

***M2-Pyruvatkinase als Marker für  
kolorektale Neoplasien***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Kai Uwe Franke**

aus **Fritzlar**

Gießen 2017

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,  
Medizinische Klinik IV und V,  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger**

Gutachter: Prof. Dr. med. Philip D. Hardt

Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Bräuninger

Tag der Disputation: 06.08.2018

---

# Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „M2-Pyruvatkinase als Marker für kolorektale Neoplasien“ selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

---

“Fortschritt hat wenig mit Geschwindigkeit zu tun, aber sehr viel mit Richtung.”

Thorsten Wittmann

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION</b> .....	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
2.1 DAS KOLOREKTALE KARZINOM .....	3
2.1.1 <i>Klassifikation</i> .....	3
2.1.2 <i>Epidemiologie, Inzidenz, Mortalität</i> .....	4
2.1.3 <i>Ätiologie / Risikofaktoren</i> .....	7
2.1.4 <i>Anatomie und arterielle Versorgung des Kolons</i> .....	9
2.1.5 <i>Lymphabfluss und entsprechende Infiltration</i> .....	10
2.1.6 <i>UICC / TNM - Klassifikation</i> .....	11
2.1.6.1 T-Stadium .....	11
2.1.6.2 N Stadium .....	12
2.1.6.3 M-Stadium .....	12
2.1.6.4 R-Stadium .....	13
2.1.6.5 G-Stadium .....	13
2.2 GENETISCHE EINFLUSSFAKTOREN .....	15
2.2.1 <i>Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli (FAP)</i> .....	15
2.2.2 <i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Syndrome (HNPCC)</i> .....	16
2.3 ADENOM-KARZINOM-SEQUENZ .....	19
2.4 NEXT-GENERATION-SEQUENCING .....	21
2.5 PRÄVENTION .....	22
2.6 METHODEN DER TUMORERKENNUNG .....	23
2.6.1 <i>Chemische Tests</i> .....	24
2.6.1.1 Guaiac-based fecal occult blood testing (gFOBT) .....	24
2.6.2 <i>Immunologische Tests</i> .....	25
2.6.2.1 ELISA und M2-PK .....	25
2.6.2.2 Faecal Immunochemical Test (FIT) / Immunochemical Fecal Occult Blood Test (iFOBT) .....	26
2.6.3 <i>Genetische Tests</i> .....	28
2.6.3.1 DNS-Test (Cologuard®) .....	28
2.6.4 <i>Endoskopische Verfahren</i> .....	29
2.6.4.1 Koloskopie .....	29
2.6.4.2 Sigmoidoskopie .....	29
2.6.5 <i>Tumormarker</i> .....	30
<b>3 M2-PYRUVATKINASE</b> .....	<b>32</b>
3.1 DIE PYRUVATKINASE .....	32

---

3.2	ISOENZYME DER PYRUVATKINASE .....	34
3.3	DIE ROLLE DER M2-PYRUVATKINASE.....	36
3.4	REGULATION DER EXPRESSION DER M2-PK .....	38
3.5	M2-PK ALS MARKER FÜR NEOPLASIE.....	40
<b>4</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>42</b>
5.1	STUDIENDESIGN UND PROTOKOLL.....	42
5.1.1	<i>Einschluss- und Ausschlusskriterien .....</i>	<i>43</i>
5.1.2	<i>Vorausgesetzte Untersuchungen .....</i>	<i>43</i>
5.1.3	<i>Makroskopische Befundung.....</i>	<i>44</i>
5.1.4	<i>Histopathologische Befundung .....</i>	<i>44</i>
5.2	METHODE DER M2-PK BESTIMMUNG .....	45
5.2.1	<i>Kooperationen und Labor.....</i>	<i>45</i>
5.2.2	<i>Probenmaterial .....</i>	<i>45</i>
5.2.3	<i>Messbereich und Präzision .....</i>	<i>45</i>
5.2.4	<i>Messung.....</i>	<i>46</i>
5.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	47
5.3.1	<i>Chi-Quadrat-Test (x<sup>2</sup>-Test).....</i>	<i>47</i>
5.3.2	<i>Die Spearmansche Rangkorrelation.....</i>	<i>47</i>
5.3.3	<i>Empirische kumulative Verteilungsfunktionen und Survival-Kurven.....</i>	<i>48</i>
5.3.4	<i>(Multiple) Logistische Regression.....</i>	<i>48</i>
5.3.5	<i>Holm Test .....</i>	<i>48</i>
5.3.6	<i>Box- und Whisker-Plot.....</i>	<i>48</i>
5.3.7	<i>Effekte Plots .....</i>	<i>49</i>
5.4	DATENSCHUTZ UND ETHIKVOTUM.....	49
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>
6.1	PATIENTENKOLLEKTIV .....	50
6.1.1	<i>Geschlechtsverteilung des Kollektivs.....</i>	<i>50</i>
6.1.2	<i>Altersverteilung des Kollektivs .....</i>	<i>51</i>
6.1.2.1	<i>Entnahmealter getrennt nach Geschlecht .....</i>	<i>51</i>
6.1.2.2	<i>Alter und Geschlecht von Patienten mit pathologischen Befunden .....</i>	<i>52</i>
6.1.3	<i>Verteilung der Polypen und Karzinome .....</i>	<i>53</i>
6.1.4	<i>Verteilung der histologischen Entitäten .....</i>	<i>54</i>
6.2	HÄUFIGKEITEN VERSCHIEDENER BEFUNDE / RISIKOTYPEN .....	56
6.2.1	<i>Häufigkeiten der Befunde getrennt nach Geschlecht.....</i>	<i>56</i>
6.3	ENTZÜNDUNGEN DES DARMS.....	57
6.4	M2-PYRUVATKINASE .....	58

6.4.1	<i>Acht-Zahlen-Zusammenfassung für metrische Variablen</i> .....	58
6.4.2	<i>M2-PK und Entartungsstadien von Polypen</i> .....	61
6.4.3	<i>M2-PK und Sensitivität / Spezifität</i> .....	62
6.4.4	<i>M2-PK und Polypen, low risk und high risk Situation</i> .....	64
6.4.4.1	Vergleich der empirischen kumulativen Verteilungsfunktionen .....	64
6.4.4.2	Logistische Regression mit proportionalen Odds von Polypen an M2-PK (mit Entzündungspatienten) .....	64
6.4.4.3	Logistische Regression mit proportionalen Odds von Polypen an M2-PK (ohne Entzündungspatienten) .....	68
6.4.5	<i>M2-PK und Multiple logistische Regression für den Risikotyp</i> .....	71
6.4.6	<i>M2-PK und Entzündungen</i> .....	73
6.4.6.1	Spearman'sche Rangkorrelation .....	73
6.4.6.2	Vergleich der empirischen kumulativen Verteilungsfunktionen .....	74
6.4.6.3	Logistische Regression mit proportionalen Odds von Entzündungsdetail an M2-PK .....	75
6.4.7	<i>M2-PK und Entnahmealter / Geschlecht</i> .....	78
6.4.7.1	Effekte-Plots für das logistische Regressionsmodell des Risikotyps .....	78
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>80</b>
7.1	ABHÄNGIGKEIT DER KRK - AUSPRÄGUNG VON GESCHLECHT UND LEBENSALTER .....	81
7.2	VERTEILUNG DER POLYPEN .....	83
7.3	VERTEILUNG DER KARZINOME .....	84
7.4	VERTEILUNG DER HISTOLOGISCHEN ENTITÄTEN .....	86
7.5	ABHÄNGIGKEIT VON ENTZÜNDUNGEN .....	87
7.6	M2-PYRUVATKINASE .....	89
7.6.1	<i>M2-PK als Entzündungsmarker im Blut und Stuhl</i> .....	90
7.6.2	<i>M2-PK und Sensitivität, Spezifität mit Cut-Off-Punkt / Area Under the Curve (AUC)</i> .....	92
7.6.3	<i>M2-PK im Vergleich mit anderen Studien</i> .....	93
7.6.4	<i>M2-PK Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu anderen Tumormarkern</i> .....	96
7.6.5	<i>M2-PK und Karzinome bzw. kann die TuM2-Pyruvatkinase als Marker für Gastrointestinale Neoplasien etabliert werden?</i> .....	98
<b>8</b>	<b>ENTZÜNDUNGEN ALS PRÄZEDENZFÄLLE</b> .....	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>FAZIT UND AUSBLICK</b> .....	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>106</b>
<b>11</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>108</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>110</b>
12.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	110
12.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	114

---

12.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	116
12.4	STUDIENPROTOKOLL.....	118
12.5	ETHIKVOTUM.....	151
<b>13</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>153</b>
<b>14</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>171</b>
<b>15</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>172</b>

# 1 Einleitung

Als kolorektales Karzinom (KRK) bezeichnet man eine tumoröse Erkrankung des Dickdarms. Das KRK entwickelt sich über Jahre hinweg ausgehend von einfachen Darmpolypen über Adenome bis hin zum Karzinom (HERMANEK P 1987; JESS T et al. 2005; MORSON BC 1974).

Jedes Jahr erkranken weltweit über *1,3 Millionen Menschen* am KRK. Davon erliegen fast *700.000 Menschen* den Folgen der Erkrankung (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER / WHO / IARC 2012).

Das KRK ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern (746.000 Fälle / Jahr) und die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen (614.000 Fälle / Jahr). In den elf Jahren von 2002-2012 hat sich die Zahl der Erkrankungen mehr als verdoppelt und die Inzidenz an einem KRK zu erkranken stieg im selben Zeitraum von 9 auf 10%.

Dabei wurden fast 55% aller KRK in den höher entwickelten Staaten (den sog. Industrieländern) sowohl für weibliche als auch männliche Patienten erfasst. Die Mortalität liegt in den Industriestaaten mit fast 48% jedoch etwas niedriger als in den landwirtschaftlich geprägten Ländern (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER / WHO / IARC 2012; SHIKE M et al. 1990). Das spricht für eine grundsätzliche Behandlungsfähigkeit, allerdings noch auf einem Niveau mit offensichtlichem Optimierungspotential. Hier wie anderswo scheint nur eine möglichst frühe Vorsorgeuntersuchung mit einer entsprechenden Diagnostik und möglichst frühzeitiger Behandlung Erfolg zu versprechen.

Aus diesem Grund ist es sinnvoll Früherkennungsmaßnahmen zu treffen. Eine bereits angebotene, zuverlässige Vorsorgeuntersuchung bzw. Diagnostik kann per Koloskopie erfolgen. Damit lassen sich bereits sehr frühe Stadien mit Polypen entdecken und durch Entfernung dieser eine Entartung vermeiden. Die Koloskopie gehört in Deutschland zu den Standard-Vorsorgeuntersuchungen ab dem 55. Lebensjahr der gesetzlichen und privaten Krankenversicherung.

Zu bemerken ist jedoch, dass diese Untersuchung ausschließlich in Deutschland als Vorsorgemaßnahme zur Anwendung kommt. In anderen Ländern findet diese Untersuchungsform keine solche Anwendung.

Des Weiteren nutzten bis 2010 jährlich nur etwa 4,2 Millionen Versicherte das Angebot der Früherkennungskoloskopie. Dies umfasst, in der Altersgruppe von 55 bis 74 Jahren, nur ca. 18,3% der Männer und 20,1% der Frauen (SCHÄFER M et al. 2012). Seit 2012 hat die Bereitschaft zur Koloskopie stetig abgenommen (LERCH M 2014). Aktuell wird sie auf ca. 14% geschätzt (HARDT PD 2017).

Eine alternative Screeningmethode bzw. Sekundärprävention ist der international genutzte Test auf okkultes Blut (Fecal Occult Blood Test = FOBT). Dieser ist sehr kostengünstig und non-invasiv, bietet jedoch nur eine sehr geringe Sensitivität für Adenome und Karzinome (MANDEL JS et al. 2000)

Wünschenswert ist somit ein hochsensitiver und non-invasiver Test, der bisherige Vorsorgeuntersuchungen ergänzen oder sogar ersetzen kann.

Ein vielversprechender Tumormarker, der von Eigenbrodt entdeckt und von Hardt und Mazurek im Hinblick auf das Kolonkarzinom untersucht wurde, ist die dimere (M2) Form der Pyruvatkinase (M2-PK) (EIGENBRODT E et al. 1992; HARDT PD et al. 2003b; HARDT PD et al. 2004c).

Die Pyruvatkinase ist in allen lebenden Zellen für die Energieversorgung essentiell, findet sich aber nur in eukaryotischen Zellen durch Zuckermoleküle modifiziert. Man spricht daher von Glykosylierung. Eine Besonderheit ist die Nachweismöglichkeit dieses Enzymes bzw. Markers im Stuhl des Patienten. Da sich die von Bakterien ausgeschiedenen Pyruvatkinase-Moleküle durch die fehlende Glykosylierung unterscheiden, haben Sie keinen Einfluss auf die Untersuchung mittels selektiver Antikörper (EIGENBRODT E et al. 1992; HARDT PD et al. 2003b; HARDT PD et al. 2004c).

Im Rahmen dieser Arbeit wird der M2-PK - Marker in einem großen multizentrisch prospektiv evaluierten Patientenkollektiv untersucht. Es wird dessen Nutzen als Marker bei der Diagnostik von KRK untersucht.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das kolorektale Karzinom

#### **2.1.1 Klassifikation**

Unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms (KRK) werden alle malignen Tumore des Kolons und Rektums zusammengefasst. Diese machen ca. 90% aller Karzinome im Darm aus. Es ergibt sich eine Verteilung im Dickdarm von 60% im Rektum, 20% im Sigmoid, 10% im Caecum und 10% in anderen Lokalisationen im Darm (Colon asc. / transv. / desc.) (SCHALHORN A et al. 2006).

Dies ist relevant, da je nach Ort des KRK die Tumore unterschiedliche Verteilungen in Bezug auf Geschlecht und Alter aufweisen (IACOPETTA B 2002).

Tumore des proximalen Kolons treten gehäuft bei Frauen und älteren Patienten auf. Dagegen werden Tumore im distalen Kolon eher von Männern und jüngeren Patienten entwickelt (MATANOSKI G et al. 2006; NAWA T et al. 2008).

Über 90% der entdeckten Karzinome sind aus Drüsengewebe hervorgegangen und bilden damit sogenannte Adenokarzinome (AMERICAN CANCER SOCIETY 2013). Weitere 5-10% verteilen sich auf muzinöse Adenokarzinome (MAKSIMOVIC S 2007).

Weitaus seltenere Formen des KRK sind Plattenepithel- und Siegelringzellkarzinome, Karzinoide, kleinzellige Karzinoide, Sarkome als histologische Rarität, undifferenzierte und kleinzellige Karzinome (AGIS H et al. 2006).

Diese Arbeit widmet sich jedoch ausschließlich den Adenokarzinomen.

### 2.1.2 Epidemiologie, Inzidenz, Mortalität

Das KRK ist weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern (746.000 Fälle / Jahr) und die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen (614.000 Fälle / Jahr) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER / WHO / IARC 2012).

Die höchste Wahrscheinlichkeit an einem KRK zu erkranken liegt in den USA für beide Geschlechter bei einem Alter von 69-75 Jahren (SIEGEL R et al. 2014). Laut Daten des Robert-Koch-Instituts erkranken Männer im Schnitt mit 69 Jahren und Frauen mit 75 Jahren (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2013).

Die Wahrscheinlichkeit für Männer in ihrem Leben an einem KRK zu erkranken ist mit 5% im Vergleich zu Frauen mit 4,7% leicht erhöht. Dieser Unterschied ist gravierender, wenn die Inzidenz und Mortalität mit einbezogen wird. Damit ergibt sich für Männer eine generell höhere Wahrscheinlichkeit von 30-40% (SIEGEL R et al. 2014). Generell hat sich seit den 90er Jahren die Zahl der Neuerkrankungen mehr als verdoppelt, und die Inzidenz stieg auf insgesamt 10% (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER / WHO / IARC 2012; SHIKE M et al. 1990).

In Deutschland kam es 2012 (zuletzt erfasste Daten des Robert-Koch-Instituts) zu 33.740 männlichen und 28.490 weiblichen Neuerkrankungen und im gleichen Zeitraum zu 13.772 männlichen und 12.200 weiblichen Todesfällen aufgrund eines KRK.

Die 5-Jahres Prävalenz liegt für Männer bei 116.200 und bei Frauen bei 98.100. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei den Männern und Frauen gleichauf bei 63% -siehe Tabelle 1-. Rückblickend auf die Jahre 2002-2012 sind jedoch die Inzidenz und Mortalität rückläufig (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2013; ROBERT-KOCH-INSTITUT 2014).

Tabelle 1: Auszug aus den epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2013)

	2009		2010		Prognose 2014	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Inzidenz	34.770	29.540	33.800	28.620	35.500	28.400
Mittleres Erkrankungsalter (Jahre)	71	74	71	75		
Sterbefälle	13.572	12.504	13.489	12.510		
5-jahres-Prävalenz	116.800	99.700	116.200	98.100		
Relative 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) (%)			64 (57-68)	65 (58-68)		

Der folgenden Grafik lässt sich entnehmen, dass bei einem Alter von 80+ Jahren ein KRK bei Männern und Frauen deutlich bevorzugt im proximalen Kolon auftritt, dagegen in einem Alter von 0-49 Jahren eher bevorzugt im Rektum.

Bei Vergleich der weltweiten Daten zeigte sich ein gehäuftes Auftreten von KRK von 55% in den Industriestaaten. Dies trifft für weibliche und männliche Patienten zu. Jedoch liegt die Mortalität in den Industriestaaten mit 48% etwas niedriger als in den Entwicklungsländern.

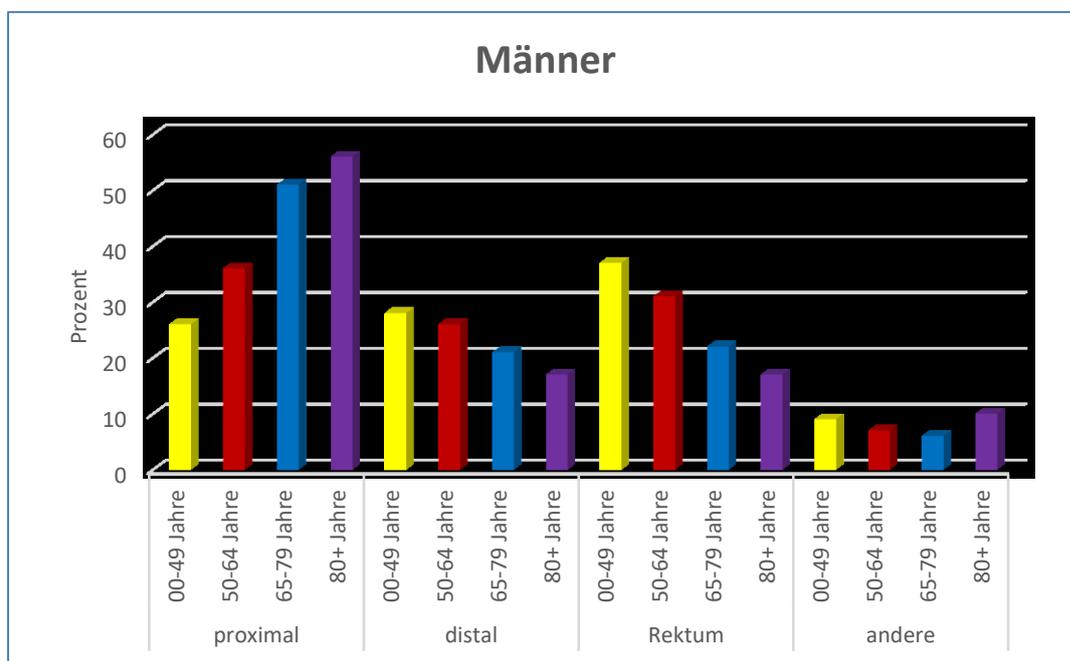


Abbildung 1: Alters- und Lokalisationsverteilung des KRK bei Männern (SIEGEL R et al. 2014)

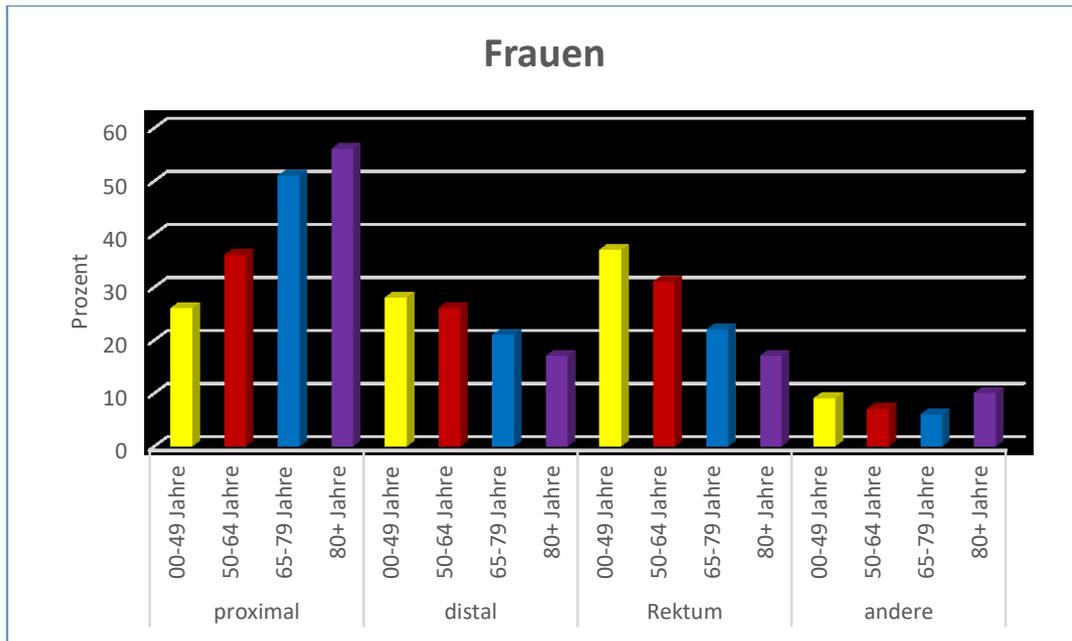


Abbildung 2: Alters- und Lokalisationsverteilung des KRK bei Frauen (SIEGEL R et al. 2014).

Deutschland weist eine ASR (*Age-Standardised-Rate: Eine Formel von Segi et al., mit der sich Populationen unterschiedlicher Altersverteilungen standardisieren und vergleichen lassen*) von 56,2 (/100.000 Einwohner) für Männer und 34,9 (/100.000 Einwohner) für Frauen auf und erreicht damit im internationalen Vergleich ein mittleres Risiko ein KRK zu entwickeln.

Weiterhin scheinen sich die Inzidenz- und die Mortalität der einzelnen Bundesländer zum Teil deutlich zu unterscheiden, wie eine Untersuchung des Robert-Koch-Institutes ergab. Zum Beispiel liegt Hessen über dem deutschen Durchschnitt und Berlin dagegen deutlich darunter. Eine Möglichkeit für diese Diskrepanz kann in der jeweiligen Ernährung gelegen sein (DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (DGE) 2014).

Auf Deutschland entfallen 2014 nach aktuellen Daten vom Robert-Koch-Institut ca. 35.500 Neuerkrankungen bei den Männern und 28.400 bei den Frauen, also insgesamt fast 64.000 prognostizierte Neuerkrankungen für das Jahr 2014 (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2013).

### 2.1.3 Ätiologie / Risikofaktoren

KRK entstehen aufgrund von verschiedenen morphologischen und präkanzerösen Veränderungen der Schleimhaut, die unter dem Begriff der Dysplasie zusammengefasst werden (KLIMPFINGER M et al. 1992).

Hauser schreibt „die Dysplasie ist histologisch durch zelluläre Atypie, abweichende Differenzierung und gestörte epitheliale Architektur gekennzeichnet“ (HAUSER H 2004). Als Folge scheint es regelmäßig zu einer Entwicklung als Adenom-Karzinom-Sequenz zu kommen. Diese beschreibt die Entwicklung von einem Adenom zum Karzinom über einen stetig intensivierten Dysplasiegrad (HERMANEK P 1987; JESS T et al. 2005; MORSON BC 1974).

Nach Hauser und Klimpfinger benötigt es 8-15 Jahre, bevor aus einem adenomatösen Polypen (*entspricht einer gutartigen Schleimhauthypertropie*) ein Karzinom entsteht. Bei frühzeitiger Diagnostik mit Entfernung des Polypen besteht eine Heilungschance bzw. Prävention von mehr als 90% (HAUSER H 2004; KLIMPFINGER M et al. 1992).

Adenome werden unterteilt in niedriggradige (früher leichtgradige / mittelgradige intraepitheliale Neoplasie (IEN)) und hochgradige (hochgradige IEN) Neoplasien. Während einer Koloskopie sollten Adenome stets möglichst früh entfernt werden, da sie ansonsten ihr Volumen alle 2 Jahre verdoppeln können und somit eine erfolgreiche Entfernung im Gesunden immer schwieriger wird (HOFF G 1987).

Adenome werden in tubulär, tubulovillös, villös und serratierte Adenome eingeteilt. Villöse Adenome sind gewöhnlich größer und verfügen über maligneres Potential als das häufigere tubuläre Adenom. Als Hilfe zur Unterscheidung hat die WHO im Jahre 2000 die Adenomklassen definiert. Diese Definitionen wurden jedoch 2010 überarbeitet, weshalb hier nur die aktuellen Angaben genannt werden. Adenome gelten als tubulär, wenn der villöse Anteil < 25% beträgt. Für tubulovillöse Adenome beträgt der Anteil 25-75% und für villöse Adenome > 75% (HAMILTON SR et al. 2000; HAMILTON SR et al. 2010).

Das Malignitätsrisiko (also die Inzidenz einer high grade intraepithelialen Neoplasie (HGIEN)) eines Adenoms korreliert mit seiner Größe, Villösität, Dysplasie und dem Alter des Patienten. Daher gilt: Je größer ein Adenom ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit auf ein hochgradig villöses Adenom, eine hochgradige IEN und auf mehrere Adenome zu treffen (KUROME M et al. 2008; O'BRIEN MJ et al. 1990).

Für diese Arbeit wurden alle entnommenen Polypen vom Pathologen anhand ihrer Beschaffenheit in Adenome mit low grade intraepithelialer Neoplasie (LGIEN) und Adenome mit high grade intraepithelialer Neoplasie (HGIEN) eingeteilt. Diese Einteilung entspricht der aktuellen WHO Klassifikation (BOSMAN FRED T. 2010).

Die LGIEN oder auch in manchen Quellen als „low risk Adenome“ bezeichnet sind definiert als 1-2 tubuläre Adenomen mit einer Länge von weniger als 10mm. In manchen Graphiken werden diese der Übersicht auch als ALow bezeichnet. (BOSMAN FRED T. 2010)

Dagegen sind die HGIEN oder auch „high risk Adenome“ definiert als Adenome mit villöser Histologie, einer Länge ab 10mm oder einer Anzahl von drei oder mehr tubulären Adenomen oder 10 oder mehr serratierten Adenomen beliebiger Größe. In manchen Graphiken werden diese auch als AHigh (BOSMAN FRED T. 2010; DAVID A et al. 2012).

Tabelle 2: Einteilung der Adenome (BOSMAN FRED T. 2010)

<b>low risk Adenom / LGIEN / ALow</b>	<b>high risk Adenom / HGIEN / AHigh</b>
1-2 Adenome	≥ 3 tubuläre Adenome
< 1 cm	≥ 1 cm
tubulär	villös
niedriggradige IEN (Dysplasien / intraepitheliale Neoplasien)	≥ 1 Adenom mit hochgradiger IEN
	≥ 10 serratierte Adenome beliebiger Größe

Präkanzeröse Veränderungen der Kolonschleimhaut, die nicht der Adenom-Karzinom-Sequenz folgen, können sich auch als Folge von Vorerkrankungen, wie z.B. der FAP (familiäre adenomatöse Polypose) (ca. 1%), der Colitis Ulcerosa (ca. 1%) und dem Lynch-Syndrom (ca. 5% / im Falle: autosomal dominant: 80%) manifestieren. Eine IEN kann sich in unterschiedlichen Schweregraden ausbilden, die in direktem Zusammenhang mit dem Karzinomrisiko stehen.

### 2.1.4 Anatomie und arterielle Versorgung des Kolons

Die Grenze zwischen Caecum und Colon ascendens wird durch die Bauhinsche Klappe gebildet. Zum Rektum grenzt sich das Kolon durch eine festgelegte Grenzlinie ab, die bei 16cm oral der Anokutanlinie liegt.

Sekundär retroperitoneal finden sich das Colon ascendens und descendens, dagegen liegen das Colon transversum und das Sigmoideum intraperitoneal.

Die Unterscheidung von Sigmoideum und Rektum gelingt durch die beim Sigma vorhandenen Tännien, der Bedeckung durch Peritoneum und den Appendices epiploicae. Eine Versorgung wird durch Äste der A. mesenterica sup., der A. mesenterica inf. Und der A. pudenda int. ermöglicht. Interessant ist die Trennung in Colon transversum und Colon desc., die durch den Wechsel der Gefäßversorgung von der A. mesenterica inf. Auf die A. pudenda int bestimmt ist angibt (BECKER H et al. 2001; SCHALHORN A et al. 2006; SCHUMPELICK V 2006).

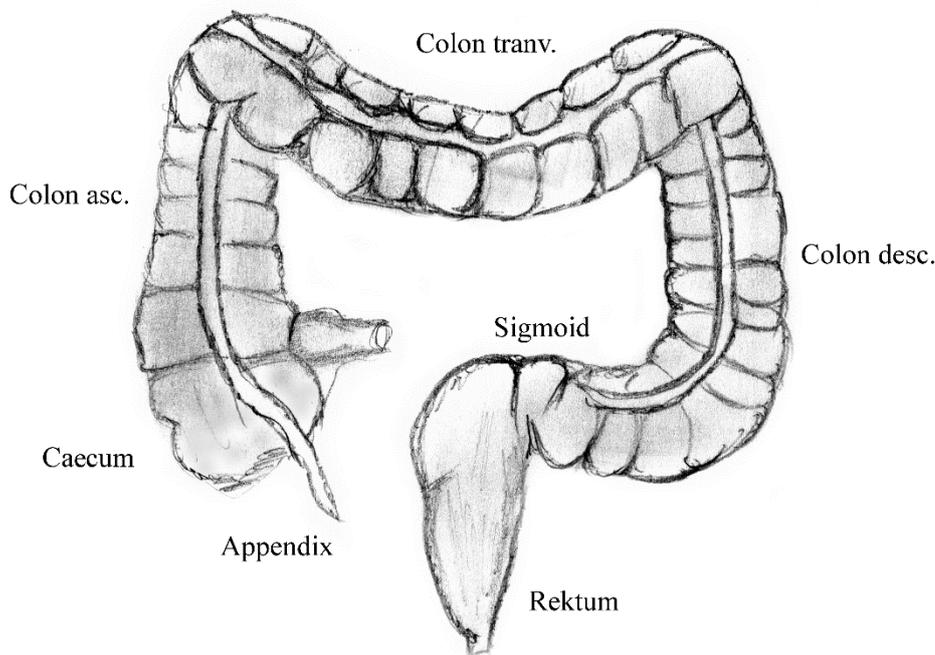


Abbildung 3: Aufbau des Kolons

### 2.1.5 Lymphabfluss und entsprechende Infiltration

Ein frühzeitiger Einbruch in Lymphbahnen, parakolisches / perirektales Fettgewebe oder venöse Blutgefäße ist nicht ungewöhnlich beim KRK. So kann auch eine infiltrierte Submukosa ein Zeichen für eine lymphogene Metastasierung sein. Wenn Lymphknoten befallen sind, wird dies in der TNM - Klassifikation mit mindestens N1 beschrieben. Fernmetastasen (M1) liegen bereits bei Infiltration sog. juxtaregionärer Lymphknoten (WITTEKIND C et al. 2010).

Tabelle 3: Lymphknotenstationen (COERPER S et al. 2009)

Regionäre Lymphknoten	A. Ileocolica	A. Colica dextra	Colica media	Colica sinistra	Mesenterica inf.	Aa. Sigmoideae	A. Rectalis sup.	A. Iliaca int.	Rectalis media, inf. mesorectale
Appendix	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Caecum	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Colon asc.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Flex. hep.	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Colon transv.	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Flex. lien.	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Colon desc.	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Sigma	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Rektum	-	-		-	+	-	+	+	+

### 2.1.6 UICC / TNM - Klassifikation

Mit Hilfe der TNM bzw. der UICC (Union Internationale contre le Cancer) – Klassifikation kann die Größe eines Primärtumors, seine Ausbreitung, Infiltration in Lymphknoten und Metastasen erfasst werden.

Im Folgenden sollen die Aspekte der TNM-Klassifikation vorgestellt werden. Dabei steht das T-Stadium für Tumorstadium, N-Stadium für Knotenstadium (engl. node), M-Stadium für Metastasierung, R-Stadium für einen Residualtumor und G-Stadium für verschiedene Stufen der Differenzierung (engl. grading).

#### 2.1.6.1 T-Stadium

Das T-Stadium bezieht sich auf die Größe und Ausdehnung des Primärtumors.

Tabelle 4: T- Stadium (SOBIN LH et al. 2002; WITTEKIND C et al. 2010; WITTEKIND C et al. 2010)

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ, intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria (ohne feststellbare Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa)
T1	Tumor infiltriert Submukosa (Größe: maximal 2cm)
T2	Tumor infiltriert Muskularis propria (Größe: 2cm-5cm)
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in perikolisches Gewebe (Größe: > 3cm)
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert anliegende Organe oder Strukturen bzw. andere Teile des Kolons
T4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt anliegende Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

### 2.1.6.2 N Stadium

Die N-Klassifikation beschreibt den Infiltrationsstatus regionaler Lymphknoten. Um eine zuverlässige Aussage treffen zu können, sind mindestens 12 Lymphknoten notwendig. Diese Festlegung gilt auch heute noch als aktuell und wurde erst 2010 in einer Studie von Rajput et al. überprüft und bestätigt (RAJPUT A et al. 2010).

Tabelle 5: N-Stadium (WITTEKIND C et al. 2010)

Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten
pN0	Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung von 12 oder mehr Lymphknoten ohne Befund
N1	Metastase(n) in 1-3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in 1 regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
pN1c	Wenn ein solches Tumorknötchen vom Pathologen als vollständig durch Tumor ersetzter Lymphknoten (im Allgemeinen mit glatter äußerer Kontur) angesehen wird, dann sollte es als Lymphknotenmetastase klassifiziert werden und jedes Tumorknötchen sollte einzeln als Lymphknotenmetastase gezählt und in der Klassifikation berücksichtigt werden
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4 - 6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

### 2.1.6.3 M-Stadium

Das M-Stadium dient der Darstellung der Fernmetastasierung eines Primärtumors.

Tabelle 6: M- Stadium (WITTEKIND C et al. 2010)

Mx	das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
----	--

M0	kein Anhalt für das Vorliegen von Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

#### 2.1.6.4 R-Stadium

Im Rahmen einer Operation muss durch den Pathologen per Schnellschnitt bestimmt werden, ob der Tumor restlos entfernt wurde, also die Schnittländer keine Malignitätszeichen mehr aufweisen. Dies wird in Form des R-Stadium dargestellt. Das Ziel des Operateurs ist es eine R0 Resektion zu erreichen.

Tabelle 7: R-Stadium (HERMANEK P et al. 1994; WITTEKIND C et al. 2010)

Rx	Ein Vorhandensein eines Residualtumors kann nicht ausgeschlossen werden
R0	Kein Residualtumor nachweisbar (weder makroskopisch, noch mikroskopisch)
R1	Residualtumor mikroskopisch nachweisbar
R2	Residualtumor makroskopisch nachweisbar (Tumorrest, Lymphknoten- / Fernmetastasen)

#### 2.1.6.5 G-Stadium

Karzinome von Drüsengeweben werden zusätzlich nach Malignitätsgrad differenziert. Dies wird als „Grading“ bezeichnet.

Tabelle 8: G-Stadium (Grading / Malignitätsgrad) (WITTEKIND C et al. 2010)

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Im Folgenden sind die Stadien des KRK, in Abhängigkeit der genannten TNMRG-Stadien, zusammengefasst in der -Tabelle 9-, dargestellt.

Tabelle 9: Klassifikation der Tumorstadien (UICC 2010) (WITTEKIND C et al. 2010)

Stadium	Dukes	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen	Definition
0		Tis	N0	M0	Carcinoma in situ
I	A	T1, T2	N0	M0	T1: Beschränkung auf Mukosa und Submucosa T2: Infiltration von Muscularis propria
IIA	B	T3	N0	M0	T3: Infiltration aller Wandschichten
IIB	--	T4a	N0	M0	T4: Überschreiten der Darmwand
IIIC	C	T4b	N0	M0	
IIIA	--	T1 - 2	N1 (1-3 betroffene LK)	M0	Regionale Lymphknoten
	--	T1	N2a (4-6 betroffene LK)	M0	
IIIB	--	T3 - 4	N1 (1-3 betroffene LK)	M0	
	--	T2-3	N2a (4-6 betroffene LK)	M0	
	--	T1-2	N2b ( $\geq 7$ betroffene LK)	M0	
IIIC	--	T4a	N2a (4-6 betroffene LK)	M0	
	--	T3-T4a	N2b ( $\geq 7$ betroffene LK)	M0	
	--	T4b	N1-2	M0	
IVA	D	jedes T	jedes N	M1a	Fernmetastasen
IVB	--	jedes T	jedes N	M1b	

## 2.2 Genetische Einflussfaktoren

Genetischen Prädispositionen, wie z.B. beim HNPCC oder dem autosomal-dominanten Erbgang beim FAP wird ein Einfluss von ca. 10% auf die Entstehung eines KRK zugeschrieben. Man unterscheidet Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli (FAP) und Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Syndrome (HNPCC), das sog. Lynch-Syndrom.

### **2.2.1 Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli (FAP)**

Das FAP ist eine obligate Präkanzerose, die autosomal-dominant vererbt wird (MISHRA N et al. 2012). Es wird angenommen, dass es für ca. 1% aller KRK verantwortlich ist und sich mit dem frühen Auftreten von 100-1000 adenomatösen Polypen, die meist über das gesamte Kolon ausgebreitet sind, vergesellschaftet ist (ALKHOURI N et al. 2010). Außerhalb des Kolons können sich Tumore auch in anderen Organen manifestieren, wie z.B. eine kongenitale Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels, duodenale Adenome bzw. Adenokarzinome, Schilddrüsenkarzinome und Hirntumore (TRAINER AH 2009).

Grundsätzlich werden FAP-Patienten mit einer gesunden Darmschleimhaut geboren und entwickeln erst nach 20 bis 30 Jahren eine Polyposis. Die große Gefahr der Polyposis ist die nahezu 100%ige Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines KRK bis zur 4. Dekade (ALKHOURI N et al. 2010).

Nur eine genetische Beratung bzw. Testung kann frühzeitig die Mutation im APC-Gen nachweisen. Eine frühzeitige Koloskopie mit Biopsie wird bereits ab dem 10. Lebensjahr empfohlen. Diese sollte jährlich wiederholt und mit einer Augenhintergrundspiegelung kombiniert werden, da sich dort spezifische Veränderungen als Hinweis auf eine Genmutation zeigen können (ALKHOURI N et al. 2010; COTTRELL S et al. 1992; TRAINER AH 2009). Ebenfalls sollte eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) durchgeführt werden, da die FAP vermehrt mit präkanzerösen Veränderung im Gastroduodenalbereich vergesellschaftet ist.

Durch die 100%ige Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Karzinoms im Kolon sollte eine sphinktererhaltende totale Proktokolektomie mit Ileoanal-Anastomose durch einen J-Pouch durchgeführt werden. Dies gilt als Goldstandard bei der Therapie der FAP (AGIS H et al. 2006; ALKHOURI N et al. 2010; BELIARD A et al. 2010).

### 2.2.2 *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Syndrome (HNPCC)*

Das „Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Syndrome“ (HNPCC) ist eine autosomal-dominant vererbte Prädisposition für die Entstehung eines KRK. Die Erkrankung wird auch als „Lynch-Syndrom“ bezeichnet. Das Lynch-Syndrom ist für 5% aller Karzinome verantwortlich, da es eine hohe Penetranz von 80-85% hat. Das durchschnittliche Manifestationsalter liegt bei ca. 45 Jahren, jedoch selten vor dem 25. Lebensjahr (LYNCH HT et al. 1998; SCHLINGENSIEPEN I 2011).

Die Erkrankung wird durch eine erbliche Mutation in einem von vier DNS Mismatch Reparaturgenen (MMR-Genen) hervorgerufen. Etwa jede 500. Person ist Träger dieser Mutation im MMR Gen. Dies macht das HNPCC zur häufigsten genetischen Prädisposition (STEINKE V et al. 2013).

Durch die hohe Penetranz erkranken in Deutschland jedes Jahr ca. 3.300 Patienten an einem durch HNPCC verursachten KRK (VOGELSANG H 2000). „Das HNPCC-Syndrom stellt damit die häufigste Entität der hereditären Kolonerkrankungen dar“ (VOGELSANG H 2000). Auffällig ist die mit über 50%iger bzw. sogar bis 80% reichende Wahrscheinlichkeit, dass sich ein durch HNPCC ausgelöstes KRK im rechten Kolonabschnitt lokalisiert (VOGELSANG H et al. 2001).

