst und Aushilfstätigkeit beim Deutschen Roten Kreuz in Büdingen mit der Ausbildung zum staatlich anerkannten Rettungssanitäter
1992 – 1998 Regelmäßige Nebentätigkeit im Ärztlichen Notdienst Büdingen
1993 – 1994 Regelmäßige Nebentätigkeit beim Deutschen Roten Kreuz Büdingen
04/96 – 03/97 Aushilfspflegekraft auf der Intensivstation des Mathildenhospitals in Büdingen
04/97 – 12/97 Aushilfspflegekraft auf der Intensivstation des Kreiskrankenhauses in Schotten
06/97 – 04/98 Studentische Aushilfskraft im Ärztlichen Notdienst in Hüttenberg
01/98 – 01/01 Regelmäßige Nebentätigkeit als Sitz- und Sonderwache auf der Medizinischen Intensivstation der Justus-Liebig-Universität Gießen

Studium und Prüfungen:

1994 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
- 09/1996	Ärztliche Vorprüfung in Gießen
- 09/1997	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Gießen
- 09/2000	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Gießen
- 10/00 – 09/01	Praktisches Jahr
- 10/2001	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Bisheriger ärztlicher Werdegang:

01/02 – 06/03	AIP in der Inneren Abteilung der Asklepios Klinik Lich (<i>Chefarzt Prof. Dr. med. G. Goubeaud</i>)
07/03 – 03/04	Assistenzarzt in der Inneren Abteilung der Asklepios Klinik Lich
03/04 – 04/07	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik I des Lahn-Dill-Klinikums Wetzlar (<i>Chefarzt Prof. Dr. med. Kramer</i>)
09/06	Erlangung der Zusatzbezeichnung „Notfallmedizin“
Seit 04/07	Freiberufliche Tätigkeit als Notarzt für die Notarzteinsatzgruppe Büdingen und den Kreisausschuss des Lahn-Dill-Kreises

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5277-3



9 178383519527751