

Aus dem Zentrum für onkologische, endokrinologische und
minimalinvasive Chirurgie, Neu-Ulm
PD Dr. med. Bertram Poch

Dendritische Zelltherapie in der palliativen Behandlung des Pankreaskarzinoms – eine immunologische Analyse

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

Vorgelegt im Jahre 2011 von
Yvonne Simone Neuhäusler
geboren in Illertissen

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Bertram Poch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Sven Norbert Reske

Tag der Promotion: 13.07.2012

Meinem Bruder Julian und meiner Tante Anna gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		III
1 Einleitung		1
1.1	Das Pankreaskarzinom	1
1.2	Therapiestandards beim Pankreaskarzinom	5
1.3	Spezifische Immuntherapie: Dendritische Zelltherapie	7
1.4	Immunologie	9
1.5	Klinische Relevanz der Dendritischen Zelltherapie	11
1.6	Patientenverhalten Standardtherapie / Zusatztherapie	12
1.7	Fragestellung und Ziel der Analyse	12
2 Material und Methoden		14
2.1	Patienten	14
2.2	FACS	17
2.3	Herstellung von Dendritischen Zellen	20
2.4	Bestimmung der CD4+ / CD8+-Ratio	25
2.5	Statistiken	26
3 Ergebnisse		27
3.1	Überlebenszeiten	27
3.2	Immunstatus unter Therapie mit Dendritischen Zellen	35

3.3	Therapiekosten	38
4	Diskussion	39
4.1	Therapieansätze	39
4.2	Überlebenszeiten	45
4.3	Immunologie	46
4.4	Patientenzahlen	48
4.5	Therapiekosten im Vergleich	48
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	53
	Abbildungsverzeichnis	67
	Tabellenverzeichnis	68
	Danksagung	69
	Lebenslauf	70

Abkürzungsverzeichnis

1-JÜR	1-Jahresüberlebensrate
3-JÜR	3-Jahresüberlebensrate
5-FU	5-Fluorouracil / 5-Fluoruracil
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
A	Arteria / Arterie
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Aufl	Auflage
CA	Karzinom
CBR	clinical benefit rate
CD	cluster of differentiation
CHT	Chemotherapie
CT	Computertomographie
DC	dendritic cells / Dendritische Zellen
DNA	DNS / Desoxyribonukleinsäure
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	European Union / Europäische Union
FACS	fluorescence activated cell sorter
FDA	Food and Drug Administration

FITC	Fluoresceinthiocyanat
FSC	Forward Scatter / Durchlicht
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GMP	good manufacturing practice
Hb	Hämoglobin
HLA	human leukocyte antigen
IFN	Interferon
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
LK	Lymphknoten
M	Fernmetastasen
MHC	major histocompatibility complex / Haupthistopatibiltätskomplex
N	Lymphknoten-Metastasen
n	Patientenzahl
NK	Natürliche Killerzellen
OP	Operation
PC5	Phycoerythrin-CY5
PCNP	proliferating cell number antigen
PE	Phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PHA	Phytohemagglutinin
PSA	prostataspezifisches Antigen
QM	Qualitätsmanagement
SD	standard deviation / Standardabweichung
SSC	Sideward Scatter / 90°-Ablenkung

T	Primärtumor
TAP	transporter associated with antigen processing
TGF	transforming growth factor / transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Die Inzidenz des exokrinen Pankreaskarzinoms hat in den vergangenen Jahren weltweit zugenommen. Die Häufigkeit beträgt zehn bis zwölf pro 100.000 Einwohner; das Geschlechterverhältnis liegt bei eins zu zwei für Frauen und Männer. Eine Gesamt-fünfjahresüberlebensrate von 0,4 % macht das Pankreaskarzinom zur vierthäufigsten Krebstodesursache in den westlichen Industriestaaten, sowohl bei Frauen als auch bei Männern [49][86].

Die Erkrankungsraten unterliegen beträchtlichen geographischen Unterschieden, wobei die niedrigste Inzidenz mit 2,2 % in Indien, Singapur und Kuwait und die höchste mit 9 –14 % in den westlichen Industrieländern gefunden wurde. Die zunehmende Inzidenz dieses Tumors über die letzten 70 Jahre kann zum Teil durch die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten und durch eine allgemein höhere Lebenserwartung erklärt werden. Das Pankreaskarzinom ist eine Erkrankung, die vorwiegend die ältere Bevölkerung betrifft. So treten über 80 % der Fälle im Alter zwischen 65 und 75 Jahren auf und weniger als 0,3 % bei unter 40-Jährigen [36][41].

Obwohl die Ätiologie der Erkrankung als unbekannt gilt, ist eine Reihe von Faktoren bekannt, die das Erkrankungsrisiko erhöht. Die wichtigsten Risikofaktoren sind: Zigarettenrauchen, eine ballaststoffarme, fettreiche Ernährung, Alkoholabusus, diverse noch nicht genau identifizierte Karzinogene, chronische Pankreatitis und eine heredi-

täre Form der chronischen Pankreatitis [8]. Diabetes mellitus tritt zwar häufiger bei Patienten mit Pankreaskarzinom auf, gilt aber nicht als Risikofaktor, sondern wird eher als Folge des bestehenden Pankreaskarzinoms gesehen [69][84].

Die Tumore gehen überwiegend vom exokrinen Teil des Pankreas aus. In ungefähr 90 % der vom Drüsenepithel ausgehenden Pankreaskarzinome handelt es sich um Adenokarzinome. Dieser Tumortyp prägt gewöhnlich den Begriff Pankreaskarzinom. Das ductale Adenokarzinom tritt bevorzugt im Pankreaskopf mit 60-70 % auf, 20 % sind im Corpus, 5 % im Schwanzbereich lokalisiert. In 10-19 % ist die gesamte Drüse betroffen [65].

Zur Stadieneinteilung werden die Klassifikationen des American Joint Committee on Cancer (AJCC) (siehe Tabelle 1) und der Union internationale contre le cancer (UICC) (siehe Tabelle 2) benutzt. Die Klassifikation des Pankreaskarzinoms, die Tumorgröße, Invasion von benachbarten Organen, Lymphknotenbeteiligung und das Vorliegen von Fernmetastasen einbezieht, ist entscheidend für die Behandlungsmodalitäten [7].

Das Pankreaskarzinom hat eine unverändert schlechte Prognose. In der palliativen Situation liegt die mediane Überlebenszeit bei drei Monaten. Kein Patient überlebt fünf Jahre [7]. Trotz verbesserter chirurgischer Operationsverfahren in den vergangenen Jahren haben nur Patienten im TNM-Stadium I und II nach Tumorexstirpation und adjuvanter Chemotherapie eine Chance für ein Langzeitüberleben. Die 3-JÜR liegt nach R0-Resektion und CHT bei 30 %, die 5-JÜR nur bei 15 %. Insgesamt leben weniger als 2 % der Patienten länger als fünf Jahre. Im Median überleben Patienten nach R0-Resektion zwischen 17 und 28 Monaten, nach R1/2-Resektion zwischen acht und 22 Monaten [8]. Gründe für die schlechte Prognose sind vor allem die späte Diagnosestellung, eine aggressive Tumorzellbiologie und die weitgehende Therapieresistenz.

Tabelle 1: TNM-Stadien für das Pankreaskarzinom nach AJCC (American Joint Committee on Cancer) [65] (T = Primärtumor, N = regionäre Lymphknoten-Metastasen (LK), M = Fernmetastasen)

Stadium	Beschreibung
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Beweis für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf das Pankreas beschränkt, < 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor auf das Pankreas beschränkt, > 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Ausbreitung jenseits des Pankreas, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior (nicht resektabel)
NX	Regionäre LK-Metastasen können nicht bewertet werden
N0	Keine regionären LK-Metastasen
N1	Regionäre LK-Metastasen (peripankreatisch, am Mizhilus pankretikoduodenal, pylorisch, prox. mesenterial und zöliakal)
MX	Fernmetastasen können nicht bewertet werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (Leber, Lunge, Knochen, Gehirn usw.)
Stadien- gruppierung	I: T1N0M0 bis T2N0M0 II: T3N0M0 bis T1-3N1M0 III: alle T4, M0 IV: alle M1

Tabelle 2: Stadien nach Union internationale contre le cancer (UICC) (modifiziert aus [6]) (T = Primärtumor, N = regionäre Lymphknoten-Metastasen (LK), M = Fernmetastasen)

Stadium	T	N	M	Häufigkeit (in %)
I	1	0	0	10–20
II	2	0	0	20–30
III	1–3	jedes N	0	20–30
IV a	4	jedes N	0	20–30
IV b	jedes T	jedes N	1	20–30

Mögliche Symptome sind Bauchschmerzen, Übelkeit, Gewichtsverlust, Müdigkeit, schmerzloser Ikterus und Depression. Jedoch treten diese meist erst im fortgeschrittenen Tumorstadium auf. Obwohl die partielle oder die totale Pankreatektomie für Patienten die einzige Möglichkeit auf Heilung darstellt, haben zum Zeitpunkt der klinischen Präsentation nur ca 20 % der Patienten resektable Tumore, bei 40 % ist die Erkrankung lokal fortgeschritten und bei den verbleibenden 40 % bereits metastasiert. Eine potenziell kurative Ausgangssituation im Sinne einer chirurgischen Resektabilität ist jedoch Grundvoraussetzung für eine Verbesserung der Langzeitüberlebensrate [7].

Die Prognose für Patienten mit resektablem Tumor ist abhängig von Stadium, Tumorphistologie, Molekulargenetik, perioperativen Faktoren und dem Einsatz postoperativer adjuvanter Therapien [7]. Die chirurgische Therapie des Pankreaskopfkarzinoms ist die partielle Duodenopankreatektomie (Operation nach Whipple), in der Regel wird jedoch heute die pyloruserhaltende Whipple-Operation vollzogen. Bei Corpus- und Schwanzkarzinomen stellt die chirurgische Standardtherapie die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie und Lymphknotendissektion dar. Weiterhin werden adjuvante CHT sowie adjuvante und neoadjuvante Radiochemotherapie eingesetzt, durch

die bei ca. 15 % der Patienten mit resektablen Karzinomen vor der Operation ein Downstaging erreicht werden kann. Bei Patienten mit Fernmetastasierung sollten palliativ Ikterus, duodenale Abflussbehinderung sowie Schmerzen behandelt werden [27]. Diese Situation führt unweigerlich zu Überlegungen der Therapieoptimierung, insbesondere in der palliativen Situation [17][51].