Weiterhin findet man Tumore auch in anderen Organsystemen, wie dem Endometrium (28%), seltener jedoch im oberen Gastrointestinaltrakt (6%), Mammae (6%), im hepatobiliären System (4%), Ovar (3%), im Urogenitalsystem (2%), Dünndarm (1%) oder Gehirn (0,4%-3%) (AL-TAIE O et al. 2001; LYNCH HT et al. 1998; SCHACKERT G 2016; VOGELSANG H et al. 2001).

Die Histologie der Karzinome wird oft als gering differenzierte Adenokarzinome beschrieben. Diese weisen ein solide-trabekuläres und medulläres Tumorwachstum auf (HOLINSKI-FEDER E et al. 2006). Darüber hinaus werden Karzinome ebenfalls gehäuft als muzinöse bzw. siegelringzellige Adenokarzinome beschrieben (VOGELSANG H et al. 2001).

Man unterscheidet zwei Formen des Lynch Syndroms:

### **Lynch I und Lynch II:**

Lynch I (HNPCC I) weist eine verstärkte familiäre Assoziation auf, jedoch ohne Bezug zu extrakolischen Tumoren.

Lynch II (HNPCC II) tritt dagegen als KRK häufiger familiär gepaart mit anderen Karzinomen (Haut, Larynx, Mamma, Pankreas, Ovar und Endometrium) auf. Die genauen Kriterien, die ein HNPCC ausmachen, wurden von der Mallorca Group als klinische Leitlinien (Amsterdam Kriterien) formuliert (VASEN HF et al. 2013).

Die Amsterdam II-Kriterien stellten eine Weiterentwicklung der Amsterdam I Kriterien dar, erfassten aber nur ca. 50% aller Fälle. Daher mussten weitere Kriterien gefunden werden, um möglichst alle risikobehafteten Familienangehörigen zu finden. Um dies zu schaffen, wurden die sog. „Bethesda-Kriterien“ festgelegt. Diese helfen die klinische Verdachtsdiagnose des HNPCC-Syndroms zu stellen -siehe Tabelle 10-.

Die Ursache für das Auftreten des HNPCC liegt in einer Mutation von DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)-Genen in der Keimbahn. Bei HNPCC finden sich Deletionen oder Insertionen in den repetitiven Sequenzen, da die Polymerasen dort häufig Fehler machen, die bei MMR-Defizienz nicht beseitigt werden. Die defekten Reparaturgene können als Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) nachgewiesen werden (AL-TAIE O et al. 2001).

Treffen die Bethesda-Kriterien auf einen Patienten mit MSI zu, so ist das Vorliegen eines HNPCC-Syndroms wahrscheinlich.

Tabelle 10: Bethesda-Kriterien (revidiert; mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein) (NATIONAL CANCER INSTITUTE 1997)

<b>Bethesda-Kriterien</b>
KRK bei einem Patienten, Erstdiagnose vor dem 50. Lebensjahr
Synchrone/metachrone Kolon-/Rektumkarzinome oder HNPCC-assoziierte Karzinomerkrankungen (Endometrium, Nierenbecken/Ureter, Dünndarm, Magen, Pankreas, Gallengang, Ovar, hepatobiliäres System und Gehirn-üblicherweise Glioblastome, Talgdrüsenadenome und Keratoakanthome) unabhängig vom Alter
Kolorektales Karzinom mit MSI-Histologie typischer Morphologie, diagnostiziert bei einem Patienten vor dem 60. Lebensjahr
Patient mit KRK und mindestens einem erstgradigen Verwandten mit einem HNPCC-assoziierten Tumor (s.o.), mit mindestens einem Tumor, dessen Erstdiagnose vor dem 50. Lebensjahr gestellt wurde
Patient mit KRK und mindestens zwei erst- oder zweitgradig Verwandten mit HNPCC-assoziierten Tumoren (s. o.), unabhängig vom Erkrankungsalter

Die häufigsten Karzinome bei HNPCC-Patienten sind die KRK, wobei ca. zwei bis drei Prozent der KRK auf einem MMR-Gendefekt beruhen. Es besteht zusätzlich ein erhöhtes Auftrittsrisiko für weitere Karzinome, welche in den Bethesda-Kriterien aufgeführt sind -siehe Tabelle 10-.

Andere Karzinome, wie das Mamma-, Blasen- und Prostatakarzinom treten bei Patienten mit HNPCC zwar etwas häufiger auf, zählen jedoch nicht zu den typischen HNPCC-assoziierten Karzinomen (STEINKE V et al. 2013).

Tabelle 11: HNPCC-assoziierte Karzinome und ihre Auftrittswahrscheinlichkeiten

<b>Tumor</b>	<b>Risiko Männer</b>	<b>Risiko Frauen</b>
Kolorektales Karzinom	34 - 73%	32 - 59%
Endometriumkarzinom		39 - 50%
Ovarialkarzinom		7 - 8%
Magenkarzinom	1 - 6%	
Karzinom des Nierenbeckens	2 - 8%	
Gallengangskarzinom	1 - 4%	
Dünndarmkarzinom	1 - 4%	

### 2.3 Adenom-Karzinom-Sequenz

Eine Theorie, die versucht die Karzinomentstehung in ein Modell zu bringen, wurde von Vogelstein 1988 formuliert und später in Zusammenarbeit mit Fearon in einem neu entwickelten Modell, der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ interpretiert.

Dieses Modell baut darauf auf, dass Karzinome über Zwischenschritte entstehen. Diese beginnen mit einem Adenom, das sich in ein Adenokarzinom transformiert. Bei seinen Studien fiel auf, dass größere Adenome (>1cm) mit einem deutlich erhöhten Risiko einhergehen, sich bösartig zu verändern.

Daher besteht aus klinischer Sicht die Notwendigkeit, polypöse Läsionen > 1cm auf jeden Fall restlos zu entfernen. Gleichzeitig sollten Polypen mit einer Größe von kleiner 1cm ebenfalls entfernt werden, da sie im Verlauf weiterwachsen können (FEARON ER et al. 1990; VOGELSTEIN B et al. 1988).

Nach der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein entstehen Karzinome durch eine Verkettung von Einzelschritten, die in einer Mutation des APC - Gens ihren Anfang nehmen -siehe Abbildung 4-.

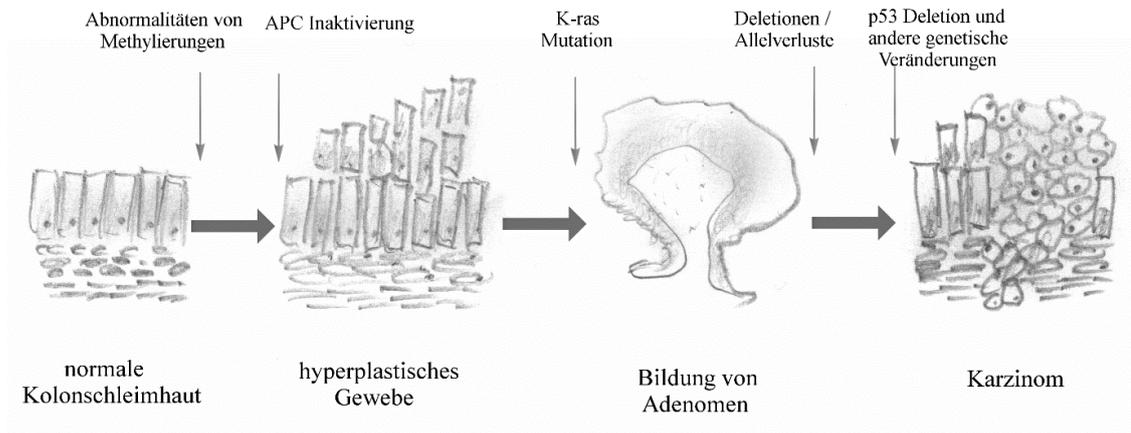


Abbildung 4: Verbessertes Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz nach (FEARON ER et al. 1990) und modifiziert durch (TORIBARA NW et al. 1995)

Dieses Gen ist beim FAP-Syndrom bereits in der Keimbahn mutiert, wodurch das Karzinomrisiko dieser Erkrankung bedingt wird.

Der nächste Schritt ist die Mutation des K-ras, in dessen Folge es zur Bildung sog. *intermediärer Adenome* kommt.

In weiteren Schritten mutieren verschiedene Gene, wie DCC, SMAD2 oder SMAD4. Die sich daraus entwickelnden Adenome werden als *späte Adenome* bezeichnet.

Der letzte Schritt ist eine Mutation im p53-Gen. Da in allgemeinen Kolonadenomen diese Mutation nicht auftritt, dagegen in KRK schon, wird dieser Schritt als essentiell angesehen (KUMAR V et al. 2007).

## 2.4 Next-Generation-Sequencing

Das kolorektale Karzinom ist eine Störung, bei welcher genomische Umlagerungen, Genfusionen, Punktmutationen oder Veränderungen der Chromosomenzahl die Krankheit initiieren und deren Fortschreiten begünstigen können. Mit Hilfe moderner Next-Generation-Sequencing (NGS) – Techniken hat sich die Katalogisierung solcher genomischer Veränderungen revolutioniert (KAHVEJIAN A et al. 2008).

Das NGS ist bereits bei diversen Krebsarten erfolgreich zum Einsatz gekommen: Karzinome der Haut, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Hepatozelluläres Karzinom und das kolorektale Karzinom (AGRAWAL N et al. 2012; FUJIMOTO A et al. 2012; MARDIS ER 2012; ZANG ZJ et al. 2012).

Ein Ziel beim Einsatz von NGS kann das Aufspüren von pathogenen Einflüssen auf die KRK Entwicklung sein. Mit Hilfe von NGS wurde bei der Analyse von KRK-Sequenzdatensätzen genetisches Material von *Fusobacterium* identifiziert (BASS AJ. et al. 2011; KOSTIC AD et al. 2011; KOSTIC AD et al. 2012).

Zukünftige Therapiestrategien erfordern genaue genetische Informationen über den jeweiligen Krebstyp. Hierbei kann der Einsatz von NGS wertvolle Unterstützung leisten.

## 2.5 Prävention

Das Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken, kann mit geeigneten präventiven Maßnahmen gesenkt werden (SCHMIEGEL W et al. 2008). Die S3-Leitlinien der DGVS empfehlen in ihrer aktuellen Fassung vom August 2014 eine gesunde Lebensweise, um das Risiko für ein KKK zu minimieren. Dies beinhaltet regelmäßige körperliche Aktivität und einen BMI unter 25 kg/m<sup>2</sup>, da sich bei Personen mit erhöhtem BMI (> 25 kg/m<sup>2</sup>) gehäuft Kolonadenome mit erhöhtem Karzinomrisiko finden (GIOVANNUCCI E 2002; GIOVANNUCCI E 2003; GIOVANNUCCI E 2003). Gleichzeitig bestätigten Untersuchungen von Friedenreich et al., dass Personen mit gesteigerter körperlicher Aktivität deutlich weniger Kolonadenome aufweisen (; FRIEDENREICH CM et al. 2002; TERRY MB et al. 2002). Tabakrauchen wurde als ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung von Kolonadenomen und KKK festgestellt (LEUFKENS AM et al. 2010; LIMBURG PJ et al. 2003). Es zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Raucherjahre und dem Auftreten von multiplen Adenomen und der Adenomgröße (REID ME et al. 2003).

Zur Protektion wird eine höhere Ballaststoffzufuhr durch genügend Obst und Gemüse empfohlen und sollte durch den weitestgehenden Verzicht auf rotes Fleisch ergänzt werden (SCHMIEGEL W et al. 2008).

Wenig Ballaststoffe, sowie geräuchertes, gepökeltes und rotes Fleisch waren dagegen mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert. Zusätzlich sollte auch der Alkoholkonsum eingeschränkt werden, um eine weitere Risikoreduktion zu erreichen (SCHMIEGEL W et al. 2008).

Neben den Ballaststoffen, als protektive Ernährungskomponente, spielt auch eine ausreichende Folsäure- und Methioninzufuhr eine Rolle.

Folsäure findet sich überwiegend in grünem Blattgemüse und dient im Körper als Überträger von Kohlenstoffresten in der Purin- und Thymidilatsynthese, sowie der DNS-Methylierung. Man geht davon aus, dass ein niedriger Folsäurespiegel zu einer Schädigung der DNS oder eine veränderte Genexpression zur Folge hat und somit die Entstehung eines KKK begünstigen kann.

Bekräftigt wird diese Vermutung durch eine Beobachtung des Enzyms Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), das durch einen weit verbreiteten Polymorphismus im

C677T-Gen in seiner Funktion beeinträchtigt wird und dadurch schützende Stoffwechselläufe nicht mehr erfüllen kann und so zu KRR bei erniedrigten Folsäurespiegeln führen kann. Die MTHFR hilft z.B. beim Abbau des schädlichen Homocysteins und der bakteriellen Methanbildung (BOTT C et al. 2003; SCHMIEGEL W et al. 2008).

## 2.6 Methoden der Tumorerkennung

Die Wahrscheinlichkeit eine Neoplasie im Kolon zu entwickeln nimmt im Alter stetig zu (WHITLOCK EP et al. 2008a). Dies deckt sich mit Studien von Schmiegel et al., die ein überwiegendes (95%iges) Auftreten von KRR erst ab dem 50. Lebensjahr zeigen konnten, wodurch es Sinn macht vor allem ab diesem Alter eine Vorsorgeuntersuchung durchzuführen (SCHMIEGEL W et al. 2008). Ein Screening in Form einer Koloskopie vor dem 50. Lebensjahr wird nicht empfohlen, da eine prospektive Studie nur eine sehr geringe Nachweisrate von durchschnittlich 3,5% bei den 40- 49jährigen zeigen konnte. Patienten einer KRR-Risikogruppe sollten dagegen möglichst frühzeitig und regelmäßig koloskopiert werden (IMPERIALE TF et al. 2002).

Grundsätzlich werden die Verfahren der Tumorerkennung unterteilt in zwei Kategorien. Die eine dient dem Nachweis von Karzinomen mit Hilfe von FOBT: genetischen Stuhltests oder dem M2-PK Tumormarker.

Die andere Kategorie ist zusätzlich in der Lage Adenome zu entdecken. Als Verfahren kommen in Frage: *Koloskopie*, *Sigmoidoskopie*, *CT-Kolonographie*, *Kapselendoskopie* (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2014).

### **2.6.1 Chemische Tests**

Chemische Tests beruhen auf dem Nachweis von z.B. Blut anhand von chemischen Reaktionen, die als Folge eine Farbänderung aufweisen. Es handelt sich um einen qualitativen Test.

#### **2.6.1.1 Guaiac-based fecal occult blood testing (gFOBT)**

Der einfachste Weg der Screeninguntersuchung ist die Stuhluntersuchung auf okkultes Blut. Dieser Test stützt sich darauf, dass KRK häufiger von Blutungen betroffen sind, als die normale Schleimhaut (SCHMIEGEL W et al. 2008).

Der gFOBT-Test verwendet Filterpapier, das mit Guaiakharz imprägniert ist. Im Stuhl vorhandenes Hämoglobin bindet sich an das Harz und lässt sich unter Zugabe von Wasserstoffperoxid blau färben. Insgesamt gibt es drei Tests auf dem Markt: Hämocult®, HemoCare® und HemoFEC®.

Untersuchungen zeigten, dass KRK auch intermittierend bluten können (DORAN J et al. 1982). Aus diesem Grund erfolgt der Test auf okkultes Blut mittels wiederholter (meist drei), aufeinanderfolgender Stuhlproben (AHLQUIST DA 1989). Insgesamt konnte durch diese Vorsorgeuntersuchung die Mortalität des KRK um 16-25% gesenkt werden. Es wird ein einjähriges Testintervall in den S3-Richtlinien vorgeschlagen, da dies einem zweijährigen Intervall in Bezug auf die Mortalität überlegen war (POX CP et al. 2013).

Ein positiver Hämocult-Test sollte im Anschluss immer eine Koloskopie zur weiteren Diagnosesicherung nach sich ziehen.

Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2007, die insgesamt 59 Studien zum gFOBT-Test auswertete, kam zu dem Ergebnis, dass der Test eine äußerst variable Sensitivität von 6,2% (Spezifität 98,0%) bis 83,3% (Spezifität 98,4%) aufwies. Gleichzeitig variierte ebenfalls die Spezifität von 65,0% (Sensitivität 44,1%) bis 99,0% (Sensitivität 19,3%) (BURCH J. A. et al. 2007).

Der Test ist äußerst günstig durchzuführen und non-invasiv. Jedoch sind zum Nachweis von intermittierenden Blutungen regelmäßige Wiederholungen nötig. Da der Test nur unspezifisch auf Blut reagiert, kann er durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst werden. Dies macht ca. 10 Tage vor Beginn der Untersuchung das strikte Einhalten einer Diät erforderlich. Auch ist der Test nicht spezifisch für Blutungsquellen im Kolon, sodass auch proximale Blutungen falsch positive Ergebnisse liefern können (ELSAFI SALAH H. et al. 2015; LAKATOS PL et al. 2013; MANDEL JS et al. 2000)

Aus diesen Gründen sollte der gFOBT nicht als alleinige Vorsorgeuntersuchung zur Anwendung kommen.

Eine Alternative können dagegen sogenannte Immunologische FOBT (iFOBT) bzw. fäkale immunochemische Tests (FIT). Diese reagieren nur auf humanes Blut sensibel, wodurch keine Änderung der Ernährung beachtet werden muss.

## **2.6.2 Immunologische Tests**

Immunologische Tests nutzen Antikörper zum Nachweis spezifischer Antigene. Sie sind spezifischer als rein chemische Tests und zählen zu den quantitativen Tests (YEASMIN F. et al. 2013).

### **2.6.2.1 ELISA und M2-PK**

Der Nachweis der dimeren Form der Pyruvatkinase erfolgt mit Hilfe des „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA).

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis Toxinen, niedermolekulare Verbindungen (z.B. Hormone), Viren, von Proteinen (bsp. Antikörpern) und Enzymen wie der M2-PK.

Das Testprinzip basiert auf spezifischen Antikörpern, die an das nachzuweisende Antigen (z.B. die M2-PK) binden. Antikörper-gekoppelte Enzyme führen dabei nach Zugabe eines farblosen Substrates, dem sog. Chromogen, zu einem Farbumschlag, zu Fluoreszenz oder Chemolumineszenz. Letztere Reaktion dient zur Quantifizierung der Antigenkonzentration.

Man unterscheidet das direkte, das indirekte und das Sandwich-ELISA.

Im Rahmen dieser Studie kommt das Sandwich-ELISA zum Einsatz. Hierbei werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an unterschiedliche Epitope der M2-PK binden. Der erste sog. Coat-Antikörper wird meist an eine feste Phase, wie sie in einer Mikrotiterplatte vorliegt, gebunden. Nach Ausspülen wird das Antigen hinzugefügt und inkubiert, um die Antigen-Antikörperbindung zu ermöglichen.

Die Platte wird im Anschluss erneut gewaschen. Ungebundene Antigene werden so entfernt. Nun erfolgt die Beigabe des Detektions-Antikörpers, der seinerseits ein Enzym gebunden hat. Dadurch bildet sich der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, weswegen das Verfahren als Sandwich-ELISA bezeichnet wird (HEINRICH PC et al. 2014; LENG SEAN X. et al. 2008; VAN WEEMEN B. K. et al. 1971).

#### ***2.6.2.2 Faecal Immunochemical Test (FIT) / Immunochemical Fecal Occult Blood Test (iFOBT)***

Immunologische Tests basieren auf der Nutzung von Antikörpern zum Nachweis von Antigenen bzw. in diesem Fall von menschlichem Hämoglobin.

Zu den immunologischen Tests zählt z.B. der FIT (engl.), welcher auch unter dem Synonym iFOBT bekannt ist.

Dieser Test wurde als Alternative für den gFOBT entwickelt, um eine höhere Sensitivität beim Nachweis von Blut im Stuhl zu erlangen. Der FIT ist in der Lage selektiv das Globulin (Protein) im Stuhl nachzuweisen. Dies beseitigt ein großes Problem des gFOBT, der nur unspezifisch auf humanes Globulin-Protein reagiert und so durch Fleischverzehr falsch positiv sein kann.

Ein großer Vorteil immunologischer Tests ist, dass diese höchst selektiv für menschliches Blut sind, wodurch falsch-positive Ergebnisse des gFOBT ausgeschlossen und die Spezifität erhöht werden kann (RANSOHOFF DF 2007). Ein weiterer Vorteil ist, dass bereits normale Verdauungsprozesse ausreichen, um das Globulin-Protein aus dem proximalen Darm so stark zu degradieren, dass falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen sind.

Eine Studie von Oort aus dem Jahre 2009 konnte im Vergleich zum gFOBT beim FIT eine Verbesserung der Sensitivität von 74,2% auf 87,1% feststellen. Dies resultierte in einer Erkennungsrate von Krebs bei 54/62 Personen im Vergleich zum gFOBT mit 46/62 Personen (OORT FA et al. 2010). Weitere Studien zeigten für iFOBT eine Sensitivität von 60% im Vergleich zum gFOBT von ca. 30% (BURCH J. A. et al. 2007).

Eine Überprüfung von insgesamt 59 Studien ergab für den iFOBT ebenfalls eine variable Sensitivität von 5,4% (Spezifität 98,5%) bis 62,6% (Spezifität 94,3%). Die Spezifität reichte von 89,4% (Sensitivität 30,3%) bis 98,5% (Sensitivität 5,4%). Im Vergleich zum gFOBT zeigte sich insgesamt somit keine signifikante Verbesserung (BURCH J. A. et al. 2007).

### 2.6.3 *Genetische Tests*

Genetische Tests dienen dazu, Mutationen bestimmter Gene oder Chromosomenaberrationen zu detektieren.

#### 2.6.3.1 *DNS-Test (Cologuard®)*

Im Adenom-Karzinom-Modell führen genetische Mutationen letztendlich zu einer kanzerösen Veränderung der Darmschleimhaut. Somit kann der Nachweis eben dieser genetischen Veränderungen in der DNS abgeschilfterter Zellen der Darmschleimhaut auch ohne Blutung als ein Vorsorgetest dienen (AHLQUIST DA 2000; DONG SM ET AL. 2001). Diese genetischen Mutationen werden vom Cologuard®-Test überprüft. Dies beinhaltet Tests auf K-ras-Mutationen, methylierte BMP3-Promotor-Regionen und Nachweise des Referenzgens Beta-Actin. Zusätzlich beinhaltet der Test ein Immunassay auf Hämoglobin.

In einer großangelegten Studie wurde DNS im Stuhl auf insgesamt 23 verschiedene, genetische Mutationen untersucht und mit dem gFOBT-Test verglichen. Das Ergebnis war enttäuschend, da die Sensitivität zwar höher, jedoch auf maximal 50% für Karzinome und auf 15% für weit entwickelte Adenome beschränkt war. Gleichzeitig war jeder Test mit hohen Kosten verbunden (AHLQUIST DA 2008; IMPERIALE TF et al. 2004).

Der Cologuard®-Test ein Test, um Neoplasien zu erkennen. Dies gelingt mit einer Erkennungsrate von bis zu 92,3% bei Krebsfällen, sowie bei 42,4% der präkanzerösen Vorstufen (ONIEVA-GARCIA M. A. et al. 2015).

Eine Studie von Imperiale et al. beschäftigte sich mit der Berechnung der minimalen Patientenzahl die nötig ist, um ein Karzinom erfolgreich entdecken zu können. Für den genetischen Test liegt dieser Wert bei 166 Menschen, beim iFOBT bei 208 und bei der Koloskopie bei 154 (ELKE OBERHOFER 2014).

### **2.6.4 Endoskopische Verfahren**

Eine invasive Methode stellt die Koloskopie dar. Durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität stellt die Koloskopie den Goldstandard moderner Screeninguntersuchungen dar. Ein großer Vorteil der Koloskopie ist eine zuverlässige, frühzeitige Erkennung von Adenomen, also präkanzerösen Veränderungen, deren Entfernung das Krebsrisiko senken kann. Eine retrospektive Studie konnte zeigen, dass eine frühzeitige Adenomektomie verhindern kann, dass die Adenome - im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz - entarten (CITARDA F et al. 2001).

#### **2.6.4.1 Koloskopie**

Ein weiterer Vorteil ist, dass in nur einer Untersuchung das gesamte Kolon untersucht werden kann. Da die Koloskopie für eine umfassende Screening-/Vorsorgeuntersuchung absolut notwendig ist, wurde sie in die S3-Leitlinien aufgenommen und wird seitdem als der „Goldstandard“ bezeichnet (SCHMIEGEL W et al. 2008).

Vor einer Koloskopie steht, als non-invasive Methode, allen Personen im Alter von 50-54 Jahren ein jährlicher Hämoccult®-Test zu (Test auf okkultes Blut). Bei positivem Test oder generell ab dem Alter von 55 Jahren haben Patienten jedoch grundsätzlich Anspruch auf die Durchführung einer Früherkennungskoloskopie. Nach einem unauffälligen Befund sollte die nächste Wiederholungskoloskopie frühestens nach 10 Jahren erfolgen (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2010).

#### **2.6.4.2 Sigmoidoskopie**

In den Leitlinien vom Robert-Koch-Institut wird empfohlen, Patienten, die eine Koloskopie ablehnen, zumindest eine Sigmoidoskopie anzubieten. Da diese Untersuchung nur die letzten 60cm des Dickdarmes untersucht, sollte jährlich ein FOBT zum frühen Nachweis eines proximalen Karzinoms durchgeführt werden (DEUTSCHE APOTHEKER ZEITUNG 2014; NIH NATIONAL CANCER INSTITUTE 2014; ROBERT-KOCH-INSTITUT 2014).

Eine aktuelle Studie zeigte sogar, dass eine einmalig durchgeführte Sigmoidoskopie für 17 Jahre das Karzinomrisiko zu senken vermag (ATKIN WS et al. 2010).

### **2.6.5 Tumormarker**

Als Tumormarker werden Substanzen bezeichnet, deren Nachweis Rückschlüsse auf das Vorhandensein, eventuell die Malignität oder das Stadium eines Tumors ermöglicht.

#### ***CEA (Carcino-Embryonic-Antigen)***

Das CEA kommt als Bestandteil der kolorektalen Schleimhaut, dem Vaginalgewebe und diversen Drüsengeweben vor und bildet ein 180-kd-Glykoprotein der Glykokalix. Die Aufgabe besteht im Ausbilden einer Schutzfunktion gegen Mikroorganismen.

Eine Hepatopathie nicht-malignen Ursprungs, sowie Lebermetastasen des primären KRK, wie auch des Adenokarzinoms der Lunge und des Pankreaskarzinoms, bewirken eine Erhöhung des CEA. Dies liegt darin begründet, dass das CEA in der Leber abgebaut wird.

Dieser Umstand macht diesen Tumormarker zu einem idealen und dem empfindlichsten Verlaufsmarker nach Therapie des KRK. Besonders nach chirurgischer Exstirpation des Primärtumors kann CEA als non-invasiver Marker für Rezidive genutzt werden (HARDT PD 2008) *-siehe Tabelle 12-*.

Dies kann sich z.B. als fehlender Abfall von CEA nach einer inkompletten Resektion oder bei Auftreten eines Tumorrezidives zeigen. Dieser Marker reagiert sogar Monate bevor sich ein Rezidiv klinisch bzw. in bildgebenden Verfahren zeigt. Dagegen kann bei einem fehlenden Anstieg bzw. einem Plateauniveau von einer stagnierten Tumorprogredienz ausgegangen werden. Dies gelingt sogar mit einem negativen-prädiktiven Wert von 85-95% (HARDT PD 2008).

Da das CEA in bestimmten Situationen ein sensitiver Marker sein kann, wird empfohlen den Verlauf postoperativ für 3 Jahre alle 2-3 Monate zu überprüfen. Dies gilt im Besonderen für Tumoren in den UICC Stadien II und III.

Die Tabelle 12 zeigt den Zusammenhang zwischen dem UICC-Stadium und der CEA Konzentration:

Tabelle 12: Ausbreitung des KRK in Relation zur CEA-Erhöhung (MOERTEL CG et al. 1995)

UICC - Stadium	CEA-Erhöhung in %
I	0 - 20
II	40 - 60
III	60 - 80
IV	80 - 85

## 3 M2-Pyruvatkinase

Im Zell- und Tumorstoffwechsel ist die Pyruvatkinase das wichtigste Enzym der Glykolyse. Deren Aufgabe besteht in einer sauerstoffunabhängigen, enzymatischen Reaktion die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat in Pyruvat unter ATP-Gewinn zu katalysieren. Diese Reaktion ist die „zweite Substratkettenphosphorylierung der Glykolyse“.

### 3.1 Die Pyruvatkinase

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der Glykolyse dargestellt. -siehe *Abbildung 5-*  
Die Ausgangssubstanz der Glykolyse ist Glukose. Dieser 6-Kohlenstoffkörper wird unter ATP-Verbrauch in drei Schritten in den 6-Kohlenstoffkörper Fruktose-1,6-Bisphosphat umgewandelt. Dieses wird anschließend in zwei unterschiedliche 3-Kohlenstoffkörper gespalten. Während der resultierende erste 3-Kohlenstoffkörper Glyceron-3-Phosphat in einem Folgeschritt durch Triosephosphatisomerase in Glycerinal-3-Phosphat umgewandelt wird, ist der zweite 3-Kohlenstoffkörper bereits selbst das gewünschte Glycerinal-3-Phosphat. Am Ende der Umwandlungskette der 3-Kohlenstoffkörper steht die Pyruvatkinasereaktion. Diese Reaktion ist für die Energiebilanz der Glykolyse von wesentlicher Bedeutung, weil durch sie erstmals die Energiebilanz positiv wird. Es werden pro Glukose-Molekül zwei Moleküle ATP, zwei Moleküle Pyruvat und zwei Moleküle NADH + H<sup>+</sup> gebildet.

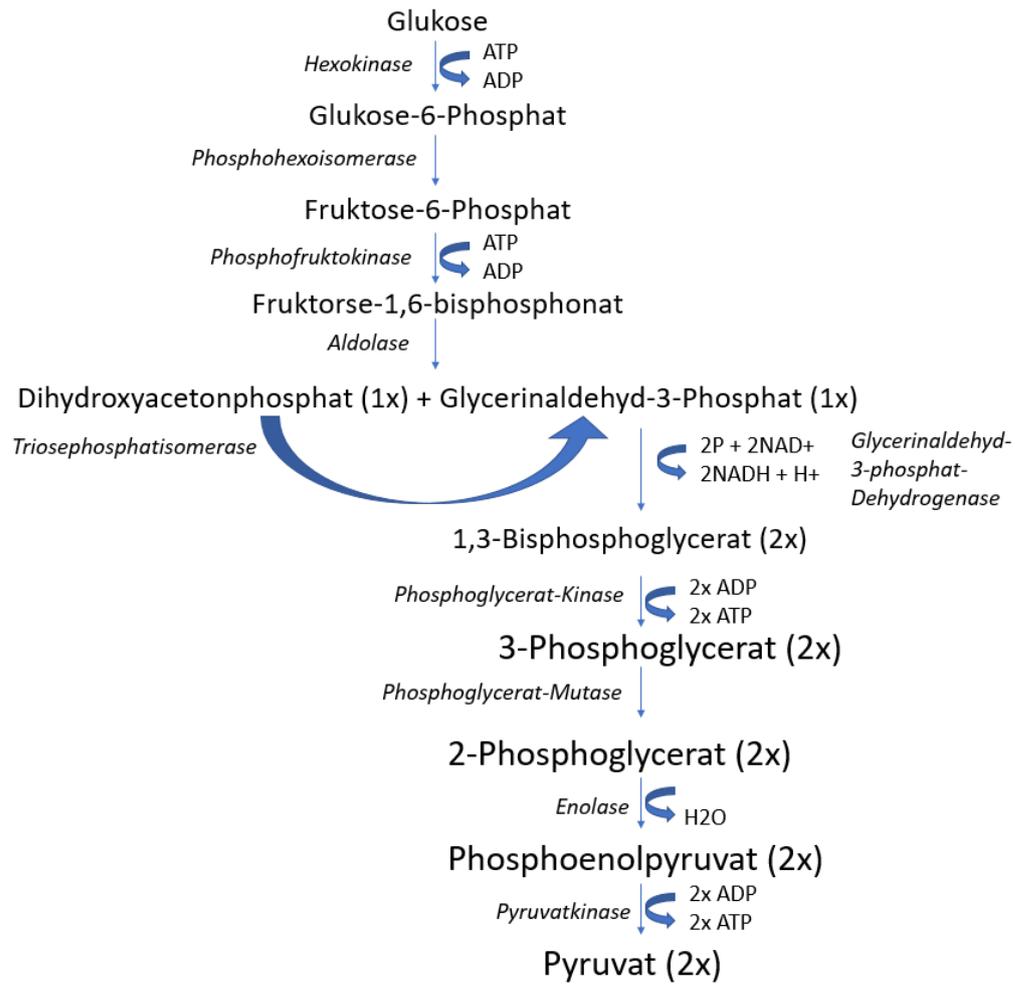


Abbildung 5: Ablaufschema der zentralen, universellen Glykolyse zur Energiegewinnung

Damit ist die Pyruvatkinase ein ubiquitär vorkommendes, unverzichtbares Enzym der Energiegewinnung der Zelle. Das gebildete Pyruvat ist Substrat für den Zitronensäurezyklus, der eine weitere wichtige ATP- und Redoxäquivalent-Quelle ist.

### 3.2 Isoenzyme der Pyruvatkinase

Die Pyruvatkinase ist das zentrale Enzym der Glykolyse. Ihre Aufgabe ist die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat. Damit ist sie essenziell für die Nettoenergiegewinnung der Glykolyse. Abgestimmt auf die spezifischen metabolischen Aufgaben unterschiedlicher Gewebe werden angepasste Isoenzyme der Pyruvatkinase ausgebildet. Insgesamt kennt man im menschlichen Körper vier Isoformen: M1-PK, M2-PK, L-PK und R-PK. Dies ermöglicht unter anderem gewebsspezifische Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit und der Regulation der Enzymaktivität (OREMEK GM et al. 1999).

In Geweben mit hoher Glukoneogenese wie der Leber oder den Nieren findet sich hauptsächlich die L-Typ-Isoform, hingegen wird der R-Typ nur in Erythrozyten exprimiert. Die M1-PK findet sich in Muskel und Gehirn. Die M2-PK ist ein charakteristisches Isoenzym für sich teilende Zellen. Sie lässt sich einerseits in embryonalen Zellen und in adulten Stammzellen nachweisen, andererseits aber auch in Tumorzellen, weswegen die M2-PK in dieser Arbeit als Marker für Tumorzellen ausgewählt wurde.

Bei der Tumorentstehung wird das Isoenzymmuster der Zellen gewechselt. Hierbei verschwindet das jeweilige gewebsspezifische Isoenzym, wie zum Beispiel die L-PK in der Leber oder die M1-PK im Gehirn, und das M2-PK-Isoenzym wird vermehrt gebildet - *siehe Abbildung 6-* (EIGENBRODT E et al. 1985; MAZUREK S et al. 2005a; MAZUREK S 2008; REINACHER M et al. 1981).

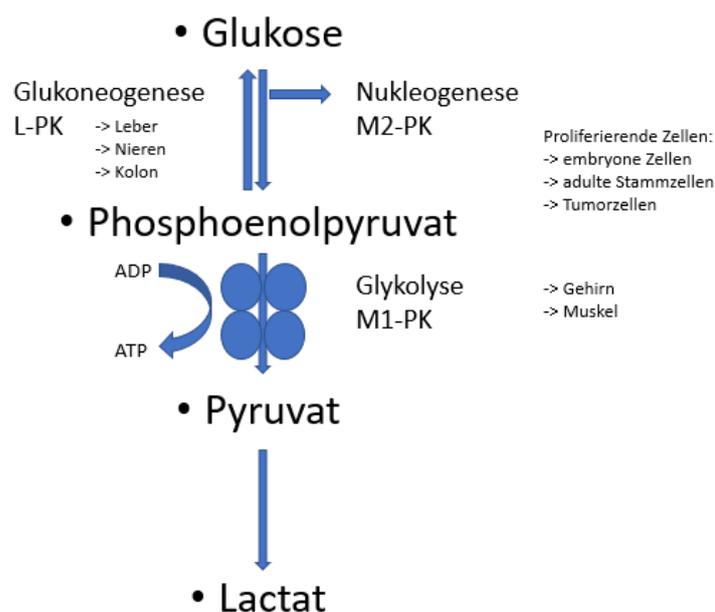


Abbildung 6: Gewebeexpression der Pyruvatkinase - Isoformen (HARDT PD et al. 2004a)

Die molekularen Unterschiede wurden von Mazurek et al. untersucht. Die menschliche M2-PK wird aus insgesamt 531 Aminosäuren gebildet und besteht aus mehreren Untereinheiten (Domänen). Die Verbindungsregion zwischen den Domänen A2 und C wird „intersubunit contact domain“ (ISCD) genannt. Die Verbindungsregion zwischen der A- und der B-Domäne formt die katalytisch aktive Seite. Die C-Domäne bildet mit ihrem Carboxylende die Bindungsstelle für allosterische Aktivatoren.

Der Unterschied zwischen der M1-PK und der M2-PK wird durch 22 Aminosäuren bestimmt, die sich, kodiert durch „alternatively spliced exons“, über das ISCD verteilen. Dieser Unterschied ermöglicht die besonderen Fähigkeiten der M2-PK wie z.B. der allosterischen Regulation oder die Fähigkeit zwischen der dimeren und der tetrameren Form zu wechseln. Die inaktive dimere Form bildet sich aus dem Zusammenschluss von zwei Monomeren an ihrer A-Domäne. Die aktive tetramere Form entsteht durch Bindung zweier weiterer dimerer M2-PK an die ISCD (EIGENBRODT E et al. 1997; MAZUREK S et al. 2001a; MAZUREK S et al. 2001b; MAZUREK S 2008; PRAKASAM G et al. 2018) -siehe *Abbildung 7*.

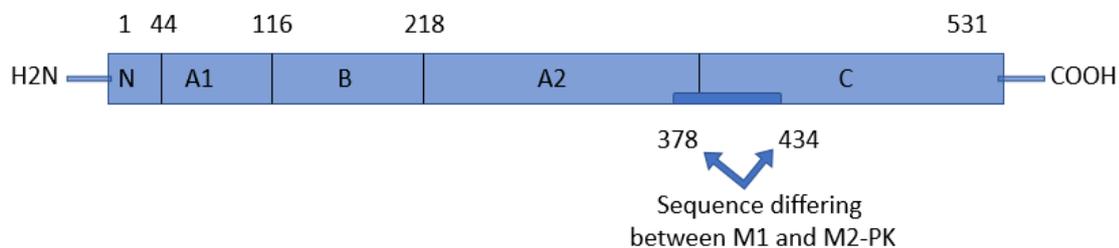


Abbildung 7: Darstellung der Unterschiede zwischen M1 und M2 Form der PK (MAZUREK S 2008)

### 3.3 Die Rolle der M2-Pyruvatkinase

Untersuchungen ergaben, dass die M2-Form der PK in zwei spezifischen Variationen vorliegen kann, die durch die Zahl ihrer Untereinheiten bestimmt wird. Es gibt die aktive tetramere und die inaktive dimere Form (EIGENBRODT E et al. 1997).

Vier Untereinheiten bewirken eine hohe Substrataffinität und damit eine hohe enzymatische Aktivität. Dieses Tetramer sollte der Normalzustand sein, hier wird Pyruvat als Substrat für den Zitronensäurezyklus und ATP als direkter Energieträger gebildet. Alle Energiegewinnungsvorgänge zusammen liefern aus einem Mol Glukose insgesamt 38 Mol ATP. Da hier das Hauptaugenmerk der Zelle auf Energiegewinnung und Produktion liegt, wird dieser Zustand als normal bezeichnet -siehe *Abbildung 8*-

Liegt die dimere Form vor, wie dies z.B. auch während der Tumorentstehung der Fall sein kann, ändert sich zusätzlich das typische Isoenzymmuster. Statt einer vorherrschenden Isoform, z.B. der L-Form (in Leber, Nieren, Kolon) oder der M1-Form (in Gehirn und Muskeln) kann diese durch die M2-Form ersetzt werden (EIGENBRODT E et al. 1985; MAZUREK S et al. 2005a; VEELLEN CW VAN et al. 1979).

Die dimere M2-Form produziert kein Pyruvat, Laktat oder ATP. Stattdessen häufen sich, durch fehlende Enzymaktivität der Pyruvatkinase, alle Zwischenprodukte der vorherigen Reaktionen an. Dabei handelt es sich um Aminosäuren, Nukleinsäuren und Phospholipide. Sie können für die Zellreparatur, der Bildung von Zellbestandteilen oder für den Zellaufbau während der Mitose verwendet werden -siehe *Abbildung 9*- (MAZUREK S et al. 2005a; YUHUI J et al. 2014).