1.2 Therapiestandards beim Pankreaskarzinom

1.2.1 Gemcitabin

In den vergangenen Jahren konnte der positive Einfluss von Gemcitabin (2', 2' Difluorodeoxycytidin), ein difluoriertes Desoxycytidin und Pyrimidin-Analogon, auf die Lebensqualität von Patienten mit Pankreas-CA in der palliativen Behandlung nachgewiesen werden [26][39][86]. Je nach Publikation liegt die mediane Überlebenszeit zwischen 5,6 und 7,1 Monaten [9][40]. Eine radiosensibilisierende Eigenschaft für Gemcitabin konnte mehrmals gezeigt werden [37][38][42]. So ist es möglich, Gemcitabin mit Radiotherapie zu kombinieren und dabei den systemischen Effekt durch Gemcitabin zu steigern – bei gleichzeitig lokaler Kontrolle durch Bestrahlung [35].

Bei Nacktmäusen mit implantierten Pankreaskarzinomzellen wurde eine weitaus geringere Rezidivrate erreicht, wenn adjuvant Gemcitabin nach chirurgischer Resektion appliziert wurde – im Vergleich ohne Gemcitabin-Gabe (28,6 % vs. 70,6 %) [35]. Neben der Verbesserung klinischer Symptome weist Gemcitabin ein günstiges Toxizitätsprofil auf. Es hat mit Übelkeit, Erbrechen, dosislimitierender Myelosuppression, Flu-like-Syndrom (Ödeme, Kopf- und Gliederschmerzen) und kaum Alopezie im Vergleich zu anderen Zytostatika geringe Nebenwirkungen. Daher wird Gemcitabin sowohl in adjuvanten Therapiemodalitäten als auch standardmäßig in der Firstline-Therapie beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom verwendet [33][35].

1.2.2 5-Fluorouracil

Bis vor zehn Jahren galt in Europa auch 5-Fluorouracil als Standard in der Therapie des Pankreaskarzinoms. 5-FU ist ein Analogon des Pyrimidins. Durch Tetrahydrofolsäure bzw. Folinsäure wird die Wirkung von 5-FU verstärkt. Dieser Effekt wird für Kombinationstherapien genutzt. Capecitabin stellt ein orales Prodrug von 5-Fluorouracil dar, ein inaktiver pharmakologischer Stoff, der erst durch Metabolisierung im Körper aktiv wirkt.

Bereits 1997 konnte Burris in einer Studie zeigen, dass Gemcitabin 5-FU überlegen ist bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom: Die Ansprechrate von Gemcitabin betrug 24 % im Vergleich zu 5 % bei 5-FU. Auch bei der medianen Überlebensrate war Gemcitabin überlegen: 5,65 Monate gegenüber 4,41 Monaten bei 5-FU. Gemcitabin konnte demnach zu 39 %, 5-FU nur zu 19 % die Krankheit stabilisieren. Zudem ist eine Behandlung mit Gemcitabin bei Patienten sinnvoll, die auf 5-FU refraktär sind [9].

1.2.3 Kombinationen von Chemotherapien

Da Gemcitabin als Standardtherapie gilt, gab es einige Ansätze, es mit anderen Zytostatika zu kombinieren [40][55]. In Phase III-Studien führte die Mischung aus Oxaliplatin oder Cisplatin zu einer Ansprechrate von über 25 %, jedoch zu keinem signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben der Patienten [21][40]. Eine Studie von 2005 zeigte erstmals einen signifikanten Überlebensvorteil für eine Kombination mit Capecitabin, dem oralen Prodrug von 5-FU, und Gemcitabin im Gegensatz zu Gemcitabin als alleinige Therapie [12]. Allerdings konnte in zwei weiteren Phase-III-Studien für diese Kombination kein signifikanter Überlebensvorteil gezeigt werden [23][64].

Eine Studie mit Erlotinib (Tarzeva[®]), einem Tyrosinkinase-Inhibitor, in Verbindung mit Gemcitabin zeigte eine statistisch signifikante Verbesserung, weshalb dieser Arzneistoff seit 2007 gegen metastasiertes Pankreas-CA zugelassen ist. Der Unterschied im medianen Überleben von plus 15 Tagen war zwar klinisch weniger relevant, aber vor allem Patienten, die eine deutliche Hautreaktion in Form von ausgeprägten Exanthenen auf Erlotinib zeigen, profitieren von der Kombination [43]. Bei der Zweitlinientherapie gab es eine Studie nach Versagen von Gemcitabin, die mit einer Kombination aus 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin eine Überlegenheit gegenüber 5-FU oder „Best supportive Care“ beschrieb [56].

Eine Übersicht über die Überlebenszeiten der einzelnen Zytostatika als Mono- wie als Kombitherapie gibt Tabelle 8 in Kapitel 4 dieser Arbeit wieder.

1.3 Spezifische Immuntherapie: Dendritische Zelltherapie

Dendritische Zellen (Dendritic cells – DC) sind Zellen des Immunsystems. Sie stammen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Ihre Funktion ist die Prozessierung und Präsentation von Antigenen (Antigen-präsentierende Zellen = APC – antigen presenting cells). Den APC ist die Fähigkeit vorbehalten, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. Als immunologische Effektorzellen können sie Tumorzellen abtöten. Physiologisch kommen DC unter anderem in Thymus, Milz und den Lymphknoten vor. Mikroskopisch verfügen sie über lange dendritische Ausläufer und sind unregelmäßig geformt [52][60].

DC gelangen über das Blut in die Gewebe, wo sie Antigene zur Vorbereitung der Antigenexpression einfangen – durch Phago- oder Pinozytose. Nach Antigenaufnahme – dabei ist die T-Zellstimulation der DC noch gering ausgeprägt und DC gelten als

unreif – findet das so genannte homing statt: DC verlassen die peripheren Gewebe und wandern zu den zugehörigen lymphatischen Organen, wo sie ausreifen. Chemokine, also regulative Signalproteine, leiten diese Zellmigration. Nach dem homing ist es den DC unmöglich, weitere Antigene zu erkennen und zu prozessieren [60].

Im Paracortex der Lymphknoten können sie besonders effektiv auf T-Zellen wirken: DC können T-Zellen stimulieren, indem sie über ihren Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Klasse-II-Moleküle) die zu Peptiden prozessierten Antigene den T-Zellen präsentieren und sie aktivieren. Dies geschieht unter Ausschüttung bestimmter Zytokine. Die so generierten zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage, die ihnen präsentierten Strukturmerkmale fremder Zellen zu erkennen und sie zu zerstören. Sie sind also fähig, antigenspezifische Immunantworten zu initiieren und zu regulieren [54][71].

Mittlerweile ist es möglich, DC aus verschiedenen menschlichen Geweben zu generieren, zu kultivieren und zu reinigen. Dazu zählen hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark und im peripheren Blut. Für die Herstellung von Tumorstoffen können Dendritische Zellen aus dem Blut der erkrankten Patienten gewonnen werden. Zudem ist eine steigende Anzahl von Tumor-assoziierten Antigenen entdeckt worden, was zu mehreren, neuen Möglichkeiten im Bereich der Immuntherapie bei Tumoren führt [32][54][61][71].

Die Forschung richtet mehr und mehr ihr Augenmerk darauf, die Wirksamkeit von DC weiter zu steigern [46]. Die Arzneimittelzulassungsbehörde der USA, FDA (Food and Drug Administration), ließ erstmals im April 2010 die Vakzine zur Therapie des Prostatakarzinoms zu [13][82]. Die Dendritischen Zellen werden – gemäß dem für diesen individuellen Heilversuch verwendeten Ulmer Hersteller Cabion Technologies – auch als LANEX-DC[®] bezeichnet.

1.4 Immunologie

1.4.1 Lymphozyten

Lymphozyten lösen sämtliche adaptiven Immunantworten aus. Sie zählen zu den weißen Blutzellen, die an ihrer Oberfläche mit verschiedenen Rezeptoren für Antigene versehen sind. Durch Antikörper können die mikroskopisch gleichartig erscheinenden Lymphozyten in Subpopulationen unterteilt werden, die für verschiedene Aufgaben zuständig sind [1][48].

1.4.1.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten reifen im Knochenmark heran. Ihre wichtigste Funktion sind Bildung und Sekretion von Immunglobulinen (Antikörper). Der Antigenrezeptor auf den B-Lymphozyten (= B-Zellrezeptor) ist ein Zelloberflächenimmunglobulin. Nach der Aktivierung durch ein Antigen differenzieren sich B-Lymphozyten: zu langlebigen Gedächtniszellen oder zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen. Sie sind für die humorale Immunantwort verantwortlich [2].

1.4.1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind weiße Blutkörperchen, die aus dem Knochenmark in die Thymusrinde einwandern und dort immunologisch geprägt werden. Sie sind für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor, der ihre Spezifität festlegt. Sie sind durch Rezeptoren gekennzeichnet, die mit den Proteinen des CD3-Komplexes assoziiert sind. Der CD3-Komplex aktiviert die T-Lymphozyten. Diese werden aufgrund der akzessorischen Oberflächenantigene CD4+ und CD8+ funktionell in zwei Gruppen eingeteilt [47].

CD4-T-Zellen sind T-Zellen, die das Corezeptorprotein CD4 tragen. Sie erkennen Peptide, die aus dem Inneren von Vesikeln stammen und an die MHC-Klasse-II- Moleküle gebunden sind. Sie differenzieren sich in Untergruppen: [47]

- TH1-Zellen aktivieren vor allem Makrophagen und Killerzellen. Man bezeichnet sie als inflammatorische CD4-T-Zellen.
- TH2-Zellen regen durch die Ausschüttung von Interleukinen die B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern an. Man bezeichnet sie auch als CD4-T-Helferzellen [47].

CD8-T-Zellen sind T-Zellen, die den Marker CD8 tragen und selektiv Zellen zerstören können. Dafür heften sie sich mit ihrem Rezeptor an die befallenen Körperzellen. Sie erkennen Antigene von intrazellulären Krankheitserregern (insbesondere Viren) sowie von Tumoren, die ihnen durch MHC-Komplexe präsentiert werden. Sie differenzieren sich zu zytotoxischen CD8-T-Zellen [47].

1.4.1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK) gehören zum angeborenen Immunsystem; sie besitzen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren. Sie können Tumorzellen und virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten – mithilfe ihrer natürlichen zytotoxischen Rezeptoren, die mit MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche der abnormalen Zellen reagieren [47].

1.4.2 Messung der Immunfunktion

In der vorliegenden Arbeit werden die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Lymphozyten gemessen, denn Patienten mit Pankreas-CA leiden unter einer

systemischen Dysfunktion des Immunsystems [58]. Eine Arbeit von Poch et al. zeigt, dass es zwar keine Unterschiede in der Verteilung der Immunozyten gibt, wohl aber eine signifikant verminderte Reaktion der Lymphozyten nach Stimulation mit PHA (Phytohemagglutinin) sowie Anti-CD3-Antikörper.

Durch Zytokine im Serum kommt es demnach zu einer Verschiebung in Richtung TH2-Zellen (T-Helfer 2). TH2-Zellen setzen vermehrt Interleukine frei (IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10). TH1-Zellen (T-Helfer 1) produzieren u.a. IL-2 und gelten als inflammatorisch.