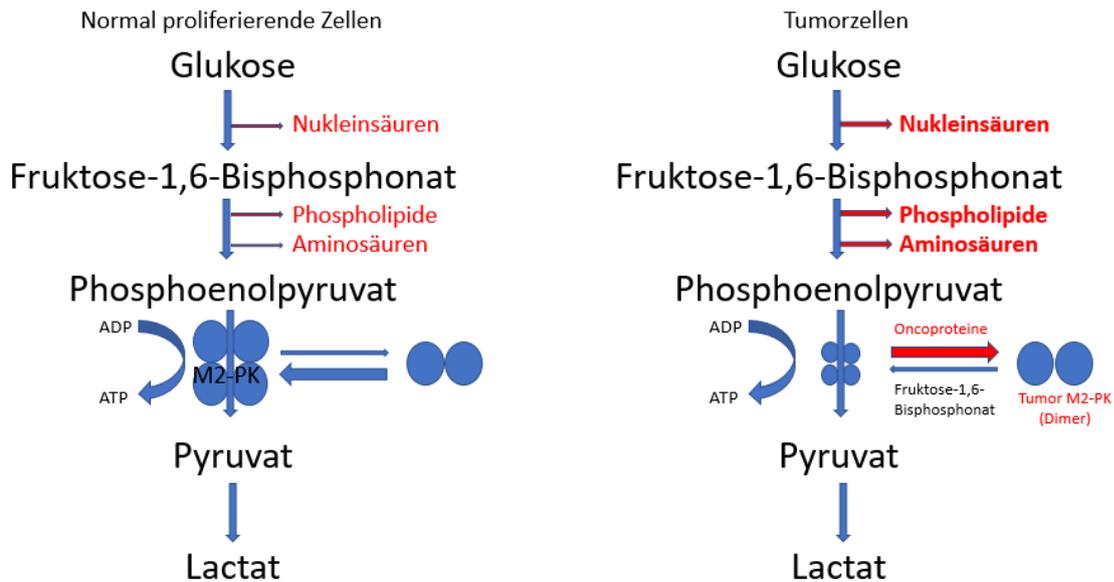


Abbildung 8: Effekt der tetrameren und dimeren Form der M2-PK auf den Stoffwechsel der Zellen (MAZUREK S 2002)

Von wesentlicher Bedeutung für diese Arbeit ist die Tatsache, dass die M2-Form nicht nur in proliferierenden Zellen, sondern auch in embryonalen Stammzellen, adulten Zellen und Tumorzellen exprimiert wird. Durch die ständige Zellteilung der Tumorzelle liegt die dimere M2-Form des Enzyms verstärkt vor. Sie wird daher als **TuM2-PK** bezeichnet (HAUG U et al. 2008b; MAZUREK S 2010; SPODEN GA et al. 2009).

Messungen von Board et al. konnten bestätigen, dass auffällig hohe Konzentrationen von TuM2-Pk besonders in metastasierenden Zellen vorkommen. Gleichzeitig weisen diese Zellen eine um den Faktor 100 höhere Konzentration an Phosphometaboliten auf, als dies in normalen Zellen der Fall wäre. Dies wurde durch eine  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie nachgewiesen (BOARD M et al. 1990).

### 3.4 Regulation der Expression der M2-PK

Interessant für das Gesamtverständnis der Funktion der M2-PK ist ihre Regulation durch Primärmetaboliten. Bei der normalen Zelle erfolgt die Oszillation zwischen der dimeren und tetrameren Form der M2-PK gesteuert durch den Metaboliten der Glykolyse, Fruktose-1,6-Bisphosphat (MAZUREK S et al. 1993; MAZUREK S et al. 2005a).

Steigt die Konzentration von Fruktose-1,6-Bisphosphat bis auf einen bestimmten Schwellenwert an, so wird die Pyruvatkinase von der dimeren Form in die tetramere Enzymstruktur umgebildet und so die angestauten Metabolite zu Pyruvat abgebaut. Sinkt die Konzentration von Fruktose-1,6-Bisphosphat durch enzymatische Abbauvorgänge im weiteren Verlauf unter einen bestimmten Schwellenwert, so dissoziiert die tetramere Form in die dimere Form. Anschließend steigen die Zwischenmetabolite erneut an und der oszillierende Umwandlungsprozess der M2-PK beginnt von neuem. Damit stellt Fruktose-1,6-Bisphosphat den zentralen Regulator der Glykolyse dar (MAZUREK S et al. 1993; MAZUREK S et al. 2005a).

Alternative Regularien können über die Aminosäure L-Serin, die aus den Glykolyse-Zwischenmetaboliten Glycerol-3-Phosphat und Glutamat entsteht, ermöglicht werden. Diese kann über einen allosterischen Wirkmechanismus direkt auf die Affinität der M2-PK für ihr Substrat Phosphoenolpyruvat Einfluss nehmen. Durch die Erhöhung der Affinität der M2-PK sinkt die nötige Konzentration von Fruktose-1,6-Bisphosphat, um eine Umwandlung zur dimeren Form zu ermöglichen (EIGENBRODT E et al. 1992; GUMINSKA M et al. 1997).

An der Regulation sind außerdem die Aminosäuren L-Alanin, L-Cystein, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin und L-Prolin beteiligt. Diese reduzieren die Affinität für Phosphoenolpyruvat und erhöhen so die Konzentration der tetrameren Form. Einen identischen Effekt haben nach Mazurek auch Fettsäuren *-siehe Abbildung 9-* (MAZUREK S et al. 2005b).

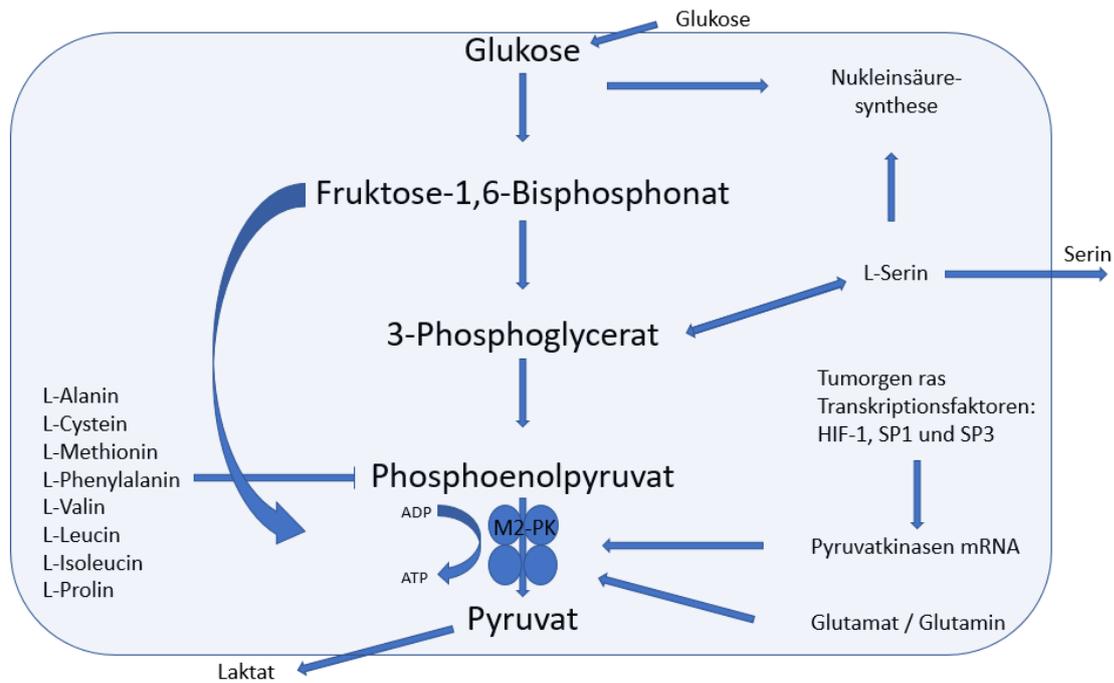


Abbildung 9: Regulation der M2-PK (MAZUREK S. et al. 2002)

Eine weitere Regulationsmöglichkeit besteht in der vermehrten Expression der M2-PK. Diese erfolgt durch verstärkte Expression der Pyruvatkinasen-mRNA. Dieser Prozess wird seinerseits durch ras und die Transkriptionsfaktoren HIF-1, SP1 und SP3 gesteuert (MAZUREK S et al. 2005b).

Im Fall des Humanen Papilloma Virus (HPV) vom Typ 16 hat z.B. das Onkoprotein E7 die Fähigkeit, direkt in die Regulation einzugreifen. Dabei bindet das Onkoprotein E7 an die M2-Form der Pyruvatkinase, sodass diese von der tetrameren in die dimere Form wechselt. Dies konnte von Mazurek et al. an ras-exprimierenden „normal rat kidney“ Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich ist der notwendige Fruktose-1,6-Bisphosphat Grenzwert für den Rückwechsel zur tetrameren Form stark erhöht (MAZUREK S et al. 2001a). Als Folge dessen stehen umfangreiche Mengen an Zwischenmetaboliten, bevorzugt Phosphometabolite, bereit, um ein Tumorstadium zu begünstigen (MAZUREK S et al. 2001b; ZWERSCHKE W et al. 1999).

### 3.5 M2-PK als Marker für Neoplasien

Für diese Arbeit von großer Bedeutung ist die Beobachtung, dass die M2-PK in ihrer dimeren Form keineswegs ausschließlich intrazellulär z.B. in den Mitochondrien nachweisbar ist. Diese Arbeit stützt sich auf die Erkenntnis, die von Eigenbrodt et al. entwickelt wurde, der nachweisen konnte, dass die M2-PK Form der Pyruvatkinase in verschiedenen Tumorgeweben nachweisbar ist. Dies gelang ihm durch die Bildung von Antikörpern gegen die M2-Form und Nachweis dieser mittels Färbungen. Im Folgenden wurde versucht diesen, möglicher Weise tumorspezifischen, Marker im Blut nachzuweisen, da man davon ausging, dass durch z.B. Lysevorgänge Zellbestandteile dort zu finden sind. Auch beim Pankreas-Karzinom ist die M2-PK im Blut erhöht (HARDT PD et al. 2000).

Im Blut konnte die M2-PK durch immunchemische Untersuchungen bei diversen Karzinomen nachgewiesen werden. Sie wurde auch in Kolon- und Magenkarzinomen (EIGENBRODT E et al. 1997; HARDT PD et al. 2000; KIM CW et al. 2003; LÜFTNER D et al. 2001), Nierenzellkarzinomen (HARDT PD et al. 2000; OREMEK GM et al. 2000), Lungenkarzinomen (SAPOUTZIS N et al. 2002; SCHNEIDER J et al. 2000), Ovarial-/Mammakarzinomen (HOOPMANN M et al. 2002; LÜFTNER D et al. 2001), Zervixkarzinomen (KAURA B et al. 2004), Pankreaskarzinomen (CERWENKA H et al. 1999; OREMEK GM et al. 1997) und in malignen Melanomen gefunden (UGUREL S et al. 2005).

Von besonderer Bedeutung war der Befund, dass die M2-PK sogar in den Stuhl abgegeben wird (EWALD N et al. 2005; HARDT PD et al. 2003c; HARDT PD et al. 2004a).

Der Vergleich der M2-PK im Stuhl bei Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen und kolorektalen Adenomen ergab im Mittel höhere Werte als bei gesunden Probanden (HARDT PD 2003) -siehe Tabelle 13-.

Tabelle 13: Fäkale Tumor M2-PK Konzentrationen bei gastrointestinalen Karzinomen, kolorektalen Adenomen und einer Kontrolle (HARDT PD et al. 2003c)

<b>Gruppe</b>	<b>N=</b>	<b>Mittelwert [U/ml]</b>	<b>Median [U/ml]</b>	<b>Bereich [U/ml]</b>
GI Krebs insg.	21	19,0	7,0	0,0-196,8
KRK	9	31,9	7,7	0,0-196,8
Rektaler Krebs	7	12,5	5,7	0,0-4225
Magenkrebs	5	4,8	3,0	0,0-14,3
Adenome	8	5,1	2,6	0,0-11,7
Kontrolle	49	2,0	1,7	0,0-9,1

Eine Studie aus Korea verglich den M2-PK Stuhltest und den iFOBT hinsichtlich der Früherkennung von KRK und von Polypen bei Patienten vor einer Koloskopie. Bei positivem M2-PK Stuhltest lag die Erkennungsrate für KRK bei 92,8% und bei Polypen bei 69,4%. Bei positivem iFOB-Bluttest lag die Erkennungsrate für KRK hingegen nur bei 47,5% und für Polypen lediglich bei 12,1%, so dass eine Überlegenheit des M2-PK Stuhltests gegenüber dem iFOBT bei der Früherkennung von KRK und Polypen konstatiert wurde (KIM YC et al. 2015).

## 4 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit liegt darin, M2-PK im Stuhl als Screening Marker zu evaluieren und den Zusammenhang zwischen der M2-PK-Konzentration im Stuhl von Patienten und dem Risiko eines KRK zu evaluieren. Als Grundlage dieser Arbeit steht ein Patientengut von insgesamt 255 Patienten zur Verfügung. Nach kritischer Prüfung, Sichtung und Ordnung, sollen die Daten statistisch ausgewertet, die Sensitivität und Spezifität, sowie der Cut-off-Punkt für die M2-PK Messdaten bestimmt werden.

Dafür greift diese Studie eine von Hardt et al. im Jahre 2003 begonnene multizentrische, Studie auf und komplettierte sie mit neu erhobenen Daten des Standorts Gießen.

Die multizentrische Studie umfasst Daten aus Gießen, Ulm, Mannheim und Ludwigshafen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Studiendesign und Protokoll

Die vorliegende Arbeit komplettiert, verbindet und analysiert die Daten der Studie aus dem Jahre 2003 mit dem Studiennamen: "Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten".

Es handelte sich um eine prospektive, multizentrische Studie mit einem Patientenkollektiv von 185 Personen, bestehend aus 98 Männern und 87 Frauen.

Das Kollektiv entstammt den Standorten Gießen, Mannheim, Ludwigshafen und Ulm. Alle Patienten des Kollektivs wurden total koloskopiert. Mögliche Gründe waren:

- Patienten mit KRK vor OP/Radio-/Chemo-/Immuntherapie
- endoskopisch unauffällige Probanden im Rahmen der Krebsvorsorge
- Patienten mit geplanter diagnostischer Koloskopie

Koloskopierte Patienten wurden auf das Vorhandensein von Polypen oder auffälligen Schleimhautveränderungen hin untersucht. Falls nötig, wurden endoskopisch Biopsien entnommen. Diese wurden anschließend vom Pathologen des jeweiligen Zentrums untersucht und klassifiziert. Die Proben wurden differenziert nach: hyperplastischer Polyp/-en (HP), Polyp/en (P), Adenom/en (A) und Karzinom/en (K).

Zum Termin der Koloskopie brachten die Patienten eine Stuhlprobe mit.

### ***5.1.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien***

In das Patientenkollektiv wurden Probanden eingeschlossen, die entweder asymptomatisch waren im Rahmen der Krebsvorsorge, oder die symptomatisch waren und zur Abklärung einer unerwarteten Änderung der Stuhlgewohnheiten, klinisch vorstellig wurden.

Dazu gehörten Patienten mit Obstipation, Diarrhoe, Flatulenz, Hämatochezie und Schleimbeimengung oder schwarz verfärbtem Stuhl. Auch Gewichtsverlust oder bekannte Polypen, Adenome, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, im Alter von 18-80 Jahren, Patienten mit kolorektalem Karzinom vor OP / Radio- / Chemo- oder Immuntherapie oder eine obligate Untersuchung konnten Gründe für eine Koloskopie sein, ebenso wie eine regulär geplante Vorsorgekoloskopie.

Patienten, die ein Zweitmalignom oder lokale Rezidive aufwiesen, wurden ausgeschlossen. Patienten nach entferntem kolorektalen Primärtumor, nach Chemo- / Radio- oder Immuntherapie oder Patienten, die keine Einschlusskriterien erfüllten, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

### ***5.1.2 Vorausgesetzte Untersuchungen***

Alle Patienten wurden einer totalen Koloskopie unterzogen. Im Falle eines auffälligen Befundes wurde eine Biopsie bzw. Ektomie des oder der Polypen durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die histopathologische Untersuchung.

Weiterhin wurde auf Tumor M2-Pyruvatkinase und okkultes Blut im Stuhl getestet.

### **5.1.3 Makroskopische Befundung**

Die Polypen wurden nach ihrer rein makroskopischen Anatomie differenziert, zum einen nach der Größe, Lokalisation und Anzahl, zum anderen nach Form (gestielt, tailliert, sessil, flach oder mit zentraler Eindellung), der mikroskopischen Beurteilung und des Resektionsstatus (R0 ja/nein).

Eine neoplastische Veränderung der Darmschleimhaut wurde ebenfalls erfasst und mit Biopsien komplettiert.

### **5.1.4 Histopathologische Befundung**

Die histopathologische Befundung erfolgte nach aktueller WHO-Klassifikation und beurteilt den Dysplasiegrad (bei Adenomen), Angaben zur vollständigen Entfernung und Differenzierungsgrad von Adenomen und Karzinomen.

Entsprechend ihres Entnahmeortes wurden die Biopsien folgendermaßen ihrer anatomischen Lokalisation zugeteilt:

- proximales Kolon: = „*Caecum + Colon asc.*“
- mittleres Kolon: = „*Colon transv.*“
- distales Kolon: = „*Colon desc. + Sigma + Rektum*“.

Histologisch wurden polypöse Veränderungen in hyperplastische Polypen, sessil serra-tierte Adenome, tubuläre, tubulo-villöse und villöse Adenome mit jeweils geringgradiger bzw. hochgradiger Dysplasie unterteilt (DAVID A et al. 2012). Somit konnte das Entar-tungsrisiko der gefundenen Adenome bestimmt werden. Diese wurden als LGIEN Ade-nom oder HGIEN Adenom angegeben.

Alle Details der Studie können dem Studienprotokoll aus dem Anhang (*Studienprotokoll, Kapitel: 12.4, Seite: 118*) entnommen werden.

## 5.2 Methode der M2-PK Bestimmung

### 5.2.1 *Kooperationen und Labor*

Die Bestimmung der M2-PK Konzentration erfolgte in Kooperation mit dem firmeneigenen Labor der Firma ScheBo® Biotech AG (Netanyastr. 3 in 35394 Gießen).

Die Messungen erfolgten mit einem Sandwich-ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern, die das Isoenzym „Tumor M2-PK“ hochspezifisch erkannten. Je Platte konnten 42 Patientenproben in Doppelbestimmung gemessen werden.

Die Messungen wurden von November 2003 bis August 2008 durchgeführt.

### 5.2.2 *Probenmaterial*

Als Probenmaterial kam eine erbsengroße Stuhlprobe zum Tragen.

### 5.2.3 *Messbereich und Präzision*

Laut Testanleitung vom November 2003 erlaubte das Testkit eine Bestimmung der Tumor M2-PK in einem Messbereich von  $\leq 2$  bis 60 U/ml.

Präzision:

Intraassay-Varianz: der mittlere Variationskoeffizient (VK) lag bei 7,9% (3,5-13,6).

Interassay-Varianz: der mittlere VK lag bei 7,3% (3,8-12,6%).

Im Rahmen einer Verbesserung des Messsystems veränderte sich ebenfalls auch der Messbereich, sowie die Präzision.

Laut Testanleitung von Juni 2007 erlaubte das Testkit eine Konzentrationsbestimmung der Tumor M2-PK im Messbereich von  $\leq 1$  bis 20 U/ml.

Präzision:

Intraassay-Varianz: der mittlere Variationskoeffizient (VK) lag bei 4,8% (2,9-7,7%).

Interassay-Varianz: der mittlere VK lag bei 6,4% (4,3-9,4%).

#### 5.2.4 *Messung*

- Vorbereitung des Waschpuffers (und des Extraktionspuffers)
- Stuhl homogenisieren/extrahieren
- lyophilisierte Standards und Kontrollen mit Waschpuffer rekonstituieren
- je 50 µl Blank, Standards, Kontrolle und Proben als Doppelbestimmung in ELISA-Platte pipettieren – 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren – Waschen
- Zugabe von je 50 µl anti Tumor M2-PK–Biotin-POD-Streptavidin-Komplex (gebrauchsfertig) – 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren – Waschen
- Zugabe von 100 µl Substratlösung (gebrauchsfertig) – 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Zugabe von 100 µl Stopplösung (gebrauchsfertig)
- Extinktionsbestimmung OD 450 oder OD 450 – OD 620
- Auswertung mittels doppellogarithmischer Standardkurve

(SCHEBO® BIOTECH AG 2014)

### 5.3 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden in Microsoft Office-Excel 2013 erfasst. Zur Analyse der Rohdaten, der explorativen Datenanalyse, der inferenzstatistischen Analyse und zur Darstellung sämtlicher Graphiken wurde das Open Source-Programm „R“ (Version 3.1.1 (2014-07-10) (R. CORE TEAM 2014) mit den Paketen: lattice, NADA, coin, MASS, car und effects benutzt. Kardinalskalierte Daten mit integriertem Streuungs- und Lagemaß wurden mittels Boxplots dargestellt. Die statistische Auswertung wurde freundlicherweise von Dr. Gerrit Eichner vom Mathematischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Zur Anwendung kommen verschiedene statistische Verfahren:

#### 5.3.1 Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test)

Der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) findet Anwendung im Vergleich von Häufigkeiten von nominalskalierten, also kategorischen, Variablen. Der Test beurteilt, ob sich Häufigkeiten, die beobachtet wurden, signifikant von den erwarteten Häufigkeiten unterscheidet (FAHRMEIR L et al. 2016; HEMMERICH WA 2015)

$$\chi^2 \equiv \sum_{i=1}^k \frac{(\text{beobachtete Häufigkeit}_i - \text{erwartete Häufigkeit}_i)^2}{\text{erwartete Häufigkeit}_i}$$

Abbildung 10: Chi-Quadrat-Wert als Summe aller Werte der Chi-Quadrat-Tabelle (FAHRMEIR L et al. 2016)

#### 5.3.2 Die Spearmanische Rangkorrelation

Die Spearmanische Rangkorrelation misst, wie gut eine beliebige monotone Funktion die Korrelation zwischen zwei Variablen beschreiben kann. Gleichzeitig erfolgt jedoch keine Annahme über die Wahrscheinlichkeitsverteilung dieser Variablen (FAHRMEIR L et al. 2016).

In dieser Arbeit wird mit ihrer Hilfe überprüft, ob ein monotoner Zusammenhang zwischen den zwei betrachteten Merkmalen M2-PK (*in den Graphiken als: TuM2-PK.LC bezeichnet*) und Polypen existiert.

### **5.3.3 Empirische kumulative Verteilungsfunktionen und Survival-Kurven**

Die empirisch kumulative Verteilungsfunktion findet in der beschreibenden Statistik Verwendung. Durch diese Funktion können jeder reellen Zahl ( $x$ ) alle größeren oder kleineren Stichprobenwerte zugeordnet werden.

### **5.3.4 (Multiple) Logistische Regression**

Die Logistische Regression beinhaltet Regressionsanalysen, mit der die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten bestimmter Ereignisse, in Abhängigkeit diverser Einflussgrößen, bestimmt werden kann.

Dieses Verfahren ist notwendig, wenn der Einfluss auf Variablen von einem binären (ja/nein, 0/1) Messniveau, von sogenannten erklärenden Variablen, bestimmt werden muss (BENDER R, ZIEGLER A, LANGE ST 2002; FAHRMEIR L et al. 2016)

### **5.3.5 Holm Test**

Der Holm Test ist eine Form der Testung von adjustierten p-Werten bei multipler Testung. Dies ist nötig, wenn mehrere Nullhypothesen getestet werden. Dabei werden nach Holm die Nullhypothesen so umgeordnet, dass entsprechende p-Werte monoton ansteigen (DÜMBGEN L 2016).

### **5.3.6 Box- und Whisker-Plot**

Als Boxplot (oder auch Box-Whisker-Plot) bezeichnet man eine spezielle Kastengraphik, mit der kardinalskalierte Daten dargestellt werden können. Dabei werden diverse „robuste Streuungs- und Lagemaße“ in die Graphik integriert. Ziel ist es einen schnellen Überblick über die Daten und deren Verteilung zu gewinnen (FAHRMEIR L et al. 2016).

### 5.3.7 Effekte Plots

Effekte Plots visualisieren bei einem prototypischen Patienten den Einfluss von diskreten oder kontinuierlichen Prädiktoren auf den Outcome (HRisk). Einen prototypischen Patienten beschreibt dabei, dass dessen Variablen einen Durchschnittswert haben.

In dieser Arbeit werden Effekte Plots für die diskreten bzw. nominal skalierten Prädiktoren Geschlecht und Entzündung, sowie für die kontinuierlichen bzw. metrisch skalierten Prädiktoren Entnahmealter und M2-PK gezeigt (FAHRMEIR L et al. 2016).

## 5.4 Datenschutz und Ethikvotum

Zur Wahrung des Datenschutzes wurden alle gesammelt Daten zu jeder Zeit in einem verschlüsselten, sog. „Container“ gespeichert. Dieser Container wird von dem, bis jetzt als sicher geltenden, open source-Programm: „TrueCrypt 7.1a“ bereitgestellt.

Das Ethikvotum vom 30.09.2003 (Aktenzeichen: 71/03) mit dem Titel: „*Bestimmung der Tumor M2-PK (Pyruvat Kinase) im Stuhl total koloskopierter Patienten.*“ liegt vor und deckt alle erfassten Daten dieser Arbeit ab -siehe Kapitel: 12.5-.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Patientenkollektiv

Aus der im Jahre 2003 begonnenen Studie lagen 185 Datensätze aus den Standorten Ludwigshafen, Mannheim und Ulm vor. Zusätzlich wurden 70 Datensätze aus Gießen in das Patientenkollektiv aufgenommen. Aus dem Gesamtkollektiv von 255 Patienten mussten 70 Patienten wegen unvollständiger Datensätze entfernt werden.

Insgesamt mussten 38 Patienten aufgrund fehlender histologischer Befunde, 15 Patienten aufgrund fehlender Koloskopiebefunde, 3 Patienten aufgrund fehlender M2-PK – Konzentration und 14 Patienten aufgrund fehlenden Akten ausgeschlossen entfernt werden.

Somit umfasste das finale Patientenkollektiv insgesamt 185 Personen mit fast gleicher Geschlechterverteilung (98 Männer /87 Frauen).

#### 6.1.1 Geschlechtsverteilung des Kollektivs

Die Patienten des Kollektivs verteilen sich auf die Standorte Gießen (n=70; 37,8%), Ludwigshafen (9; 4%), Mannheim (86; 46,5 %) und Ulm (20; 10,8%). Eine detaillierte Aufstellung ist unter Tab. 1 aufgeführt.

Tabelle 14: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Orte

Ort	Absolute Zahlen			Prozente		
	männlich	weiblich	Summe	männlich	weiblich	Summe
GI	42	28	70	42.9	32.2	37.8
LU	4	5	9	4.1	5.7	4.9
MA	41	45	86	41.8	51.7	46.5
U	11	9	20	11.2	10.3	10.8
Summe	98	87	185	100.0	99.9	100.0

*Durch Rundungsfehler beim Berechnen der Prozente kann es zu maximalen Prozentsummen von 99,9% bis 100,1%, statt den zu erwarteten 100,0% kommen.*

Für eine statistische Analyse der Daten ist es zwingend notwendig, dass das Patientenkollektiv homogen verteilt ist, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicher zu stellen.

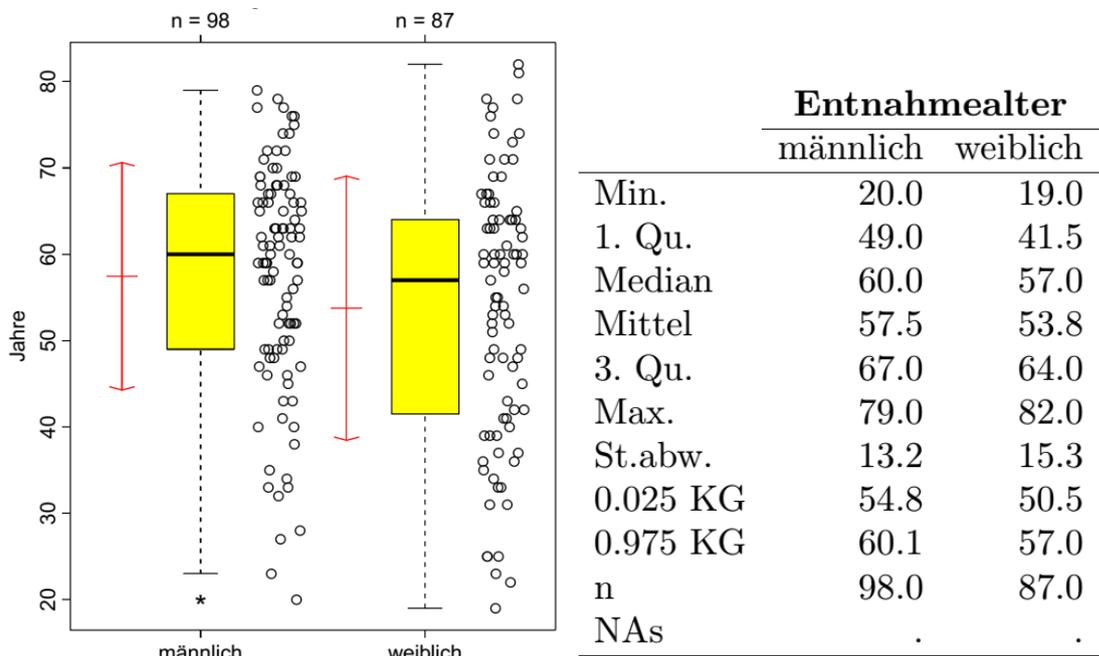
In dieser Studie sind die Geschlechter annähernd identisch verteilt, sodass von einer homogenen Verteilung ausgegangen werden kann (adjustierter p-Wert nach Holm  $p = 0,5156$ ).

### 6.1.2 Altersverteilung des Kollektivs

#### 6.1.2.1 Entnahmealter getrennt nach Geschlecht

Untersucht wurden 98 männliche Patienten mit einer Altersspanne von 20 bis 79 Jahren. Dabei lag das mittlere Untersuchungsalter bei 57,5 Jahren, der Median bei 60,0 Jahren. Bei den 87 weiblichen Patientinnen lag die Altersspanne zwischen 19 und 82,0 Jahren. Das mittlere Untersuchungsalter betrug 53,8 Jahre. Der Median lag bei 57,0 Jahren. Basierend auf der Fallverteilung kann von einer Normalverteilung des Kollektivs ausgegangen werden -siehe: Tabelle 15-

Tabelle 15: Acht-Zahlen-Zusammenfassung für metrische Variablen / Entnahmealter getrennt nach Geschlecht



In der -Tabelle 15- sind die Daten graphisch und mit Kennzahlen zur Lage und Streuung dargestellt.

### 6.1.2.2 *Alter und Geschlecht von Patienten mit pathologischen Befunden*

Tabelle 16 zeigt die Alters- und Geschlechterverteilung für Patienten des Kollektivs, die ein HGIEN oder Karzinom aufweisen. Getrennt davon wird dann in Tabelle 17 der spezifische Altersdurchschnitt mit Geschlechterverteilung für Patienten mit einem HGIEN, einem Karzinom oder insgesamt einem hohen Risikotyp (high risk type) dargestellt.

Tabelle 16: Patienten mit Karzinom oder HGIEN

<b>Entität</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>Geschlecht</b>
HGIEN	81	männlich
HGIEN	50	männlich
HGIEN	74	männlich
HGIEN	76	<i>weiblich</i>
Karzinom	70	männlich
Karzinom	53	<i>weiblich</i>
Karzinom	66	männlich
Karzinom	82	<i>weiblich</i>
Karzinom	54	<i>weiblich</i>
Karzinom	74	männlich
Karzinom	59	männlich

Tabelle 17: Zusammenfassung der Altersdurchschnitte für Karzinom, HGIEN und High Risk Type

<b>Karzinom</b>	<b>HGIEN</b>	<b>High Risk Type</b>
Ø Alter für Männer = 67,25y	Ø für Männer = 68,33y	Ø für Männer= 67,71y
Ø Alter für Frauen = 63,00y	Ø für Frauen = 76,00y	Ø für Frauen = 66,25y
Geschlechterverteilung: 4m / 3w	3m / 1w	7m / 4w

### 6.1.3 Verteilung der Polypen und Karzinome

Insgesamt wurden an allen teilnehmenden Zentren 85 Patienten mit polypösen Veränderungen der Mukosa biopsiert und histopathologisch untersucht. Die Polypen waren über das gesamte Colon verteilt. Hierbei waren Unterschiede in der Auftrittshäufigkeit, entsprechend der anatomischen Lokalisation, zu beobachten.

In dem untersuchten Kollektiv fanden sich bei 20 Patienten (10 Männer, 10 Frauen) Polypen im proximalen Kolon. Bei 7 Patienten fanden sich Polypen im mittleren Kolon (5 Männer, 2 Frauen) und bei 58 Patienten im distalen Kolon (35 Männer, 23 Frauen).

Bezüglich der Geschlechterverteilung (p-Wert des Holm-adjustierten Fisher Test:  $p = 1,00$ ) und der Studienorte (p-Wert des Holm-adjustierten Fisher Test: 0,5156) zeigte sich eine homogene Verteilung.

Tabelle 18: Häufigkeiten für Polypenlokalisierung getrennt nach Geschlecht

Polypenort	Absolute Zahlen			Prozente		
	männlich	weiblich	Summe	männlich	weiblich	Summe
Caecum + Colon asc.	10	10	20	10.2	11.5	10.8
Colon desc. + Sigma + Rektum	35	23	58	35.7	26.4	31.4
Colon transversum	5	2	7	5.1	2.3	3.8
NA	48	52	100	49.0	59.8	54.1
<b>Summe</b>	<b>98</b>	<b>87</b>	<b>185</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.1</b>

Legende: NA: NA: not available bzw. Patienten mit fehlenden pathologischen Befunden

Die gefundenen sieben Karzinome in diesem Kollektiv zeigten bei Männern eine Auftrittswahrscheinlichkeit von 100% (4/4 Patienten) im distalen Kolon. Bei den Frauen jedoch nur von 66,6% (2/3 Patienten). Dabei lag bei den weiblichen Patienten je ein Karzinom im proximalen und distalen Kolon -siehe Tabelle 19-

Tabelle 19: Verteilung der Karzinome auf das Kolon

Alter	Geschlecht	Lokalisation
54	weiblich	distal
66	männlich	distal
70	männlich	distal
74	männlich	distal
59	männlich	distal
82	weiblich	proximal
53	weiblich	distal

#### 6.1.4 Verteilung der histologischen Entitäten

Das Kollektiv von 185 Patienten muss nach histologischer Einteilung aufgetrennt werden in 91 Patienten mit einem polypenfreien Befund, sowie in 11 Patienten, für die ein unklarer Befund oder kein Befund existiert. Von den verbliebenen 83 Patienten mit einem Befund wiesen 20 (absolut 10,8%, rel. 24,1%) (13 Männer, 13,3%; 7 Frauen 8,0%) hyperplastische Polypen auf. LGIEN wurden in 52 (28,1%, rel. 62,65%) (Männer 28, 28,6%; Frauen 24, 27,6%) und HGIEN in 4 Patienten (4,1%, rel. 4,82%) (2 Männer, 2,0%; 2 Frauen, 2,3%) diagnostiziert. Karzinome wurden bei 7 Patienten gefunden, (4 Männer, 4,1%; 3 Frauen, 3,4%) und bildeten 3,8% (rel. 8,43%) des Gesamtkollektives. Signifikante Unterschiede der polypösen Läsion und des Patientengeschlechts konnten nicht beobachtet werden (adjustierte p-Wert nach Fisher  $p=1,0000$ ).

Die Auflistung dieser Daten kann, graphisch dargestellt, aus der *-Abbildung 11-* und *-Tabelle 20-* entnommen werden.

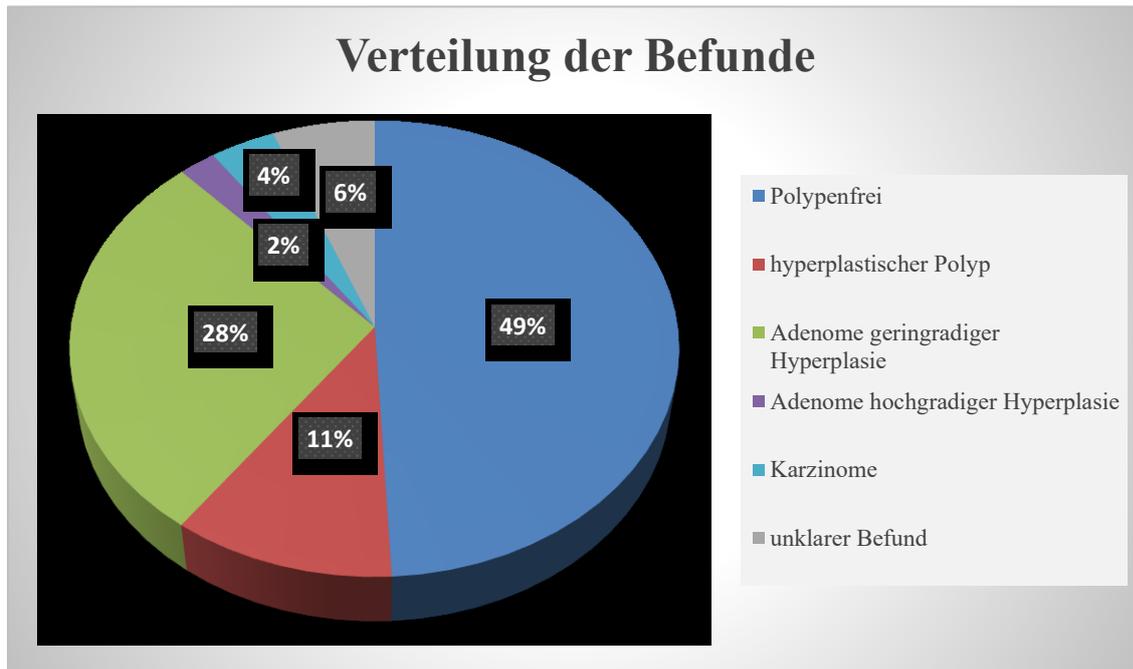


Abbildung 11: Verteilung der histologischen Entitäten

Tabelle 20: Histologische Befunde getrennt nach Geschlecht

	Absolute Zahlen			Prozente		
	männlich	weiblich	Summe	männlich	weiblich	Summe
Polypen						
nein	46	45	91	46.9	51.7	49.2
HP	13	7	20	13.3	8.0	10.8
ALow	28	24	52	28.6	27.6	28.1
AHigh	2	2	4	2.0	2.3	2.2
Karzinom	4	3	7	4.1	3.4	3.8
NA	5	6	11	5.1	6.9	5.9
Summe	98	87	185	100.0	99.9	100.0

Legende: Nein: kein pathologischer Befund, HP: hyperplastischer Polyp, ALow: Adenom mit LGIEN, AHigh: Adenom mit HGIEN, Karzinom: karzinogene Veränderung, NA: not available bzw. Patienten mit fehlenden pathologischen Befunden

## 6.2 Häufigkeiten verschiedener Befunde / Risikotypen

Beim Risikotyp werden die verschiedenen Differenzierungsstadien von Polypen in zwei Gruppen unterschiedlicher Pathogenität zusammengefasst. Die eine Gruppe wird als „low Risk“ (Niederrisikotyp) bezeichnet und beinhaltet (nein=keine Auffälligkeiten“, HP=hyperplastische Polypen und LGIEN), also besteht insgesamt ein niedriges Entartungsrisiko.

Die andere Gruppe wird als „high Risk“ (Hochrisikotyp) bezeichnet und HGIEN und Karzinome, also besteht insgesamt ein hohes Entartungsrisiko. Patienten mit dem Status NA=Not available konnten keiner Gruppe zugeordnet werden.

### 6.2.1 Häufigkeiten der Befunde getrennt nach Geschlecht

In -Tabelle 21- findet sich eine Auflistung aller Niederrisikotyp- und Hochrisikotyp-Patienten. Im Patientenkollektiv fanden sich für die Gruppe vom Niederrisikotyp insgesamt 87 männliche (47,0%) und 76 weibliche Patienten (41,1%). Unter die Gruppe vom Hochrisikotyp fielen 6 männliche (3,2%) und 5 (2,7%) weibliche Patienten.

Beim Vergleich des Befundes bzw. Risikotyps nach Geschlecht wird eine homogene Verteilung ohne signifikante Unterschiede deutlich. Dies bestätigt sich im Holm-adjustierten p-Wert nach Fisher von 1,0000.

Tabelle 21: Häufigkeiten für Risikotyp getrennt nach Geschlecht

Risikotyp	Absolute Zahlen			Prozente		
	männlich	weiblich	Summe	männlich	weiblich	Summe
low	87	76	163	88.8	87.4	88.1
high	6	5	11	6.1	5.7	5.9
NA	5	6	11	5.1	6.9	5.9
Summe	98	87	185	100.0	100.0	99.9

Legende: low: niedriger Risikotyp, high: hoher Risikotyp, NA: NA: not available bzw. Patienten mit fehlenden pathologischen Befunden

Die 11 (5,9%) Patientin mit der Bezeichnung „NA“ sind, wie oben geschrieben, durch fehlende Arzt- oder Pathologiebefunde begründet.

### 6.3 Entzündungen des Darms

In dem untersuchten Kollektiv von 185 Patienten weisen 53 eine Entzündung auf. Dies entspricht über die Geschlechter hinweg 28,6% der Patienten (28 Männer, 28,6%; 25 Frauen 28,7%). -siehe Tabelle 20-

Tabelle 22: Häufigkeiten von Entzündungen getrennt nach Geschlecht

Entzündung	Absolute Zahlen			Prozente		
	männlich	weiblich	Summe	männlich	weiblich	Summe
nein	70	62	132	71.4	71.3	71.4
ja	28	25	53	28.6	28.7	28.6
Summe	98	87	185	100.0	100.0	100.0

Legende: nein: Patienten ohne Entzündungen, ja: Patienten mit Entzündungen

Unterschieden wurde im Kollektiv nach akuten und chronischen Entzündungen. Akute Entzündungen wurde bei 15 Patienten (8,1%) (8 Männer, 8,2%; 7 Frauen, 8,0%), chronischen Entzündungen bei 38 Patienten (20,5%) (20 Männer 20,4%; 18 Frauen, 20,7%) diagnostiziert.

Tabelle 23: Häufigkeiten für Entzündungsdetail getrennt nach Geschlecht

Entzündungsdetail	Absolute Zahlen			Prozente		
	männlich	weiblich	Summe	männlich	weiblich	Summe
nein (akut)	70	62	132	71.4	71.3	71.4
ja (akut)	8	7	15	8.2	8.0	8.1
chronisch	20	18	38	20.4	20.7	20.5
Summe	98	87	185	100.0	100.0	100.0

Legende: nein (akut): keine akuten Entzündungen, ja (akut): akute Entzündungen, chronisch: chronische Entzündungen liegen vor

Betrachtet man die Entzündungen in Hinblick auf die Geschlechterverteilung, wird mittels des Holm-adjustierten Fisher Tests mit einem p-Wert von 1,0000 deutlich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtergruppen besteht.

## 6.4 M2-Pyruvatkinase

### 6.4.1 Acht-Zahlen-Zusammenfassung für metrische Variablen

Die Acht-Zahlen-Zusammenfassung ist eine Erweiterung der Standard Fünf-Zahlen-Zusammenfassung. Diese dient wiederum der Darstellung von Informationen eines Datensatzes. Meist erfolgt eine graphische Darstellung als Box- und Whisker-Plot und ist eine geeignete Form, um erste Aussagen zur Lage und Verteilung der Daten zu ermöglichen.

Dabei werden die berechneten Werte des Medians und die Quartile in vier Abschnitte geteilt zu je 25%. Die Box enthält anschließend 50% der Beobachtungswerte. –siehe auch: Kapitel 5.3.6-

Die TuM2-Pyruvatkinase hat bei den Männern ein linkszensiertes Minimum von  $\leq 1,0$  U/ml und ein Maximum bei 459,0 U/ml. Der Median liegt bei 2,0 U/ml, das Mittel bei 15,7 U/ml und die Standardabweichung bei 63,3. Bei Frauen liegen das linkszensierte Minimum bei  $\leq 1$  U/ml und das Maximum bei 926,0 U/ml. Der Median liegt bei 2,0 U/ml, der Mittelwert bei 23,7 U/ml und die Standardabweichung bei 106,0. Aufgrund der linkszensierten Daten erhält die Bezeichnung „TuM2PK“ in den Tabellen die Erweiterung „LC“ (left censored).

Tabelle 24: Acht-Zahlen-Zusammenfassung für metrische Variablen getrennt nach Geschlecht

	Entnahmealter		TuM2PK.LC		log10.TuM2PK.LC	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Min.	20.0	19.0	1.00	1.000	.	.
1. Qu.	49.0	41.5	1.00	1.000	.	.
Median	60.0	57.0	2.00	2.000	0.301	0.301
Mittel	57.5	53.8	15.70	23.700	0.437	0.471
3. Qu.	67.0	64.0	3.54	4.700	0.549	0.672
Max.	79.0	82.0	459.00	926.000	2.660	2.970
St.abw.	13.2	15.3	63.30	106.000	0.590	0.662
0.025 KG	54.8	50.5	3.01	0.806	0.318	0.327
0.975 KG	60.1	57.0	28.40	46.600	0.555	0.614
n	98.0	87.0	98.00	84.000	98.000	84.000
NAs	.	.	.	3.000	.	3.000

Legende: Min.: Minimum, 1. Qu.: 1. Quartil, 3. Qu.: 3. Quartil, Max. Maximum, St.abw.: Standardabweichung, 0.025 KG: 25% Konfidenzintervall, 0.975: 97,5% Konfidenzintervall, n: Anzahl, NA: nicht zuweisbar

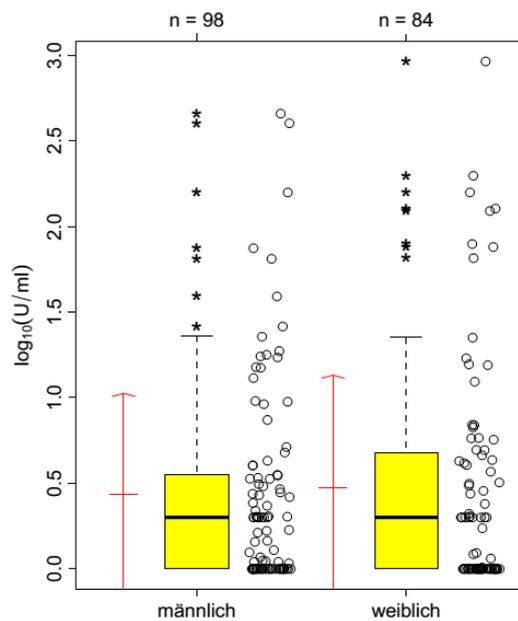


Abbildung 12:  $\log_{10}(\text{TuM2PK.LC})$  getrennt nach Geschlecht

Die  $\log_{10}$ -transformierten Werte der -Abbildung 12- zeigen zwar reduzierte, aber immer noch vorhandene Ausreißer, zahlreiche Bindungen<sup>1</sup> und gewisse Asymmetrien.

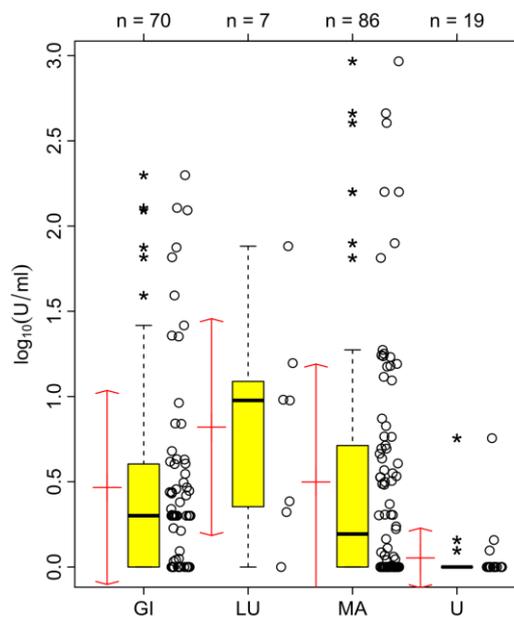
Gleichzeitig fand sich jedoch auch eine gewisse Ähnlichkeit der Datenverteilung. Die Testung der Normalverteilung zwischen Männern und Frauen (Holm adjustierter Fisher Test) ergibt  $p=0,8145$ .

Mittels eines inferenzstatistischen Vergleichs der Geschlechter-Gruppen, bezüglich der  $\log_{10}(\text{TuM2PK.LC})$  Konzentration mit Holm-adjustierten p-Werten, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtergruppen bezüglich der  $\log_{10}(\text{TuM2PK.LC})$  Konzentration gefunden werden. -vgl. Tabelle 25-

<sup>1</sup>: Mit einer Bindung wird im Rahmen der Rangstatistik das Auftreten von multiplen, gleichen Werten bezeichnet. Diesen kann kein eindeutiger Rang zugeordnet werden. Eine Lösung ist es diesen Werten den Durchschnittswert der hypothetischen Ränge zuzuweisen (DÜMBGEN L 2016).

Tabelle 25: Unadjustierter und Holm-adjustierter p-Wert für  $\log_{10}$ .TuM2PK.LC

	nicht adjustiert	Holm-adjustiert
<b>ttest</b>		
$\log_{10}$ .TuM2PK.LC	0.7147	1.0000

Abbildung 13:  $\log_{10}$ .TuM2PK.LC getrennt nach Ort

In der graphischen Darstellung der  $\log_{10}$  TuM2PK-Werte werden zahlreiche Ähnlichkeiten und Asymmetrien der Studienorte deutlich. Die Verteilung zwischen Gießen und Mannheim ist annähernd identisch, wohingegen Ludwigshafen und Ulm deutliche Abweichungen zeigen. Die Annahme einer Normalverteilung der  $\log_{10}$  TuM2PK-Werte ist daher schwierig. Dies bestätigt der p-Wert von 0,00111 im Peto & Peto Test in *-Tabelle 26-*

Tabelle 26: Peto &amp; Peto Test der TuM2PK - Konzentration bezogen auf die Studienorte

Ort	Anzahl	Beobachtet	Erwartet	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
<b>Gießen</b>	70	26,30	26,82	0,0102	0,0213
<b>Ludwigshafen</b>	7	4,75	1,84	4,6147	5,8215
<b>Mannheim</b>	86	38,38	32,66	0,9998	2,4083
<b>Ulm</b>	19	1,86	9,96	6,5879	10,4282
Chi-Quadrat: 16,1 (mit 3 Freiheitsgraden), $p=0,00111$					

#### 6.4.2 M2-PK und Entartungsstadien von Polypen

Die -Abbildung 14- zeigt die TuM2-PK Konzentration bezogen auf die verschiedenen Polypen - Entartungsstadien (keine Polypen (nein), hyperplastische Polypen (HP), LGIEN Adenome (ALow), HGIEN Adenome (AHigh) und Karzinome) als Boxplot.

Der Median der TuM2-PK-Konzentration steigt zu hyperplastischen Polypen hin an. Von den Niederrisikoadenomen bis hin zu den Hochrisikoadenomen fällt die TuM2-PK-Konzentration wieder ab und steigt schließlich bei den Karzinompatienten wieder an.

Es lässt sich kein linearer Zusammenhang zwischen der TuM2-PK - Konzentration und den verschiedenen Polypenstadien erkennen (Monte-Carlo-Approximation: p-Wert: 0,2074).

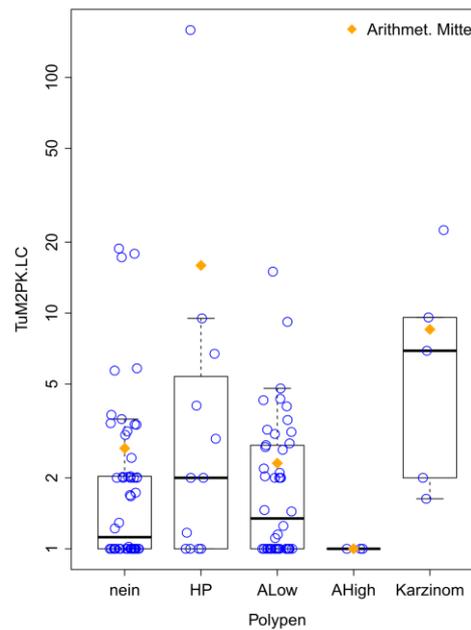


Abbildung 14: Verteilung der M2-PK-Werte pro Polypen-Gruppe (ohne Entzündung)

Die graphische Darstellung zeigt deutliche Ausreißer, die jedoch in einer Rangkorrelation vernachlässigbar sind. Der „Approximative Spearman Correlation Test“ ergibt einen p-Wert von 0,3955. Ein monotoner Zusammenhang zwischen der Polypenart und der TuM2-PK-Konzentration kann nur bedingt erkannt werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten keinen deutlich monotonen Zusammenhang zwischen dem TuM2-PK-Wert und der Entartungswahrscheinlichkeit bzw. der Karzinomhäufigkeit.

### 6.4.3 M2-PK und Sensitivität / Spezifität

Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität ist abhängig vom Cut-Off-Wert. Dabei handelt es sich um einen Toleranzwert, der festlegt, ab wann ein Testergebnis als positiv bzw. maligne bezeichnet wird. Ziel ist es die Anzahl an „falsch-positiven“ Ergebnissen so klein, wie möglich zu halten.

Ein für dieses Kollektiv passender Cut-Off-Wert wurde mit Hilfe einer Receiver-Operating-Characteristic (ROC) Kurve bzw. der graphischen Darstellung der Daten in der Area Under the Curve (AUC) ermittelt (THOMAS GT 2015).

Für dieses Kollektiv gibt die ROC-Kurve in -Abbildung 15- zwei passende Cut-Off-Werte an. Der minimal mögliche Cut-Off-Wert liegt bei 1,63 U/ml, der zweite bei 6,92 U/ml.

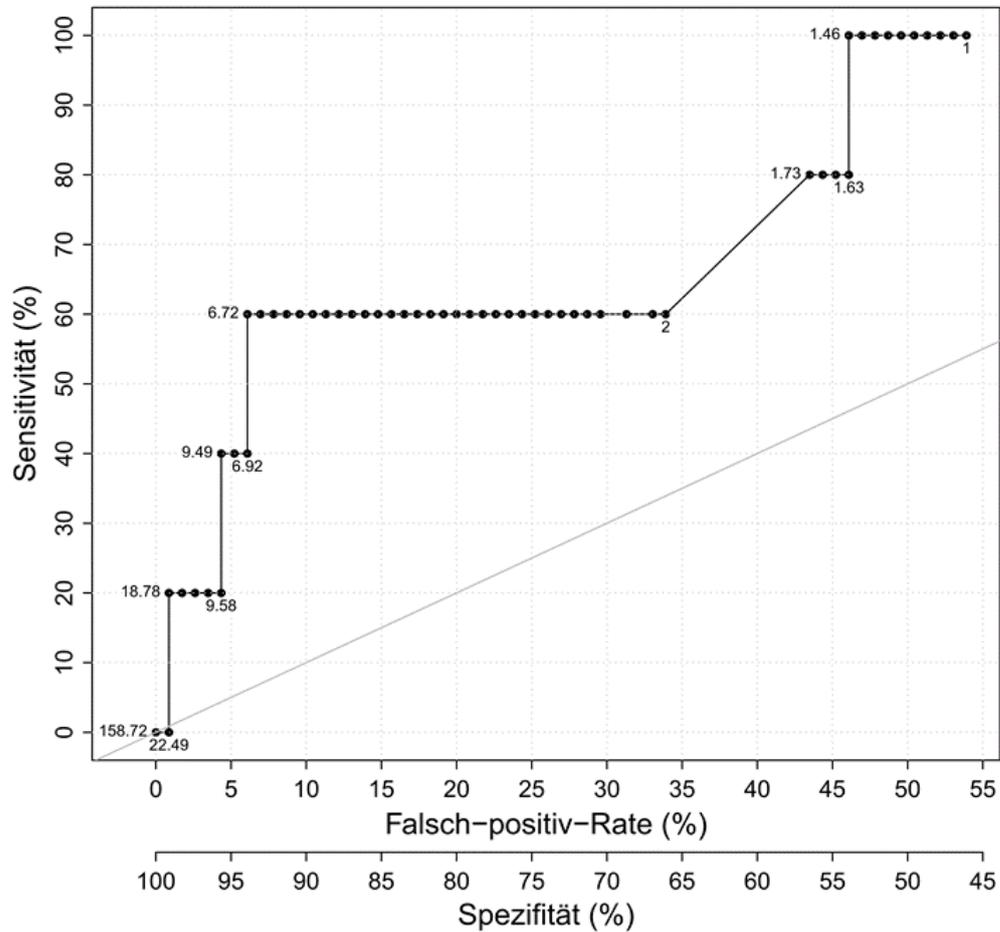


Abbildung 15: ROC Kurve von Karzinom und TuM2-PK

Jeder Cut-Off-Punkt hat seine eigenen Vor- und Nachteile, wodurch eine entsprechende Auswahl getroffen werden musste.

Für dieses Kollektiv und deren TuM2-Pyruvatkinase-Werte wurde entschieden den „Cut-Off 2“ bei 6,92 U/ml zu setzen. Dieser bietet bezogen auf dieses Kollektiv zwar nur eine Sensitivität von 60% (vs. Cut-Off 1: 100%), dafür jedoch eine Spezifität von 94% (vs. 54%).

Weiterhin ergibt sich ein Wert von 7% (vs. 53%) für Falschpositive und ein positiver Vorhersagewert von 30% (vs. 9%). Der negative Vorhersagewert beträgt 98% (vs. 100%) und der falsch negative Wert 2% (vs. 0%).

#### **6.4.4 M2-PK und Polypen, low risk und high risk Situation**

##### **6.4.4.1 Vergleich der empirischen kumulativen Verteilungsfunktionen**

Die statistische Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen der Polypenart (Hyperplastischer Polyp, Adenom mit low grade intraepitheliale Neoplasie (LGIEN), Adenom mit high grade intraepitheliale Neoplasie (HGIEN) / high risk Adenom, Karzinom) und der TuM2-PK Konzentration ergab im Peto & Peto-Test keinen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,136$ ).

##### **6.4.4.2 Logistische Regression mit proportionalen Odds von Polypen an M2-PK (mit Entzündungspatienten)**

Die logistische Regression mit proportionalen Odds findet Verwendung, wenn eine Beziehung zwischen zwei unterschiedlich skalierten Variablen gesucht wird. In diesem Fall wird eine Verbindung zwischen der ordinal skalierten (sog. Response-) Variable „Polypen“ (mit den unterschiedlichen Leveln (nein, HP, LGIEN, AGIEN und Karzinom) und anders skalierten, möglichen Einflussgrößen (den sog. Covariablen oder Prädiktoren) wie z.B. „Geschlecht, Entnahmealter und der Konzentration der TuM2-Pyruvatkinase“ gesucht.

Die Darstellung der Daten von Geschlecht, Entnahmealter und TuM2-PK sind als 3D-Verteilung der Daten aus vier verschiedenen Blickrichtungen nach Geschlecht farblich kodiert dargestellt.

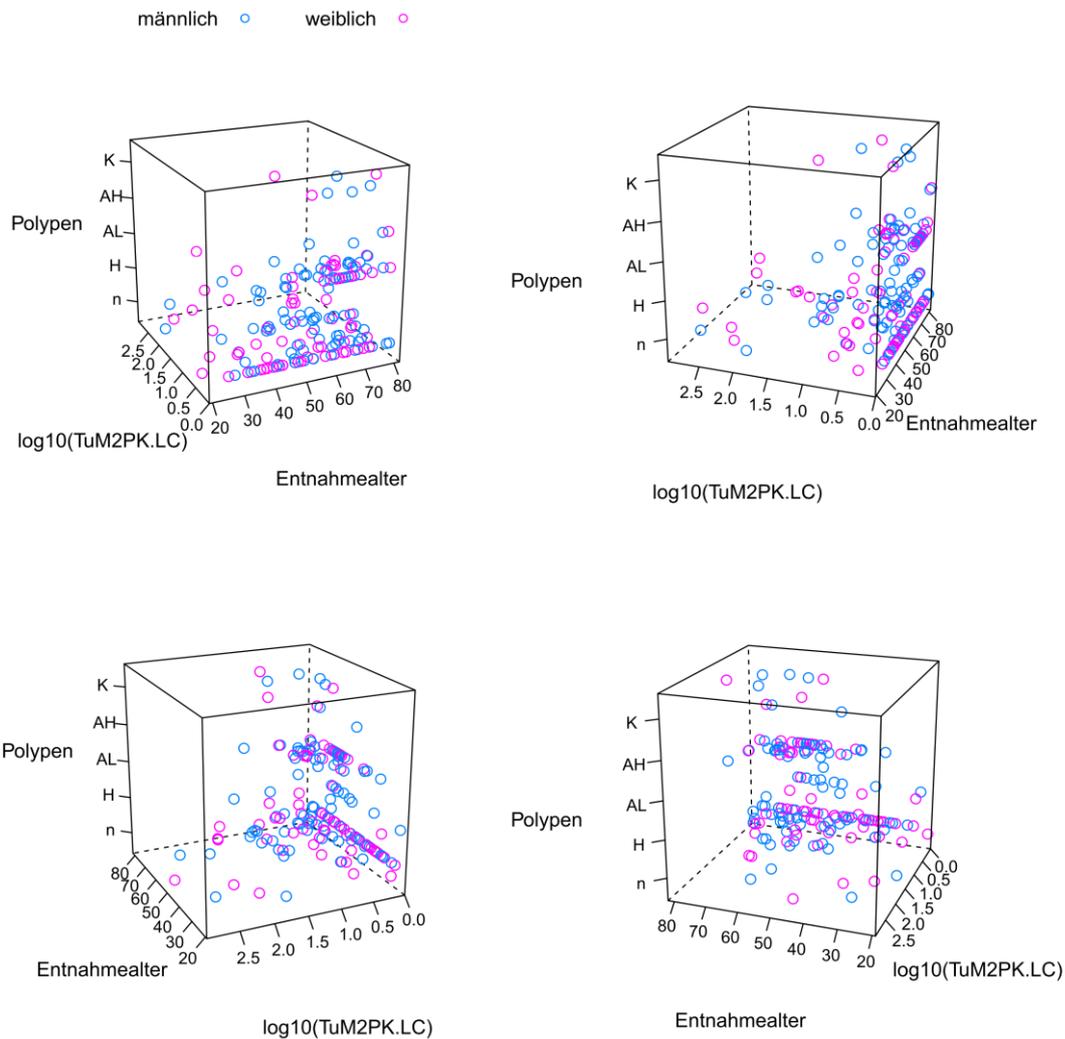


Abbildung 16: 3D-Punktewolken für Polypen, Entnahmealter, TuM2PK.LC

Die Daten werden in den 3D-Punktewolken nach Geschlechtern getrennt gruppiert. Dies erfolgt durch Kombination einer Farbkodierung der qualitativen Variablenwerte des Geschlechts (Mann: blau, Frau: pink) und der Interpretation metrischer und ordinaler Variablenwerte als Raumkoordinaten.

Insgesamt zeigen 85 Patienten einen auffälligen Polypenbefund. Weiterhin zeigt sich eine Häufung der Patienten ohne Polypen bei niedrigem Tumormarker und hohem Alter. Die

Verteilung der Polypen über die Geschlechter ist annähernd gleich. Mit steigendem Alter nehmen jedoch die HGIEN und die Karzinome deutlich zu.

In der anschließenden „Deviance“-Analyse wird das „gefittete ordinale Regressionsmodell“ zur Beurteilung der Signifikanz des Einflusses der einzelnen Prädiktoren auf die Response-Variable verwendet.

Tabelle 27: Deviance-Analyse-Tabelle (Type II Tests)

	<b>LR Chisq</b>	<b>Df</b>	<b>PR (&gt;Chisq)</b>
<b>Geschlecht</b>	0,2355	1	0,6274590
<b>Entnahmealter</b>	13,0409	1	<b>0,0003048</b>
<b>Log10(TuM2PK.LC)</b>	3,7573	1	0,0525764

Legende: Log10(TuM2PK.LC): Die log10 transformierten Messwerte der linkszensierten TuM2PK

Für das Geschlecht ergibt sich ein p-Wert von 0,6275, ebenso für die logarithmierten Werte des TuM2PK ( $\log_{10}(\text{TuM2PK})$ ):  $p=0,0526$ .

Wie bereits den 3D-Punktwolken *-Abbildung 16-* und *-Abbildung 17-* entnommen, lässt sich jedoch für das Entnahmealter ein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,0003$ ) bestimmen.

Die Daten aus *-Tabelle 23-* lassen sich auch graphisch darstellen *-siehe Abbildung 17-*:

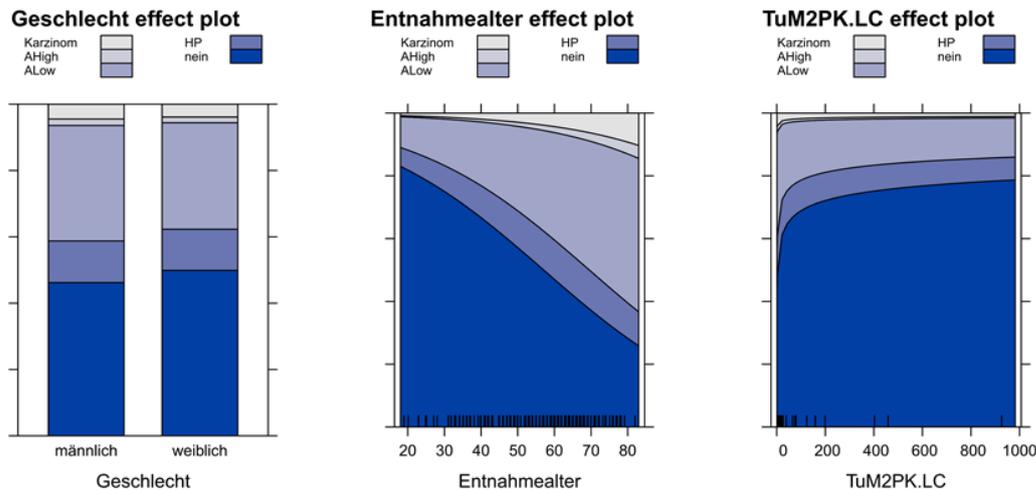


Abbildung 17: Effekte-Plots des obigen Regressionsmodells für Polypen

In -Abbildung 17- wird die Auftrittshäufigkeit verschiedener histologischer Typen (nein = keine Neoplasie, HP = hyperplastischer Polyp, ALow = LGIEN, AHigh = HGIEN und Karzinom = Karzinom) in Abhängigkeit vom Geschlecht, Entnahmealter und der TuM2-PK – Konzentration präsentiert. Die Darstellung wurde so gewählt, dass die Aufsummierung aller histologischen Typen jeweils 100% ergibt. An der jeweiligen Skalierung (Y-Achse) kann der relative Anteil an der Gesamtverteilung abgelesen werden. Die Skalierung entspricht jeweils 20% Anteilen.

Im linken Plot erfolgt die Unterscheidung nach Geschlecht. Aus der Grafik geht hervor, dass die unterschiedlichen histologischen Typen über die Geschlechter hinweg annähernd gleich verteilt sind.

Der mittlere Plot zeigt die altersabhängige Verteilung der verschiedenen histologischen Typen. Hierbei ist eine Verschiebung der Anteile mit dem Alter zu erkennen: Mit zunehmendem Entnahmealter ist eine Reduktion der Auftrittshäufigkeiten der Gruppen „Nein“ (=Keine Polypen) und „HP“ (=hyperplastischer Polyp) festzustellen. Gleichzeitig beobachtet man einen Anstieg des relativen Anteils der Kategorien „ALow“ (=LGIEN), „A-high“ (=HGIEN) und „Karzinome“ (=Karzinome).

Der rechte Plot zeigt ein antiproportionales Verhältnis zwischen der relativen Auftrittshäufigkeit der Kategorien „ALow“, „AHigh“ und „Karzinome“ und der TuM2-PK-Konzentration. Dementsprechend ergibt sich bei sehr niedrigen TuM2-PK-Konzentrationen eine höhere Auftrittshäufigkeit für die genannten Gruppen „ALow“, „AHigh“ und „Karzinome“.

**6.4.4.3 Logistische Regression mit proportionalen Odds von Polypen an M2-PK (ohne Entzündungspatienten)**

Die nachfolgend aufgezeigten 3D-Punktewolken -siehe Abbildung 18- zeigen das Patientenkollektiv ohne Entzündungen und getrennt nach Geschlecht. Zusätzlich werden die Daten nach dem Entnahmealter, den Polypen und der logarithmierten TuM2PK-Konzentration aufgetrennt.

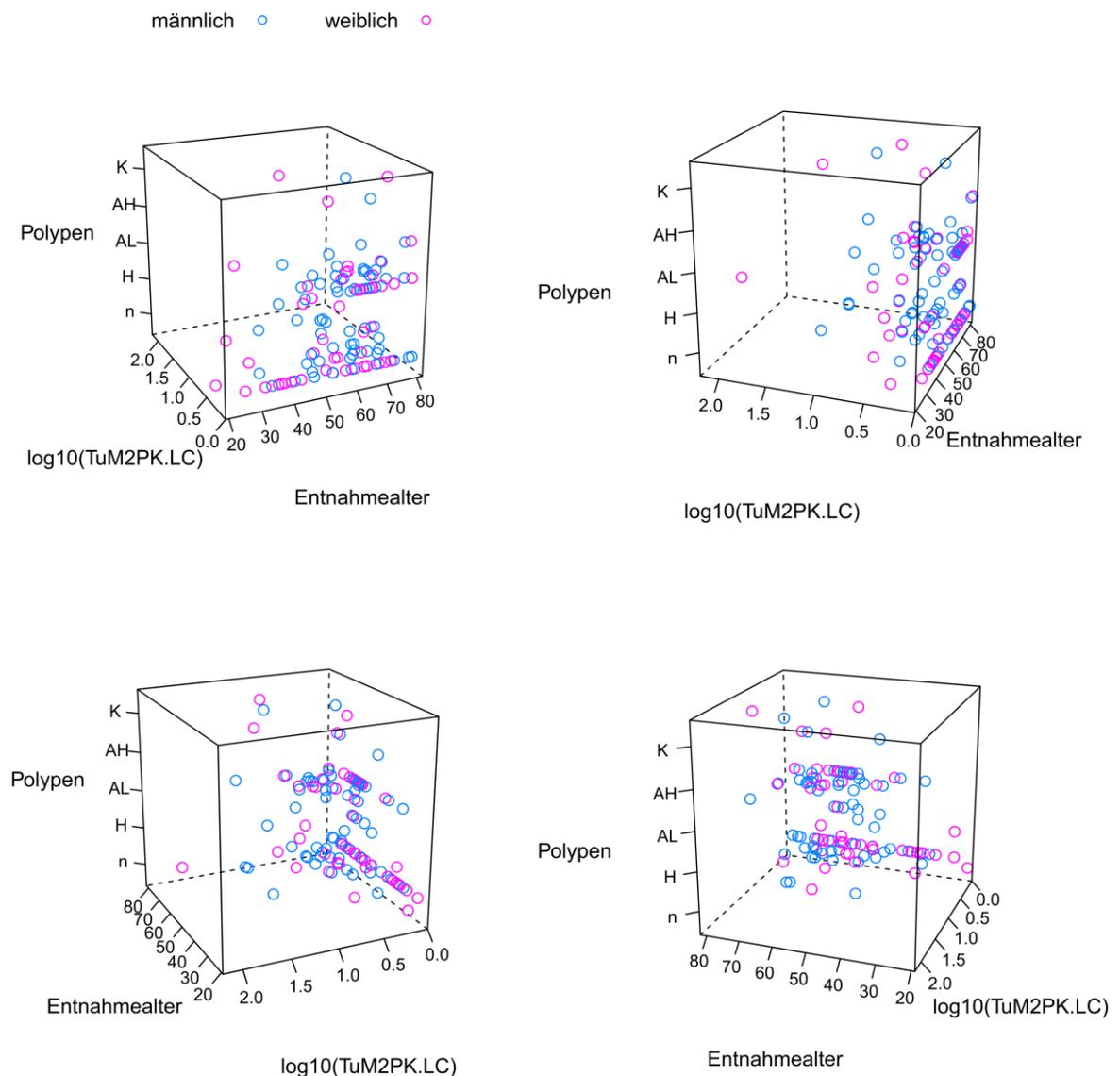


Abbildung 18: 3D-Punktewolken für Polypen, Entnahmealter, TuM2PK.LC  
(Es handelt sich in allen Abbildungen um die identische Darstellung, jeweils 90° gedreht.)

Die Punktwolken zeigen einen ansteigenden Trend von jungen Patienten mit niedriger M2-PK Konzentration und keinen Polypen im Gegensatz zu hohem Patientenalter mit zunehmend pathologischen Polypenformen. Jedoch ist dieser Trend nicht mit steigenden TuM2PK-Konzentrationen assoziiert.

Diese Vermutung zeigt sich ebenfalls in den „Effekte-Plots“ in *-Abbildung 19-*. Hierbei werden die Auftrittswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Polypenformen bezogen auf Geschlecht, Entnahmealter und TuM2PK-Konzentration aufgezeigt.

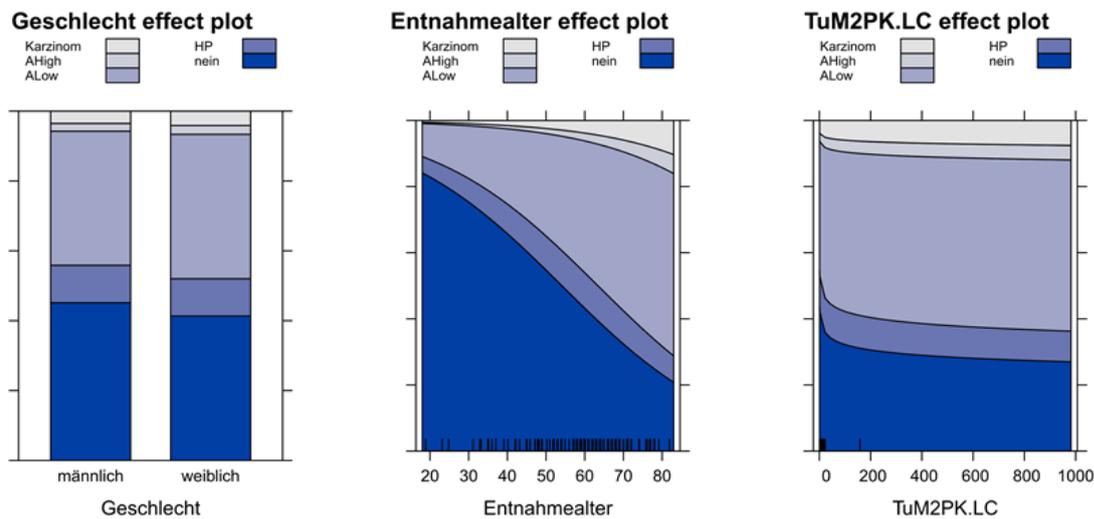


Abbildung 19: Effekte-Plots des obigen Regressionsmodells für Polypen (ohne Entzündung)

In der linken Graphik zeigt sich eine fast identische Auftrittswahrscheinlichkeit zwischen den Geschlechtern. In der mittleren Darstellung sind, bei steigendem Patientenalter, eine deutliche Zunahme von LGIEN, HGIEN Adenomen und Karzinomen, verbunden mit einem dementsprechenden Abfall der Auftrittswahrscheinlichkeiten für niederpathologische Polypen ersichtlich.

Im rechten Effekt-Plot zeigt sich bei sehr niedrigen TuM2PK-Konzentrationen ein starker Zusammenhang mit der Auftrittswahrscheinlichkeit pathologischer Polypenformen und

von Karzinomen. Bei steigenden Konzentrationen nimmt dieser Zusammenhang jedoch schnell ab und ein Zusammenhang lässt sich nicht länger erkennen.

Eine statistische Übersicht zeigt die folgende Analyse: *gefittetes, ordinales Regressionsmodell zur Beurteilung der Signifikanz des Einflusses der einzelnen Prädiktoren auf die Response-Variable -siehe Tabelle 28-*.

Tabelle 28: Analyse der Abweichungen (Type II tests)

	<b>LR Chisq</b>	<b>Freiheits- grad</b>	<b>PR (&gt;Chisq)</b>
<b>Geschlecht</b>	0,01871	1	0,665375
<b>Entnahmealter</b>	10,0201	1	<b>0,001548</b>
<b>Log10(TuM2PK.LC)</b>	0,3233	1	0,569628

Legende: Log10(TuM2PK.LC): Die log10 transformierten Messwerte der linkszensierten TuM2PK

Es zeigt sich, dass zwischen dem Polypentyp und dem Geschlecht ( $p=0,67$ ) sowie der TuM2Pk-Konzentration ( $p=0,57$ ) kein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht.

Jedoch besteht sehr wohl ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Entnahmealter und dem Auftreten bestimmter Polypentypen ( $p=0,0015$ ) -siehe Tabelle 28-.

### 6.4.5 M2-PK und Multiple logistische Regression für den Risikotyp

Die multiple logistische Regression dient der Analyse des Zusammenhangs zwischen diversen Prädiktoren und dem Risikotyp. In diesem Fall kommt sie zur Anwendung, um die Beziehung zwischen der dichotomen (Response-) Variable Risikotyp (mit den Levels: low Risk und high Risk) und den Prädiktoren (Risikotyp, Geschlecht, Entzündung, Entnahmealter und TuM2-PK-Konzentration) zu beschreiben.

Dafür wird in dreidimensionaler Form die Datenverteilung (Risikotyp, Entnahmealter,  $\log_{10}(\text{TuM2-PK.LC})$ ) gruppiert nach Geschlecht und Entzündung dargestellt.

Die Verwendung der logarithmierten Skala für die M2-PK Konzentration (hier als Tumor M2-PK bezeichnet) bietet sich aufgrund der Ausreißer der Werte an, damit eine sinnvolle, graphische Darstellung der Messwerte erfolgen kann. –siehe Kapitel 6.4.1–

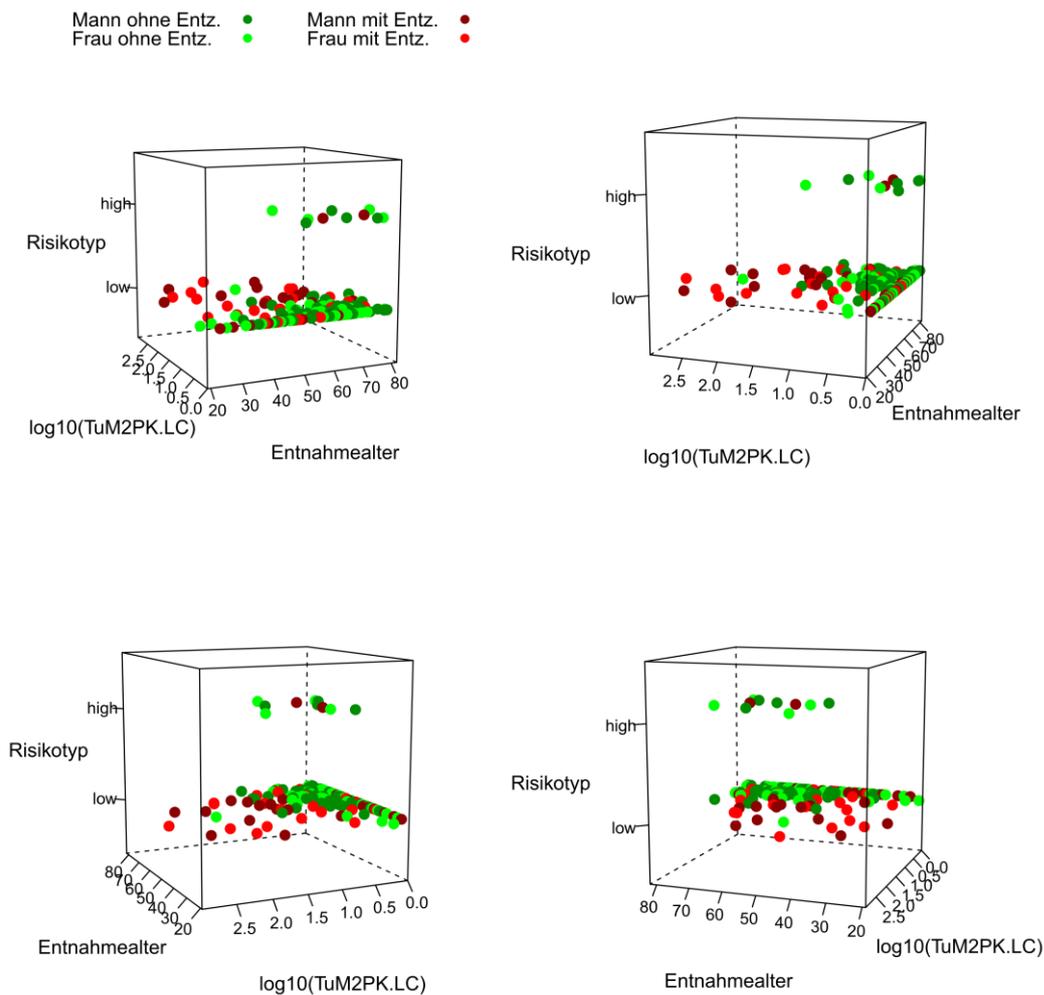


Abbildung 20: 3D-Punktewolken für Risikotyp, Entnahmealter, TuM2PK.LC

Die Daten in der 3D - Punktwolke scheinen hauptsächlich bei niedrigen  $\log_{10}(\text{TuM2-PK})$  - Konzentrationen und dem Risikotyp „low“ zu liegen. Ansonsten lässt sich bemerken, dass die Verteilung zum Risikotyp „high“ mit dem Alter zunimmt.

Statistisch bestätigt sich in *-Tabelle 29-*, jedoch einzig ein signifikanter Bezug zwischen dem Entnahmealter in Bezug auf den Risikotyp ( $p=0,01522$ ).

Tabelle 29: Deviance-Analyse-Tabelle (Type II Tests)

	<b>LR Chisq</b>	<b>Df</b>	<b>PR (&gt;Chisq)</b>
<b>Geschlecht</b>	0,0290	1	0,86470
<b>Entzündung</b>	0,0371	1	0,84732
<b>Entnahmealter</b>	5,8902	1	<b>0,01522</b>
<b>Log10(TuM2PK.LC)</b>	0,0280	1	0,86721

Legende: Log10(TuM2PK.LC): Die  $\log_{10}$  transformierten Messwerte der linkszensierten TuM2PK

### 6.4.6 M2-PK und Entzündungen

Untersucht wird der Zusammenhang zwischen der M2-PK-Konzentration und dem Auftreten von Entzündungen. Diese werden differenziert in akute und chronische Entzündungen.

#### 6.4.6.1 Spearmansche Rangkorrelation

Der zur Anwendung kommende „Approximative Spearman Correlation Test“ ergibt einen p-Wert von:  $p=0,00001$ . Dies deutet auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen Entzündungen (akut und chronisch) und der TuM2-PK-Konzentration hin.

Graphisch lässt sich dieser Zusammenhang im Boxplot in -Abbildung 21- darstellen. Dabei zeigt sich ein deutlich ansteigender Trend von niedrigen TuM2-PK-Werten bei entzündungsfreien Patienten und ansteigenden TuM2-PK-Werten von akuten zu chronischen Entzündungen.