Neben Poch konnten auch Schmitz-Winnenthal et al. erhöhte Level von TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha) und TGF-beta (transforming growth factor) finden. Diese beiden Zytokine können Zelldifferenzierung- und proliferation, Apoptose sowie Ausschüttung anderer stimulierender Faktoren anregen und somit das Immunsystem bei Krebspatienten langfristig herabsetzen [58][70].

1.5 Klinische Relevanz der Dendritischen Zelltherapie

Es gibt zwischenzeitlich zahlreiche Publikationen über die Wirkung Dendritischer Zellen in der Tumorthherapie. Ein Großteil dieser Veröffentlichungen lässt einen Benefit für die Patienten erkennen. So gibt es bereits über 60 Publikationen, insbesondere zu Malignem Melanom und Prostatakarzinom [10][59]. Bei Pankreaskarzinom sind es deutlich weniger, insbesondere bei prospektiven Untersuchungen.

1.6 Patientenverhalten

Standardtherapie / Zusatztherapie

Aufgrund der beschriebenen schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms gibt es kaum Patienten, die sich nicht der Standardtherapie mit Zytostatika und – sofern möglich – Operation unterziehen.

Etwa 70 % der Patienten des Zentrums für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie fragen nach weiteren Optionen, zum Beispiel Homöopathie, Vitamine, Immuntherapien, Methoden aus der ganzheitlichen Medizin oder allgemein in den Bereichen Sport und Ernährung. Nach ausführlicher Aufklärung und Darstellung entscheiden sich 50 % der Erkrankten für eine Immuntherapie mit Dendritischen Zellen.

Immer häufiger zeigt es sich, dass sich Patienten vorab über diese Therapie informiert haben, insbesondere über das Internet oder persönliche Kontakte wie in Selbsthilfegruppen. Wegen des möglichen Benefits bezüglich Lebensqualität und -verlängerung wurde der Wunsch einer Zusatztherapie der Patienten bezüglich Dendritischer Zellen im Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm akzeptiert [18].

1.7 Fragestellung und Ziel der Analyse

Die Patienten, welche an einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinom (Stadium UICC IV) leiden und Dendritische Zellen auf eigenen Wunsch erhalten, bilden die Grundlage dieser Analyse.

Diese Arbeit beinhaltet mehrere Fragen. Im Wesentlichen soll herausgefunden werden, inwieweit die zusätzliche Therapie mit Dendritischen Zellen die mediane Über-

lebenszeit verlängert gegenüber publizierten historischen Daten. Zum anderen soll im Rahmen dieses individuellen Heilversuchs analysiert werden, wie sich der Immunstatus der therapierten Patienten verändert.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Im Zeitraum von Dezember 2001 bis Oktober 2010 erhielten 134 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, die in dem vorliegenden individuellen Heilversuch aufgenommen wurden, Immunisierungen als palliative Therapie mit Dendritischen Zellen. Davon waren 58 weiblichen und 76 männlichen Geschlechts. Die mediane Zeit zwischen Erstdiagnose (ED) und erster Behandlung mit DC betrug 1,4 Monate in einem Bereich von 0,1 und 24,3 bzw. 10,1 Monaten. Die Patienten waren zwischen 31 und 87 Jahre alt, das Durchschnittsalter betrug 63,9 Jahre. Bei 26 Erkrankten lag das UICC Stadium IV a und bei 108 IV b vor (siehe Tabelle 3).

38 Patienten (28 %) hatten ein Lokalrezidiv. Metastasen konnte man wie folgt finden: 84 Mal in der Leber (63 %), 30 Mal im Peritoneum in Form einer Peritonealkarzinose (22 %), 16 Mal in der Lunge (12 %) und je fünf Mal in den Knochen und den retroperitonealen Lymphknoten (je 4 %). Eine Übersicht über den Metastasierungsstatus ist in Tabelle 4 dargestellt.

Zehn Patienten lehnten eine CHT ab und wünschten DC als alleinige Behandlung. Die anderen 124 Patienten erhielten neben Dendritischen Zellen eine Therapie mit Zytostatika. Diese setzte sich folgendermaßen zusammen: 110 Erkrankte erhielten Gemcitabin, vier Patienten 5-FU und ein Patient Mitomycin als Zytostatika-Monotherapie. Sechs Patienten wurde neben Gemcitabin Oxaliplatin gegeben und zwei Patienten die

Tabelle 3: Übersicht über die 134 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom aus dem Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010 (*n* = Patientenzahl, UICC = Union internationale contre le cancer)

Patientenzahl	n=134 (Follow-up-Rate: 100 %)
Alter	63,9 Jahre (31–87)
weiblich	58
männlich	76
UICC Stadium IV a	26
UICC Stadium IV b	108
Beobachtungszeitraum	12/2001 – 10/2010

Kombination aus Gemcitabin und 5-FU. Ein Patient erhielt die Mischung aus 5-FU und Oxaliplatin.

Bei 25 Patienten wurden während der Therapie mit DC ein Immunstatus erhoben und eine Reihe immunologischer Untersuchungen veranlasst.

2.1.1 Aufklärung des Patienten

Jeder Patient wurde in einem ausführlichen Gespräch über seine evidenzbasierten Therapiemöglichkeiten aufgeklärt und diesen bei Zustimmung zugeführt. In Bezug auf die Therapie mit Dendritischen Zellen wurde explizit darauf hingewiesen, dass es sich hierbei um einen so genannten individuellen Heilversuch handelt, da die Behandlung wissenschaftlich noch nicht als evidenzbasiert gilt. Über diesen individuellen Heilversuch bekam jeder Patient eine schriftliche Ausfertigung der Aufklärung. Dabei wurde nochmals der Therapieansatz erklärt. Diese Aufklärung wurde umfassend dokumentiert und vom Patienten unterschrieben. Erst dann wurde mit der Dendritischen Zelltherapie begonnen.

Tabelle 4: Übersicht über die Metastasierung der 134 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom aus dem Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010

Metastasierungsstatus	Patienten	Prozent
Lebermetastasen	84	63
Peritonealmetastasen	30	22
Lungenmetastasen	16	12
Knochenmetastasen	5	4
Lymphknoten (retroperitoneal)	5	4

2.1.2 Einschlusskriterien

Als Einschlusskriterium für diese Analyse galt, dass sich die Therapie ausschließlich an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom richtete. Die Diagnose musste jeweils histologisch gesichert sein. Zudem mussten die Patienten schriftlich mit dem individuellen Heilversuch einverstanden sein. Erkrankte im finalen Endstadium mit einer Lebenserwartung unter sechs Wochen wurden dabei ausgeschlossen, da die Möglichkeit der zweiten Immunisierung gegeben sein sollte. Zusammengefasst waren die Einschlusskriterien also folgende:

- Tumorstadium UICC IV
- Lebenserwartung > sechs Wochen
- Aufklärung über standardmäßige, evidenzbasierte Therapie
- Aufklärung über individuellen Heilversuch mit DC
- Unterschrift zu individuellem Heilversuch

2.1.3 Evaluierung der Daten

Wenn Patienten in der Klinik oder direkter Betreuung durch das Zentrum für onkologische, endokrinologische oder minimalinvasive Chirurgie verstarben oder Angehörige den Todeszeitpunkt dort telefonisch bekannt gaben, wurden diese Daten in die Krankenakten aufgenommen. Ansonsten wurden die Todesdaten über die Standes- bzw. Einwohnermeldeämter der Gemeinde und Städte evaluiert: Diese wurden allesamt schriftlich angeschrieben und um Auskunft über den Todeszeitpunkt gebeten. 89 % der Daten wurden darüber gewonnen, 11 % über die oben genannte unmittelbare Kenntnis.

2.2 FACS

Bei dem Akronym FACS (fluorescence activated cell sorter) handelt es sich um eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson. Dennoch steht dieses Akronym meistens als Synonym für die Durchflusszytometrie. Dieses Gerät erlaubt die Analyse von Zellen durch Emission optischer Signale mit Hilfe eines Lasers. Damit lassen sich Zellpopulationen nach Größe, Anzahl und Granulation unterscheiden. Dies gelingt durch deren Oberflächenantigene. Für die Messung müssen die Zellen durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, denn dieser dient – konjugiert an Antikörper – zur Markierung von bestimmten Stoffen oder – wie hier – Zellen. Somit ist ein primär qualitativer Nachweis bestimmter Oberflächenantigene möglich.

Hier kam als Fluoreszenzfarbstoff das Fluochrom Propidium Iodid (= 3,8-diamino-9-phenyl-10-ethyl-phenanthridinumbromid) zur Anwendung, das sich zwischen die Basen der DNA einlagert. Durch die Kopplung an das Fluochrom handelt es sich um direkte/ primäre Immunfluoreszenz. Propidium Iodid wird durch einen Laser mit einer Emission bei 488 nm zur Fluoreszenz angeregt und emittiert rötliches Licht [48][85].

2.2.1 Ablauf des FACS

Die zu messenden Zellen befinden sich in einer Lösung. Die Lösung wird zur Durchflusszytometrie durch eine Kapillare gedrückt, so dass ein Flüssigkeitsstrom mit einzelnen Zellen entsteht. Der Flüssigkeitsstrom passiert den Laserstrahl, mit dem verschiedene Parameter der Zelle gemessen werden und der jeweilige Flüssigkeitsstrom kann durch Ablenkungsplatten in das richtige Gefäß umgeleitet werden. Die Photomultiplier weisen das Licht nach, das die Zellen emittieren. Je nach Menge des Lichts kann auf Komplexität und Größe der Zellen geschlossen werden. Das Seitwärtsstreu-licht (SSC = Sideward Scatter; 90°-Ablenkung) hängt von Granulierung, Anzahl der Vesikel sowie Größe des Zellkerns ab. Volumen und Zellgröße beeinflussen das Vorwärtsstreu-licht (FSC = Forward Scatter; Durchlicht). Ein Computer analysiert die Informationen. Abbildung 2 stellt die beschriebenen Schritte dar.

Die Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Expression der Oberflächenmoleküle in jeder Zelle. Diese Expressionsrate wird als Histogramm dargestellt. Abbildung 1 zeigt die Verteilung von Zellen durch eine FACS-Analyse im Vollblut [73].