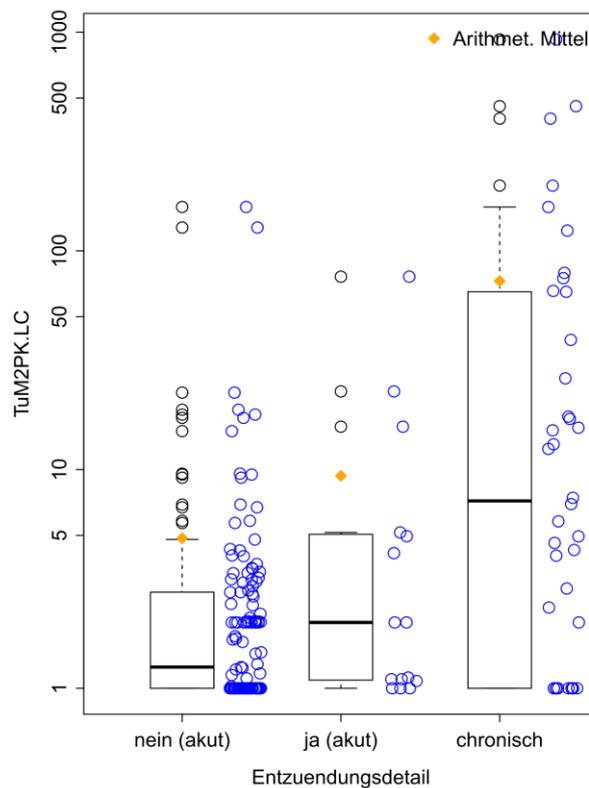


Abbildung 21: Verteilung der M2-PK-Werte pro Entzündungsdetail-Gruppe

#### 6.4.6.2 Vergleich der empirischen kumulativen Verteilungsfunktionen

Die empirischen kumulativen Verteilungsfunktionstests testen auf einen Zusammenhang zwischen den Entzündungsdetails „nein, ja (akut) und chronisch“ und der TuM2PK-Konzentration. Dafür wird der Peto & Peto Test verwendet.

Tabelle 30: Peto & Peto Test der kumulativen Verteilung

	Anzahl	Beobachtet	Erwartet	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
<b>Entzündungsdetail = nein (akut)</b>	129	40,8	56,15	4,223	25,673
<b>Entzündungsdetail = ja (akut)</b>	15	7,0	5,58	0,359	0,505
<b>Entzündungsdetail = chronisch</b>	38	23,5	9,55	20,476	30,194
<b>Chi-Quadrat=32,1 (mit 2 Freiheitsgraden), p=1,08e-07</b>					

Der p-Wert als Ergebnis des Peto & Peto Tests -Tabelle 30- liegt bei  $p=0,000000108$  bzw.  $p<0,05$ . Dies ist ein hoch signifikanter Befund für einen Zusammenhang zwischen den Messwerten der TuM2-PK-Konzentration und dem Entzündungsdetail.

**6.4.6.3 Logistische Regression mit proportionalen Odds von Entzündungsdetail an M2-PK**

In dieser Darstellung der Daten ist es das Ziel eine Beziehung zwischen der ordinal skalierten (Response-) Variable „Entzündungsdetail“ (keine Entzündung=n, akute Entzündung=a, chronische Entzündung=c) und Einflussgrößen (Covariablen oder Prädiktoren) wie Geschlecht, Entnahmealter und der TuM2-PK-Konzentration zu beschreiben.

Die Daten werden alle zusammen in einer 3D-Punktewolke dargestellt.

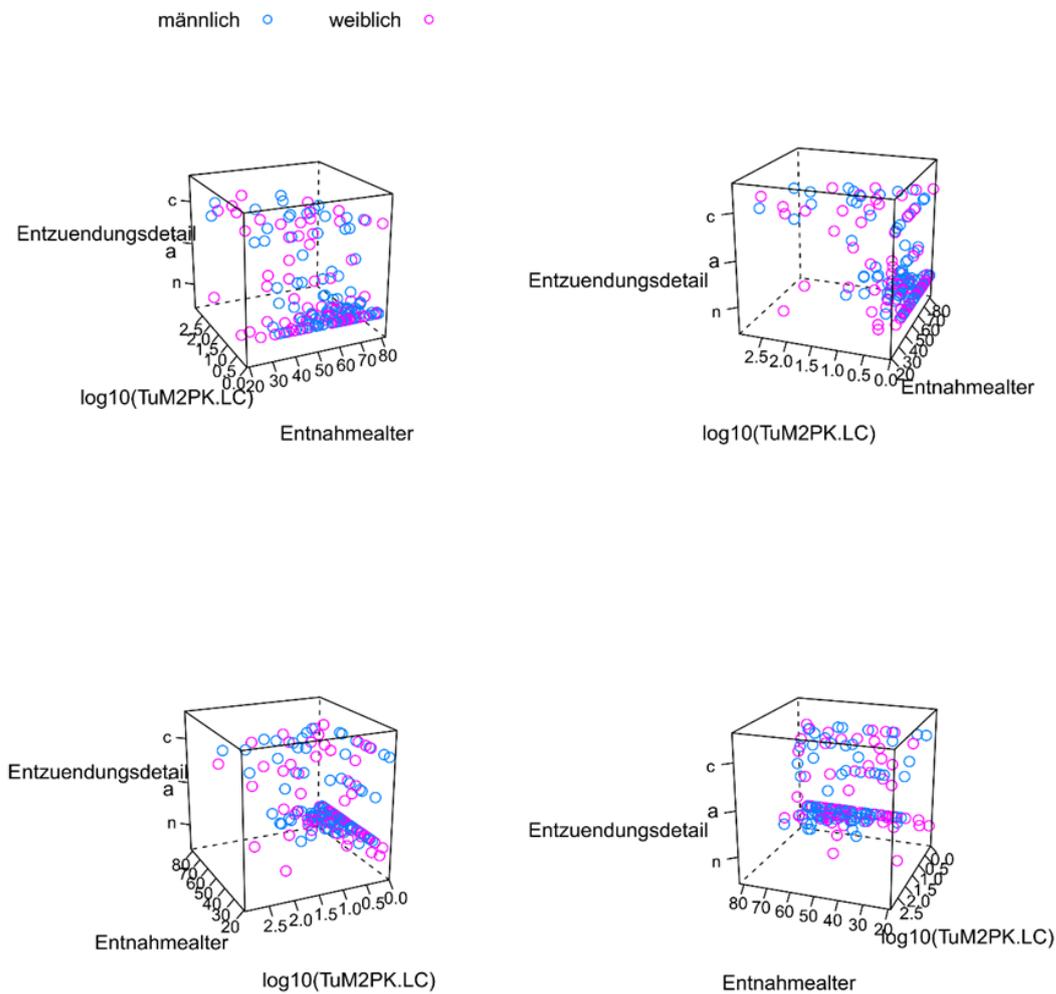


Abbildung 22: 3D-Punktewolken für Entzündungsdetail, Entnahmealter, TuM2PK.LC

Diese Darstellung zeigt ein Überwiegen der entzündungsfreien Patienten, ebenso wie eine Geschlechter-unabhängige Verteilung der Punktwolken. Deutlich fällt jedoch auf, dass der bekannte Trend von „keine Entzündung“ und niedrigen TuM2-PK-Werten über „akute Entzündung“ und mittleren TuM2-PK-Werten bis hin zur „chronischen Entzündung“ und hohen TuM2-PK-Werten erkennbar ist. Gleichzeitig scheinen chronische Entzündungen eher bei jungen Patienten und keine Entzündungen bevorzugt bei alten Patienten vorzuliegen.

Diese Ansichten lassen sich mit den p-Werten aus *-Tabelle 31-* belegen. Dabei besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Entnahmealter und dem Entzündungsdetail ( $p=0,001878$ ), sowie ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der TuM2-PK-Konzentration und dem Entzündungsdetail ( $p=0,000000007471$ ). Aber es liegt kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Entzündungsdetail vor.

Tabelle 31: Deviance-Analyse-Tabelle (Type II Tests)

	<b>LR Chisq</b>	<b>Df</b>	<b>PR (&gt;Chisq)</b>
<b>Geschlecht</b>	0,401	1	0,526405
<b>Entnahmealter</b>	9,665	1	<b>0,001878</b>
<b>Log10(TuM2PK.LC)</b>	33,408	1	7,47e-09

Legende: Log10(TuM2PK.LC): Die log10 transformierten Messwerte der linkszensierten TuM2PK

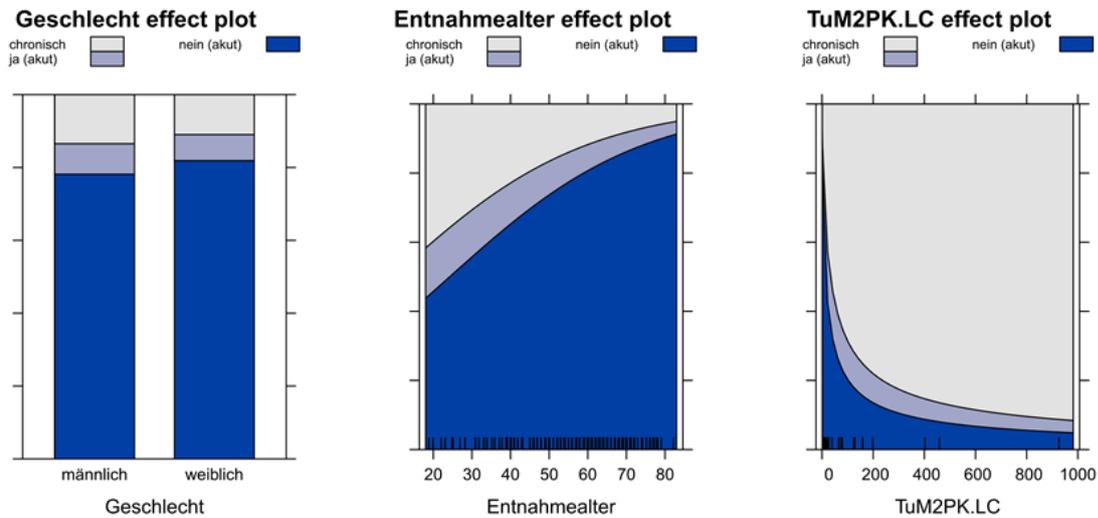


Abbildung 23: Effekte-Plots des obigen Regressionsmodells für Entzündungsdetail

Die letzte Aussage kann auch in der graphischen Darstellung der Effekte in *-Abbildung 23-* gezeigt werden. Die Effekte der Geschlechter auf das Entzündungsdetail (nein, akut und chronisch) sind nahezu identisch, wohingegen die mittlere Graphik einen deutlichen Trend zeigt. Hierbei nehmen mit steigendem Alter die chronischen Entzündungen stark und die akuten Entzündungen leicht ab. Dementsprechend nehmen „keine Entzündungen“ deutlich zu.

Bezogen auf die TuM2-PK Konzentration beginnt mit steigenden Werten eine fast exponentielle Zunahme der chronischen Entzündungen, gepaart mit einem leichten Anstieg der akuten Entzündungen. Die ordinal skalierte Response Variable für „keine Entzündung“ sinkt mit steigenden TuM2-PK-Werten nahezu exponentiell ab.

## 6.4.7 M2-PK und Entnahmealter / Geschlecht

### 6.4.7.1 Effekte-Plots für das logistische Regressionsmodell des Risikotyps

Die -Abbildung 24- stellt die Effekte des oben gefitteten Modells als graphische Darstellung der Wirkung der Prädiktoren auf die Response-Variable dar.

Die Abbildungen zeigen die diskreten bzw. nominal skalierten Prädiktoren Geschlecht und Entzündung, sowie die kontinuierlichen bzw. metrisch skalierten Prädiktoren Entnahmealter und TuM2PK-Konzentration bezogen auf den Risikotyp (HRisk) der Patienten.

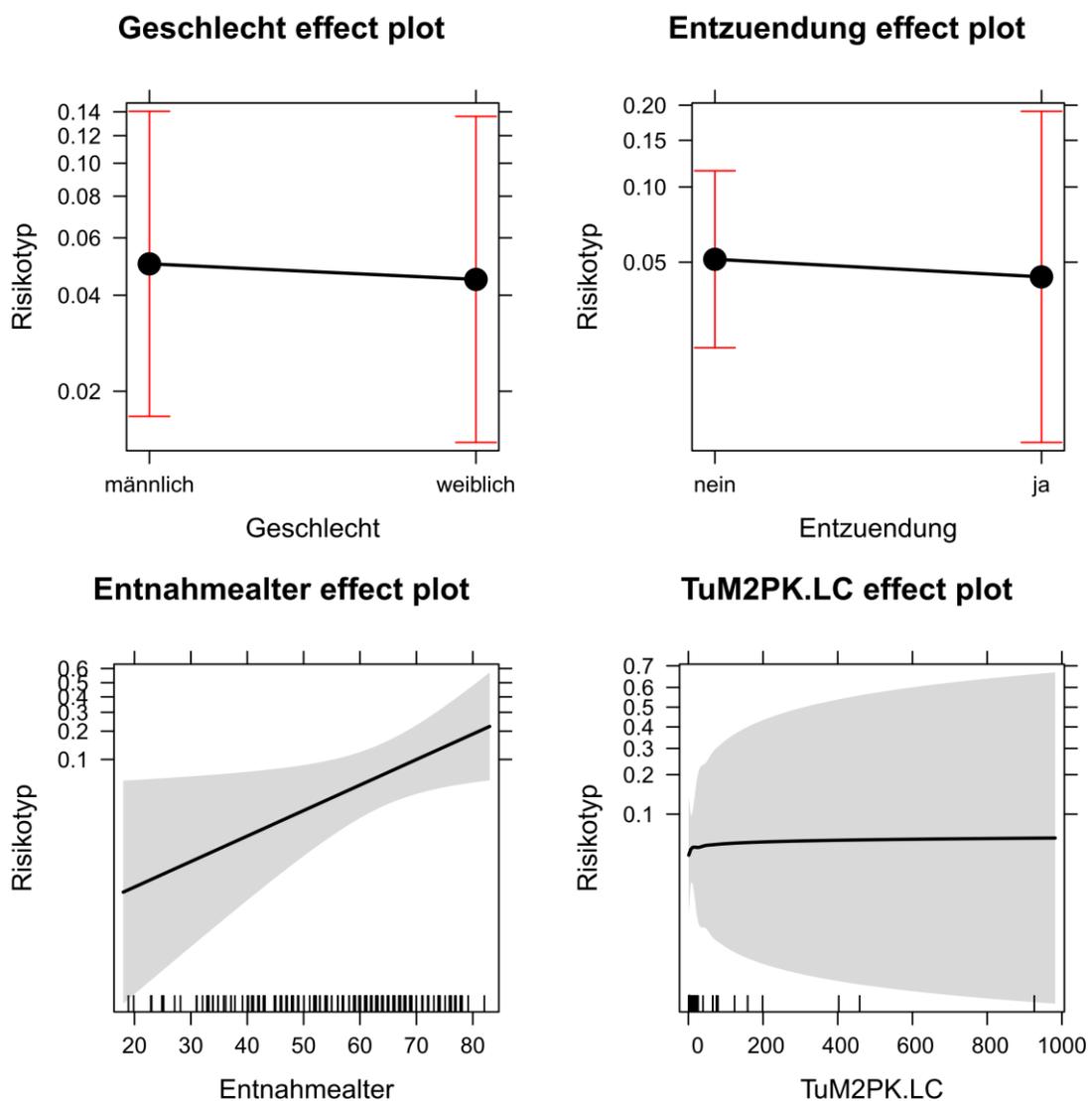


Abbildung 24: Effekte-Plots des obigen logistischen Regressionsmodells für den dichotomisierten Risikotyp

Für das Geschlecht zeigt sich für Männer und Frauen ein nahezu identisches bzw. fast komplett überlappendes Konfidenzintervall mit homogener Verteilung der Daten. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen HRisk Patienten und dem Geschlecht.

Auch für Entzündungen zeigen sich überlappende Konfidenzintervalle und somit kein signifikanter Einfluss auf HRisk Patienten.

Dies gilt auch für die TuM2-PK Konzentration und den Risikotyp. Eine waagerechte Verbindung der Konfidenzintervalle zeigt keinen signifikanten Bezug der TuM2-PK Konzentration auf die HRisk Patienten.

Einzig das Entnahmealter zeigt einen, mit dem Alter ansteigenden, signifikanten Einfluss auf den Risikotyp. Graphisch ist dieser Zusammenhang durch die nicht überschneidenden Konfidenzintervalle dargestellt -*vergleiche Abbildung 24*-.

## 7 Diskussion

Aufbauend auf den wissenschaftlichen Vorleistungen von Hardt, Mazurek und Eigenbrodt widmet sich diese Studie dem Zusammenhang zwischen der Konzentration von M2-PK im Stuhl und der Auftrittswahrscheinlichkeit von Karzinomen.

Insgesamt wurden nach Selektion 185 Personen in das Patientenkollektiv aufgenommen. Nach Anwendung der festgelegten Einschlusskriterien und Analyse der Daten mussten 70 Datensätze verworfen werden. Teilnehmer der Studie gaben eine Stuhlprobe zeitgleich mit der durchgeführten Koloskopie ab. Dies ist von Relevanz für die Aufstellung des Kollektivs, da eine Koloskopie meist an einen Termin gebunden ist und erst nach zehn Jahren wiederholt werden muss. Das Kollektiv setzt sich in Bezug auf Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen rein zufällig zusammen.

Die anonymisierten Testergebnisse und vorbestehenden Daten der anderen Studienorte wurden von Hardt an mich zur systematischen Zusammenführung, Ergänzung durch von mir gesammelten Daten Gießener Patienten, sowie zur statistischen Auswertung übergeben.

Im Einzelnen sollten folgende Problemfelder diskutiert werden:

- Abhängigkeit der M2-PK Konzentration vom Geschlecht
- Abhängigkeit der M2-PK Konzentration vom Lebensalter
- KRK - Lokalisation in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter
- Abhängigkeit der M2-PK Konzentration von Entzündungen
- Früherkennung bei tatsächlich KRK ausbildenden Patienten
- Reproduzierbarkeit bei gesunden Patienten
- Akzeptanz innerhalb des Kollektivs (Abbruchrate)

Zum Abschluss der Studie wird ein Vergleich mit der aktuellen Literatur durchgeführt. Dieses ist von besonderer Bedeutung, weil die Methode der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen Pyruvatkinase zwischenzeitlich weltweit eingesetzt wird.

## 7.1 Abhängigkeit der KRK - Ausprägung von Geschlecht und Lebensalter

Mit Hilfe der Methode der Koloskopie untersuchten Regula et al. die Prävalenz von fortgeschrittenen Adenomen bei Männern im Alter von 50-54 Jahren und bei Frauen im Alter von 60-64 Jahren. Im Ergebnis hat sich ein um ca. 10 Jahre verzögertes Auftreten von Karzinomen bei Frauen gezeigt (REGULA J et al. 2006).

Dem entspricht ein Bericht aus dem Center for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta Georgia, dass Männer häufiger von KRK betroffen sind als Frauen. Danach wird statistisch gesehen bei 1,26% der 60-jährigen Männer in den nächsten 10 Jahren ein Karzinom auftreten, bei den gleichaltrigen Frauen dagegen nur bei 0,89% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) 2014).

In dem Studienkollektiv fanden sich insgesamt 7 Patienten mit einem Karzinom und 4 Patienten mit einem HGIEN. Für die Auswertung mussten aufgrund des Einflussfaktors Entzündung auf den TuM2PK Marker zwei Karzinompatienten mit gleichzeitig vorliegender Entzündung aus dem Kollektiv entfernt werden. Daher ergaben sich insgesamt nur 5 Karzinome, die in die Auswertung eingehen konnten.

Für diese Befunde zeigen sich für Männer deutlich niedrigere Durchschnittsalter  $\bar{O} = 68,3$  Jahren im Gegensatz zu den weiblichen  $\bar{O} = 76$  Jahren Patienten.

Für die männlichen Patienten mit einem Hochrisikotyp lag das mittlere Auftretsalter bei 68,2 Jahren und bei 66,3 Jahren für die Frauen. Insgesamt zeigte diese Studie ein um 2,9% erhöhtes Auftretsalter bei den Männern im Vergleich zu den Frauen.

Für die männlichen und weiblichen Patienten mit einem Karzinom lag das durchschnittliche Auftretsalter bei 68 Jahren.

In Bezug auf das Lebensalter finden sich folgende Untersuchungsergebnisse in der Literatur.

So beschreiben Hagggar et al., dass über 90% der KRK-Fälle bei Menschen über 50 Jahren auftreten. Dabei finden sich im Vergleich zu 40-jährigen fünfzigfach häufiger Krebsfälle bei Patienten im Alter von 60-79 Jahren (HAGGAR FA et al. 2009).

Studien aus Australien zeigen ein ähnliches altersabhängiges Auftreten von KRK bei Frauen zwischen 70 bis 74 Jahren im Vergleich zu Männern mit einem Alter zwischen

60 bis 64 Jahren. Es ergibt sich ein verfrühtes Auftreten von KRK bei Männern von ca. 10 Jahren (AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE (AIHW) AND AUSTRAL-ASIAN ASSOCIATION OF CANCER REGISTRIES (AACR) 2007; KOO JH et al. 2010).

Entsprechende Ergebnisse haben auch Brenner et al. in ihren Studien gefunden. Sie bestimmten einen früheren Erkrankungszeitpunkt für Männer von 4-6 Jahren (BRENNER H et al. 2007).

Die gewonnenen Studiendaten deuten auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Auftrittswahrscheinlichkeit von unterschiedlichen Polypenstadien (z.B. AHigh und Karzinomen) und dem Alter hin ( $p=0,0003$ ) -siehe *Abbildung 17*-.

## 7.2 Verteilung der Polypen

Das Kollektiv besteht zu einem großen Teil aus Patienten, die Polypen im Kolon an verschiedenen Stellen präsentierten. Dabei zeigten sich homogene Verteilungen zwischen Männern und Frauen ( $p = 1,00$ ) sowie den Studienorten ( $p = 0,52$ ).

Insgesamt wiesen 85 der 185 Patienten polypöse Veränderungen auf, deren Loci sich im Kolon folgendermaßen darstellten: Im proximalen Kolon fanden sich insgesamt 20 Patienten bzw. 10,8% (rel. 23,53%) mit polypösen Veränderungen der Darmschleimhaut (10,2% Männer, 11,5% Frauen). Die geringste Anzahl an Polypen fanden sich im mittleren Kolonabschnitt, dem Colon transversum mit nur 7 Patienten, was einer absoluten Häufigkeit von 3,8% (rel. 8,24%) entspricht (5 Männer, 5,1% und 2 Frauen, 2,3%). Die meisten Polypen wurden bei insgesamt 58 Patienten mit 31,4% (rel. 68,24%) im distalen Kolon gefunden (35 Männer, 35,7% und 23 Frauen 26,4%).

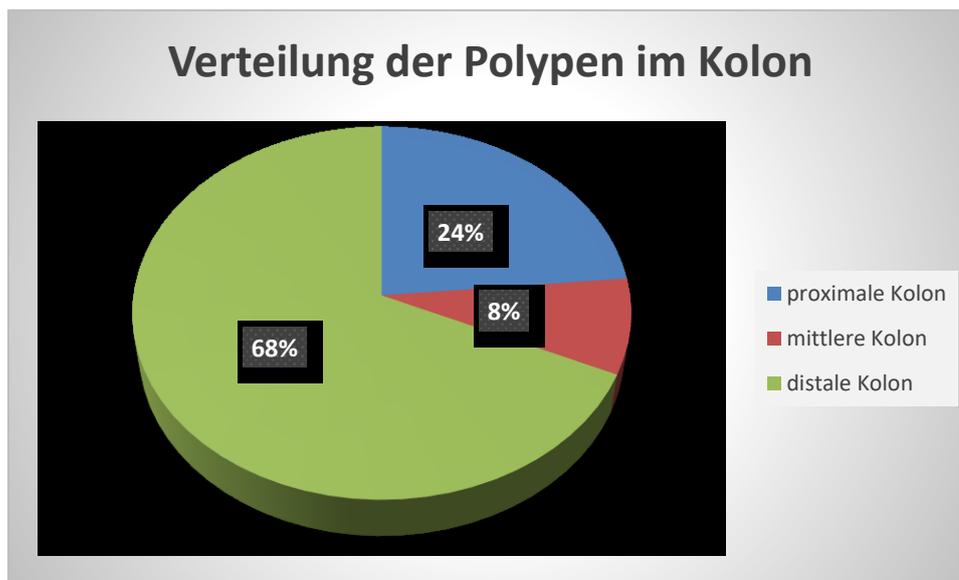


Abbildung 25: Verteilung der Polypen im Kolon

Die aktuellen Studiendaten zeigen keinen statistischen Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Auftreten von Polypen, Adenomen oder Karzinomen. Ebenso sind die gemessenen TuM2-PK-Werte nicht spezifisch einer Entartungsform (HP Polyp, LGIEN Adenom, HGIEN Adenom und Karzinom) zuweisbar.

Das vorliegende Verteilungsmuster bestätigte sich in anderen Studien. Eine Studie aus 2012 verglich 2400 Patienten mit einer 50%:50% Geschlechterverteilung und kam zu der

Erkenntnis, dass 69,4% der Patienten einen distalen Polypen aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen 39,3% der Patienten einen Polypen im proximalen Kolon auf ( $p=0,0001$ ). Weiterhin wurde beim weiblichen Geschlecht eher eine geringere Anzahl an Dysplasien im distalen Kolon gefunden ( $p=0,03$ ) (QUMSEYA BJ et al. 2012).

Eine andere Studie aus 2016 zeigte bei fast 14000 Patienten eine höhere Auftretswahrscheinlichkeit von Polypen/Adenomen beim Mann (single Polyp: Mann: 57,7% vs Frau: 42,3% ( $p < 0,0001$ ) und multi Polyp: Mann: 62,2% vs Frau: 37,8% ( $p < 0,001$ )). Die Polypen/Adenome konzentrierten sich (beim Mann) im Kolon transversum und distalen Kolon. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Alter auch die Anzahl der Polypen und Adenome ansteigt und diese dann auch vermehrt im distalen Kolon zu finden sind (LAIRD-FICK HS et al. 2016).

### 7.3 Verteilung der Karzinome

Schalhorn et al. ermittelten eine geschlechtsunabhängige Lokalisationsverteilung von KRK in folgender Auftretshäufigkeit: Rektum 60%, Sigmoid 20%, Caecum 10%, andere Lokalisation: 10%). Diese lässt sich zusammenfassen zu 10% proximal lokalisierten und 80% distal lokalisierten Karzinomen (SCHALHORN A et al. 2006; SCHALHORN A et al. 2013). Eine Studie von Zahn et al. gibt sehr ähnliche Verteilungen an. Von allen erfassten Adenokarzinomen in seiner Studie wurden insgesamt 72,2% im distalen Kolon gefunden (ZHAN T et al. 2015).

Dieses steht zumindest im partiellen Widerspruch mit älteren Angaben, nach denen sich KRK bei älteren Frauen grundsätzlich häufiger proximal als distal entwickeln (KOO JH et al. 2008; MCARDLE CS et al. 2004; NELSON RL et al. 1997).

Eine ältere Studie aus dem Jahr 1997 mit fast 39000 Patienten von Nelson et al. bestätigt diese Proximalisierung (proximal shift) bei älteren Frauen (NELSON RL et al. 1997).

Eine Studie aus dem Jahre 2002, die die Karzinomentwicklung in Japan über die Jahre 1974 bis 1994 beobachtete, zeigt einen sog. „proximal shift“ bei weiblichen, sowie männlichen Patienten über 70 Jahren (TAKADA H et al. 2002). Andere Studien mit insgesamt 9000 Patienten gab Hinweise, dass das weibliche Geschlecht ein unabhängiger Prädiktor für ein proximales KRK ist (GONZALEZ EC et al. 2001; KOO JH et al. 2010).

Dieser „proximal shift“ kann sogar zu einer sog. „Ineffektivität der flexiblen Sigmoidoskopie bei Frauen über 50 Jahren“ führen, die zu einem falsch-negativem Untersuchungsergebnis in 44-65% der Fälle führen kann (KOO JH et al. 2008; KOO JH et al. 2010). Aus diesem Grund wird in der Literatur sogar empfohlen immer eine vollständige Koloskopie bis zum Caecum durchzuführen, um eben auch die proximalen Karzinome erkennen zu können (REGULA J et al. 2006).

Aufgrund dieser widersprüchlichen Literaturangaben war es von hohem Interesse die erhobenen Studienergebnisse daraufhin zu überprüfen, ob sie die eine oder andere Angabe bestätigen können.

Dieses Kollektiv enthält 7 Karzinome. Diese verteilen sich auf das proximale (2 Patienten, 28,6%) und das distale Kolon (5 Patienten, 71,4%).

Insgesamt fanden sich bei den Männern 75% und bei den Frauen 66% der Karzinome im distalen Kolon.

Die Verteilung der Karzinome bzw. Karzinomvorstufen auf das distale Kolon muss jedoch weiter differenziert werden.

Trotz der häufigeren Lokalisation im distalen Kolon, wurden in dieser Studie Unterschiede zwischen den Geschlechtern gefunden. Dabei ist die Mehrheit der Karzinome bei den Männern (75%) ausschließlich auf das distale Kolon begrenzt, wohingegen bei den Frauen nur 66% der gefundenen Karzinome dort lokalisiert waren. Die restlichen 33% der Karzinome bei Frauen finden sich im proximalen Kolon.

Das Durchschnittsalter bei Entdeckung der Karzinome lag im Kollektiv bei den Frauen bei 66,25 und bei den Männern bei 67,25 Jahren. Wenn man die 33% der Karzinome bei Frauen betrachtet, die sich auf das proximale Kolon verteilen, erkennt man ein deutlich erhöhtes Alter von 82 Jahren. Das Durchschnittsalter der Patienten mit rein distal lokalisiertem KKK lag bei 60,75 Jahren.

Schlussendlich muss aber konstatiert werden, dass die geringe Fallzahl weder gesicherte Kenntnisse, noch Tendenzen in irgendeine Richtung unterstützen.

## 7.4 Verteilung der histologischen Entitäten

Zahn et al. konnte eine Verteilung von 52,5% an low-grade Dysplasien (LGIEN Adenome), 26,7% an high-grade Dysplasien (HGIEN Adenome) und 11,2% Karzinome bei der durchgeführten Karzinomdiagnostik nachweisen (ZHAN T et al. 2015).

Von den insgesamt 185 Personen des Kollektivs zeigen 81 histologische Entitäten auf. Dabei weisen 20 Patienten (rel. 24,1%) hyperplastische Polypen, 52 Patienten (rel. 62,7%) LGIEN, 4 Patienten (rel. 4,8%) HGIEN und 7 Patienten (rel. 6,0%) Karzinome auf.

In dieser und der Studie von Zahn können übereinstimmend keine geschlechterspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Art der polypösen Läsion gefunden werden. ( $p=1,0000$ ) -Vergleiche Tabelle 20-.

## 7.5 Abhängigkeit von Entzündungen

Die Fragestellung nach einem Zusammenhang zwischen KRK und vorangegangener Entzündung ist bisher in der Literatur, wenn überhaupt, stets nur im Zusammenhang mit einer geographischen Verteilung thematisiert worden. Für europäische und nordamerikanische Patienten kann eine Verteilung der Geschlechter mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung (CED) gefunden werden, die von 1:1 bis 2,5:1 variieren kann (BERNSTEIN CN et al. 2001; FREEMAN et al. 2004; SINCIC BM et al. 2006).

In asiatischen Ländern dominieren die Männer deutlich bei der Verteilung der CED (ISHIGE T et al. 2010; YANG SK et al. 2008).

Dieser Verteilung und der Zunahme der CED scheinen dortige Umweltfaktoren und weniger genetische Faktoren zugrunde zu liegen (NG SC et al. 2013). Generell können eine vorausgegangene Appendektomie (ANDERSSON RE et al. 2003) orale Kontrazeptiva (CORNISH JA. et al. 2008) oder Rauchen (LAKATOS PL et al. 2013), das Risiko für Frauen erhöhen an einer CED zu erkranken. Hingegen erhöht bei Männern vermehrte Antibiotikarezeptierung stark das Erkrankungsrisiko (SHAW SY et al. 2010).

Aufgrund des hier vorliegenden Datensatzes können Risiken, wie sie für asiatische Männer beschrieben wurden, ausgeschlossen werden, so dass die Möglichkeit einer geschlechterspezifischen Auswertung genutzt werden sollte.

Insgesamt wurden bei 28 Patienten im Kollektiv Entzündungen gefunden. Es waren 71% (71% Männer, 71% Frauen) der Patienten ohne Entzündung vorstellig geworden, dagegen 8% (8% Männer, 8% Frauen) mit akuten Entzündungen, 20% (20% Männer, 20% Frauen) mit CED. 1% der Patienten zeigten unklare Befunde.

Die Verteilung auf die Geschlechter scheint somit deutlich homogen verteilt ( $p = 1,000$ ).

Die Entzündungen teilten sich auf in akute und chronische Entzündungen, die während der pathologischen oder endoskopischen Untersuchung erkannt wurden. Interessant an diesem Befund ist die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil dieser Entzündungen zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits bekannt war.

Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Daten, die unter Verwendung der TuM2-Pyruvatkinase gesammelt wurden, noch einmal unter verschiedenen Gesichtspunkten intensiv betrachtet. Im Mittelpunkt dieser Betrachtung stand die Frage, ob die angestrebte

Früherkennung von KHK allgemein durch Entzündungen gestört oder umgekehrt unterstützt wird.

## 7.6 M2-Pyruvatkinase

Die M2-Pyruvatkinase, als Beschreibung der dimeren Form der Pyruvatkinase im letzten Schritt der Glykolyse, entsteht vermehrt bei einem verstärkten Bedarf an Metaboliten der Glykolyse-Zwischenreaktionen. Ein solcher Bedarf kann im Falle von Karzinomen oder Adenomen vorliegen (EIGENBRODT E et al. 1985). Ziel ist es dabei der Zelle ein Überleben, Teilungsfähigkeit und Regenerationspotential auch an schlecht versorgten Lokalisationen (niedrige Sauerstoff- und Glukoseversorgung) zu ermöglichen (KOSS K et al. 2004).

Der „Switch“ zwischen der tetrameren und der dimeren Form der Pyruvatkinase kann dabei intern oder extern durch diverse Onkoproteine induziert werden. Mögliche Onkoproteine können das E7 Onkoprotein des HPV-16 (MAZUREK S et al. 2001a), die A-Raf-Kinase, das Onkoprotein HERC1 (MAZUREK S et al. 2007) und die pp60v-scr-Kinase des Rous Sarcoma Virus sein (COOPER JA et al. 1981; MAZUREK S et al. 2005a).

Durch die antigenspezifische Nachweisreaktion der M2-PK durch monoklonale Antikörper ist der Test unabhängig von Blutungen (vgl. Haemocult®-Test) und daher auch unempfindlich gegenüber nichtkarzinogenen akuten Blutungen, wie Hämorrhoiden. Somit kann es nicht zu falsch-positiven Ergebnissen bei einer vorliegenden Blutung kommen. Gleichzeitig können auch nicht blutende Polypen erkannt werden (TONUS C et al. 2012).

Die Möglichkeit die M2-PK - Konzentrationen im Patientenserum zu testen, ist bereits seit 1981 bekannt. Jedoch erst 2003 konnte in einer umfassenden Pilotstudie von Hardt et al. mit insgesamt 60 Patienten und einer 144 Patienten umfassenden Kontrollgruppe der Nachweis erbracht werden, dass das Enzym M2-Pyruvatkinase im Stuhl nachweisbar ist (HARDT PD et al. 2003c; HUANG JX et al. 2014).

Die Firma ScheBo Biotech AG (Gießen, Deutschland) hat einen Test (ScheBo® • M2-PK™ Colorectal Cancer Screening) auf dem Markt etabliert, mit dessen Hilfe sich eine Überprüfung auf TuM2-PK durchführen lässt. Dazu wird eine Stuhlprobe entnommen und im Labor ausgewertet.

### **7.6.1 M2-PK als Entzündungsmarker im Blut und Stuhl**

Eine Erhöhung der M2-Pyruvatkinase im Blut bei Entzündungen ist in der Literatur bereits 2003 von Oremek et al. für rheumatologische Erkrankungen beschrieben worden (OREMEK GM et al. 2003). Dieser Zusammenhang wurde ebenso für Colitis Ulcerosa (WALKOWIAK J et al. 2005) erforscht.

Eine umfangreiche Studie von Shastri et al. mit insgesamt 2383 Stuhlproben zeigte bei akuter Diarrhoe einen deutlichen Anstieg der M2-PK Konzentration. Heraus kam eine Sensitivität von 83% und Spezifität von 87% für Entzündungen, sodass von einem deutlichen Zusammenhang zwischen Entzündungen des Darms und dem Anstieg der TuM2-Pyruvatkinase ausgegangen werden kann (SHASTRI YM et al. 2008a).

In einer Studie von Czub et al. wurden Kinder mit einer akuten Infektion des Darmes (Salmonellen) untersucht und mit gesunden Kindern verglichen. Es konnte für die M2-PK als Entzündungsmarker im Stuhl eine Sensitivität von 75,9% und eine Spezifität von 71,4% bestimmt werden (CZUB E et al. 2014).

Dies stützt die These, dass akute oder chronische Darmentzündungen Einflüsse auf den M2-PK-Marker haben können. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei der M2-PK um einen bekannten Proliferationsmarker handelt und dieser daher bei Entzündungen erhöht sein kann (MAZUREK SYBILLE et al. 2003).

In diesem Zusammenhang empfiehlt eine Studie von Mulder et al., dass Patienten mit einer Entzündung vom Kollektiv ausgeschlossen werden sollten, wenn ein entzündungsabhängiger Einfluss auf die M2-Pyruvatkinase vermieden werden soll (MULDER SA et al. 2007).

Diese Arbeit zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der M2-PK-Konzentration und dem Entnahmealter ( $p < 0,05$ ) und dem Entzündungsdetail (keine / akute oder chronische Entzündung) des Darms ( $p < 0,05$ ). Das Geschlecht hat dabei keinerlei Auswirkungen gezeigt.

Das Kollektiv zeigt sogar bei 15 von 185 Patienten eine akute Entzündung des Darmes, die histopathologisch bestätigt wurde, obwohl die Patienten noch keine Beschwerden hatten.

Da es das Ziel dieser Arbeit ist, den Nutzen der Tumor-M2-Pyruvatkinase als Detektor von Karzinomen (und Vorstufen) zu untersuchen, wird zur Beurteilung statistischer Zusammenhänge zwischen dem TuM2-PK-Marker und HGIEN, sowie Karzinomen, aus diesem Grund ein um Entzündungspatienten reduziertes Kollektiv verwendet.

Dies resultierte in einem auf 5 Karzinome reduziertem Kollektiv, da eine durchgeführte Koloskopie und die pathologische Auswertung der Biopsien bei diesen Patienten, neben dem Karzinom, ebenfalls eine Entzündung im Darm zeigte.

Grundsätzlich ist ein Ausschließen der Patienten mit bekannten chronischen Entzündungen für diese Studie nicht unbedingt von Nachteil für die Patienten, denn bei bekannten Entzündungen wird der Patient regelmäßig zur weiteren Diagnostik mit Koloskopien einbestellt.

### **7.6.2 M2-PK und Sensitivität, Spezifität mit Cut-Off-Punkt / Area Under the Curve (AUC)**

Die Sensitivität und Spezifität für ein gegebenes Kollektiv kann mit Hilfe der Area under the Curve (AUC) bestimmt werden. Zusätzlich kann mindestens ein sog. Cut-Off-Punkt bestimmt werden. Dieser Punkt stellt in diesem Kollektiv für eine gegebene Konzentration an M2-PK Marker dar, ob ein Patient erkrankt oder gesund ist.

Oft wird ein Cut-Off-Punkt durch die Literatur vorgegeben und liegt für die Pyruvatkinase bei 4 U/ml. Dies kann jedoch, abhängig vom Kollektiv, ungenau sein. Für dieses Kollektiv errechnet sich ein optimaler Cut-Off-Punkt von 6,92 U/ml. Um trotzdem einen Vergleich von Sensitivität und Spezifität mit der Literatur zu ermöglichen, sind entsprechende Werte ebenfalls für 4 U/ml angegeben *-siehe Tabelle 32-*.

Im Vergleich zu den hier erhobenen Studienergebnissen zeigen Untersuchungen von Haug et al. in einem Kollektiv von 917 Erwachsenen (Median: 65 Jahre für Männer, 62 Jahre für die Frauen) für den Marker der M2-PK und einem Cut-Off von 4 U/ml eine Sensitivität von 85% für das Kolonkarzinom und von 56% für das Rektumkarzinom. Die Spezifität lag bei 79% (HAUG U et al. 2007).

In einer weiteren Studie, die ein Jahr später (2008) durchgeführt wurde, fanden sich bei einem Kollektiv von 1080 Patienten 30% mit Adenomen vom Niederrisikotyp und 10% mit Adenomen vom Hochrisikotyp, die miteinander verglichen wurden. Dabei ergab sich bei einem Cut-Off von 4 U/ml, der Standard der Literatur, eine Sensitivität von 22% für LGIEN Adenomen und 23% für die Erkennung von HGIEN Adenomen. Die Spezifität betrug 82% (HAUG U et al. 2008b).

Dieses Kollektiv zeigt, bezogen auf HGIEN Adenome (incl. Karzinome), erreichte eine Sensitivität von 37,50% und eine Spezifität von 86,61%.

Grundsätzlich lässt sich im Vergleich von dieser Studie mit anderen erkennen, dass ein Cut-Off von 6,9 U/ml in diesem Kollektiv grundsätzlich die exakteren Ergebnisse erzielt. Dagegen ist bei einem Cut-Off bei 4 U/ml zwar die Sensitivität identisch bei 60%, jedoch die Spezifität deutlich reduziert. *-siehe Tabelle 32-* Im Vergleich mit den anderen Studien liegt die Sensitivität dieses Patientenkollektivs mit 60% (vs. Ø 79,9%) etwas niedriger, als der Durchschnitt der anderen Studien. Die Spezifität ist jedoch mit 94% (vs. Ø 77,9%) deutlich höher.

Im direkten Vergleich zeigt eine Studie von Hardt aus dem Jahre 2014 für einen Cut-Off bei 4 U/ml eine berechnete Sensitivität von 73% und eine Spezifität von 78%. Dabei stieg die Sensitivität bei Einteilung T1/UICC I von 59% zu 78% bei Stadium T4 und schließlich bis 90% im Stadium UICC IV (HARDT PD et al. 2004b).

Zusammenfassend kann ermittelt werden, dass ein Test auf M2-PK in den Stuhlproben im Rahmen dieser Studie zwar nur mit einer Sensitivität von 60%, dafür jedoch mit 94%iger Sicherheit bei einem negativen Nachweis dieser Patient auch einen negativen Koloskopie Befund aufweisen wird.

Dies bestätigt sich ebenfalls bei Betrachtung des Positiven Prädiktiven Wertes, der nur zu 30% sicher ist, dass ein positives Testergebnis auch ein Krebsleiden bestätigt. Jedoch kann ein negatives Testergebnis ein Krebsleiden zu 98% ausschließen.

*-siehe Kapitel 6.4.3 und Tabelle 32-*

### **7.6.3 M2-PK im Vergleich mit anderen Studien**

In der folgenden *-Tabelle 32: Studien zu TuM2-PK - Sensitivität / Spezifität-* sind einige Studien mit Cut-Off Wert und entsprechender Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu den Studienergebnissen aufgeführt. Diese zeigt die errechneten Werte bei einem festgelegten Cut-Off bei 4 U/ml bzw. berechneten Cut-Off bei 6,9 U/ml auf. Der für dieses Kollektiv nicht optimale Cut-Off von 4 U/ml dient, wie oben bereits dargestellt, dem Vergleich mit anderen Studien, die stets einen Cut-Off von 4 U/ml bevorzugten.

Tabelle 32: Studien zu TuM2-PK - Sensitivität / Spezifität

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Cut-Off</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>	<b>KRK</b>	<b>Insgesamt (M/F)</b>
Parente et. al.	2012		87%		85	280
Li et. al.	2012		79%	81%		
Tonus, C. et. al.	2012		87%	73%	704	12116
Shastri et. al.	2008	4 U/ml	78,2%	73,8%		
Shastri et. al.	2007	4 U/ml	81,1%	86,7%		232 (58/29)
Tonus, C. et. al.	2006	4 U/ml	77,8%	92,9%	33	96
Vogel et. al.	2005	4 U/ml	77%	72%		138
Koss et. al.	2005	4 U/ml	92,3%	92,3%	26	49
Haug et. al.	2004	4 U/ml	85%	79%	65	204
Hardt et. al.	2004	4 U/ml	73,3%	77,8%		78 (58/29)
Naumann et. al.	2004		85,2%	65,3%		232 (129/112)
Hardt et. al.	2003	4 U/ml	68%		15	15 (5/7)
			Ø= 81,2%	Ø=79,3%	Ø=180	
<b>Aktuelle Dissertation</b>		6,9 U/ml	60,0%	94,0%	7	185 (98/87)
-“-		4 U/ml	60,0%	86,96%	7	185 (98/87)

Beim Vergleich dieser Studienergebnisse und der Ergebnisse von anderen Studien fällt im Vergleich bei einem Cut-Off von 4 U/ml auf, dass die Sensitivität im Durchschnitt der Studienergebnisse bei 81,2% und die Spezifität bei 79,3% liegen. Bei diesen Daten liegen sie dagegen bei 60,0% und 86,96% bzw. bei 94%, wenn man den Cut-Off bei 6,9 U/ml ansetzen würde.

Eine Sensitivität von nur 60% ist ein sehr niedriger Wert. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist das genutzte Kollektiv mit seiner geringen Karzinomhäufigkeit von nur 5 Karzinomfällen. Diese geringe Anzahl lässt eine exakte Berechnung der Sensitivität nicht zu.

Die in dieser Studie bestimmte Spezifität von 86,96% ist deutlich über dem Durchschnitt der anderen Studien. Dies zeigt das Potential dieses Tests in der Vorsorgediagnostik. Exaktere Aussagen könnten nur weiterführende Studien mit einem größeren Patientenkollektiv mit mehr Karzinomen ermöglichen.

In der Literatur finden sich im Mittel höhere Werte der M2-PK Konzentration bei Karzinompatienten im Vergleich zu gesunden Probanden. (HARDT PD 2003; SITHAMBARAM S et al. 2015; ZACCARO C et al. 2017)

In der hier vorgestellten Arbeit konnten keine höheren Werte für die M2-PK bei Karzinompatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zur Literatur. Aufgrund des sehr geringen Anteils an Karzinompatienten (5 ausgewertete Karzinompatienten auf 180 nicht-Karzinompatienten) wäre für eine Überprüfung dieses Aspektes ein Kollektiv mit einem größeren Karzinomanteil erforderlich.

#### **7.6.4 M2-PK Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu anderen Tumormarkern**

Der CEA-Marker (Carcino-Embryonic-Antigen) ist ein Glykoprotein, dass u.a. auch in der Kolonschleimhaut vorkommt. Eine aktuelle Studie von 2015 von Kim et al. verglich bei einem multizentrischen Kollektiv die Sensitivitäten des TuM2-PK-Tests mit der eines immunologischen Tests auf okkultes Blut (iFOBT) und dem bewährten CEA-Marker (KIM YC et al. 2015).

Dabei wurden, mit einem Cut-Off bei 4 U/ml, Sensitivitäten von 92,8% für TuM2-PK, 47,5% für iFOBT und 45,3% für CEA gemessen. Die Studie bezeugte dem TuM2-PK-Test eine hohe Sensitivität bei fortgeschrittenen KRK und adenomatösen Läsionen im Vergleich zum iFOBT und bestätigte dem TuM2-PK-Test eine sehr hohe Leistungsfähigkeit (KIM YC et al. 2015).

Studien von Shastri et al. bestätigen ebenfalls der TuM2-PK eine höhere Sensitivität ( $\emptyset = 68,93\%$ ) im Vergleich zu CEA (33,6%) und Haemocult® ( $\emptyset = 33\%$ ) (SHASTRI YM et al. 2006; TONUS C et al. 2006).

Die M2-PK bietet somit nicht nur eine höhere Sensitivität als gFOBT, iFOBT und CEA, sondern vermag zusätzlich nicht nur blutende (gFOBT / iFOBT) Karzinome zu entdecken. Des Weiteren zeigt die M2-PK eine sensiblere Nachweismöglichkeit im Vergleich zu universellen Tumormarkern (CEA), deren Serumspiegel auch bei gutartigen Erkrankungen, wie Pankreatitis, Colitis Ulcerosa, Ulcus ventriculi, Divertikulitis oder Leberzirrhose erhöht sein kann (LOEWENSTEIN MS et al. 1978).

In der Literatur wird dieser Marker aufgrund der niedrigen Sensitivität von ca. 50% (Variiert je nach Tumorstadium) nicht als Marker für Screeninuntersuchungen empfohlen (HARDT PD 2008).

Im Vergleich zum CA 19-9, das ebenfalls ein Glykolipid ist und ein KRK nachweisen kann, kommt dieser Marker jedoch am Ehesten zum Nachweis eines Rezidivs zum Tragen, da die Sensitivität bei 38-70% bei einer Spezifität von 90% liegt. Aufgrund der sehr variablen Sensitivität ist dieser (vergleichen mit den Daten der M2-PK) nicht als Screeningmarker einsetzbar (HARDT PD 2008).

AFP (Alpha-Fetoprotein) ist ebenfalls ein Marker, der grundsätzlich ein KRK anzeigen könnte, jedoch ist er als Marker äußerst unspezifisch, da er ebenfalls auf hepatozelluläre

Karziome, Keimzelltumoren des Hodens oder Dottersacktumore, Magenkarzinome, Pankreaskarzinome und cholangiozelluläre Karzinome ansprechen kann. (HARDT PD 2008)

Deutlich werden die individuellen Einschränkungen der jeweiligen Marker im Vergleich zur M2-PK als Marker für KRK. Gerade die Sensitivität der M2-PK ist im Vergleich besser ohne Einschränkungen bei der Spezifität hinnehmen zu müssen.

### ***7.6.5 M2-PK und Karzinome bzw. kann die TuM2-Pyruvatkinase als Marker für Gastrointestinale Neoplasien etabliert werden?***

Eine Studie von Kim verglich mit Stuhlproben den M2-PK-Test mit dem iFOBT, einem immunologischen Blut-im-Stuhl-Test. Dabei lag die Erkennungsrate für den M2-PK-Test für KRK bei 92,8% und für Polypen bei 69,4%. Dagegen beim iFOBT nur bei 47,5% für KRK und lediglich 12,1% für Polypen. Der M2-PK-Test erkennt somit fast doppelt so viele KRK und 6x häufiger Polypen als dieser etablierte Marker (KIM YC et al. 2014).

Studien von Shastri et al. bestätigen dem TuM2-PK eine höhere Sensitivität ( $\emptyset = 68,93\%$ ) im Vergleich zu CEA (33,6%) und Haemocult® ( $\emptyset = 33\%$ ) (SHASTRI YM et al. 2008a; TONUS C et al. 2006).

Weitere Studien stellen die M2-PK-Sensitivität gegenüber der Sensitivität (40%) und Spezifität (20-98%) des FOBT als überaus überlegen dar. (KIM YC et al. 2014) (ROSS M. et al. 2013; SCHALHORN A et al. 2013)

Die Sensitivität der fäkalen M2-PK Konzentration als Screeningmarker für KRK weist beim Vergleich von insgesamt 10 retro- und prospektiven Studien zu dieser Thematik eine Spannbreite von 68,8% bis 91,0% und eine Spezifität von 71,9% bis 100% (HARDT PD et al. 2008).

Diese Studienergebnisse lassen insgesamt an eine Screening-Anwendung denken, vorausgesetzt Patienten mit akuten-/chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen werden vorher aussortiert, da der Test bei solchen Patienten falsch-positive Ergebnisse anzeigen würde. Natürlich bieten falsch-positive Ergebnisse bei Vorliegen einer Entzündung auch die Möglichkeit z.B. Patienten mit einer unbekanntem Colitis Ulcerosa zu entdecken und einer Koloskopie zuzuführen. Die ist besonders wichtig, da die Colitis Ulcerosa signifikant mit dem KRK vergesellschaftet ist. Ein frühzeitiges Erkennen und Therapieren kann die Wahrscheinlichkeit eines KRK deutlich reduzieren (ROSS M. et al. 2013).

Generell weisen Studienergebnisse von Eigenbroth, Mazurek und Hardt et al. und anderen insgesamt auf eine mögliche Nutzung des M2-PK als Stuhltest im Rahmen großflächiger Vorsorgeuntersuchungen hin (EWALD N et al. 2007; HARDT PD et al. 2008).

Aktuell finden Vorsorgeuntersuchungen in Deutschland hauptsächlich als Koloskopien, als „Goldstandard“, statt. Diese werden ab dem 55. Lebensjahr alle 10 Jahre wiederholt und können in der Zwischenzeit mit dem FOBT ergänzt werden (VOGEL T et al. 2005). Dabei kann, abhängig vom Untersucher, eine Sensitivität und Spezifität von bis zu 100%

erreicht werden. Solch hohe Werte sind sehr erstrebenswert. Leider zeigen Untersuchungen, dass die Aussagefähigkeit einer Koloskopie stark vom Untersucher und dessen Training abhängig ist (GARBORG K et al. 2013; KAMINSKI MF et al. 2010).

Andere Studien gehen sogar so weit, zu sagen, dass eine normale Koloskopie rechtsseitige KRK nur unzureichend darstellen kann (BRENNER H et al. 2010).

Natürlich dürfen auch die seltenen Risiken wie Perforationen oder Blutungen nicht außer Acht gelassen werden. Des Weiteren können auch Vorerkrankungen, wie z.B. eine Divertikulose oder die fehlende Compliance des Patienten bei der Koloskopievorbereitung (der Darm muss vollständig sauber sein) eine Untersuchung mit der Koloskopie erschweren (GARBORG K et al. 2013; WHITLOCK EP et al. 2008b).

Gleichzeitig empfiehlt eine Studie von Vogel et al. explizit die Nutzung von Koloskopien zur Darmkrebsvorsorge, da die M2-PK in eigenen Studien nur eine Sensitivität von 48% - 77% und eine Spezifität von nur 72% aufwies (VOGEL T et al. 2005). Dies ist im Kontrast zum bewährten iFOB-Test mit einer Spezifität von rund 94% relativ gering. Auch andere Studien kommen zu ähnlich schlechten Ergebnissen für den M2-PK-Marker (HAUG U et al. 2008a; LI R et al. 2012; SHASTRI YM et al. 2008b).

Damit ein Marker als zuverlässiger Tumormarker etabliert werden kann, muss er verschiedene Kriterien erfüllen. Zum einen sollte er für ein jeweiliges Karzinom spezifisch und robust gegen Störungen sein. Ein sicherer Marker sollte daher eine hohe Sensitivität und Spezifität haben. Dabei zeigt er eine hohe Sensitivität eine hohe Anzahl an richtig-positiven Ergebnissen, eine hohe Spezifität und eine hohe Anzahl an richtig-falschen Ergebnissen an.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 94% für den M2-PK-Marker. Eine aktuelle Studie zum „ScheBo® • M2-PK Quick™“-Test sogar eine Sensitivität von 94% und eine Spezifität von 96%. Diese Daten müssen natürlich mit einer gewissen Skepsis gesehen werden, da die Firma ScheBo selbst einen Test für die M2-PK herstellt und diesen erfolgreich vertreiben möchte. Ein Vergleich mit den Durchschnittswerten von insgesamt 12 Studien zeigt eine Sensitivität von 81,2% und eine Spezifität von 79,3%. Dies deckt sich deutlich näher mit den Studienergebnissen dieser Studie (60,0% Sensitivität, 86,6% Spezifität). (SCHEBO BIOTECH AG 2015)

Die gemessenen und berechneten Werte zeigen, dass die M2-PK bzw. in der Tumorsuche auch TuM2-PK-Marker genannt, in diesem Kollektiv durchaus nützlich im klinischen Alltag sein kann, denn 86,6% der Patienten mit negativem Testergebnis werden kein KRK aufweisen. Leider ermöglichen die Daten nur eine Sensitivität von 60% zu erreichen. Dies lässt daher nur eine geringe Sicherheit bei den positiven Testergebnissen zu. Ein Hauptgrund für dieses Ergebnis ist die geringe Datenmenge, die dieses Kollektiv darstellt, da insgesamt nur 7 Karzinome die Einschlusskriterien erfüllen konnten. Verlässliche statistische Daten benötigen ein deutlich umfangreicheres Kollektiv. Zu Beginn der Studie war diese Datenlage nicht absehbar. Tatsächlich ist es sogar erstaunlich, dass ein Kollektiv von 185 Patienten sogar 7 Karzinome aufzeigt. Dies zeigt deutlich wie groß das Risiko ist an einem KRK zu erkranken und wie wichtig eine Vorsorgeuntersuchung ist. Trotzdem hat der Marker Potential, wie bereits andere Studien mit mehr Karzinomen im Kollektiv zeigen konnten. Diese berechneten eine deutlich höhere Sensitivität von 68% bis 93% (HARDT PD et al. 2003a; HARDT PD et al. 2003b; KOSS K et al. 2007).

## 8 Entzündungen als Präzedenzfälle

Patienten mit akuten Entzündungen oder CED wurden bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt, da erwartet werden musste, dass die Konzentration an TuM2-Pyruvatkinase im Stuhl allein aufgrund der Entzündung stark ansteigt. Diese falsch-positiven Ergebnisse sollten das Ergebnis der Studie nicht verfälschen.

Die mögliche Verfälschung gilt jedoch nur für die statistische Auswertung, nicht aber für die Auswertung in Hinsicht auf eine angestrebte klinische Anwendung. Gerade im Falle von nicht diagnostizierten Colitis Ulcerosa-Patienten, kann die Fähigkeit des Proliferations- bzw. Entzündungsmarkers M2-PK als eine äußerst nützliche Eigenschaft beschrieben werden. Da diese Entzündungsreaktion des Darmes mit der unbehandelten Dauer ein immer größerer Risikofaktor für ein KRK darstellt, ist eine Entdeckung äußerst wichtig. KRK können mit einer entzündlichen Reaktion verbunden sein, deren Detektion ebenfalls ein Benefit für den Patienten durch nachgeschaltete weitere Diagnostik ist.

Tatsächlich trat in diesem Kollektiv dieser Fall für zwei Patienten mit einem Karzinom auf. Sie mussten hier zwar aus dem Kollektiv ausgeschlossen werden, hätten aber in der klinischen Anwendung unbedingt koloskopisch untersucht werden müssen. Dieses ist tatsächlich auch so geschehen.

Diese zwei Präzedenzfälle sollten als gute Beispiele für die Nützlichkeit des TuM2-PK-Markers hervorgehoben werden. Durch den Einsatz des Markers als Vorsorgekonzept wären die betroffenen zwei Patienten aufgrund der hohen M2-PK-Konzentration zunächst „nur“ als Entzündungsträger identifiziert worden. Aber in der klinischen Anwendung sind beide Personen einer weiterführenden Diagnostik mit Durchführung einer Koloskopie und Probenentnahme zugeführt worden. So sind die Karzinome erkannt worden.

Bedenkt man nun, dass der Marker in diesem Kollektiv über eine 86,6%ige Spezifität verfügt, hätte ein negatives Testergebnis zumindest eine Entzündung fast vollständig ausgeschlossen. Man darf zusätzlich nach heutigem Erkenntnisstand davon ausgehen, dass dann auch ein Karzinom als zumindest sehr unwahrscheinlich gelten darf.

Im Hinblick auf die Entzündung gilt nun, dass durchaus nicht jede Entzündung auf die Anwesenheit eines Tumors schließen lässt. Aber bei routinemäßiger Anwendung des Testes gilt auch, dass alle Patienten mit einem Titer entweder eine Entzündung oder einen Tumor aufweisen können.

Wenn nur noch Patienten mit einer hohen M2-PK-Konzentration (Titer) zur Koloskopie geschickt werden müssen, ergibt sich eine beträchtliche Reduktion des Aufwandes und damit der Kosten. Deshalb soll an dieser Stelle als wesentliches Ergebnis dieser Studie vorgeschlagen werden, dass man in Zukunft zweistufig vorgeht:

Ab einem festzulegenden Alter sollte regelmäßig eine Stuhluntersuchung mit dem TuM2-PK-Test durchgeführt werden. Aufgrund der reduzierten Kosten für einen Schnelltest könnte dies auch bei Patienten vor dem 55. Lebensjahr durchgeführt werden, wenn diese bestimmte Risikofaktoren mitbringen. Die Patienten könnten sich den entsprechenden Test auf Rezept in der Apotheke holen und zu Hause selbstständig durchführen. Bei einem auffällig hohen Titer erfolgt die Vorstellung beim Hausarzt, der den Patienten nach einer Kontrolle und ggf. Wiederholung des Tests zu einem entsprechenden Facharzt zur Koloskopie schickt. So bleibt die Vorsorge auf Darmkrebs in den Händen der Spezialisten, dennoch ist die Abdeckung für die Risikogruppe gewährleistet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass hier sogar in der Bilanz eine Kostenersparnis möglich ist. Zumindest die Hemmschwelle, an der Vorsorge teilzunehmen, dürfte drastisch sinken.

## 9 Fazit und Ausblick

Unter Verwendung eines zwar kleinen, aber sorgfältig geprüften Patientenkollektivs konnte gezeigt werden, dass ein in Gießen entwickelter Schnelltest auf KRK ein klares Potential hat, KRK unter diesen klinischen Bedingungen zu erkennen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einer Reihe von unabhängigen Untersuchungen, die weltweit in jüngster Zeit vorgestellt wurden. Damit steigt die Chance, die bisher angewandte Koloskopie durch ein kostengünstiges Verfahren abzulösen oder zumindest zu ergänzen.

Der Hämocult® Stuhltest auf Blut kann ab dem 50. Lebensjahr jährlich zu Lasten der GKV in Anspruch genommen werden. Die Koloskopie wird bei Patienten ab dem 55. Lebensjahr von den gesetzlichen Krankenkassen als Vorsorgeuntersuchung anerkannt (TECHNIKER KRANKENKASSE 2015). Die allgemeine Akzeptanz einer effektiven Koloskopie scheitert aber an dem damit verbundenen Aufwand, der unbequemen Untersuchung und der schwer vermittelbaren Wichtigkeit. Außerdem sind die Untersuchungsintervalle mit 10 Jahren Abstand nicht geeignet, die Koloskopie als Routinemethode zu etablieren.

Der hier untersuchte TuM2-PK-Test kommt dagegen aktuell noch nicht als Kassen finanzierte Standard-Vorsorgeuntersuchungsmethode zur Anwendung. Dies liegt, laut dem Medizinischen Dienst der Krankenkassen (MDK) darin begründet, dass dem Monitor für Individuelle Gesundheitsleistungen der Krankenkassen, dem sog. „IGeL-Monitor“, noch keine Studie vorliegt, die eindeutig belegt, wie effektiv die KRK-Mortalität durch diesen Test reduziert werden kann (EIKERMANN M 2017). Hier liegt also ein klassisches Dilemma vor, das auf Grund der langen KRK-Inkubationszeit kaum lösbar zu sein scheint. Im Sinne einer allgemeinen Kostenreduktion bietet sich jedoch die Anwendung von Darmkrebstests an, indem nur jene Patienten die Kosten für die Koloskopie erstattet bekommen, die sich regelmäßig einem Darmkrebstest unterzogen haben.

In vorgezogener Anerkennung des Darmkrebstests wird seine Anwendung bereits als Satzungsleistung für Kassenpatienten zunehmend angeboten. Gerade auch der M2-PK-Stuhltest wurde, als Ergänzung zu dem Guajak-Test, durch die Techniker Krankenkasse, die BKK Bertelsmann, die R+V BKK und die Handelskrankenkasse (hkk) in ihr Bonusprogramm aufgenommen, sodass die Kosten erstattet werden. Die Firma ScheBo-Tec bietet darüber hinaus bereits einen Kombi-Test auf Anwesenheit des Enzym-Biomarkers M2-PK und Blut im Stuhl an (ÄRZTEZEITUNG 2015).

Diese hier vorgelegte Arbeit bietet nun weitere Argumente für eine solche Vorgehensweise. Für ein deutschlandweites Kollektiv konnte gezeigt werden, dass der Tumormarker M2-PK in Stuhlproben eine hohe Sensitivität und eine sehr hohe Spezifität beim Nachweis von KRK aufweist. Zwar konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der TuM2-PK-Konzentration und der Auftrittswahrscheinlichkeit für KRK bzw. der entsprechenden Polypenart gefunden werden ( $p=0,0526$ ), aber eine Fehleranalyse erlaubt plausible Erklärungen dafür.

Belegbar ist dagegen, dass der Test auf M2-Pyruvatkinase als Marker in diesem Kollektiv in der Lage ist, einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Patientenalter und der Auftrittswahrscheinlichkeit für HGIEN Adenome und Karzinome ( $p<0,05$ ) aufzuzeigen. Die Daten zeigen auch eine signifikante Abhängigkeit zwischen der TuM2-PK-Konzentration und dem Vorliegen einer Entzündung ( $p<0,05$ ). Ebenfalls zeigen die Daten eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Alter und dem Vorliegen einer Entzündung ( $p<0,05$ ). Für diesen Zusammenhang gibt es eine Bestätigung durch unabhängige Studien. In diesem Kollektiv zeigt der Test bei zwei Patienten mit Entzündung einen Hinweis auf ein Geschehen, das bei späterer, weiterführender Diagnostik zwei Karzinome zeigte. Daraus lässt sich nur folgern, dass die M2-Pyruvatkinase mit ihrer grundsätzlich hohen Sensitivität und Spezifität die Möglichkeit eröffnet, eine wichtige Rolle in zukünftigen Vorsorgeuntersuchungen zu erlangen. Nun müssen weitere Studien zeigen, ob der TuM2-Pyruvatkinase-Test in der Lage ist, die KRK-Mortalität zu reduzieren.

Diese Aussage kann allerdings nur mit hohem zeitlichem und finanziellem Aufwand verifiziert werden. Der finanzielle Aufwand könnte reduziert und gleichzeitig die notwendige Zeit sinnvoll genutzt werden, wenn man ein Vorsorgepaket mit heute schon vorhandenen gut genutzten Vorsorgemaßnahmen kombiniert. So kann man beispielsweise den etablierten Test auf prostataspezifisches Antiserum (PSA) im Blut bei Männern als Ausgangspunkt nehmen. Dieser wird mittlerweile häufig bereits beim Hausarzt im Rahmen eines regulären Check-Up bei Männern durchgeführt. Bei Frauen könnte es in Kombination mit einer Mammographieuntersuchung angeboten werden, die deutschlandweit ab dem 50. Lebensjahr Frauen zur Verfügung steht. Wenn es gelingt, im zeitlichen Zusammenhang mit den anderen Untersuchungen auch Stuhlproben einzusammeln, dann könnte in denselben Diagnose-Laboratorien mit relativ geringem Verwaltungsaufwand oder sogar in der Praxis mit einem Schnelltest ein Test auf KRK durchgeführt werden. Der behandelnde Arzt könnte im Patientengespräch dann in einem sehr frühen Stadium auf die

Möglichkeit der etablierten Koloskopie verweisen. So wird ein günstiger, non-invasiver Schnelltest auf M2-PK einer großen Patientengruppe zugänglich gemacht, gleichzeitig aber die Koloskopie gezielt eingesetzt. Hier sollte man prüfen, ob ein Einsparpotential die Mehrkosten aufwiegt, aber trotzdem eine hohe Spezifität erreicht wird.

## 10 Zusammenfassung

Das KRK (KRR) ist die dritthäufigste Tumorerkrankung des Menschen. Jährlich erkranken weltweit über 1,3 Millionen Menschen. Davon erliegen fast 700.000 Menschen den Folgen der Erkrankung.

Aktuell stehen zwei von den Krankenkassen in Deutschland als Vorsorgeuntersuchungen anerkannte Verfahren zur Verfügung: Der Okkultbluttest ab dem 50. Lebensjahr und die Koloskopie ab dem 55. Lebensjahr.

Der Test auf okkultes Blut ist günstig, bietet jedoch nur eine geringe Sensitivität. Die Koloskopie stellt aktuell die beste Untersuchungsform dar. Sie hat eine sehr hohe Sensitivität, ist jedoch relativ kostenintensiv und stellt ein gewisses Verletzungsrisiko dar. Auch ist diese Untersuchung dem Patienten nur schwer zu vermitteln, da sie unbequem und invasiv ist.

Ziel dieser Arbeit ist es daher für ein mutmaßlich günstiges, dabei schnelles, nichtinvasives und trotzdem zuverlässiges Verfahren die Ergebnisse einer Reihenuntersuchung auszuwerten und zu ergänzen. Es handelt sich um einen immunologischen Test auf die Konzentration an Tumor M2-Pyruvatkinase (TuM2-PK) im Stuhl.

Das hierzu verwendete Patientenkollektiv umfasst 185 Patienten (98m / 87w) aus Gießen, Ludwigshafen, Ulm und Mannheim. Die Patienten gaben vor einer Koloskopie eine Stuhlprobe ab, deren TuM2-PK-Konzentration bestimmt wurde. Entsprechende Ergebnisse beider Untersuchungen wurden gesammelt, sortiert und statistisch ausgewertet. Hauptziel ist die Bestimmung der Sensitivität, Spezifität mit dem Cut-Off des Tumor M2-PK Stuhltests und der Nachweis, ob sich der Marker zur Früherkennung kolorektaler Karzinome eignet.

Die Auswertung der Daten ergab einen idealen Cut-Off bei 6,9 U/ml mit einer Sensitivität von 60,0% und einer sehr hohen Spezifität von 94,0%, einem PPV von 30,0% und einem NPV von 98,0%. Ein literaturvergleichender Cut-Off von 4 U/ml wurde ebenfalls bestimmt und ergab eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 86,6%.

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass der Tumormarker M2-PK in Stuhlproben eine hohe Sensitivität und eine sehr hohe Spezifität beim Nachweis von KRR aufweist. Ein direkter Zusammenhang zwischen der TuM2-PK-Konzentration und der Auftrittswahr-

scheinlichkeit für KRK ( $p=0,0526$ ) zeigte sich nicht, jedoch war ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Patientenalter und der Auftretswahrscheinlichkeit für high risk Adenome und Karzinome ( $p=0,0003$ ), zwischen dem Alter und dem Vorliegen einer Entzündung ( $p=0,0003$ ), sowie ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Entzündung ( $p < 0,001$ ) und dem TuM2-PK sichtbar.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen das Potential dieses Markers mit seiner hohen Sensitivität und sehr hohen Spezifität, die einen Einsatz als Vorsorgemarker denkbar machen. Zusätzlich wird ein Vorschlag vorgestellt, wie dieser Marker kostengünstig die Zahl der Koloskopien senkt, ohne das Vorsorgeziel zu entwerten. Dieser Vorschlag könnte dafür geeignet sein, die Akzeptanz der Vorsorgemethode deutlich zu erhöhen.

# 11 Summary

Colorectal cancer (CRC) is the third most common tumor disease in humans. Every year, more than 1,3 million people are affected. Nearly 700,000 people are succumbing to the disease.

Currently, two procedures recognized by the health insurance funds in Germany are available as preventive examinations: the occult blood test from the age of 50 and the colonoscopy from the age of 55.

The test for occult blood is favorable but offers only a low sensitivity. The colonoscopy is currently the best form of investigation. It has a very high sensitivity but is relatively cost-intensive and presents a certain risk of injury. This examination is also difficult to convey to the patient because it is uncomfortable and invasive.

The aim of this work is therefore to evaluate and supplement the results of a series examination for a presumably favorable, yet fast, non-invasive yet reliable procedure. It is an immunological test for the concentration of tumor M2-pyruvate kinase (TuM2-PK) in the stool.

The patient group used for this purpose comprises of 185 patients (98male / 87female) from Giessen, Ludwigshafen, Ulm and Mannheim. Patients gave a stool sample before colonoscopy, the TuM2-PK concentration of which was determined. Corresponding results of the investigations were collected, sorted and statistically evaluated. The main goal is the determination of the sensitivity, specificity and cut-off of the M2-PK stool test and the detection of whether the marker is suitable for the early detection of colorectal carcinomas.

Evaluation of the data showed an ideal cut-off at 6,9 U/ml with a sensitivity of 60,0% and a very high specificity of 94,0%, as well as a PPV of 30,0% and a NPV of 98,0%. A literature-comparing cut-off of 4 U/ml was also determined and showed a sensitivity of 60% and a specificity of 87%.

As a result, the tumor marker M2-PK in stool specimens proved to have high sensitivity and very high specificity in the detection of colorectal carcinomas. There was no direct correlation between the TuM2-PK concentration and the probability of occurrence for CRC ( $p = 0,0526$ ), but a significant correlation was found between the age of the patient and the probability of occurrence for high risk adenomas and carcinomas ( $p=0,0003$ ), as

well as a highly significant correlation between the presence of inflammation ( $p < 0,001$ ) and the TuM2-PK.

The results of the investigations show the potential of this marker with its high sensitivity and very high specificity which make it possible to use it as a precautionary marker. In addition, a proposal is presented on how this marker lowers the number of colonoscopy at low cost without devaluing the precautionary goal. This proposal could be appropriate to significantly increase the acceptance of the precautionary principle.

## 12 Anhang

### 12.1 Abkürzungsverzeichnis

0.025 KG	2,5% Konfidenzintervall
0.975 KG	97,5% Konfidenzintervall
1.Qu.	1. Quartil
3.Qu.	3. Quartil
Abb.	Abbildung(en)
AFP	Alpha-Fetoprotein
AP	alkalische Phosphatase
APC	adenomatous polyposis coli gene / Synonym: Adenomatöses Polyposis Coli Gen
ASR	Age-Standardised-Rate
AUC	Area under the curve / Synonym: Fläche unter der Kurve
BMI	Body Mass Index
Ca	Carcinom
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEA	Carcino-embryonic antigen
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
chronisch	chronische Entzündungen liegen vor
Colon asc.	Colon ascendens
Colon desc.	Colon descendens
Colon transv.	Colon transversum
CRC	Colorectal cancer
CT	Computertomographie

---

DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich ELISA
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V.
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DNS / DNA	Desoxyribonukleinsäure / deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAP	Familiäre Adenomatöse Polypose
FIT	Faecal Immunochemical Test
Flex. hep.	Flexura hepatica
Flex. lien	Flexura lienalis
FOBT	Fecal Occult Blood Test
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GOD	Glucose-Oxidase
grading	Differenzierung
HEP	Hepatitis
HGIEN	high grade intraepitheliale Neoplasie
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HNPCC	Hereditäres Nicht Polypöses Kolonkarzinom
HRP	Meerrettichperoxidase, von engl. horseradish peroxidase
IGeL	Individuelle Gesundheitsleistungen
IEN	intraepitheliale Neoplasie
ja (akut)	akute Entzündungen
K-ras	monomeres G-Protein und entscheidend für Proliferation von bösartigen Tumoren
KRK	kolorektales Karzinom
Kap.	Kapitel
LGIEN	low grade intraepitheliale Neoplasie

---

Lk	Lymphknoten
Log10.TuM2PK.LC	Log10 Daten der bestimmten M2-PK Konzentration
m	männlich
Max.	Maximum
MDK	Medizinische Dienst der Krankenkassen
Min.	Minimum
MMR-Gen	DNA-Mismatch-Reparaturgene
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilitäten
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
n	Anzahl
nein (akut)	keine akuten Entzündungen
node	Knoten
NPV	Negative Predictive Value (negativer Vorhersagewert)
OEGD / ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
oPD	o-Phenylendiamin
Pat.	Patient(en)
PK	Pyruvatkinase
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PPV	Positive Predictive Value (positiver Vorhersagewert)
PSA	prostata-spezifisches Antiserum
ROC	Receiver-Operating-Characteristic-Kurve
Sen.	Sensitivität
Spez.	Spezifität
St.abw.	Standardabweichung
SUM	Summe

Tab.	Tabelle
TNM	Facetten-Klassifikation zum Staging von Tumorerkrankungen
TuM2-PK	Tumor M2-Pyruvatkinase
UICC	Union internationale contre le cancer
vgl.	Vergleich
w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 12.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alters- und Lokalisationsverteilung des KRK bei Männern (SIEGEL R et al. 2014).....	5
Abbildung 2: Alters- und Lokalisationsverteilung des KRK bei Frauen (SIEGEL R et al. 2014).....	6
Abbildung 3: Aufbau des Kolons .....	9
Abbildung 4: Verbessertes Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz nach (FEARON ER et al. 1990) und modifiziert durch (TORIBARA NW et al. 1995).....	20
Abbildung 5: Ablaufschema der zentralen, universellen Glykolyse zur Energiegewinnung .....	33
Abbildung 6: Gewebeexpression der Pyruvatkinase - Isoformen (HARDT PD et al. 2004a) .....	34
Abbildung 7: Darstellung der Unterschiede zwischen M1 und M2 Form der PK (MAZUREK S 2008) .....	35
Abbildung 8: Effekt der tetrameren und dimeren Form der M2-PK auf den Stoffwechsel der Zellen (MAZUREK S 2002) .....	37
Abbildung 9: Regulation der M2-PK (MAZUREK S. et al. 2002) .....	39
Abbildung 10: Chi-Quadrat-Wert als Summe aller Werte der Chi-Quadrat-Tabelle (FAHRMEIR L et al. 2016).....	47
Abbildung 11: Verteilung der histologischen Entitäten .....	55
Abbildung 12: $\log_{10}$ .TuM2PK.LC getrennt nach Geschlecht .....	59
Abbildung 13: $\log_{10}$ .TuM2PK.LC getrennt nach Ort.....	60
Abbildung 14: Verteilung der M2-PK-Werte pro Polypen-Gruppe (ohne Entzündung).....	62
Abbildung 15: ROC Kurve von Karzinom und TuM2-PK.....	63
Abbildung 16: 3D-Punktewolken für Polypen, Entnahmealter, TuM2PK.LC.....	65
Abbildung 17: Effekte-Plots des obigen Regressionsmodells für Polypen .....	67
Abbildung 18: 3D-Punktewolken für Polypen, Entnahmealter, TuM2PK.LC.....	68

Abbildung 19: Effekte-Plots des obigen Regressionsmodells für Polypen (ohne Entzündung) .....69

Abbildung 20: 3D-Punktewolken für Risikotyp, Entnahmealter, TuM2PK.LC ..... 71

Abbildung 21: Verteilung der M2-PK-Werte pro Entzündungsdetail-Gruppe ..... 73

Abbildung 22: 3D-Punktewolken für Entzündungsdetail, Entnahmealter, TuM2PK.LC ..... 75

Abbildung 23: Effekte-Plots des obigen Regressionsmodells für Entzündungsdetail ....77

Abbildung 24: Effekte-Plots des obigen logistischen Regressionsmodells für den dichotomisierten Risikotyp .....78

Abbildung 25: Verteilung der Polypen im Kolon .....83

## 12.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug aus den epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland (ROBERT-KOCH-INSTITUT 2013) .....	4
Tabelle 2: Einteilung der Adenome (BOSMAN FRED T. 2010) .....	8
Tabelle 3: Lymphknotenstationen (COERPER S et al. 2009) .....	10
Tabelle 4: T- Stadium (SOBIN LH et al. 2002; WITTEKIND C et al. 2010; WITTEKIND C et al. 2010) .....	11
Tabelle 5: N-Stadium (WITTEKIND C et al. 2010) .....	12
Tabelle 6: M- Stadium (WITTEKIND C et al. 2010).....	12
Tabelle 7: R-Stadium (HERMANEK P et al. 1994; WITTEKIND C et al. 2010).....	13
Tabelle 8: G-Stadium (Grading / Malignitätsgrad) (WITTEKIND C et al. 2010).....	13
Tabelle 9: Klassifikation der Tumorstadien (UICC 2010) (WITTEKIND C et al. 2010)..	14
Tabelle 10: Bethesda-Kriterien (revidiert; mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein) (NATIONAL CANCER INSTITUTE 1997) .....	18
Tabelle 11: HNPCC-assoziierte Karzinome und ihre Auftrittswahrscheinlichkeiten ....	19
Tabelle 12: Ausbreitung des KRK in Relation zur CEA-Erhöhung (MOERTEL CG et al. 1995).....	31
Tabelle 13: Fäkale Tumor M2-PK Konzentrationen bei gastrointestinalen Karzinomen, kolorektalen Adenomen und einer Kontrolle (HARDT PD et al. 2003c) .....	41
Tabelle 14: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Orte .....	50
Tabelle 15: Acht-Zahlen-Zusammenfassung für metrische Variablen / Entnahmealter getrennt nach Geschlecht .....	51
Tabelle 16: Patienten mit Karzinom oder HGIEN.....	52
Tabelle 17: Zusammenfassung der Altersdurchschnitte für Karzinom, HGIEN und High Risk Type.....	52
Tabelle 18: Häufigkeiten für Polypenlokalisierung getrennt nach Geschlecht.....	53
Tabelle 19: Verteilung der Karzinome auf das Kolon.....	54

Tabelle 20: Histologische Befunde getrennt nach Geschlecht.....	55
Tabelle 21: Häufigkeiten für Risikotyp getrennt nach Geschlecht .....	56
Tabelle 22: Häufigkeiten von Entzündungen getrennt nach Geschlecht .....	57
Tabelle 23: Häufigkeiten für Entzündungsdetail getrennt nach Geschlecht .....	57
Tabelle 24: Acht-Zahlen-Zusammenfassung für metrische Variablen getrennt nach Geschlecht .....	58
Tabelle 25: Unadjustierter und Holm-adjustierter p-Wert für $\log_{10}$ .TuM2PK.LC .....	60
Tabelle 26: Peto & Peto Test der TuM2PK - Konzentration bezogen auf die Studienorte .....	61
Tabelle 27: Deviance-Analyse-Tabelle (Type II Tests).....	66
Tabelle 28: Analyse der Abweichungen (Type II tests).....	70
Tabelle 29: Deviance-Analyse-Tabelle (Type II Tests).....	72
Tabelle 30: Peto & Peto Test der kummulativen Verteilung .....	74
Tabelle 31: Deviance-Analyse-Tabelle (Type II Tests).....	76
Tabelle 32: Studien zu TuM2-PK - Sensitivität / Spezifität.....	94

## 12.4 Studienprotokoll

Prospektive multizentrische Studie

---

Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total  
koloskopierter Patienten

# Studienprotokoll

Eine gemeinsame Studie des

Klinikums der Stadt Ludwigshafen  
Universitätsklinikums Ulm  
Universitätsklinikums Magdeburg  
Universitätsklinikums Giessen  
Universitätsklinikums Mannheim