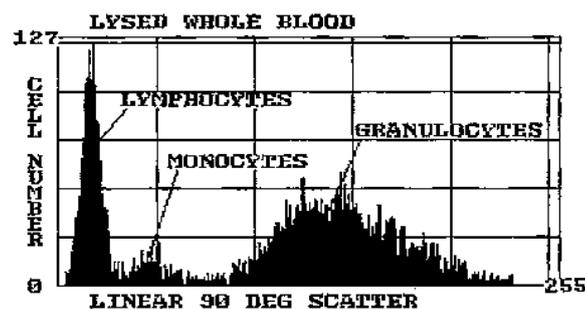


Abbildung 1: Beispiel-Histogramm: Verteilung von markierten Leukozyten im Vollblut (aus [73])

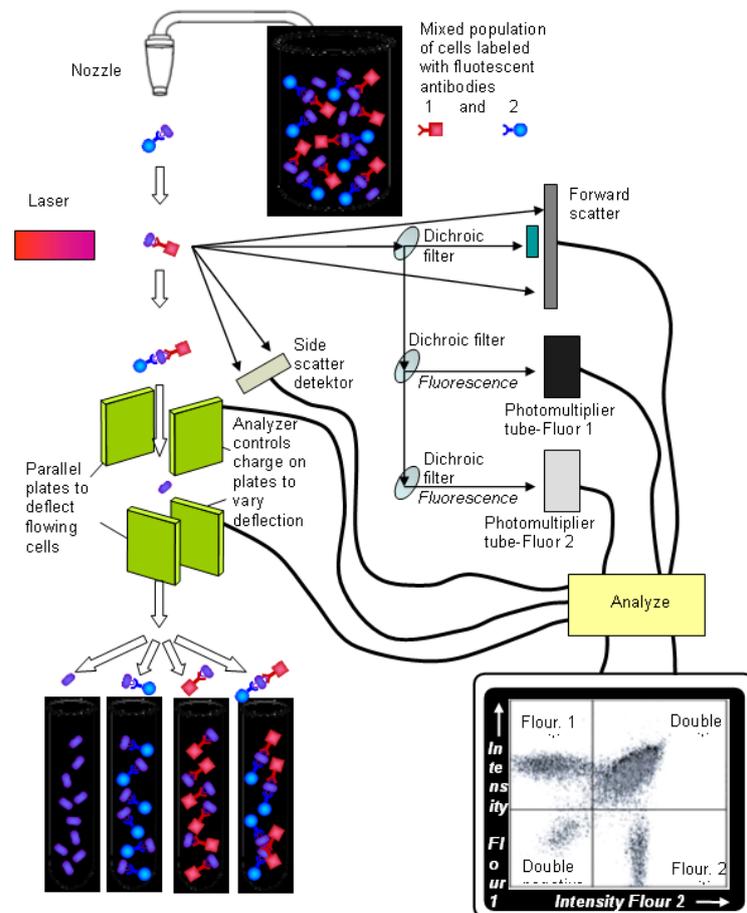


Abbildung 2: Schema einer FACS-Analyse (Abbildung: Siegfried Reule, Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie, Ulm) (FACS = fluorescence activated cell sorter)

2.2.2 Bestimmung des Immunstatus im peripheren Blut

Die Bestimmung des Immunstatus stellt eine Art Leistungsnachweis der Immuntherapie dar. Es soll gezeigt werden, welche Zelltypen und in welcher Anzahl die jeweiligen Populationen im Blut enthalten sind. Wenn eine spezifische Immunthera-

pie Erfolg hat, sollten insbesondere die CD8-Zellen ansteigen. Für den Immunstatus müssen die peripheren Lymphozyten im Vollblut gemessen werden. Um diese zu differenzieren, wurde eine vierfarbige Immunfluoreszenz verwendet. Diese wurde bereits von Laer et al. beschrieben [34]. Außerdem wurden die folgenden Maus-anti-Mensch Antikörper hierfür gebraucht: anti-CD3-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD4-APC, anti-CD45-Percep, anti-CD56-56 und anti-CD19-APC (alle Dianova Hamburg, Deutschland).

2.3 Herstellung von Dendritischen Zellen

2.3.1 Isolation

Um Vorläuferzellen zur Generation von Dendritischen Zellen zu gewinnen, werden dem Patienten – je nach Vitalität – 150 ml bei einem Hb-Wert < 10 mg/dl und 250 ml Blut bei einem Hb-Wert > 10 mg/dl abgenommen. Über die jeweilige Menge der Abnahme bestimmt der behandelnde Arzt; der Hb-Wert ist nicht nach dem Qualitätsmanagement (QM) validiert. Für die Herstellung werden mindestens 100 ml Blut benötigt. Die Lagerung des Blutes erfolgt bei Raumtemperatur. Dem Blutentnahmebeutel ist Heparin (0,2 µl/ml) zur Antikoagulation zugesetzt. In diesem Beutel dürfen keine Anzeichen für Hämolyse oder Blutgerinnsel sein. Im Labor der Cabion Technologies GmbH in Ulm wird die Herstellung in einem Reinraum der Klasse D (null Partikel pro Kubikmeter) vorgenommen, der den aktuellen europäischen Richtlinien zur Herstellung von Arzneimitteln entspricht (EU-GMP/European Union - good manufacturing practice). Die Herstellung ist dem zuständigen Regierungspräsidium angezeigt.

Das Blut wird mittels Zentrifugation in verschiedene Fraktionen unterteilt: Lymphozyten werden von Erythrozyten und Granulozyten getrennt, welche verworfen wer-

den. Aus den im weiteren Arbeitsverlauf gewonnenen Lymphozyten werden die Dendritischen Zellen gezüchtet.

2.3.2 Inkubation

Die Inkubation, also die Bebrütung, dauert insgesamt sieben Tage. Die selektive Züchtung der DC geschieht nach mehreren Reinigungsschritten in einer Zellkulturschale mit Nährlösung, die für den Ausreifungsprozess mit Wachstumsfaktoren versetzt wird. Auf der Zellkulturschale sinken die Zellen nach und nach ab. Die Dendritischen Vorläuferzellen adhären an der Plastikoberfläche des Schalenbodens. Dieser Vorgang läuft in einem Zellbrutschrank mit konstanten Parametern – 37 °C Temperatur sowie 5%igem Kohlendioxid Luftgemisch – und unter sterilen Bedingungen ab [18][71].

2.3.3 Reifung

Am Anfang der Ausreifung werden den Monozyten IL-4 und GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) in Kultur zugegeben. Das Kulturmedium beinhaltet 10 % autologes Serum. GM-CSF ist ein Glykoprotein, das Zellen des Immunsystems und des Endothels physiologisch ins Blut abgeben. In vivo kann GM-CSF die Differenzierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in Granulozyten und Makrophagen bewirken.

Das Pulsen der Dendritischen Zellen, also die Zugabe des Antigens, erfolgt an Tag eins und vier mittels der GMP-konformen Zugabe von 1000 U/ml rekombinanten Antigenen ins Zellkulturmedium, um die spezifische Zytotoxizität zu steigern. Dies soll die „Eigenpulsung“ durch das Serum verstärken. Abbildung 3 zeigt die Schritte der DC-Herstellung.

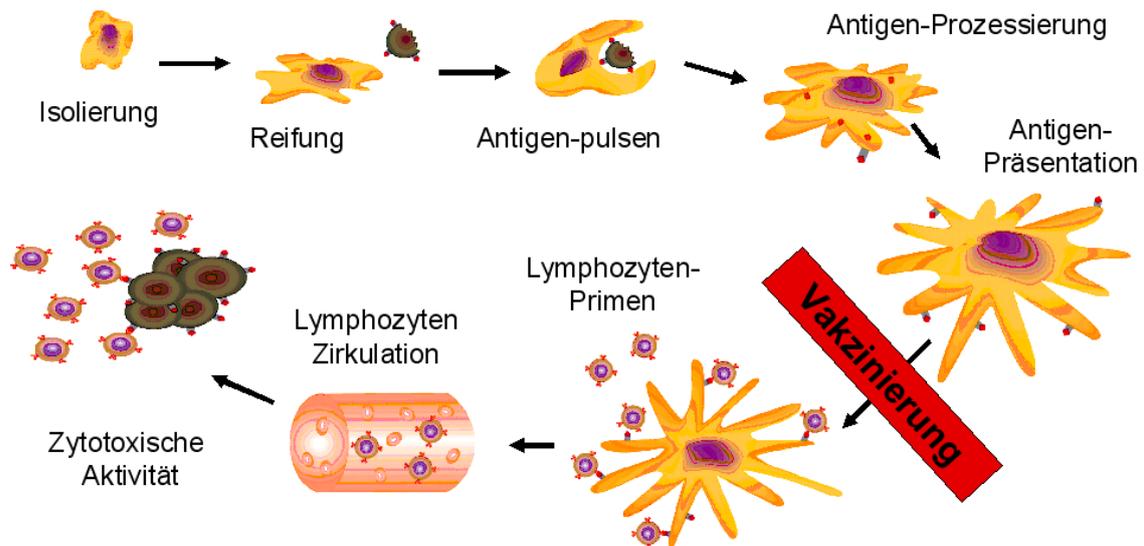


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips zur Herstellung Dendritischer Zellen (Schema: Firma Cabion Technologies, Ulm)

Während der sieben Tage dauernden Züchtungsphase wird die Ausreifung der Zellen immer wieder mikroskopisch kontrolliert: Durch ihre dünnen, haarähnlichen Ausläufer lassen sie sich leicht von anderen Zellen unterscheiden (Abbildung 4). Bei den Kontrollen spielen folgende Akzeptanzkriterien eine Rolle: keine Kontamination, keine Anzeichen für Zelltod sowie erkennbare mononukleäre Zellen.

2.3.4 Validierung

Bevor die Zellen gerntet werden, wird ein Teil davon mittels Durchflusszytometrie auf spezifische Cluster of differentiation hin untersucht und überprüft. Die Validierung des Produkts, also der DC, stellt eine überprüfende Maßnahme dar: Es wird aufgezeigt, ob der Herstellungsprozess zum gewünschten Produkt führt.

Für das Ansetzen der Antikörpermischungen für die durchflusszytometrische End-

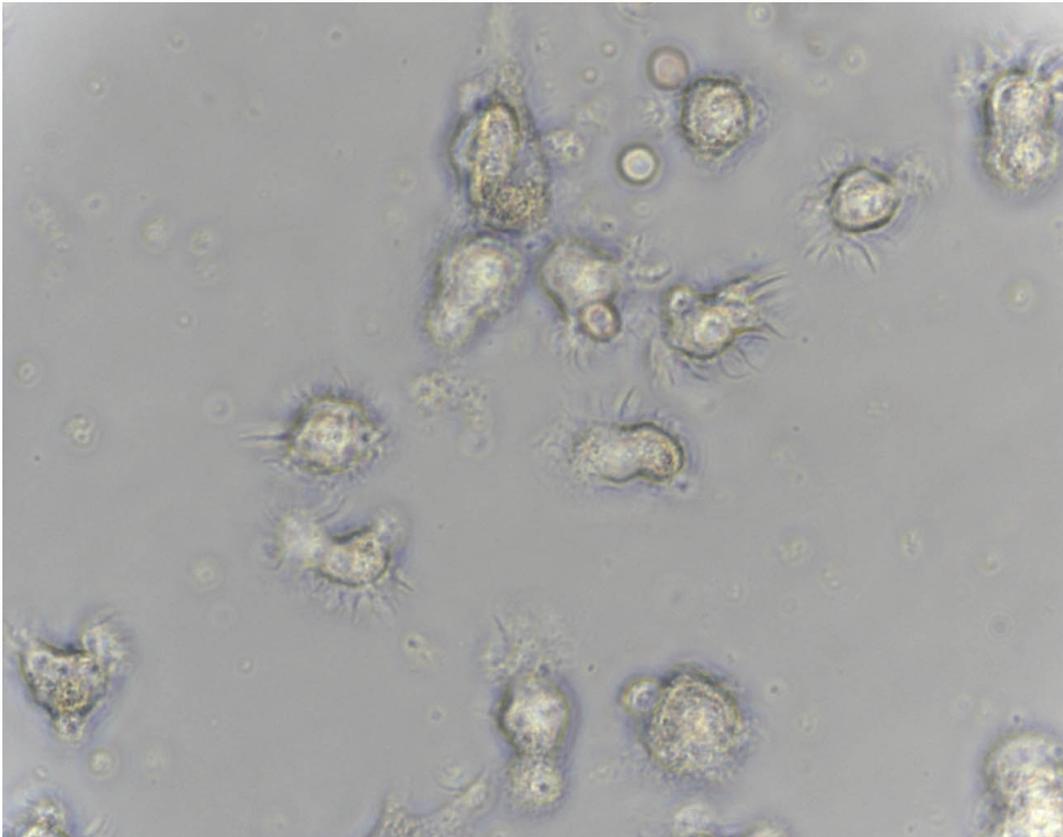


Abbildung 4: Dendritische Zellen unter dem Invertoskop während ihrer einwöchigen Inkubation im Labor der Firma Cabion Technologies in Ulm (Bild: Firma Cabion Technologies, Ulm; Gerät: Invertoskop Zeiss Axiovert 2,0)

kontrolle der DC verwendet die Firma Cabion Technologies folgende Antikörper: IgG1-FITC-Isotyp, IgG2a-PE-Isotyp, IgG1-PC5-Isotyp, IgG2a-PC5-Isotyp, HLA-DR-FITC, CD86-PE, CD3-PC5, CD14-PC5, CD16-PC5, CD19-PC5, CD20-PC5, CD56-PC5. Neben HLA-DR-FITC sind CD-86 sind CD1, CD80, CD83 bezeichnend für DC, da sie diese Oberflächenmoleküle exprimieren. Die Materialien stammen alle von der Firma Beckman-Coulter aus Krefeld.

Abbildung 5 zeigt einen Ausdruck der FACS-Kontrolle von Dendritischen Zellen mit den verwendeten Antikörpern. Die erste (weiße) Kurve auf den sechs Bildern zeigt

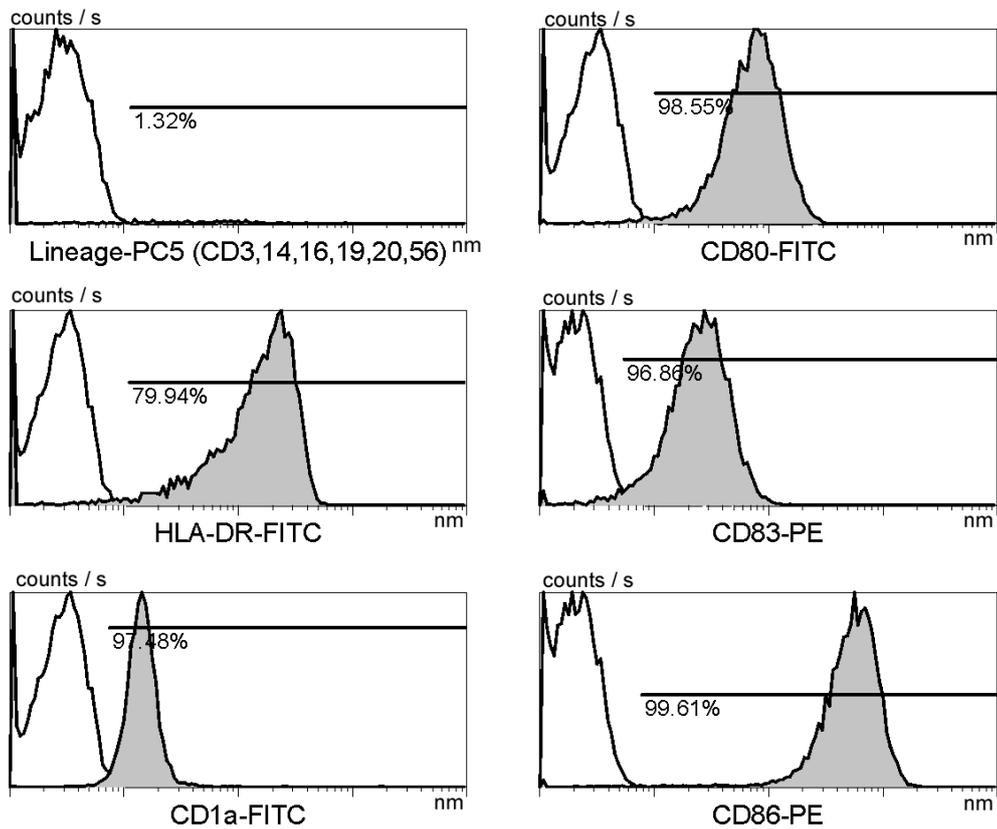


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Phänotypisierung einer Kultur von Dendritischen Zellen am siebten Tag (Diagramme: Firma Cabion Technologies, Ulm): Die Abbildung stellt die Klassifikation der Dendritischen Zellen dar. (PC5 = Phycoerythrin-CY5, CD = cluster of differentiation, FITC = Fluoresceinthiocyanat, HLA = human leukocyte antigen, PE = Phycoerythrin)

dabei je die Negativkontrolle, die als Kontrollwert dient. Bei den fünf Bildern, auf denen je zwei Kurven abgebildet sind, wurde zur ersten Probe, der Negativkontrolle, je eine zweite Probe zugegeben und gemessen, die als graue Kurve dargestellt ist. Die Prozentzahl gibt je die vorhandene Menge an Zellen im Vergleich zum Kontrollwert an.

Bei der Herstellung der DC wird nach mehrfacher Reinigung die Hälfte der gezüchteten Zellen für die erste Immunisierung in kleine Spritzen (zwei Mal 5 ml) aufgezogen, um sie ins abdominale Subcutangewebe zu applizieren. Die andere Hälfte (zwei Mal 5 ml) wird bei -196°C eingefroren und erst vor der zweiten Immunisierung aufgetaut [18][77].

2.4 Bestimmung der CD4+ / CD8+-Ratio

Der CD4 / CD8-Quotient gibt das numerische Verhältnis der Lymphozytenpopulationen CD4 (Helferzellen) und CD8 (zytotoxische Zellen) an. Er wird im Vollblut oder in der bronchoalveolären Lavage bestimmt. Die Helferzahl ist ein Maß für den Zustand des Immunsystems. Eine erniedrigte Ratio findet man insbesondere bei Tumoren und akuten Virusinfekten. Eine Erhöhung z.B. bei Psoriasis, multipler Sklerose oder Aborten.

Hier wurden für die CD4+ / CD8+-Ratio zusätzlich 2,4 ml EDTA-Blut bei der Routine-Blutentnahme entnommen. Die Bestimmung erfolgte mittels Durchflusszytometrie im immunologischen Labor der Firma Cabion Technologies, Ulm [18].

2.5 Statistiken

Für die Auswertung der Daten wurde die Gaußsche Normalverteilung vorausgesetzt. Die Statistiken dieser Arbeit wurden mit der Medcalc[®] Software berechnet. Die Signifikanzgrenze wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Um die Signifikanzen zu erhalten, wurde mit dem t-Test gerechnet. Die Bestimmung erfolgte paarig; der Immunstatus wurde bei 25 Patienten je vor und nach der DC-Gabe berechnet. Ebenfalls mit dieser Software wurde grafisch die Mortalität als Überlebenskurven nach Kaplan-Meier dargestellt. Die Überlebenszeiten wurden wieder mit dem t-Test bestimmt und verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Überlebenszeiten

3.1.1 Besonderheiten der Patienten

Alle in diesen individuellen Heilversuch aufgenommenen Patienten mit gesichertem Pankreaskarzinom im UICC Stadium IV erhielten Dendritische Zellen als Therapie. 124 Patienten bekamen zusätzlich eine palliative Chemotherapie (92,5 %). Zehn Patienten lehnten eine Behandlung mit Zytostatika ab und entschieden sich für DC als alleinige Therapie (7,5 %). Im Durchschnitt wurde die erste Vakzinierung 1,4 Monate (0,1–24,3 Monate) nach Stellung der Erstdiagnose vorgenommen. Zwei Patienten starben zwischen erstem und zweitem Intervall der Immunisierung. Elf Erkrankte waren zum Ende des Beobachtungszeitraums noch am Leben. Das Überleben wurde ab Erstimmunisierung berechnet.

Es zeigte sich zwar keine statistische Signifikanz ($p=0,063$) beim Ansprechen der Therapie bezüglich des Geschlechts (58 weibliche und 76 männliche Patienten), doch zeigte sich dass Frauen tendenziell länger überlebten (10,5 Monate) als Männer (8,0 Monate). Eine Signifikanz ließ sich beim Alter der Erkrankten nachweisen ($p=0,022$): Jüngere Patienten unter 60 Jahre ($n=46$) lebten mit 10,3 Monaten tendenziell länger als Patienten über 60 Jahre ($n=88$) mit 8,0 Monaten.

3.1.2 Besonderheiten der kultivierten Dendritischen Zellen

Nach sieben Tagen der Kultivierung wurden mittels Durchflusszytometrie die costimulatorischen Moleküle gemessen. Der Reifungsprozess der DC konnte anhand der hohen CD-Werte im Vergleich zur Kontrolle dokumentiert werden. Es zeigte sich eine ersichtliche Erhöhung von CD 80 (98,55 %), CD 83 (96,86 %), CD 86 (99,61 %) und CD1a (97,48 %). Auch die HLA-Klasse II-Moleküle stiegen auf 79,94 % an. Die mikroskopischen Kontrollen der Kulturen zeigten die typischen Dendritischen Zellen mit ihren dünnen, faserigen Ausläufern, wie sie in Abbildung 6 zu sehen sind.

Die erste Immunisierung erhielten die Patienten in der Regel sieben Tage nach der Blutentnahme und der daraus folgenden Anzuchtung. Die Zeit zwischen erster und zweiter Immunisierung konnte variieren. Die zweite Gabe der DC wurde sechs bis acht Wochen nach der ersten Subcutanspritzung angestrebt. 80 % bis 90 % der Patienten erhielten sie auch in diesem Zeitraum. Aus logistischen Gründen wurde der Zeitraum jedoch auch unter- oder überschritten (mindestens drei, maximal 15 Wochen nach der ersten Gabe von DC).