Version vom 25.07.2003

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

Inhaltsverzeichnis

Studienzentren .....	4
Biometriker .....	5
Kooperationspartner.....	5
Unterschriftenseite .....	6
Finanzierung.....	7
Kostenträger .....	7
Abkürzungen .....	8
Zusammenfassung.....	9
Ablaufschema.....	9
Hintergrund .....	10
Die Rolle der Tumor M2-Pyruvatkinase im Tumor-Stoffwechsel .....	10
Ziele .....	11
Hauptziele .....	11
Nebenziele .....	11
Studiencharakteristika .....	11
Studienorganisation und Fallzahlabstschätzung.....	12
Patientenauswahl.....	12
Kontrollgruppe .....	12
Asymptomatische Probanden und Patienten mit Symptomen oder Erkrankungen des Kolons ...	12
Tumorpatienten.....	13
Obligate Untersuchungen aller Studienteilnehmer .....	13
Makroskopische Befundung der Polypen.....	13
Histopathologische Befundung der Polypen.....	14
Postoperative Untersuchungen der Tumoren .....	14
Patientenaufklärung .....	14
Auswertungskategorien der Patienten .....	15
Datenmanagement.....	15
Statistische Methode.....	15
Überwachung und Abbruch der Studie .....	16
Monitoring .....	16
Publikationen .....	16
Literatur.....	17
Anhang .....	20
Tumor-Typisierung .....	20
Tumor-Grading .....	20
Tumor-Stadieneinteilungen .....	21
TNM-System und Stadieneinteilung (UICC1997).....	21
L-Klassifikation für die Lymphgefäßinvasion (UICC 1997).....	21

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

V-Klassifikation für die Veneninvasion (UICC 1997) .....	22
Patienteninformation .....	23
Einverständniserklärung zur Studie .....	25
Probenbegleitbogen: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl .....	26
Dokumentation Ersterhebungsbogen (1).....	27
Dokumentation Ersterhebungsbogen (2).....	28
Dokumentationsbogen Koloskopie .....	29
Dokumentation Makroskopie des /der Polypen.....	30
Dokumentation Kolorektaleskarzinom.....	31
Dokumentation Patho-Histologie (1) .....	32
Dokumentation Patho-Histologie (2) .....	33

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

**Studienleitung**

Klinikum der Stadt Ludwigshafen  
Medizinische Klinik C  
Prof. Dr. med. Jürgen Ferdinand Riemann  
Bremserstr. 79  
67063 Ludwigshafen  
Tel.: 0621-503-4100  
Fax: 0621-503-4114

**Studienzentren**

Klinikum der Stadt Ludwigshafen  
Medizinische Klinik C  
Prof. Dr. med. Jürgen Ferdinand Riemann  
Dr. med. Ralf Jakobs  
Bremserstr. 79  
67063 Ludwigshafen  
Tel.: 0621-503-4100  
Fax: 0621-503-4114

Universitätsklinikum Ulm  
Abteilung Inner Medizin I  
Medizinische Klinik und Poliklinik  
Prof. Dr. med. Guido Adler  
PD Dr. Christoph Weber  
Robert-Koch-Str. 8  
89070 Ulm  
Tel.: 0731-5002-4338  
Fax: 0731-5002-4302

Otto-von-Guericke-Universität  
Klinik für Gastroenterologie  
Hepatologie und Infektiologie  
Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner  
Dr. med. Gregor Steffens  
Leipziger Str. 44  
39120 Magdeburg  
Tel.: 0391-67-13100  
Fax: 0391-67-13105

Justus-Liebig-Universität Gießen  
Med. Klinik III und Poliklinik  
Abt. Gastroenterologie  
Prof. Dr. med. Hans-Ulrich Klör  
Dr. med. Philip D. Hardt  
Rodthohl 6  
35392 Gießen  
Tel.: 0641-99-42756  
Fax: 0641-99-42779

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Universitätsklinikum Mannheim  
II. Medizinische Universitätsklinik  
Prof. Dr. med. Matthias Löhr  
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3  
68167 Mannheim  
Tel.: 0621-383-3284  
Fax: 0621-383-3805

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

**Biometriker**

Justus-Liebig-Universität Giessen  
AG Biomathematik und Datenverarbeitung  
Dr. rer. nat. Klaus Failing  
Frankfurter Strasse 95  
35392 Giessen  
Tel.: 0641-99-38800  
Fax: 641-99-38809

**Kooperationspartner**

ScheBo® ? Biotech AG  
Netanyastr. 3-5  
35395 Giessen  
Tel.: 0641-4996-0  
Fax: 0641-4996-77

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

---

## Unterschriftenseite

### Studienleiter

Datum	Unterschrift
	Prof. Dr. med. Jürgen Ferdinand Riemann Klinikum der Stadt Ludwigshafen Medizinische Klinik C Bremsenstr. 79 67063 Ludwigshafen Tel.: 0621-503-4100 Fax: 0621-503-4114

### Biometriker

Datum	Unterschrift
	Dr. rer. nat. Klaus Failing Justus-Liebig-Universität Giessen AG Biomathematik und Datenverarbeitung Frankfurter Strasse 95 35392 Giessen Tel.: 0641-99-38800 Fax: 641-99-38809

## STUDIENZENTREN

Datum	Unterschrift
	Prof. Dr. med. Jürgen Ferdinand Riemann Dr. med. Ralf Jakobs Klinikum der Stadt Ludwigshafen Medizinische Klinik C Bremsenstr. 79 67063 Ludwigshafen Tel.: 0621-503-4100 Fax: 0621-503-4114

Datum	Unterschrift
	Prof. Dr. med. Guido Adler PD Dr. Christoph Weber Universitätsklinikum Ulm Medizinische Klinik und Poliklinik Abt. Innere Medizin I Robert-Koch-Str. 8 89070 Ulm Tel.: 0731-5002-4338 Fax: 0731-5002-4302

Datum	Unterschrift
	Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner Dr. med. Gregor Steffens Otto-von-Guericke-Universität Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Leipziger Str. 44 39120 Magdeburg Tel.: 0391-67-13100 Fax: 0391-67-13105

Datum	Unterschrift
	Prof. Dr. med. Hans-Ulrich Klör Dr. med. Philip D. Hardt Justus-Liebig-Universität Gießen Med. Klinik III und Poliklinik Abt. Gastroenterologie Rodthohl 6 35394 Giessen Tel.: 0641-99-42752 Fax: 0641-99-42779

---

Version vom 25.07.03

6

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

---

Datum	Unterschrift
	Prof. Dr. med. Matthias Löhr Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Universitätsklinikum Mannheim II. Medizinische Universitätsklinik Theodor-Kutzer-Ufer 1-3 68167 Mannheim Tel.: 0621-383-3284 Fax: 0621-383-3805

---

Datum	Unterschrift
	Dr. rer. nat. Ursula Scheefers-Borchel Dr. rer. nat. Hans Scheefers ScheBo® ? Biotech AG Netanyastr. 3-5 35395 Giessen Tel.: 0641/4996-0 Fax: 0641/4996-77

## Finanzierung

### Kostenträger

Die Kosten (inkl. Transportkosten) für die Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl werden von der ScheBo® ? Biotech AG getragen. Weitere durch die Studie verursachte Kosten fallen nicht an. Alle Kosten, die im Rahmen der kliniküblichen, routinemäßigen Untersuchungen/Bestimmungen anfallen, werden vom untersuchenden/ behandelten Klinikum getragen. Von der ScheBo® ? Biotech AG werden keine Kosten für Untersuchungen/Bestimmungen, abgesehen von der Bestimmung der Tumor M2-PK, übernommen.

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

**Abkürzungen**

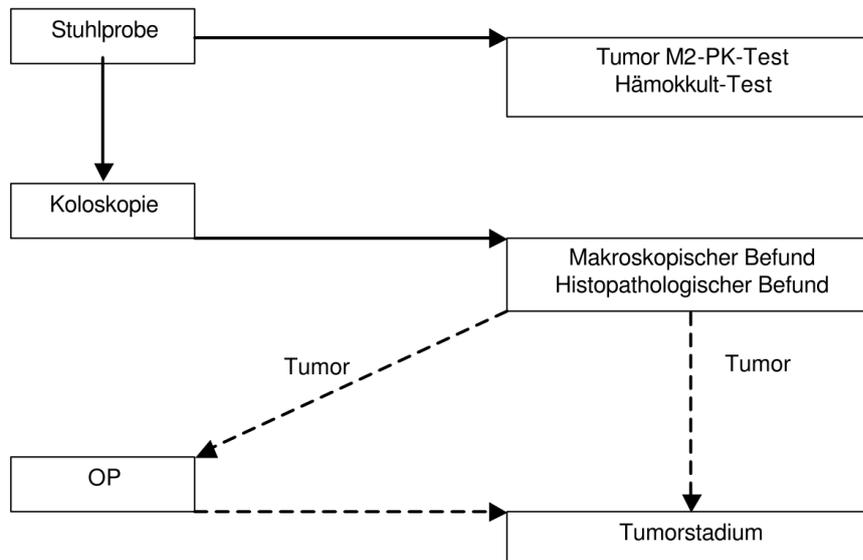
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CA72-4	Carbohydrat-Antigen 72-4
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CS	Clinical Stage
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
G	histopathologisches Grading
GT	Glutamyltransferase
ID	Identifikation
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L-Klassifikation	Klassifikation der Lymphgefäßinvasion
M	Fernmetastasen
N	Regionäre Lymphknoten (Nodus)
PK	Pyruvatkinase
PT	Prothrombinzeit
PTT	partielle Thromboplastinzeit
R-Klassifikation	Klassifikation des Residualtumors
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
T	Primärtumor
Tumor M2-PK	Tumor M2-Pyruvatkinase
UICC	Union international contre le cancer
WHO	World Health Organisation
TNM	präoperative Stadieneinteilung maligner Tumoren
pTNM	postoperative Stadieneinteilung maligner Tumoren
TPZ	Thromboplastinzeit
V-Klassifikation	Klassifikation der Veneninvasion

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

**Zusammenfassung**

Tumorzellen exprimieren eine für sie charakteristische Isoform des glycolytischen Schlüssel-enzym Pyruvatkinase (PK) [3-6, 14-17]. Dieses Isoenzym Tumor M2-PK kann im Blut [3, 9, 13, 16-21, 22-28, 30-33] und im Stuhl [11, 12] mit Hilfe eines ELISAs nachgewiesen werden. In einer prospektiven multizentrischen Studie sollen total koloskopierte Patienten vor Koloskopie eine Stuhlprobe abgeben, aus der die Konzentration der Tumor M2-PK bestimmt wird. Die Ergebnisse der Tumor M2-PK-Bestimmung werden dann zusammen mit den Ergebnissen des makroskopischen und gegebenenfalls histopathologischen Befunds bzw. des Tumorstadiums ausgewertet. Hauptziel ist es Sensitivität, Spezifität und cut-off des Tumor M2-PK Stuhltests zu ermitteln und herauszufinden, ob sich der Marker zur Früherkennung kolorektaler Karzinome eignet. Nebenziel ist der Vergleich mit der Bestimmung okkulten Blutes im Stuhl zur Früherkennung kolorektaler Karzinome. Bei den Patienten werden die im Rahmen kliniküblicher Routineuntersuchungen/-bestimmungen untersuchten Daten und Parameter dokumentiert und zur Auswertung herangezogen.

**Ablaufschema**



Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

## 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 bessere Alternative gibt.

## Die Rolle der Tumor M2-Pyruvatkinase im Tumor-Stoffwechsel

Die Pyruvatkinase ist ein Schlüssel-Enzym des Glucose-Stoffwechsels und existiert in verschiedenen Isoformen, die gewebsspezifisch 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 gewebsspezifischen Isoenzymes und zur Expression des Isoenzym 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 [5, 6, 16, 17]. Der höchste Gehalt an Tumor M2-PK findet sich in metastasierenden Tumorzellen [22, 33].

Die Dimerisierung der M2-PK erfolgt entweder durch Phosphorylierung, zum Beispiel durch die pp60<sup>v-src</sup> 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 [5, 6, 16, 17].

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 Coenzym 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-

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

PK im Gegensatz zu anderen Tumormarkern sehr schnell den Erfolg einer Tumorthherapie anzeigt [5, 6, 16, 17].

Verschiedene diagnostische Studien haben gezeigt, dass sich die **Tumor M2-PK** als Enzym ohne Organspezifität als Marker **im EDTA-Plasma** für eine Vielzahl von Tumoren eignet [zur Übersicht 16]. Klinische Studien zur Bestimmung der Tumor M2-PK EDTA-Plasma liegen für die Indikationen Lungenkrebs [24-27], Brustkrebs [8,13], Nierenzellkarzinom [1, 7, 19, 20, 22, 30- 33], Ösophagus- [10, 12, 28], Magen- [10, 11, 28], Pankreas- [2, 10, 18, 28] und Kolorektales Karzinom [16, 17, 23] 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 [28]. Die Bestimmung der Tumor-M2-PK im EDTA-Plasma eignet sich zur Ergänzung der Krebs-Diagnose [2, 3, 7, 10, 17-19, 22-25, 27, 28, 30-33] zur Überwachung von Krankheitsverläufen und Krebstherapie [13, 16, 25, 28, 30, 32].

Erste Bestimmungen der **Tumor M2-PK im Stuhl** deuten darauf hin, dass sich dieser Tumorstoffwechselmarker dazu eignet, Patienten mit kolorektalen Tumoren zu identifizieren [11, 12].

## **Ziele**

### **Hauptziele**

- Bestimmung der Sensitivität, der Spezifität und des cut-offs des ScheBo® ? Tumor M2-PK Stuhltests.
- Ermittlung der Eignung des ScheBo® ? Tumor M2-PK Stuhltests zur Früherkennung kolorektaler Tumoren.

### **Nebenziele**

- Vergleich des ScheBo® ? Tumor M2-PK Stuhltests mit dem Nachweis okkulten Blutes im Stuhl.

## **Studiencharakteristika**

Bei der Studie handelt es sich um ein diagnostische, prospektiv multizentrische Studie zur Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und des cut-offs des Tumor M2-PK Stuhltests. Eine CE-Kennzeichnung für den Tumor M2-PK-Test liegt vor.

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

## **Studienorganisation und Fallzahlabeschätzung**

Aufgrund der bisher vorliegenden Daten zur Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl wird eine Sensitivität von etwa 85 % und eine Spezifität des Tumor M2-PK-Stuhltest von 83 % vermutet. Um in einer diagnostischen Studie für einen Marker eine Sensitivität von 85 %  $\pm$  6 % und eine Spezifität von 83 %  $\pm$  6 % (6 % ist die angestrebte Genauigkeit für die zu berechnenden Konfidenzintervalle bei einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 0,95) zu schätzen, müssen mindestens 150 Patienten ohne kolorektales Karzinom und 135 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom untersucht werden. Die Fallzahlberechnungen wurden auf der Grundlage der erwarteten Sensitivität und Spezifität bei einer zugelassenen Ungenauigkeit von  $\pm$  6 % mit dem Programm BiAS für Windows Version 7.0 (Hanns Ackermann, 1998: Biometrische Analyse von Stichproben, Epsilon-Verlag, Darmstadt) errechnet. Die Gruppe der 150 Probanden ohne kolorektales Karzinom wird sich aus asymptomatischen Patienten und Patienten mit Symptomen oder nicht-malignen Erkrankungen des Kolons und Rektums zusammensetzen. Dabei wird die Gruppe der Patienten mit Symptomen oder nicht-malignen Erkrankungen den größeren Anteil bilden, da diese häufiger koloskopiert werden, als Patienten ohne Beschwerden, die in der Regel nur im Rahmen der Darmkrebs-Vorsorgeuntersuchung koloskopiert werden. Pro Prüfzentrum werden alle Patienten erfasst, die im Rahmen der ohnehin durchgeführten Untersuchungen in der Klinik total koloskopiert werden. Die Studie wird beendet, wenn die geplante Patientenzahl mit kolorektalen Karzinomen erreicht ist. Es wird erwartet, dass die Anzahl der Kontrollpersonen ohne kolorektales Karzinom deutlich über der Mindestzahl von 150 liegt. Die Patienten werden den Gruppen nach makroskopischem und/oder histopathologischem Befund zugeordnet. Die Patientenrekrutierung soll ab dem 01.09.2003 erfolgen und wird voraussichtlich 31.08.2004 beendet. Die Auswertung der Ergebnisse und der Abschlussbericht erfolgt innerhalb von 3 Monaten nach Ende der Patientenrekrutierung.

## **Patientenauswahl**

### **Kontrollgruppe**

#### ***Asymptomatische Probanden und Patienten mit Symptomen oder Erkrankungen des Kolons***

##### **Einschlusskriterien**

- Asymptomatische Probanden im Rahmen der Krebsvorsorge und symptomatische Patienten mit Änderung der Stuhlgewohnheiten ohne äußeren Anlass (Wechsel Obstipation mit Diarrhoe, Flatulenz), Blut- und Schleimbeimengung im Stuhl, oder schwarz verfärbter Stuhl, Gewichtsverlust oder bekannte Polypen/

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

Adenome, chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Alter zwischen 18 und 80 Jahren

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

**Ausschlusskriterien**

- Maligne Tumoren in der Vorgeschichte und aktuell (außer kolorektales Karzinom)
- Erkrankungen, die eine Koloskopie unmöglich machen
- Fehlen der Einschlusskriterien

**Tumorpatienten**

**Einschlusskriterien**

- Alter zwischen 18 und 80 Jahren
- Patienten mit kolorektalem Karzinom vor OP/Radio-/Chemo-/Immuntherapie
- Obligate Untersuchungen (siehe unten)
- Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

**Ausschlusskriterien**

- Patienten mit Zweitmalignom
- Patienten mit lokalem Rezidiv
- Patienten nach Entfernen des kolorektalen Primärtumors
- Patienten während oder nach präoperativer Chemo-/Radio-/Immuntherapie
- Fehlen der Einschlusskriterien

**Obligate Untersuchungen aller Studienteilnehmer**

- Totale Koloskopie gegebenenfalls mit Biopsie/Ektomie des/der Polypen und histopathologischer Untersuchung
- Tumor M2-PK im Stuhl
- Okkultes Blut im Stuhl

**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

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

### **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 (siehe Anhang)

### **Postoperative Untersuchungen der Tumoren**

- Tumorgröße und –ausbreitung
- 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)

### **Patientenaufklärung**

(siehe Anhang)

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 (Anhang). 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 (Anhang).

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

### **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.

### **Datenmanagement**

Alle patientenbezogenen Daten werden in anonymisierter Form erfasst. Jeder Patient ist durch eine Patientennummer, die bei der Registrierung zugewiesen wird, über seine Initialen, Geburtsdatum und Geschlechtsangabe unverwechselbar gekennzeichnet. Der Prüfarzt führt eine vertrauliche Patientenliste, in der die Kenndaten mit dem vollen Patientennamen verbunden sind.

Die Datenerhebung erfolgt anhand von Prüfbögen (Dokumentationsbögen), die von der ScheBo® ? Biotech AG nach Unterzeichnung der Prüfvereinbarung zur Verfügung gestellt werden. Ein Muster befindet sich im Anhang (Anhang). Die Prüfbögen liegen als Durchschreibesatz vor. Das Original ist für die ScheBo® ? Biotech AG bestimmt, die Kopie verbleibt beim Prüfarzt.

Die Daten werden zentral per EDV in Absprache mit dem Biometriker bei der ScheBo® ? Biotech AG in Giessen erfasst und von Herrn Dr. K. Failing, Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, Justus-Liebig-Universität Giessen ausgewertet.

Die folgende Software wird verwendet:

BMDP Statistical Software: . Dixon, WJ (chief editor), University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

BiAS. für Windows, Version 7.0, vom epsilon-Verlag

SigmaPlot 8.0 für Windows der Fa. SPSS Science, USA

Exel 2000 der Fa. Microsoft® , USA

Statistica für Windows, Version 5.10, der Fa. StatSoft, Inc. USA

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.

### **Statistische Methode**

a) Deskriptive Statistik

1. Häufigkeitsverteilungen aller Variablen zur Beschreibung und Gegenüberstellung der Versuchsgruppen
2. Für die quantitativen Merkmale: Arithmetisches Mittel, Standardabweichung, Median und evtl. Quantile der empirischen Verteilungen mit entsprechender Darstellung

---

Version vom 25.07.03

15

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

b) Verfahren der schließenden Statistik

1. Schätzung von Sensitivität und Spezifität des Markers einschl. Berechnung der 95 %-Konfidenzintervalle
2. ROC-Analyse zur Überprüfung des im Test verwendeten Cut-off-Wertes
3. McNemar-Test zur Überprüfung der Asymmetrie der beobachteten Vierfeldertafel

### **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 unververtretbar ist.

Die Entscheidung über den Abbruch der Studie wird durch den Studienleiter in Abstimmung mit den Studienzentren und dem Kooperationspartner getroffen.

### **Monitoring**

Die Vollständigkeit, Korrektheit und Plausibilität der eingehenden Dokumentationsbögen wird von der ScheBo® ? Biotech AG in regelmäßigen Abständen überprüft. Falls Bögen ausbleiben bzw. Rückfragen erforderlich sind, erfolgt in der Regel eine schriftliche oder telefonische Benachrichtigung durch die ScheBo® ? Biotech AG.

Der Prüfarzt erlaubt der ScheBo® ? Biotech AG bei Bedarf Besuche zu seiner Unterstützung bei der Durchführung der Studie, zur Überprüfung der für die Studie erforderlichen Voraussetzungen und zur Überwachung des korrekten Studienablaufs. Hierbei können die Vollständigkeit, Korrektheit und Plausibilität der ausgefüllten Dokumentationsbögen überprüft werden. In der Klinik kann stichprobenartig - gemeinsam durch die ScheBo® ? Biotech AG und den Prüfarzt - ein Vergleich von Daten in den Dokumentationsbogen und den Patientenakten auf Identität durchgeführt werden („Source Data Verification“).

### **Publikationen**

Die Erstpublikation der Studiendaten erfolgt gemeinsam durch die Studienzentren (pro Zentrum maximal zwei Autoren) nach Abschluss der Studie. Das /die Manuskripte werden von Dr. med. P.D. Hardt (Universität Giessen) verfasst und nach Diskussion und Zustimmung aller beteiligten Autoren medizinischen Fachzeitschriften mit peer review vorgelegt.

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

**Literatur**

1. Brinck, U., Eigenbrodt, E., Oehmke, M., Mazurek, S., Fischer, G. L- and M2- Pyruvate Kinase Expression in Renal Cell Carcinomas and their Metastases, *Virch. Arch.* 424: 177-185 (1994)
2. Cerwenka, H., Aigner, R., Bacher, H., Werkgartner, G., El-Shabrawi, A., Quehenberger, F., Mischinger H.J. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2) CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions, *Anticancer Research* 19: 849-852 (1999)
3. Eigenbrodt, E., Basenau, D., Holthusen, S., Mazurek, S., Fischer, G. Quantification of Tumor Type M2 Pyruvate Kinase (Tu M2-PK) in Human Carcinomas, *Anticancer Research* 17: 3153-5156 (1997)
4. Eigenbrodt, E., Kallinowski, F., Ott, M., Mazurek, S., Vaupel, P. Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors, *Anticancer Research* 18: 3267-3274 (1998)
5. Eigenbrodt, E., Mazurek, S., Friis, R.R. Double role of pyruvate kinase type M<sub>2</sub> in the regulation of phosphometabolic pools, in: *Cell Growth and Oncogenesis*, Bannasch, P., Kanduc, D., Papa, S., Trager, J.M. (eds), Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland (1998)
6. Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, R. Double Role for Pyruvate Kinase Type M2 in Expansion of Phosphometabolite Pools Found in Tumor Cells, *Critical Reviews in Oncogenesis* 3 (1,2): 91 - 115 (1992)
7. Fischer, G., Holzrichter, S., Reinacher, M., Heinrichs, M., Dembowski, J., Eigenbrodt, E. Immunhistochemische Darstellung der L- und M2-Pyruvatkinase in primären Nierenzellkarzinomen und deren Metastasen, *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 73: 422 - 427 (1989)
8. Hoopmann, M., Warm, M., Mallmann, P., Thomas, A., Göhring U.-J., Schöndorf, Th. Tumor M2 pyruvate kinase – determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy, *Cancer Letters* 187: 223 – 228, (2002)
9. Hugo, F., Fischer, G., Eigenbrodt, E. Quantitative Detection of Tumor M2-PK in Serum and Plasma, *Anticancer Research* 19: 2753 – 2758 (1999)
10. Hardt, P.D., Ngoumou, B.K., Rupp, J., Schnell-Kretschmer, H., Kloer, H.-U. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer, *Anticancer Res.* 20: 4965-4968 (2000)
11. Hardt, P.D., 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, *Anticancer Res* 2003: in press
12. 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, *Anticancer Res* 2003: in press
13. Lüftner, D., Mesterharm J., Akrivakis, C., Geppert, R., Petrides P.E., Wernecke, K.-D., Possinger K. Tumor Type M2 Pyruvate Kinase Expression in Advanced Breast Cancer, *Anticancer Res* 20: 5077-5082 (2000)

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

14. Mazurek, S., Grimm, H., Wilker, S., Leib, S., Eigenbrodt, E. Metabolic characteristics of different malignant cancer cells lines, *Anticancer Research* 18: 3275-3282 (1998)
15. Mazurek, S., Grimm, H., Oehmke, M., Weisse, G., Teigelkamp, S. Eigenbrodt, E. Tumor M2-PK and Glutaminolytic Enzymes in the Metabolic Shift of Tumor Cells, *Anticancer Research* 20: 5151-5154 (2000)
16. Mazurek, S., Lüftner D., Wechsel, H.W., Schneider J., Eigenbrodt, E. Tumor M2-PK: A Marker of the Tumor Metabolome, in: *Tumor Markers: Physiology, Technology, and Clinical Applications*, Eleftherios, P. Diamandis et al. (Edts.) AACCC Press 2002, 471-475
17. Mazurek, S., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Michel, A., Fischer, G., Basenau, D., Dahlmann, N., Laumen R., Eigenbrodt, E. Die Bedeutung der Pyruvatkinase in der Onkologie, *notabene medici Jg.* 23,3: 97 - 104 (1993)
18. Oremek, G.M., Eigenbrodt, E., Rädle, J., Zeuzem, St. Seiffert, U.B. Value of the Serum Levels of the Tumor Marker Tu M2-PK in Pancreatic Cancer, *Anticancer Research* 17: 3031-3034 (1997)
19. Oremek, G.M., Teigelkamp, S., Kramer, W., Eigenbrodt, E., Usadel, K.-H. The Pyruvate Kinase Isoenzyme Tumor M2 (Tumor M2-PK) as a Tumor Marker for Renal Carcinoma, *Anticancer Research* 19: 2599-2602 (1999)
20. Oremek, G.M., Sapoutzis, N., Kramer, W., Bickeböller, R., Jonas, D. Value of Tumor M2 (Tu M2-PK) in Patients with Renal Carcinoma, *Anticancer Research* 20: 5095-5098 (2000)
21. Presek, P., Reinacher, M., Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus, *FEBS Letters* 242: 194 - 198 (1988)
22. Roigas, J., Schulze, G., Raytarowski, S., Jung, K., Schnorr D., Loening, S.A. Tumor M2 Pyruvate Kinase in Plasma of Patients with Urological Tumors, *Tumor Biol* 22: 282-285 (2001)
23. Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Michel, A., Will, H., Fischer, G., Basenau, D., Dahlmann, N., Laumen, R., Mazurek, S., Eigenbrodt, E. Quantitative determination (ELISA) of pyruvate kinase type tumor M2, in: *Current Tumor Diagnosis, Applications, Clinical Relevance, Research-trends*. R. Klapdor (ed.), W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München. (1994)
24. Schneider J., Morr, H., Velcovsky, H.-G., Weisse, G., Eigenbrodt, E. Quantitative Detection of Tumor M2-Pyruvate Kinase in Plasma of Patients with Lung Cancer in Comparison to other Lung Diseases, *Cancer Detection and Prevention* 24: 531-5 (2000)
25. Schneider, J., Neu, K., Grimm, H., Velcovsky, H.-G., Weisse, G., Eigenbrodt, E. Tumor M2- Pyruvate Kinase in Lung Cancer Patients: Immunohistochemical Detection and Disease Monitoring, *Anticancer Res.* 22: 311 – 318 (2002)
26. Schneider, J., Petri, G., Bitterlich, N., Philipp, M., Velcovsky, M.G., Morr, H., Katz, N., Eigenbrodt, E. Fuzzy logic-based tumor marker profiles improved sensitivity of the detection of progression in small-lung cancer patients, *Clin Exp Med* (2003), in press

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

27. Schneider, J., Velcovsky, H.-G., Morr, H., Katz, N., Neu., K., Eigenbrodt, E. Comparison of the Tumor Markers Tumor M2-PK, CEA, Cyfra 21-1, NSE and SCC in the Diagnosis of Lung Cancer, *Anticancer Res* 20: 5053-5058 (2000)
28. Schulze, G. The Tumor Marker Tumor M2-PK: An Application in the Diagnosis of Gastrointestinal Cancer, *Anticancer Res.* 20: 4961 – 4964 (2000)
29. Steinberg, P. Klingelhöffer, A., Schäfer, A., Wüst, G., Weiße, G., Oesch, F., Eigenbrodt, E. Expression of pyruvate kinase  $M_2$  in preneoplastic hepatic foci of *N*-nitrosomorpholine-treated rats, *Vierchows Arch* 434: 213-220 (1999)
30. Wechsel, H.W., Feil, G., Lahme, S., Koeser, W., Bichler, K.H. Die plasmainaktive Form der Pyruvatkinase (pTuM2PK) beim Nierenzellkarzinom: ein geeigneter Tumormarker?, *Akt. Urol.* 30, 249-253 (1999)
31. Wechsel, H.W., Petri, E., Feil, G., Bichler, K.-H. Tumor Specific Pyruvate Kinase (Tumor M2-PK): A potential marker for renal cell carcinoma (RCC), *J Urology* 157: 424 (1997)
32. Wechsel, H.W., Petri, E., Bichler, K.-H., Feil, G. Marker for Renal Cell Carcinoma (RCC): The Dimeric Form of Pyruvate Kinase Type M2 (Tumor M2-PK), *Anticancer Research* 19: 2583-2590, (1999)
33. Wechsel, H.W., Petri, E., Feil, G., Nelde, H.-J., Bichler, K.-H. Nierenzellkarzinom, Immunhistologische Untersuchungen zur Expression der inaktiven Form der Pyruvatkinase, *Urologe [A]* 38, 583-585 (1999)

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

## **Anhang**

### **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

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

**Tumor-Stadieneinteilungen**

**TNM-System und Stadieneinteilung (UICC1997)**

**TNM / pTNM-Klassifikation**

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

**L-Klassifikation für die Lymphgefäßinvasion (UICC 1997)**

- LX: Lymphgefäßinvasion nicht beurteilbar
- L0: keine Lymphgefäßinvasion
- L1: Lymphgefäßinvasion

---

Version vom 25.07.03

21

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

**V-Klassifikation für die Veneninvasion (UICC 1997)**

VX: Veneninvasion nicht beurteilbar

V0: keine Veneninvasion

V1: mikroskopische Veneninvasion

V2: makroskopische Veneninvasion

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

## Patienteninformation

Klinik

09/2003

Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

Sehr geehrte Dame, sehr geehrter Herr,

wie Sie wissen, wird bei Ihnen ein komplette Dickdarmspiegelung vorgenommen. Gegenwärtig gilt diese totale Koloskopie als die beste Möglichkeit einen Tumor des Dickdarms frühzeitig zu erkennen.

### Einladung zur Teilnahme

Wir möchten Ihnen anbieten, an einem Forschungsprojekt teilzunehmen, mit dem der neue Tumorstoffwechselmarker Tumor M2-PK untersucht werden soll. Diese klinische Studie wird an mehreren Zentren in Deutschland durchgeführt. Insgesamt werden etwa 285 Patienten teilnehmen.

### Mögliche Vorteile Ihrer Teilnahme

Der Zweck der Studie ist es zu untersuchen, wie gut sich die Bestimmung des Tumorstoffwechselmarkers Tumor M2-PK im Stuhl eignet, um Tumore des Dickdarms frühzeitig zu erkennen. Außerdem soll der Marker mit dem bisher häufig eingesetzten Nachweis von Blut im Stuhl verglichen werden.

### Zweck der Studie

Durch Ihre Teilnahme an der Studie tragen Sie dazu bei, dass das Wissen über die Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl vertieft wird und die Früherkennung von Dickdarmtumoren künftiger Patienten verbessert werden kann.

### Alternativen zur Teilnahme

Wenn Sie sich nicht zur Teilnahme entschließen können, werden Sie nach dem aktuellen Wissenstand untersucht.

---

Version vom 25.07.03

23

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

Vorgesehene Untersuchungen

Sollten Sie sich zu einer Teilnahme entschließen, bitten wir Sie vor der Dickdarmspiegelung eine walnußgroße Stuhlprobe abzugeben. Die Stuhlprobe wird an die Firma ScheBo® ? Biotech AG für weitere Untersuchungen gegeben.

Kosten

Mit der Teilnahme an dieser Untersuchung entstehen Ihnen keine Kosten.

Verwendung Ihrer Daten

Die in dieser Studie erhobenen Daten werden für wissenschaftliche Zwecke ausgewertet und ggf. veröffentlicht. Dazu werden Ihre persönlichen Daten ohne Nennung Ihres Namens gespeichert und weitergegeben. Falls es Sie interessiert, können Sie jederzeit darüber Auskunft erhalten, welche Ihrer Daten erfasst sind. Zur Überprüfung der Qualität der Daten werden auch Dritte Einsicht in die Originaluntersuchungsunterlagen haben. Die beteiligten Personen werden dabei die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes und die ärztliche Schweigepflicht einhalten.

Ansprechpartner für weitergehende Fragen

Sie haben die Möglichkeit, jederzeit weitere Fragen zu stellen und mit dem verantwortlichen Arzt zu sprechen. Als Kontaktperson steht Ihnen Name / Telefon \_\_\_\_\_ jederzeit zur Verfügung.

Freiwilligkeit der Teilnahme

Sie nehmen an dieser Studie freiwillig teil und können jederzeit ohne Angabe von Gründen von der Zusage zur Teilnahme zurücktreten, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile erwachsen. Sie erhalten dann in jedem Fall eine Untersuchung, die dem aktuellen Wissensstand entspricht.

Falls sie keine weiteren Fragen haben und sich zur Teilnahme an dieser Studie entschlossen haben, unterzeichnen Sie bitte die beiliegende Einwilligungserklärung.

Sie erhalten eine Kopie dieser Patienteninformation und der unterschriebenen Einwilligungserklärung.

**Original zur Krankenakte/Kopie für Patient**

---

Version vom 25.07.03

24

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

## Einverständniserklärung zur Studie

Klinik

### Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

Verantwortlicher Träger und Leiter der Studie: Prof. Dr. med. Jürgen Ferdinand Riemann, Klinikum der Stadt Ludwigshafen, Medizinische Klinik C, Ludwigshafen

Name: ..... Vorname: .....

Geburtsdatum: .....

Ich bin einverstanden, an der Studie teilzunehmen.

Ich bin schriftlich und mündlich aufgeklärt worden über Ihr Ziel, die praktische Durchführung, den zu erwartenden Nutzen, die möglichen Risiken und die mit ihr verbundenen Belastungen und über die Freiwilligkeit der Teilnahme und der Einwilligung zur Verarbeitung meiner Daten im Rahmen der Studie.

Ich bin berechtigt, jederzeit ohne Nachteile oder Angabe von Gründen mit Wirkung für die Zukunft meine Einwilligung zu widerrufen und aus der Studie auszusteigen sowie meine Daten löschen, sperren oder vernichten zu lassen.

Ich bin darüber informiert worden, dass die erhaltenen personenbezogenen Daten den Bestimmungen des Hessischen Datenschutzgesetzes (bzw. des zuständigen Landesdatenschutzgesetzes) unterliegen. Ich stimme ihrer Veröffentlichung unter der Voraussetzung zu, dass jeder Bezug zu meiner Person unkenntlich gemacht ist (Anonymisierung oder Pseudonymisierung der Daten).

Ich bin einverstanden, dass im Rahmen der Studie erhobene personenbezogene Daten aufgezeichnet, von einem zur Verschwiegenheit verpflichteten Mitarbeiter oder Beauftragten der fördernden Einrichtung eingesehen bzw. abgefragt und in anonymisierter Form an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert werden. Mir ist außerdem bekannt, dass in seltenen Ausnahmefällen, nur unter Wahrung meiner Persönlichkeitsrechte und mit meiner erneuten ausdrücklichen Zustimmung, eine Weitergabe meiner nicht anonymisierten Daten erforderlich sein kann.

Ich konnte Fragen stellen. Sie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich habe keine weiteren Fragen mehr.

Ich habe eine Kopie der schriftlichen Aufklärung und dieser Einverständniserklärung erhalten.

Ort/Datum

.....

Unterschrift des Patienten/Zeugen/Probanden.....

Unterschrift des Studienleiters bzw. Stellvertreters .....