3.1.3 Nebenwirkungen

Die Erkrankten vertrugen die Immuntherapie gut, so dass keine schwerwiegenden, klinischen, unerwünschten Nebenwirkungen auftauchten: 19 Patienten (14,1 %) entwickelten Fieber bis 38,5 °C (Grad II gemäß der Toxizitätskriterien der WHO), das nach ein bis zwei Tagen verschwand und keiner Therapie bedurfte. Es konnten weder allergische oder autoimmune Reaktionen noch hämatologische, hepatische oder renale Toxizität beobachtet werden.

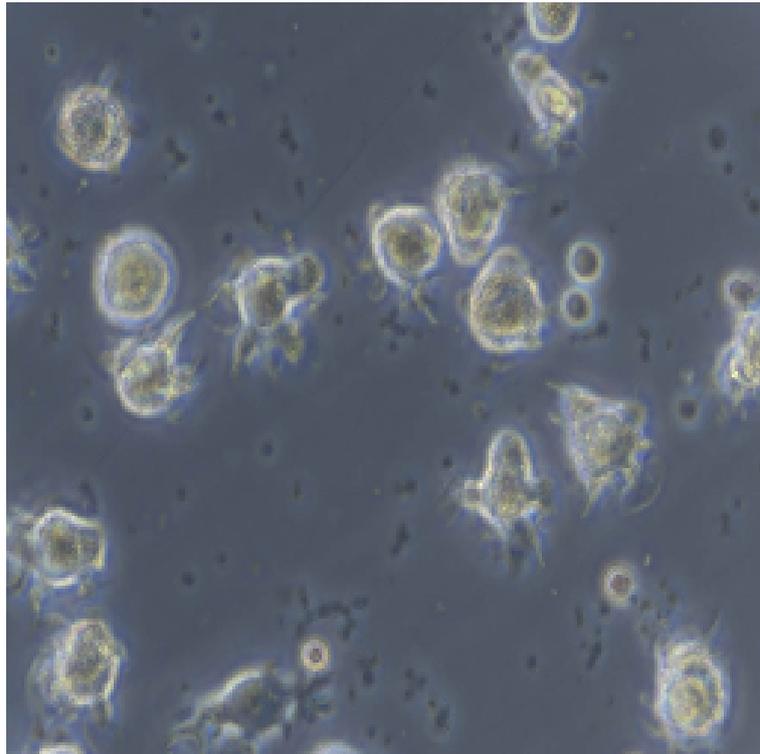


Abbildung 6: Dendritische Zellen (DC) am siebten Tag der Herstellung unter dem Invertoskop im Labor der Firma Cabion Technologies in Ulm (Gerät: Invertoskop Zeiss Axiovert 2,0): Ab diesem Zeitpunkt können die DC den Patienten verabreicht werden. (Bild: Cabion Technologies, Ulm)

3.1.4 Verlauf und Überleben

Eine komplette Remission trat in keinem Fall ein. Drei Monate nach Behandlung zeigten 63 Erkrankte (47 %) eine stabile Erkrankung. 18 Patienten (13,4 %) erzielten ein partielles Ansprechen und 53 Erkrankte (39,6 %) hatten einen Tumorprogress. Diese Ergebnisse beruhten auf bildgebenden Verfahren wie Computertomographie oder Sonographie. Die Ergebnisse der Ansprechrate zeigt Tabelle 5.

Die Ergebnisse zur Überlebensrate werden in Tabelle 6 dargestellt. Das Überleben wurde festgesetzt ab Beginn der DC-Therapie. Die Überlebensrate nach sechs Mona-

Tabelle 5: Übersicht über die Ansprechrate unter der Therapie mit Dendritischen Zellen im Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm: Es wurden dort 134 Patienten mit Pankreaskarzinom in der palliativen Situation zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010 mit DC behandelt. Zehn Patienten erhielten davon DC als Monotherapie, 124 Patienten bekamen DC in Kombination mit Chemotherapie. (DC = Dendritische Zellen, n = Patientenzahl)

Klinische Effekte	Patienten (n=134)	Prozent
Vollständiges Ansprechen	0	0
Teilweises Ansprechen	18	13,4
Stabile Erkrankung	63	47
Progressive Erkrankung	53	39,6

ten betrug 72,2 % und nach neun Monaten 50,4 %. Nach zwölf Monaten waren 30,0 % und nach 18 Monaten 14,4 % der Patienten noch am Leben (Tabelle 6). 1,3 Monate war die kürzeste, 50,5 Monate die längste Überlebenszeit. Tabelle 6 zeigt zudem die prozentualen Überlebenszeiten ab ED. Die mediane Überlebenszeit der 134 Patienten betrug 8,9 Monate ab Beginn der DC-Therapie, wie die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 7 verdeutlicht.

3.1.5 Dendritische Zell- und Chemotherapie

Zehn Patienten lehnten eine CHT ab, wohingegen 124 Patienten eine Behandlung mit Zytostatika erhielten, davon 110 Erkrankte Gemcitabin als Monotherapie. Die mediane Überlebenszeit der Gruppe mit CHT lag bei 9,0 Monaten, wohingegen in der Gruppe ohne CHT die Patienten im Median 5,9 Monate überlebten. Die Patienten mit zusätzlicher Zytostatika-Behandlung lebten damit signifikant länger ($p=0,044$). Es zeigt

Tabelle 6: Übersicht über die Überlebensrate unter der Therapie mit Dendritischen Zellen im Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm: Es wurden dort 134 Patienten mit Pankreaskarzinom in der palliativen Situation zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010 mit DC behandelt. Zehn Patienten erhielten davon DC als Monotherapie, 124 Patienten bekamen DC in Kombination mit Chemotherapie. (DC = Dendritische Zellen, ED = Erstdiagnose)

Überlebensrate	ab DC-Behandlung (in %)	ab ED (in %)
6 Monate	72,2	84,3
9 Monate	50,4	71,6
12 Monate	30,0	47,7
18 Monate	14,4	24,6

te sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorstadien ($p=0,117$; siehe Abschnitt 3.1.8).

3.1.6 Frühe Dendritische Zelltherapie nach Erstdiagnose

Ein früher Beginn mit DC-Behandlung nach Stellung der Erstdiagnose eines fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms erhöhte signifikant die mediane Überlebenszeit ($p = 0,029$): Patienten ($n=85$), die binnen von zwei Monaten nach ED mit der DC-Therapie starteten, lebten 10,4 Monate gegenüber 7,6 Monate bei jenen Patienten ($n=49$), die später als zwei Monate mit dieser Behandlung begannen. Abbildung 8 zeigt die Kaplan-Meier-Analyse.

3.1.7 Wiederholung der Dendritischen Zelltherapie

Patienten, die DC wiederholt erhalten haben, überlebten signifikant länger ($p = 0,027$): Die mediane Überlebenszeit der Gruppe mit einmaliger DC-Gabe betrug 9,0 Monate,

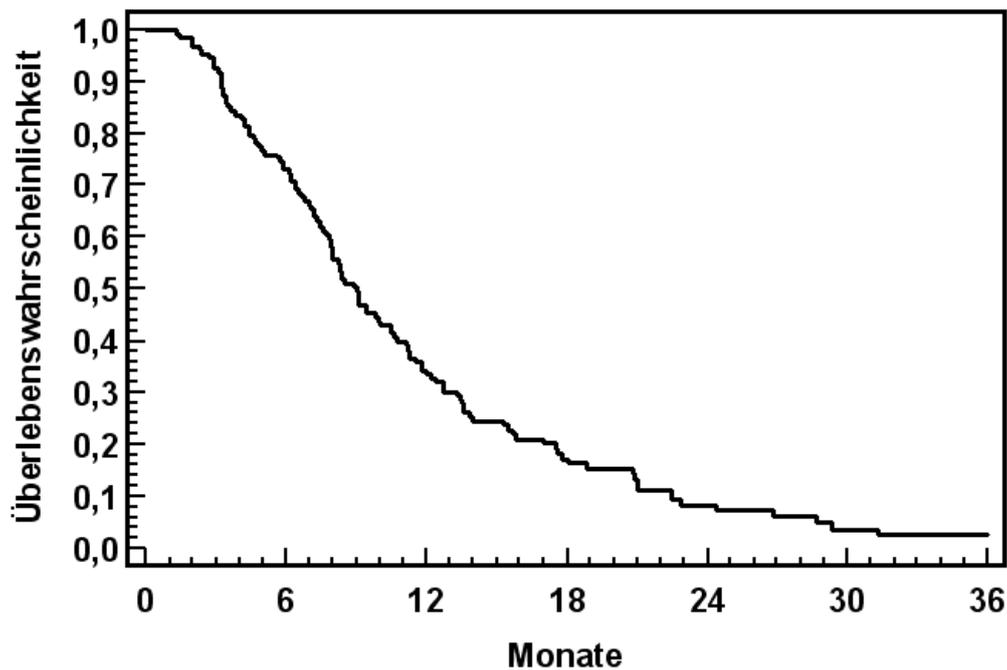


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse bei Patienten mit Pankreaskarzinom mit LANEX-DC[®] additiv als palliative Therapie: Überlebenswahrscheinlichkeit ab Erstimmunisierung. Das mediane Überleben der 134 Patienten aus dem Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm lag bei 8,9 Monaten während des Beobachtungszeitraums von Dezember 2001 bis Oktober 2010. (DC = Dendritische Zellen)

während diese in der Gruppe mit mehrmaliger Behandlung mit DC bei 13,4 Monaten lag (siehe Abbildung 9). Für diese Analyse wurden nur die Patienten (n=112) hinzugezogen, die auch die Möglichkeit hatten, DC wiederholt zu bekommen und die mindestens vier Monate nach Beginn der DC-Therapie überlebten. 79 Patienten erhielten einmalig, 33 Patienten bis zu fünf Mal die Immuntherapie. Der Durchschnitt lag bei 2,36 Zyklen.

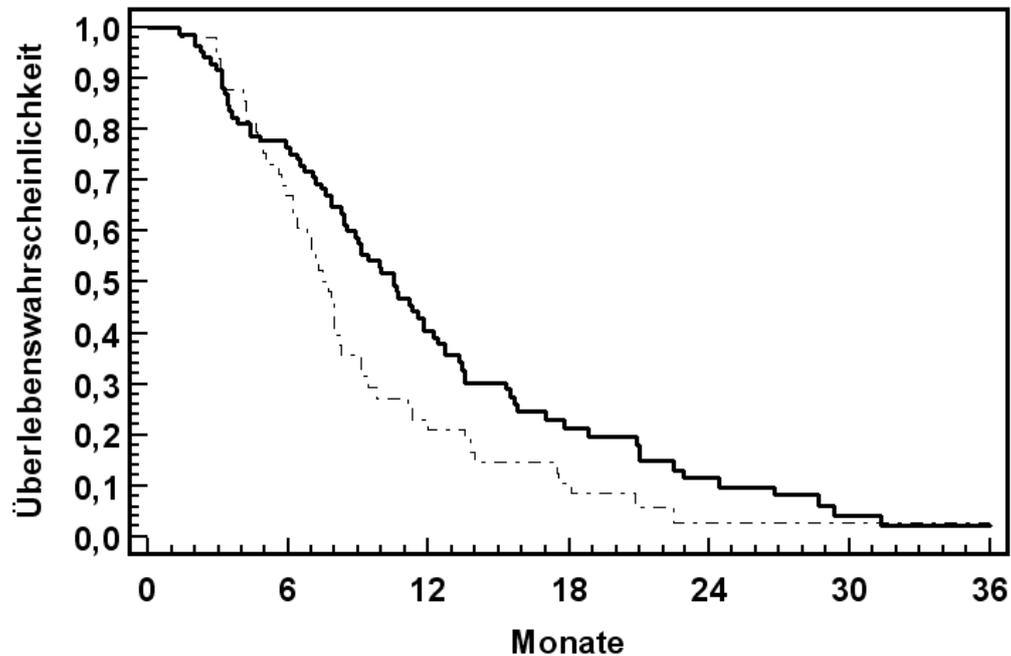


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse bei Patienten mit Pankreaskarzinom in der palliativen Situation mit einem Therapiebeginn < 2 ($n = 85$) versus > 2 ($n = 49$) Monate nach ED zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010: Einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im medianen Überleben ab Erstimmunisierung zeigte ein schnellstmöglicher Start der Behandlung mit DC im Neu-Ulmer Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie: 10,4 Monate (durchgezogene Kurve: — Therapiebeginn < 2 Monate nach ED) gegenüber 7,6 Monate (gestrichelte Kurve: - - - Therapiebeginn > 2 Monate nach ED). ($n =$ Patientenzahl, DC = Dendritische Zellen, ED = Erstdiagnose)

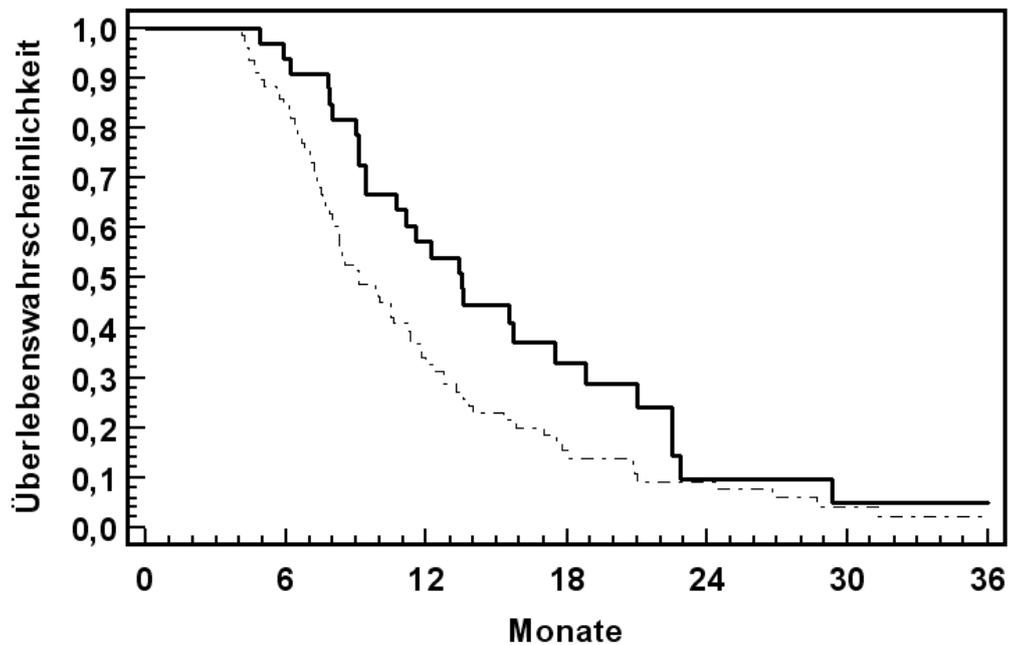


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse bei Patienten mit Pankreaskarzinom mit einmaliger ($n = 79$) versus mehrmaliger ($n = 33$) Gabe von LANEX-DC[®] als palliative Therapie: Signifikant länger mit 13,4 Monaten ($p < 0,05$) überlebten die Patienten, die mehrere Male DC erhielten (durchgezogene Kurve: — mehrmals LANEX-DC[®]). Bei Patienten mit einmaliger Gabe von DC lag die mediane Überlebenszeit bei 9,0 Monaten (gestrichelte Kurve: - - - einmalig LANEX-DC[®]). Alle Patienten wurden im Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010 behandelt. (n = Patientenzahl, DC = Dendritische Zellen)

3.1.8 Einfluss von Tumorstadium, Rezidiven und Metastasen

26 Patienten wurden dem Tumorstadium UICC IV a und 108 Patienten UICC IV b zugeordnet. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen den Stadien ($p=0,117$): 10,0 Monate bei UICC IV a und 8,4 Monate bei UICC IV b.

Patienten, bei denen eine folgende Operation ($n=96$) nicht möglich war, wiesen eine kürzere mediane Überlebenszeit von 8,0 Monaten auf im Vergleich zu 11,8 Monaten bei Patienten mit Rezidiv, bei denen eine folgende Resektion des Pankreastumors möglich war ($n=38$; $p=0,02$). Peritoneale Metastasen beeinflussten die mediane Überlebenszeit nicht ($p=0,935$), während sich Lebermetastasen darauf negativ auswirkten: Patienten mit hepatischen Tochtergeschwülsten ($n=84$) hatten ein medianes Überleben von 7,8 Monaten, Patienten ohne Lebermetastasen ($n=50$) von 12,0 Monaten ($p < 0,0005$). Eine Übersicht darüber gibt Tabelle 7.

3.2 Immunstatus unter Therapie mit Dendritischen Zellen

Alle Patienten, bei welchen der Immunstatus vor und nach der DC-Vakzinierung abgenommen wurde, wurden zur Analyse der Immunantwort herangezogen. Dies war bei 25 Patienten der Fall. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurden folgende Zellen bzw. die Anzahl der jeweiligen Population gemessen:

- T-Lymphozyten
- T-Helferzellen
- T-Suppressorzellen
- Natürliche Killerzellen

- B-Lymphozyten
- T4:T8-Verhältnis

Tabelle 7: Übersicht über den Einfluss von Tumorstadium, Operation und das Vorhandensein von Metastasen auf das Überleben der 134 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010. Zehn Erkrankte wurden mit Dendritischen Zellen allein und 124 Erkrankte in Kombination mit Zytostatika im Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm behandelt. (n = Patientenzahl, UICC = Union internationale contre le cancer)

Befund	Patienten (n=134)	Überleben (Monate)
UICC IV a	26	10,0
UICC IV b	108	8,4
Operation möglich	38	11,8
Operation unmöglich	96	8,0
Lebermetastasen	84	7,8
Keine Lebermetastasen	50	12,0

Die Werte der oben genannten Zellen wurden je vor und nach der ersten Immunisierung mit Dendritischen Zellen gemessen. Abbildung 10 zufolge konnte man also bei den gemessenen Populationen im Durchschnitt je eine Erhöhung der Zellen erzielen. Bei den T-Lymphozyten stiegen bei 14 der 24 Patienten die Zellzahlen an, was eine Signifikanz mit $p < 0,03$ bedeutet. 16 konnten gesteigerte Zahlen bei den CD-4 positiven Helferzellen aufweisen, aber keine Signifikanz ($p < 0,1$).

Ebenfalls 16 an der Zahl waren es bei den CD-8 positiven T-Suppressorzellen: ein hoch signifikantes Ergebnis ($p < 0,001$). Bei den Natürlichen Killerzellen sah das Ergebnis etwas anders aus: Es konnte keine Signifikanz ($p < 0,3$) nachgewiesen werden.

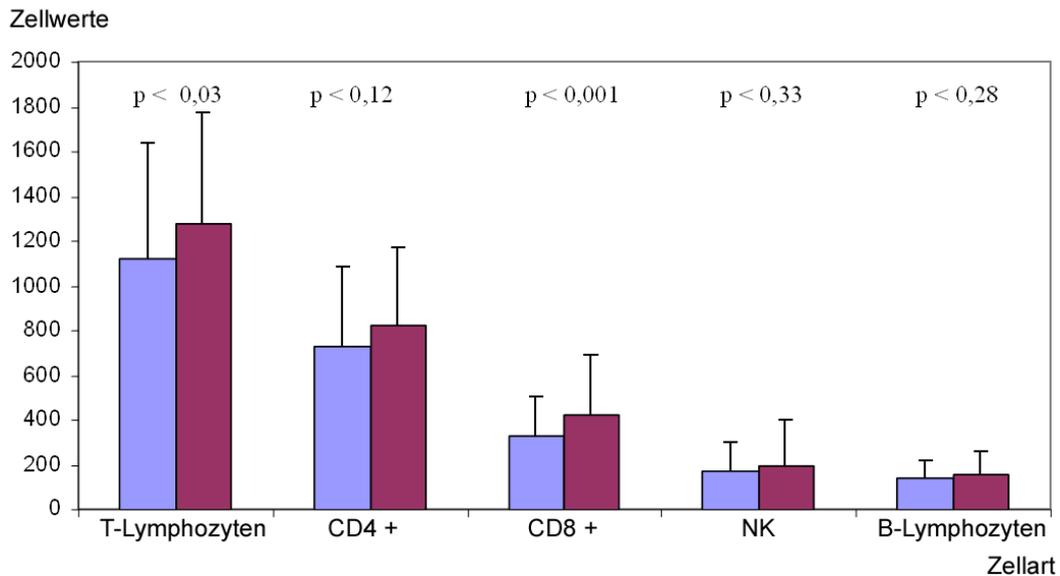


Abbildung 10: Dargestellt sind Mittelwert und SD (standard deviation/Standardabweichung) der gemessenen Lymphozytenwerte (Zellwerte) vor und nach der DC-Therapie bei 25 Patienten aus dem Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm: T- Lymphozyten = $p < 0,03$ (SD = 488,95); CD 4 = $p < 0,12$ (SD = 349,15) und CD 8 = $p < 0,001$ (SD = 261,14); NK = $p < 0,33$ (SD = 200,30) sowie B-Lymphozyten = $p < 0,28$ (SD = 100,85). Die Zellwerte wurden im Labor der Firma Cabion Technologies in Ulm zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010 gemessen. Alle Ergebnisse sind paarig getestet. Pro Zellart stellt jeweils der linke lila Balken den Wert vor der DC-Therapie dar, der rechte weinrote Balken den Wert nach der DC-Therapie. (CD = cluster of differentiation, NK = natürliche Killerzellen, DC = Dendritische Zellen)

14 Patienten verzeichneten hier ansteigende Zahlen. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei den B-Zellen ab: Wieder konnten bei 14 Patienten höhere Zahlen gemessen werden. Es zeigte sich aber keine Signifikanz bei diesen Ergebnissen ($p < 0,2$). 15 Patienten hatten nach der Therapie mit DC eine verminderte CD4:CD8-Ratio, eine Signifikanz von $p < 0,05$.