Original zur Krankenakte/Kopie für Patient

Version vom 25.07.03

25

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

## Probenbegleitbogen: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl

Dieses Formular ist bei der Probenabgabe durch den Arzt auszufüllen und mit der Probe einzusenden an:

ScheBo® ? Biotech AG, Netanstr. 3-5, 35394 Giessen

Patienteninitialen (Vorname, Zuname)   Geburtstag

Patienten ID-Nummer       Zentrum \_\_\_\_\_

Aufnahmedatum      \_\_\_\_\_

Arzt/Unterschrift

Datum der Probennahme

Ja  Nein  Lagerung bei -20°C ?  Wenn nein, wie erfolgte die Lagerung: \_\_\_\_\_

Vor der Probennahme erfolgte eine Koloskopie am    Datum

Endoskopische Intervention während der Koloskopie vor Probennahme Ja  Nein

Histologische Sicherung am    Datum

Diagnose: \_\_\_\_\_

### Bitte beachten:

- Zeitpunkt der Probennahme:** 1 Tag vor den Abführmaßnahmen zur Koloskopie (der Patient sollte mindestens 2 Wochen vor der Probennahme nicht koloskopiert worden sein)
- Probe:** natürlich abgesetzte, walnußgroße, geformte Stuhlprobe
- Probengefäß:** handelsübliches Stuhlproben-Aufnahmeröhrchen
- Lagerung:** bei -20°C bis zu 1 Jahr
- Einfluss durch Medikamente:** nicht bekannt

Original für ScheBo® ? Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen/ Kopie zur Krankenakte

Version vom 25.07.03

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

### Dokumentation Ersterhebungsbogen (1)

Dieses Formular ist bei der Ersterhebung durch den Arzt auszufüllen und einzusenden an:

ScheBo® • Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen

Patienteninitialen (Vorname, Zuname)   Geburtstag

Männlich  Weiblich

Patienten ID-Nummer       Zentrum \_\_\_\_\_

Aufnahmedatum       \_\_\_\_\_

Arzt/Unterschrift \_\_\_\_\_

#### Anamnese (bitte zutreffendes Ankreuzen)

<b>Leber:</b>	<b>Speiseröhre:</b>	<b>Darm:</b>
Hepatitis <input type="checkbox"/>	Ösophagitis <input type="checkbox"/>	Zöliakie <input type="checkbox"/>
Leberzirrhose <input type="checkbox"/>	Ösophagusvarizen <input type="checkbox"/>	Morbus Whipple <input type="checkbox"/>
<b>Gallenblase und Gallenwege:</b>	<b>Magen:</b>	Morbus Crohn <input type="checkbox"/>
Gallensteine <input type="checkbox"/>	Gastritis <input type="checkbox"/>	Colitis ulcerosa <input type="checkbox"/>
Cholezystitis <input type="checkbox"/>	Ulkus <input type="checkbox"/>	Divertikulose <input type="checkbox"/>
Cholangitis <input type="checkbox"/>	Magenschleimhaut-polypen <input type="checkbox"/>	Hämorrhoiden <input type="checkbox"/>
<b>Pankreas:</b>	Infektion mit H. pylori <input type="checkbox"/>	Polypen <input type="checkbox"/>
chron. Pankreatitis <input type="checkbox"/>		Kolorektales CA <input type="checkbox"/>
Diabetes mellitus <input type="checkbox"/>		OP/Radio-/Chemotherapie* <input checked="" type="checkbox"/>
		andere Malignome* <input checked="" type="checkbox"/>

\* Ausschlusskriterium

Andere Erkrankungen: \_\_\_\_\_

Medikamente: \_\_\_\_\_

Original für ScheBo® ? Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen/ Kopie zur Krankenakte

Version vom 25.07.03

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

### Dokumentation Ersterhebungsbogen (2)

Dieses Formular ist bei der Ersterhebung durch den Arzt auszufüllen und einzusenden an:

ScheBo® • Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen

Patienteninitialen (Vorname, Zuname)

Geburtstag

Männlich  Weiblich

Patienten ID-Nummer

Zentrum \_\_\_\_\_

Aufnahmedatum

Arzt/Unterschrift \_\_\_\_\_

Datum Okkultbluttest

Positiv  Negativ

Welcher Test wurde benutzt? \_\_\_\_\_

<b>Symptome oder Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes</b> (bitte zutreffendes ankreuzen)	Ja	Nein
Änderung der Stuhlgewohnheiten ohne äußeren Anlass	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Obstipation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diarrhoe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Flatulenz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Blut- und Schleimbeimengung im Stuhl oder schwarz verfärbter Stuhl	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gewichtsverlust	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Magen-/Oberbauchschmerzen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Andere Symptome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Original für ScheBo® ? Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen/ Kopie zur Krankenakte

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

### Dokumentationsbogen Koloskopie

Dieses Formular ist nach der Koloskopie durch den untersuchenden Arzt auszufüllen und

einzusenden an:

ScheBo® • Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen

Patienteninitialen (Vorname, Zuname)  Koloskopiedatum

Patienten ID-Nummer       Zentrum \_\_\_\_\_

Aufnahmedatum    \_\_\_\_\_

Arzt/Unterschrift

Rektale-digitale Austastung   Befund: \_\_\_\_\_

Zökum erreicht   Ausschlusskriterium

Polyp(en)   Bemerkungen: \_\_\_\_\_

Polyp(en) ektomiert   \_\_\_\_\_

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Colitis ulcerosa   Bemerkungen: \_\_\_\_\_

Morbus Crohn   \_\_\_\_\_

Divertikulose   Bemerkungen: \_\_\_\_\_

Andere Erkrankungen: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Original für ScheBo® ? Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen/ Kopie zur Krankenakte

Version vom 25.07.03

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

### Dokumentation Makroskopie des/der Polypen

Dieses Formular ist nach der Koloskopie durch den Arzt auszufüllen und einzusenden an:

ScheBo® • Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen

Patienteninitialen (Vorname, Zuname)   Koloskopiedatum

Patienten ID-Nummer       Zentrum \_\_\_\_\_

Aufnahmedatum      \_\_\_\_\_

Arzt/Unterschrift

Größe des/der Polypen: \_\_\_\_\_ Kuppe  Stiel

Lokalisation des/der Polypen: \_\_\_\_\_

Anzahl der Partikel: \_\_\_\_\_

Form des/der Polypen: gestielt  tailliert  sessil  flach   
mit zentraler Eindellung

Makroskopische Einschätzung der Entfernung im Gesunden: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Original für ScheBo® ? Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen/ Kopie zur Krankenakte

Version vom 25.07.03

Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

### Dokumentation kolorektales Karzinom

Dieses Formular ist durch den untersuchenden Arzt auszufüllen und einzusenden an:

ScheBo® • Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen

Patienteninitialen (Vorname, Zuname)   Untersuchungsdatum

Patienten ID-Nummer     Zentrum: \_\_\_\_\_

Aufnahmedatum     \_\_\_\_\_

Arzt/Unterschrift

Kolonkarzinom  Rektumkarzinom

Höhenlokalisierung (ab ano): \_\_\_\_\_

Tumorgröße: \_\_\_\_\_

zirkumferente Ausdehnung: \_\_\_\_\_

Konsistenz: \_\_\_\_\_

- Wachstumsform**
- polypös bzw. papillär exophytisch
  - infiltrativ-ulzerierend mit mehr oder weniger großen polypösen Anteilen
  - zirkulär-stenosierend
  - flach erhaben
  - flach eingesunken

Original für ScheBo® ? Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen/ Kopie zur Krankenakte

Version vom 25.07.03



Studienprotokoll: Bestimmung der Tumor M2-PK im Stuhl total koloskopierter Patienten

## Dokumentation Patho-Histologie (2)

Dieses Formular ist bei der patho-histologischen Untersuchung durch den behandelten Arzt auszufüllen und einzusenden an:

ScheBo® • Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen

Patienteninitialen (Vorname, Zuname)   Journalnummer

Patienten ID-Nummer

Aufnahmedatum

Zentrum: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 Arzt/Unterschrift

### Tumortyp (WHO-Klassifikation 1976)

Adenokarzinom  Bemerkungen: \_\_\_\_\_

Muzinöses Adenokarzinom (Gallertkarzinom)  \_\_\_\_\_

Siegelringzellkarzinom  \_\_\_\_\_

Plattenepithelkarzinom  \_\_\_\_\_

Adeno-squamöses Karzinom  \_\_\_\_\_

Undifferenziertes Karzinom  \_\_\_\_\_

### Grading (UICC 1997)

GX

G1

G2

G3

G4

### TNM-Klassifikation (UICC 1997)

pTX  NX  MX  LX  VX

pT0  N0  M0  L0  V0

pTis  N1  M1  L1  V1

pT1  N2  V2

pT2

pT3

pT4

### Spezifikation M1

Lunge  Andere: \_\_\_\_\_

Leber  \_\_\_\_\_

Skelett  \_\_\_\_\_

Hirn

Original für ScheBo® ? Biotech AG, Netanyastr. 3-5, 35394 Giessen/ Kopie zur Krankenakte

Version vom 25.07.03

33

## 12.5 Ethikvotum

UNIVERSITÄTSKLINIKUM



GIESSEN

### ETHIK-KOMMISSION am FB Humanmedizin

Ethik-Kommission, Gaffkystr. 11c, D-35385 Gießen

Herrn  
Prof. Dr. H.-U. Klör  
Med. Klinik III und Poliklinik  
Rodthohl 6

35385 Gießen

Vorsitzender:  
Prof. Dr. Drs. h.c. K. Federlin  
Gaffkystr. 11c  
D-35385 Gießen  
Tel.: (0641)99-47660/42470

Gießen, den 30.09.2003  
Az.: Prof.Fed./Erb

**Unser Zeichen: 71/03**  
**Sitzung am: 19.09.2003**

**Titel:** *Bestimmung der Tumor M2-PK (Pyruvat Kinase) im Stuhl total koloskopierter Patienten.*

Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter der Klinischen Prüfung (LKP)   
Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung

Eingesandte Unterlagen:

- Vorbegutachtung(en) durch andere Ethik-Kommissionen
- Formalisierter Antrag
- Ausführliche Darstellung des Vorhabens
- Information und Einwilligungserklärung der Patienten/Probanden
- Nachweis der Versicherung

Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Soweit betreffend, wurde **das auf Seite 2 wiedergegebene Protokoll** unter Berücksichtigung des Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community (ICH-GCP) erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags.

Forderungen der Ethik-Kommission, soweit darin aufgeführt, wurden inzwischen erfüllt.

Sie stimmt dem Vorhaben zu.

Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2).

Sie stimmt dem Vorhaben nicht zu (siehe S. 2).

Die Ethik-Kommission erwartet, daß ihr bis 31.12.04 ohne Aufforderung ein kurzer Bericht auf beigefügtem Formblatt übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, medizinisch-wissenschaftliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ethik-Kommission über alle Änderungen des Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkungen mitzuteilen, soweit sie im Bereich der Zuständigkeit dieser Ethik-Kommission aufgetreten sind. Bei überregionalen Studien sind sie auch dem LKP mitzuteilen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Die Namen der bei dieser Sitzung anwesenden Mitglieder sind hervorgehoben.

Mitglieder: Frau Dr. Blüters-Sawatzki (Pädiatrie); Dr. Bödeker (Informatik); Prof. Breithaupt (Klinische Pharmakologie); Herr Brumhard (Pharmazie); Prof. Federlin, Vorsitzender (Innere Medizin); Prof. Schapp (Bürgerliches Recht); Prof. Schmidt (Pharmakologie), Prof. Schwemmlé, stv. Vorsitzender (Chirurgie); Prof. Weiler (Rechtsmedizin).

Vertreter: Prof. Dudeck (Informatik); Dr. Gödicke (Bürgerliches Recht); Frau Prof. Kemkes-Matthes (Innere Medizin); Frau Kreckel (Pharmazie); Prof. Künzel (Gynäkologie); Prof. Lasch (Innere Medizin); Dr. Repp (Pharmakologie), PD Dr. Riße (Rechtsmedizin).

Auszug aus dem Protokoll der Kommissionsitzung vom 19.09.2003:

Für Prof. Klör berichtet Dr. Marzeion. Es handelt sich um eine multizentrische Studie, bei der Sensitivität, Spezifität und Cut-off des ScheBO-Tumor-M2-PK-Stuhltestes bestimmt werden sollen. Der Test kommt bei 2 Patientengruppen zur Anwendung: a) Pat. mit colo-rektalem Karzinom vor OP/Radio-/Chemo-/Immuntherapie, b) endoskopisch unauffällige Probanden im Rahmen der Krebsvorsorge und Patienten bei geplanter diagnostischer Coloskopie unabhängig von der Indikation. Ferner soll der Tumor M2-PK-Stuhltest mit dem Nachweis von occultem Blut im Stuhl verglichen werden. Es handelt sich um eine multizentrische Studie, LKP: Prof. Riemann/Ludwigshafen (N=285 Patienten, in Gießen 57). Die Kommission stimmt dem Vorhaben zu.

(Ende)



(Prof. Dr. Drs. h.c. K. Federlin)

## 13 Literatur

- AGIS H, HAFNER M, KORNEK G et al. Colorectal carcinoma. Wiener klinische Wochenschrift 2006; 118(quiz 17): 3–16.
- AGRAWAL N, JIAO Y, BETTEGOWDA C et al. Comparative genomic analysis of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Cancer discovery 2012; 2(10): 899–905.
- AHLQUIST DA. Patterns of occult bleeding in asymptomatic colorectal cancer. Cancer 1989; 63(9): 1826–1830.
- AHLQUIST DA. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. Gastroenterology 2000; 119(5): 1219–1227.
- AHLQUIST DA. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. Ann Intern Med. 2008; 149(7): 441–450.
- ALKHOURI N, FRANCIOSI JP, MAMULA P et al. Familial Adenomatous Polyposis in Children and Adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010.
- AL-TAIE O, MÖRK H, SEUFERT J et al. Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). Current review of etiology, clinical aspects, diagnosis and therapy. Med Klin. München 2001; 96(9): 529–538.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal Cancer Overview 2013.
- ANDERSSON RE, OLAISON G, TYSK C et al. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. Gastroenterology 2003; 124(1): 40–46.
- ÄRZTEZEITUNG. Darmkrebstest als Satzungsleistung für Kassenpatienten. Ärztezeitung 2015(16): Nr. 95-178D.
- ATKIN WS, EDWARDS R, KRALJ-HANS I et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. Lancet (London, England) 2010; 375(9723): 1624–1633.
- AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE (AIHW) AND AUSTRALASIAN ASSOCIATION OF CANCER REGISTRIES (AACR). Cancer in Australia: An Overview 2006. Cancer series no 37, Cat. No. CAN 32 2007; 37.

- BASS AJ., LAWRENCE MS., BRACE LE et al. Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion. *Nature genetics* 2011; 43(10): 964–968.
- BECKER H, HOHENBERGER W, JUNGINGER T et al. *Chirurgische Onkologie Kolonkarzinom*: Thieme Verlag; 2001.
- BELIARD A, PRUDHOMME M et al. Ileal reservoir with ileo-anal anastomosis: longterm complications. *J Visc Surg.* 2010; 147: 137–144.
- BENDER R, ZIEGLER A, LANGE ST. Logistische Regression. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 2002; 127(- Artikel Nr. 14 der Statistik-Serie in der DMW -).
- BERNSTEIN CN, BLANCHARD JF, RAWSTHORNE P et al. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *The American journal of gastroenterology* 2001; 96(4): 1116–1122.
- BOARD M, HUMM S, NEWSHOLME EA et al. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem J* 1990; 265: 503–509.
- BOSMAN FT. WHO classification of tumours of the digestive system: [reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, December 10 - 12, 2009 ; third volume of the 4th edition of the WHO series on histological and genetic typing of human tumours]. 4. Aufl. 3 (der 4. ed.). World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC; 2010.
- BOTT C, LEMBCKE B, STEIN J et al. Colorectal cancer and folate. *Z Gastroenterol.* 2003; 41: 263–270.
- BRENNER H, HOFFMEISTER M, ARNDT V et al. Protection from right- and left-sided colorectal neoplasms after colonoscopy: population-based study. *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102(2): 89–95.
- BRENNER H, HOFFMEISTER M, ARNDT V HU et al. Gender differences in colorectal cancer: implications for age at initiation of screening. *Br. J. Cancer* 2007; 86: 828–831.

- BURCH JA, SOARES-WEISER K, ST JOHN DJB et al. Diagnostic accuracy of faecal occult blood tests used in screening for colorectal cancer: a systematic review. *Journal of medical screening* 2007; 14(3): 132–137.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Colorectal (Colon) Cancer 2014.
- CERWENKA H, AIGNER R, BACHER H ET AL. et al. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions. *Anticancer research* 1999; 19: 849–851.
- CITARDA F, TOMASELLI G, CAPOCACCIA R et al. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut*. 2001; 48: 812–815.
- COERPER S, BELKA C, BITZER M et al. Kolonkarzinom Rektumkarzinom Analkarzinom. Südwestdeutsches Tumorzentrum 2009.
- COOPER JA, HUNTER T et al. Similarities and differences between the effects of epidermal growth factor and Rous sarcoma virus. *The Journal of Cell Biology* 1981; 91(3): 878–883.
- CORNISH JA., TAN E, SIMILLIS C et al. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology* 2008; 103(9): 2394–2400.
- COTTRELL S, BICKNELL D, KAKLAMANIS L et al. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet (London, England)* 1992; 340: 626–630.
- CZUB E, NOWAK JK, MOCZKO J, LISOWSKA A, BANASZKIEWICZ A BT et al. Comparison of fecal pyruvate kinase isoform M2 and calprotectin in acute diarrhea in hospitalized children. *Scientific Reports* 2014; 4(4769).
- DAVID A, LIEBERMAN, DOUGLAS KR et al. Guidelines for Colonoscopy Surveillance After Screening and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2012; 143: 844–857.
- DEUTSCHE APOTHEKER ZEITUNG. Sigmoidoskopie statt Koloskopie: Kleine Darmspiegelung als Früherkennungsuntersuchung ausreichend? *Deutsche Apotheker Zeitung* 2014(37): 38.

- DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (DGE). Männer essen anders.  
<http://www.dge.de/presse/pm/maenner-essen-anders/> 2014.
- DONG SM ET AL. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(11): 858–865.
- DORAN J, HARDCASTLE JD et al. Bleeding patterns in colorectal cancer: the effect of aspirin and the implications for faecal occult blood testing. *Br J Surg.* 1982; 69(12): 711–713.
- DÜMBGEN L. Einführung in die Statistik. Basel: Springer Basel; 2016.
- EIGENBRODT E, BASENAU D, HOLTHUSEN S, MAZUREK S, FISCHER G. et al. Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in human carcinomas. *Anticancer research* 1997; 17: 3153–3156.
- EIGENBRODT E, FISTER P RM et al. New perspectives on carbohydrate metabolism in tumor cells. In: Breitner R (Hrsg): *Regulation of carbohydrate Metabolism*. 1 Januar 1985: 141–179.
- EIGENBRODT E, REINACHER M, SCHEEFERS-BORCHEL U et al. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Critical reviews in oncogenesis* 1992; 3(1-2): 91–115.
- EIKERMANN M. IGeL-Monitor: Medizinischer Dienst des Spitzenverbandes Bund der Krankenkassen e.V. (MDS) 2017.
- ELKE OBERHOFER. Darmkrebs: DNA-Test punktet beim Screening. <http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/krebs/kolorektales-karzinom/article/858604/darmkrebs-dna-test-punktet-screening.html> 2014.
- ELSAFI SH, ALQAHTANI NI, ZAKARY NY et al. The sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios of fecal occult blood test for the detection of colorectal cancer in hospital settings. *Clinical and experimental gastroenterology* 2015; 8: 279–284.
- EWALD N, SCHALLER M, BAYER M et al. Fecal pyruvate kinase-M2 (tumor M2-PK) measurement: a new screening concept for colorectal cancer. *Anticancer research* 2007; 27(4A): 1949–1952.

- EWALD N, TOEPLER M, AKINCI A et al. Pyruvate kinase M2 (tumor M2-PK) as a screening tool for colorectal cancer (CRC). A review of current published data. *Z Gastroenterol.* 2005; 43: 1313–1317.
- FAHRMEIR L, HEUMANN C, KÜNSTLER R et al. *Statistik: Der Weg zur Datenanalyse.* 8th ed. Springer-Lehrbuch; 2016.
- FEARON ER, VOGELSTEIN B et al. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell Adhesion and Communication* 1990; 61(5): 759–767.
- FREEMAN, HJ et al. Comparison of longstanding pediatric-onset and adult-onset Crohn's disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2004; 39(2): 183–186.
- FRIEDENREICH CM, ORENSTEIN et al. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr.* 2002; 132: 3456–3464.
- FUJIMOTO A, TOTOKI Y, ABE T et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nature genetics* 2012; 44(7): 760–764.
- GARBORG K, HOLME O, LOBERG M et al. Current status of screening for colorectal cancer. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013; 24(8): 1963–1972.
- GIOVANNUCCI E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin. North Am.* 2002; 31: 925–943.
- GIOVANNUCCI E. Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *Journal of women's health (2002)* 2003; 12: 173–182.
- GONZALEZ EC, ROETZHEIM RG, FERRANTE JM et al. Predictors of proximal vs distal colorectal cancers. *Dis. Colon Rectum.* 2001; 44(251-258).
- GUMINSKA M, IGNACAK J, KEDRYNA T et al. Tumor-specific pyruvate kinase isoenzyme M2 involved in biochemical strategy of energy generation in neoplastic cells. *Acta biochimica Polonica* 1997; 44(4): 711–724.
- HAGGAR FA, BOUSHEY RP et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 2009; 22(4): 191–197.

- HAMILTON SR, BOSMAN FT, BOFETTA P ET AL. et al. Carcinoma of the colon and Rectum. WHO Classification of tumours of the digestive system 2010: 134–146.
- HAMILTON SR, VOGELSTEIN B, KUDO S et al. Carcinoma of the colon and Rectum. WHO Classification of tumours of the digestive system 2000; 2: 105–119.
- HARDT PD. Measurement of fecal pyruvate kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer colorectal\_AnticancerRes-2003-851.pdf> 2003.
- HARDT PD. Tumormarker in der Gastroenterologie. UNI-MED SCIENCE. UNI-MED Verlag AG, D-28323 Bremen; 2008.
- HARDT PD. (persönliche Mitteilung) 2017.
- HARDT PD, EWALD N et al. Tumor M2 pyruvate kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy. Expert review of molecular diagnostics 2008; 8(5): 579–585.
- HARDT PD, MAZUREK S, TOEPLER M et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. British Journal of Cancer 2004a; 91(5): 980–984.
- HARDT PD, MAZUREK S, TOEPLER M et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. Br J Cancer. 2004b; 91: 980–984.
- HARDT PD, MAZUREK S., KLÖR H.U., EIGENBRODT E. et al. Neuer Test zum Nachweis von Darmkrebs. Spiegel der Forschung 2004c; 21 (1/2): 14–19.
- HARDT PD, NGOUMOU BK, RUPP J et al. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer. Anticancer research 2000; 20: 4965–4968.
- HARDT PD, TOEPLER M, NGOUMOU B et al. Fecal pyruvate kinase concentrations (ELISA based on a combination of clone 1 and clone 3 antibodies) for gastric cancer screening. Anticancer research 2003a; 23(2A): 855–857.
- HARDT PD, TOEPLER M, NGOUMOU B et al. Measurement of fecal pyruvate kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls. Anticancer research 2003b; 23(2A): 851–853.

- HARDT PD, TOEPLER M, NGOUMOU B et al. Measurement of fecal pyruvate kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls. *Anticancer research* 2003c; 23: 851–853.
- HAUG U, HUNDT S, BRENNER H et al. Sensitivity and specificity of faecal tumour M2 pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study. *British Journal of Cancer* 2008a; 99(1): 133–135.
- HAUG U, HUNDT S, BRENNER H et al. Sensitivity and specificity of faecal tumour M2 pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study. *British journal of cancer* 2008b; 99(1): 133–135.
- HAUG U, ROTHENBACHER D, WENTE MN et al. Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer* 2007; 96(9): 1329–1334.
- HAUSER H. Das Kolorektale Karzinom Teil1: Epidemiologie, Präkanzerosen Primär- und Sekundärprävention. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2(4): 6–11.
- HERMANEK P. Gibt es gesicherte Präkanzerosen. *Erg Gastroenterol Verh* 1987; 23: 42–44.
- HERMANEK P, WITTEKIND C et al. Residual tumor (R) classification and prognosis. *Semin Surg Oncol* 1994; 10(1): 12–20.
- HOFF G. Colorectal polyps. Clinical implications: screening and cancer prevention. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1987; 22: 769–775.
- HOLINSKI-FEDER E, VOGELSANG H GM, KOPP R, TYMPNER C, KELLER G et al. Hereditäre Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes 2006; 7: 232–252.
- HOOPMANN M, WARM M, MALLMANN P et al. Tumor M2 pyruvate kinase - determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy. *Cancer letters* 2002; 187: 223–228.
- HUANG JX, ZHOU Y, WANG CH et al. Tumor M2-pyruvate kinase in stool as a biomarker for diagnosis of colorectal cancer: A meta-analysis. *Journal of cancer research and therapeutics* 2014; 10 Suppl: 8.
- IACOPETTA B. Are there two sides to colorectal cancer? *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2002; 101(403-408).

- IMPERIALE TF, ET AL. et al. Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med.* 2002; 346(23): 1781–1785.
- IMPERIALE TF, ET AL. et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med.* 2004; 351(26): 2704–2714.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER / WHO / IARC. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012.
- ISHIGE T, TOMOMASA T, TAKEBAYASHI T et al. Inflammatory bowel disease in children: epidemiological analysis of the nationwide IBD registry in Japan. *Journal of gastroenterology* 2010; 45(9): 911–917.
- JESS T, GAMBORG M, MATZEN P et al. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *The American journal of gastroenterology* 2005; 100(12): 2724–2729.
- KAHVEJIAN A, QUACKENBUSH J, THOMPSON JF et al. What would you do if you could sequence everything? *Nature biotechnology* 2008; 26(10): 1125–1133.
- KAMINSKI MF, REGULA J, KRASZEWSKA E et al. Quality Indicators for Colonoscopy and the Risk of Interval Cancer. *New England Journal of Medicine* 2010; 362(19): 1795–1803.
- KAURA B, BAGGA R, PATEL FD et al. Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (TuM2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30: 193–196.
- KIM CW, KIM JI, PARK SH et al. Usefulness of plasma tumor M2-pyruvate kinase in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Korean Journal of Gastroenterology* 2003; 42: 387–393.
- KIM YC, ET AL. et al. The Usefulness of a Novel Screening Kit for Colorectal cancer Using the Immunochromatographic Fecal Tumor M2 Pyruvate Kinase Test. *Gut and Liver* 2014.
- KIM YC, KIM JH, CHEUNG DY et al. The Usefulness of a Novel Screening Kit for Colorectal Cancer Using the Immunochromatographic Fecal Tumor M2 Pyruvate Kinase Test. *Gut and liver* 2015; 9(5): 641–648.

KLIMPFINGER M, HAUSER H, HERMANEK P et al. Pathologie kolorektaler Präkanzerosen. Chirurgische Gastroenterologie 1992; 8: 16–19.

KOO JH, JALALUDIN B, WONG SKC et al. Improved survival in young women with colorectal cancer. Am J Gastroenterol. 2008; 103: 1488–1495.

KOO JH, LEONG R.WL et al. Sex Differences in Epidemiological, Clinical and Pathological Characteristics of Colorectal Cancer. J Gastroenterol Hepatol. 2010; 25(1): 33–42.

KOSS K, HARRISON RF, GREGORY J et al. The metabolic marker tumour pyruvate kinase type M2 (tumour M2-PK) shows increased expression along the metaplasia–dysplasia–adenocarcinoma sequence in Barrett’s oesophagus. Journal of Clinical Pathology 2004; 57(11): 1156–1159.

KOSS K, MAXTON D, JANKOWSKI JA et al. Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention. Colorectal disease the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland 2007; 10(3): 244–248.

KOSTIC AD, GEVERS D, PEDAMALLU CS et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. Genome research 2012; 22(2): 292–298.

KOSTIC AD, OJESINA AI, PEDAMALLU CS et al. PathSeq: Software to identify or discover microbes by deep sequencing of human tissue. Nature biotechnology 2011; 29(5): 393–396.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N et al. Robins Basic Pathology. Saunders Philadelphia 2007; 8: 611–616.

KUROME M, KATO J, NAWA T et al. Risk factors for high-grade dysplasia or carcinoma in colorectal adenoma cases treated with endoscopic polypectomy. J Gastroenterol Hepatol. 2008; 20(2): 111–117.

Laboranalyse der M2-PK Konzentration.

LAIRD-FICK HS, CHAHAL G, OLOMU A et al. Colonic polyp histopathology and location in a community-based sample of older adults. BMC gastroenterology 2016; 16(1): 90.

- LAKATOS PL, VEGH Z, LOVASZ BD et al. Is current smoking still an important environmental factor in inflammatory bowel diseases?: Results from a population-based incident cohort. *Inflammatory bowel diseases* 2013; 19(5): 1010–1017.
- LERCH M. Bereitschaft zur Früherennungs-Koloskopie sinkt. *Dtsch Arztebl International* 2014.
- LEUFKENS AM, VAN DUIJNHOFEN FJ, SIERSEMA PD et al. Cigarette Smoking and colorectal cancer risk in the EPIC study. *Clin Gastroenterol Hepatology* 2010.
- LI R, LIU J, XUE H et al. Diagnostic value of fecal tumor M2-pyruvate kinase for CRC screening: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2012; 131(8): 1837–1845.
- LIMBURG PJ, VIERKANT RA, CERHAN JR et al. Cigarette smoking and colorectal cancer: long-term, subsite-specific risks in a cohort study of postmenopausal women. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2003; 1: 202–210.
- LOEWENSTEIN MS, ZAMCHECK N et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in benign gastrointestinal disease states. *Cancer* 1978; 42(3 Suppl): 1412–1418.
- LÜFTNER D, SCHWEIGERT M, GEPPERT R et al. Tumor Type M2 Pyruvate Kinase in Colorectal Cancer: A Predictive Activity Marker versus Classical Mass Tumor Markers. Abstract of the 3rd International Conference - Perspectives in Colorectal Cancer. Dublin, Ireland; 2001.
- LYNCH HT, SMYRK T, LYNCH JF et al. Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Oncology* 1998; 55(2): 103–108.
- MAKSIMOVIC S. Survival rates of patients with mucinous adenocarcinoma of the colorectum. *Med Arh.* 2007; 61: 26–29.
- MANDEL JS, CHURCH TR, BOND JH et al. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2000; 343(22): 1603–1607.
- MARDIS ER. Genome sequencing and cancer. *Current opinion in genetics & development* 2012; 22(3): 245–250.

- MATANOSKI G, TAO X, ALMON L et al. Demographics and tumor characteristics of colorectal cancers in the United States 1998-2001. *Cancer* 2006; 107: 1112–1120.
- Mathe Guru; 2015.
- MAZUREK S, EIGENBRODT E et al. The tumor metabolome. *Anticancer research* 2003; 23(2A): 1149–1154.
- MAZUREK S, GRIMM H, BOSCHEK CB et al. Pyruvate kinase type M2: A crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr* 2002; 87(S1): S23.
- MAZUREK S. Effekt der tetrameren und dimeren Form der M2-PK auf den Stoffwechsel der Zellen; 2002.
- MAZUREK S. Pyruvate Kinase Type M2: A Key Regulator Within the Tumour Metabolome and a Tool for Metabolic Profiling of Tumours 2008; 2007/4: 99–124.
- MAZUREK S. M2-PK-Test zur Früherkennung von kolorektalen Karzinomen. *EHK* 2010; 59: 200–205.
- MAZUREK S, BOSCHEK CB, HUGO F et al. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005a; 15: 300–308.
- MAZUREK S, BOSCHEK CB, HUGO F et al. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in cancer biology* 2005b; 15(4): 300–308.
- MAZUREK S, DREXLER HC, TROPFMAIR J et al. Regulation of pyruvate kinase type M2 by A-Raf: a possible glycolytic stop or go mechanism. *Anticancer research* 2007; 27(6b): 3963–3971.
- MAZUREK S, SCHEEFERS-BORCHEL U, SCHEEFERS H et al. Die Bedeutung der Pyruvatkinase in der Onkologie. *Notabene Med* 1993; 3: 97–103.
- MAZUREK S, ZWERSCHKE W, JANSEN-DÜRR P et al. Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochem J* 2001a; 356: 247–256.
- MAZUREK S, ZWERSCHKE W, JANSEN-DÜRR P et al. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* 2001b; 20: 6891–6898.

- MCARDLE CS, HOLE DJ et al. Emergency presentation of colorectal cancer is associated with poor 5-year survival. *Br. J. Surg.* 2004; 91: 605–609.
- MISHRA N, HALL J et al. *Clinics in colon and rectal surgery* 2012; 25(2): 67–82.
- MOERTEL CG, FLEMING TR, MACDONALD JS et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1995; 13: 2936–2943.
- MORSON BC. The polyp - cancer sequence in the large bowel. *Roy Soc Med* 1974; 67: 451–457.
- MULDER SA, VAN LEERDAM ME, VAN VUUREN AJ et al. Tumor pyruvate kinase isoenzyme type M2 and immunochemical fecal occult blood test: performance in screening for colorectal cancer. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2007; 19(10): 878–882.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Bethesda guidelines 1997.
- NAWA T, KATO J, KAWAMOTO H et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patients characteristics, Cancer morphology and histology. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23: 418–423.
- NELSON RL, DOLLEAR T, FREELS S et al. The relation of age, race and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 193–197.
- NG SC, BERNSTEIN CN, VATN MH et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 2013; 62(4): 630–649.
- NIH NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2011 2014.
- O'BRIEN MJ, WINAWER SJ, ZAUBER AG et al. The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1990; 98: 371–379.
- ONIEVA-GARCIA MA, LLANOS-MENDEZ A, BANOS-ALVAREZ E et al. A systematic review of the clinical validity of the Cologuard genetic test for screening colorectal cancer. *Revista clinica espanola* 2015; 215(9): 527–536.

OORT FA, TERHAAR JS, VAN DER HULST RWM et al. Colonoscopy-controlled intra-individual comparisons to screen relevant neoplasia: faecal immunochemical test vs. guaiac-based faecal occult blood test. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2010; 31(3): 432–439.

OREMEK GM, EIGENBRODT E, RÄDLE J et al. Value of the serum levels of the tumor marker TUM2-PK in pancreatic cancer. *Anticancer research* 1997; 17: 3031–3033.

OREMEK GM, MULLER R, SAPOUTZIS N et al. Pyruvate kinase tumor M2 plasma levels in patients afflicted with rheumatic diseases. *Anticancer research* 2003; 23(2a): 1131–1134.

OREMEK GM, SAPOUTZIS N, KRAMER W et al. Value of tumor M2 (Tu M2-PK) in patients with renal carcinoma. *Anticancer research* 2000; 20: 5095–5098.

OREMEK GM, TEIGELKAMP S, KRAMER W et al. The pyruvate kinase isoenzyme tumor M2 (Tu M2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma. *Anticancer research* 1999; 19(2599-2601).

Physical activity and cancer prevention - data from epidemiologic studies.

POX CP, SCHMIEGEL W et al. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 2013; 138(49): 2545.

PRAKASAM G, IQBAL MA, BAMEZAI RNK et al. Posttranslational Modifications of Pyruvate Kinase M2: Tweaks that Benefit Cancer. *Frontiers in oncology* 2018; 8: 22.

QUMSEYA BJ, COE S, WALLACE MB et al. The effect of polyp location and patient gender on the presence of dysplasia in colonic polyps. *Clinical and translational gastroenterology* 2012; 3: e20.

R. CORE TEAM. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2014.

RAJPUT A, ROMANUS D, WEISER MR et al. Meeting the 12 lymph node (LN) benchmark in colon cancer. *J Surg Oncol* 2010; 102(1): 3–9.

RANSOHOFF DF. What is the role of iFOBT in screening for colorectal cancer? *Gut* 2007; 56(10): 1343–1344.

- REGULA J, RUPINSKI M, KRASZEWSKA E et al. Colonoscopy in colorectal cancer screening for detection of advanced neoplasia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 1863–1872.
- REID ME, MARSHALL JR, ROE D et al. Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12: 1006–1011.
- REINACHER M, EIGENBRODT E et al. Immunohistological demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M2-Pk) in tumors of chicken and rat. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1981; 37: 79–88.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT. Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2010; 7.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT. Darmkrebs - Zentrum für Krebsregisterdaten 2013: 3.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT. Darmkrebs: Rückläufige Trends setzen sich fort 2014.
- ROSS M, NOWACKI TM, EVESLAGE M et al. Das Risiko eines kolorektalen Karzinoms für Patienten mit Colitis ulcerosa – eine Single-Center-Untersuchung: Patienten mit Colitis ulcerosa - eine Single-Center-Untersuchung. *Z Gastroenterol (Zeitschrift für Gastroenterologie)* 2013; 51(08).
- SAPOUTZIS N, OREMEK GM et al. Evaluation of Tumor M2 Pyruvatekinase Values in Patients with Lung Diseases. In: Pirker R (ed): 8th Central European Lung Cancer Conference 2002; Vienna, Austria. Monduzzi Editore S.p.A. Medimond Inc 2002: 75–80.
- SCHACKERT G. Oligometastasierung – was geht noch, wenn Hirnmetastasen dazukommen?: Präsidentin der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH); Direktorin der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Dresden anlässlich des 133. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin.  
<http://www.medmix.at/oligometastasierung-hirnmetastasen/> 2016.
- SCHÄFER M, ALTENHOFEN L, STILLFRIED D GRAF VON et al. Darmkrebsprävention: Teilnahmeraten stagnieren – mehr Information erforderlich. *Dtsch Arztebl International* 2012; 109(11): A-528-A-530.
- SCHALHORN A, KOLLIG F, TYMPNER C et al. Manual Gastrointestinale Tumoren. München: Zuckschwerdt: Sendler A, Hrsg; 2006.

- SCHALHORN A, SIEBECK M, BUMM R et al. Kolonkarzinome, Manual Gastrointestinale Tumoren. Manual Gastrointestinale Tumoren 2013; 9: 215–234.
- SCHEBO BIOTECH AG. ScheBo® • M2-PK Quick™ -Test. <https://www.schebo.de/produkte/schebo-m2-pk-stuhltest/> 2015.
- SCHEBO® BIOTECH AG. ScheBo® • Tumor M2-PK™ ELISA Stuhltest: Biomarker „M2-PK“ im Stuhl als Parameter für kolorektale Polypen und Tumoren. <https://www.schebo.de/produkte/schebo-m2-pk-stuhltest/schebo-tumor-m2-pk-elisa-stuhltest/> 2014.
- SCHLINGENSIEPEN I. 8 Jahres Bilanz - Akzeptanz für Darmkrebs Früherkennung gering. Im Focus Onkologie 2011; 5.
- SCHMIEGEL W, REINACHER-SCHICK A, ARNOLD D et al. Update S3-guideline "colorectal cancer". Z Gastroenterol. 2008; 46: 799–840.
- SCHNEIDER J, MORR H, VELCOVSKY HG et al. Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. Cancer Detect Prev 2000; 24: 531–535.
- SCHUMPELICK V. Kurzlehrbuch Chirurgie, 181 Tabellen; 2006.
- SHASTRI YM, LOITSCH S, HOEPFFNER N et al. Comparison of an established simple office-based immunological FOBT with fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) for colorectal cancer screening: prospective multicenter study. The American journal of gastroenterology 2008a; 103(6): 1496–1504.
- SHASTRI YM, NAUMANN M, OREMEK GM et al. Prospective multicenter evaluation of fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) as a screening biomarker for colorectal neoplasia. Int J Cancer. 2006; 119(11): 2651–2656.
- SHASTRI YM, STEIN JM et al. Faecal tumour pyruvate kinase M2: not a good marker for the detection of colorectal adenomas. British journal of cancer 2008b; 99(8): 1366.
- SHAW SY, BLANCHARD JF, BERNSTEIN CN et al. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. The American journal of gastroenterology 2010; 105(12): 2687–2692.
- SHIKE M, WINAWER SJ, GREENWALD PH et al. Primary prevention of colorectal cancer. Bulletin of the World Health Organization 1990; 68 (3): 377–385.

- SIEGEL R, DESANTIS C, JEMAL A et al. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 2014; 64(2): 104–117.
- SINCIC BM, VUCELIC B, PERSIC M et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2006; 41(4): 437–444.
- SITHAMBARAM S, HILMI I, GOH KL et al. The Diagnostic Accuracy of the M2 Pyruvate Kinase Quick Stool Test--A Rapid Office Based Assay Test for the Detection of Colorectal Cancer. *PloS one* 2015; 10(7): e0131616.
- Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas.
- SOBIN LH, WITTEKIND CH et al. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th edition; 2002.
- SPODEN GA, ROSTEK U, LECHNER S et al. Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation, cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply. *Experimental cell research* 2009; 315(16): 2765–2774.
- STEINKE V, ENGEL C, BUTTNER R et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Deutsches Arzteblatt international* 2013; 110(3): 32–38.
- TAKADA H, OHSAWA T, IWAMOTO S et al. Changing site distribution of colorectal cancer in Japan. *Dis. Colon Rectum* 2002; 45: 1249–1254.
- TECHNIKER KRANKENKASSE. *Darmkrebsfrüherkennung* 2015.
- TERRY MB, NEUGUT AI, BOSTICK RM et al. Risk factors for advanced colorectal adenomas: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11: 622–629.
- THOMAS GT. *Interpreting Diagnostic Tests* 2015.
- TONUS C, NEUPERT G, SELLINGER M et al. Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK. *World Journal of Gastroenterology WJG* 2006; 12(43): 7007–7011.
- TONUS C, SELLINGER M, KOSS K et al. Faecal pyruvate kinase isoenzyme type M2 for colorectal cancer screening: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology WJG* 2012; 18(30): 4004–4011.
- TORIBARA NW, SLEISENGER MH et al. Screening for Colorectal Cancer. *N Engl. J Med* 1995; 332: 861–867.

- TRAINER AH. Extra-colonic manifestations of familial adenomatous polyposis coli. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 656: 119–127.
- UGUREL S, BELL N, SUCKER A et al. Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma. *Int J Cancer.* 2005; 117: 825–830.
- VASEN HF, BLANCO I, AKTAN-COLLAN K et al. Mallorca group revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013; 12: 4943–4950.
- VEELEN CW VAN, VERBIEST H, ZÜLCH KJ et al. L-alpha-alanine inhibition of pyruvate kinase from tumors of the human central nervous system. *Cancer Research* 1979; 39: 4263–4269.
- VOGEL T, DRIEMEL C, HAUSER A et al. [Comparison of different stool tests for the detection of cancer of the colon]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 2005; 130(14): 872–877.
- VOGELSANG H. Studienprotokoll, Verbundprojekt "familiärer Dickdarmkrebs" 2000: 4–6.
- VOGELSANG H, HOLINSKI-FEDER E, GROSS M et al. Hereditäre Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltrakts.: Manual Tumorzentrum München, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Gastrointestinaler Tumoren 2001; 6: 3–24.
- VOGELSTEIN B, FEARON ER, HAMILTON SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9): 525–532.
- WALKOWIAK J, BANASIEWICZ T, KROKOWICZ P et al. Fecal pyruvate kinase (M2-PK): a new predictor for inflammation and severity of pouchitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2005; 40(12): 1493–1494.
- WHITLOCK EP, ET AL. et al. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2008a; 149(9): 638–658.
- WHITLOCK EP, LIN JS, LILES E et al. Screening for colorectal cancer: a targeted, updated systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2008b; 149: 638–658.

- WITTEKIND C, MEYER HJ et al. TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage. Wiley-VCH; 2010.
- YANG SK, YUN S, KIM JH et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-2005: a KASID study. *Inflammatory bowel diseases* 2008; 14(4): 542–549.
- YEASMIN F, ALI MA, RAHMAN MA et al. A comparative study of chemical and immunological method of fecal occult blood test in the diagnosis of occult lower gastrointestinal bleeding. *Bangladesh Medical Research Council bulletin* 2013; 39(2): 52–56.
- YUHUI J, XINJIAN LI, WEIWEI Y et al. PKM2 Regulates Chromosome Segregation and Mitosis Progression of Tumor Cells. *Molecular Cell* 2014; 53(1): 75–87.
- ZACCARO C, SARACINO IM, FIORINI G et al. Power of screening tests for colorectal cancer enhanced by high levels of M2-PK in addition to FOBT. *Internal and emergency medicine* 2017; 12(3): 333–339.
- ZANG ZJ, CUTCUTACHE I, POON SL et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes. *Nature genetics* 2012; 44(5): 570–574.
- ZHAN T, HAHN F, HIELSCHER T et al. Frequent co-occurrence of high-grade dysplasia in large flat colonic polyps (>20 mm) and synchronous polyps. *BMC gastroenterology* 2015; 15: 82.
- ZWERSCHKE W, MAZUREK S, MASSIMI P et al. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 1291–1296.

## 14 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all denen meinen besonderen Dank entgegenbringen, ohne deren Hilfe diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Philip D. Hardt, meinem Doktorvater und Betreuer, für die Bereitstellung dieses faszinierenden Themas, der freundlichen Hilfe und Inspiration.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Gerrit Eichner für seine statistische Bewandnis, die fruchtbare Zusammenarbeit und Zeit danken.

Ich danke Dr. Dr. Michael Knitschke und meinem Freund Dr. Parvis Farahmand für seine Korrekturlesung.

Ebenso danke ich Dr. med. Markus Rupp für seine Ratschläge, Hinweise und Anmerkungen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Kröger danke ich für die motivierenden Gespräche und Vorschläge.

Meinen Freunden Dr. Peter Bronsert und Dr. Sylvia Timme-Bronsert danke ich für Ihre Tipps.

Abschließend danke ich meiner Familie und meiner Freundin, Deborah Dorth, für Ihre Unterstützung und Motivation.

## 15 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version und den Druckexemplaren meiner Arbeit nicht veröffentlicht.