3.3 Therapiekosten

Die Therapiekosten werden berechnet nach dem medianen Überleben dieser Analyse und beziehen sich nur auf das Medikament (ohne Arzthonorar und ohne Materialbedarf) bzw. die Preise des Herstellers. Bei einem medianen Überleben von 8,9 Monaten liegen die Kosten für Gemzar[®] bei 1752 Euro und bei einmaliger Gabe von LANEX-DC[®], bei 552 Euro, insgesamt also bei 2304 Euro monatlich. Wird mit einem medianen Überleben von 13,4 Monaten - bei Wiederholen der LANEX-DC[®]-Therapie - gerechnet, liegen die Preise dafür bei 1410 Euro; mit Gemzar[®] insgesamt bei 3162 Euro monatlich [39][77].

Eine Übersicht über Kosten, Überlebenszeiten und Nebenwirkungen von Zytostatika und DC gibt Tabelle 9 im Diskussions-Teil wieder.

4 Diskussion

4.1 Therapieansätze

Nach wie vor gilt das Pankreaskarzinom als sehr schlecht therapierbar. Die mediane Überlebenszeit liegt nach R0-Resektion zwischen 17 und 28 Monaten, nach R1/2-Resektion zwischen 8 und 22 Monaten. Die 3-JÜR liegt nach R0-Resektion und CHT bei 30 %, die 5-JÜR nur bei 15 %. In der palliativen Situation liegt der Median bei drei Monaten; 0 % der Patienten erreichen die 5-JÜR. Über alle Stadien hinweg leben weniger als 2 % der Patienten länger als fünf Jahre [8].

Aus diesem Grund ist die Forschung seit Jahren daran interessiert, die Chancen für Erkrankte mit einem Pankreaskarzinom zu verbessern. Es sind in der Literatur zahlreiche Veröffentlichungen zu finden, die sich mit verschiedenen Therapiemöglichkeiten auseinandergesetzt haben, z.B. Operation – sofern möglich – Chemotherapie und anderen Behandlungsansätzen [7][17][51].

4.1.1 Therapieansätze mit Gemcitabin

Bei den Chemotherapien hat sich jene mit Gemzar[®], Wirkstoff Gemcitabin, einigen Studien zufolge als am Effektivsten erwiesen. Dazu hat es einige Veröffentlichungen gegeben [3][9][57]. Gemcitabin weist eine bessere Wirkung als das bisherige

Standardtherapeutikum 5-FU auf [26][86]. Zudem konnte immer wieder eine radiosensibilisierende Eigenschaft von Gemcitabin gezeigt werden, so dass sich dieses Zytostatikum mit Radiotherapie verbinden lässt [37][38][42]. Kombinieren lässt sich Gemcitabin auch mit einigen anderen Zytostatika, so zum Beispiel mit Capecitabin, dem oralen Prodrug von 5-FU, Erlotinib oder anderen Medikamenten. Herausragende Erfolge ließen sich damit nicht erzielen, doch konnte zum Teil das Überleben um einzelne Wochen bis Monate verlängert werden. Eine Übersicht über die medianen Überlebenszeiten unter der Therapie von Gemcitabin kombiniert mit anderen Zytostatika zeigt Tabelle 8.

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden die meisten Patienten mit Gemcitabin behandelt: 110 Erkrankte erhielten Gemcitabin und vier Erkrankte 5-FU als Monotherapie mit Zytostatika. Sechs Patienten wurde neben Gemcitabin Oxaliplatin gegeben und zwei Patienten die Kombination mit 5-FU und Gemcitabin. Je ein Patient wurde mit Mitomycin allein therapiert bzw. ein Patient mit der Mischung aus 5-FU und Oxaliplatin. Zehn der 124 Patienten lehnten eine Chemotherapie ab und wünschten DC als alleinige Behandlung.

4.1.2 Immuntherapie mit Dendritischen Zellen

Laut den erwähnten Studien konnte zwar Gemcitabin die Prognose von Patienten mit Pankreaskarzinom verbessern, aber keine durchbrechenden Erfolge erzielen. Aus diesem Grund werden in der Literatur neue Behandlungen aufgezeigt: Eine potentielle Möglichkeit ist die Immuntherapie, insbesondere jene mit Dendritischen Zellen [31][75].

Diese Therapie findet seit den 90er Jahren Anwendung. Allein die Möglichkeit, Dendritische Zellen anzuzüchten, gilt als Schlüsselschritt in Richtung Erfolg [62]. Die Zellen zählen als effektive Möglichkeit, die Progression von Krebs zu unterdrücken

[32]. DC kamen in den vergangenen zehn Jahren bei der Behandlung vieler bösartiger Tumoren zum Einsatz, so bei Malignem Melanom [10], Nieren- [59], Blasen- [53], Mamma- [32][44], Ovarial- [22], Zervix- [68], Prostata- [4], Bronchial- [28][32], Colon- [67], hepatozellulärem [20] und medullärem Schilddrüsenkarzinom [72]. Weiter bei Gliomen [66], B-Zell-Lymphomen [16], pädiatrischen Tumoren [19] sowie Pankreaskarzinom [45].

4.1.2.1 DC bei Prostatakarzinom

Da insbesondere beim Prostata-CA gute Ergebnisse erzielt werden konnten, hat die FDA im April 2010 DC in den USA – dort mit dem Namen Sipuleucel-T – als Therapie bei diesem Malignom zugelassen [13][82]. Die maßgeblichen Ergebnisse, die zur Zulassung führten, waren die Auswertung zweier randomisierter, doppelblinder Studien: D9901 und D9902A mit insgesamt 225 Patienten mit fortgeschrittenem Prostata-CA. Davon erhielten 147 Teilnehmer Sipuleucel-T und 78 ein Placebo. Die DC-Gruppe hatte ein signifikant längeres Überleben mit 23,2 Monaten ($p=0,011$) als die Placebo-Gruppe mit 18,9 Monaten. Auch die mediane Zeit bis Tumorprogression zeigte sich erhöht: 11,1 Monate versus 9,7 ($p=0,111$) [24].

Keine Bestätigung bezüglich der Zeit bis Tumorprogression, aber hinsichtlich des längeren Überlebens beim fortgeschrittenen Prostata-CA erfolgte mit der publizierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Arbeit von Kantoff 2010 mit 512 Patienten: 341 Teilnehmer wurden mit Sipuleucel-T und 171 mit Placebo behandelt. Die Sipuleucel-T-Gruppe überlebte im Median 4,1 Monate länger als die Placebo-Gruppe (25,8 Monate gegenüber 21,7 Monate; $p=0,03$) [30].

Draube und Kollegen beschrieben das Ergebnis von 29 Versuchen mit insgesamt 906 Patienten bei Prostata-CA sowie Nierenzellkarzinom: Sie führten objektives Ansprechen der Therapie sowie Krankheitsstabilisierung als klinische Ansprechrate (clinical

benefit rate = CBR) zusammen. Die CBR nach DC-Therapie lag für das Prostata-CA bei 54 % und für das Nierenzell-CA bei 48 %. Ein Ansprechen im Sinne einer Immunantwort zeigte sich bei beiden Tumoren zu 95 % [14].

4.1.2.2 DC bei Malignem Melanom

Beim fortgeschrittenen Melanom haben bislang nur Phase II-Studien ihre Wirksamkeit bewiesen: Ridolfi verglich in einer Arbeit Vakzination versus Vakzination mit folgender Therapie wie Operation, CHT oder Bestrahlung (n=24): Ein medianes Überleben von 15 Monaten hatten 14 Patienten mit alleiniger DC-Therapie. Folgt der Immuntherapie weitere Behandlungen (n=11) wurde eine mediane Überlebenszeit von 34 Monaten verzeichnet. Das Ansprechen auf die DC-Therapie allgemein lag bei 37,5 %, die klinische Besserung bei 54,1 %. Fünf Patienten hatten eine stabile Erkrankung [63].

Fünf von 20 Melanom-Patienten hatten in der Publikation von Toh unter DC-Therapie über sechs Monate hinaus keinen Tumorprogress, sieben über den Beobachtungszeitraum eine stabile Erkrankung. Die mediane progressionsfreie Zeit lag bei 2,4 Monaten [83]. Die Arbeiten beinhalten allgemein wenig Patientenzahlen; bislang fehlen Meta-Analysen.

4.1.2.3 DC bei Pankreaskarzinom

Beim Pankreaskarzinom beschreibt Morse 2002 den ersten Erfolg. Er konnte folgendes Ergebnis erzielen: Drei Patienten wurden nach Pankreasresektion mit Dendritischen Zellen behandelt. Nach 2,5 Jahren Beobachtungszeitraum waren alle drei Patienten ohne Rezidiv [45]. Zudem wurde von Morse veröffentlicht, dass alle Patienten die Therapie gut vertragen hatten, ohne dass Nebenwirkungen in Form von zusätzli-

chen Beschwerden aufgetaucht waren [45]. Hirooka bestätigt, dass bei seinen fünf mit DC behandelten Patienten keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse zu sehen waren [25].

Auch die Arbeitsgruppe von Stift führte in mehreren Publikationen auf, dass sich die Behandlung mit autologen DC nicht als toxisch in Bezug auf gesundes Gewebe zeigte und demzufolge als sicher galt. Kein Patient wies Autoimmunität gegenüber der Behandlung auf. Hypersensitivitäts-Reaktionen in Form von Rötung und Schwellung konnten beobachtet werden. Es wird beschrieben, dass DC zytotoxisch auf Tumorzellen wirken. Die klinischen Ergebnisse sind hier auch bei fortgeschrittenen Tumorstadien erreichbar [78][79].

Die vorliegende Arbeit kann bestätigen, dass unter der Therapie mit DC kaum Nebenwirkungen auftraten. Im Sinne einer Immunantwort zeigte sich nach den Applikationen gelegentlich leichtes Fieber, das aber keiner Behandlung bedurfte. Auch Publikationen zu Malignem Melanom und Prostata-CA beschreiben, dass die Patienten die Therapie gut vertragen und keine oder wenige Nebenwirkungen wie Fieber oder Schüttelfrost hatten [15][24][76].

Bezüglich der fortgeschrittenen Stadien des Pankreaskarzinoms hatte Kaneko ein ähnliches, aber nicht so eindeutiges Ergebnis wie diese Arbeit: Seiner Veröffentlichung (Patientenzahlen n=46) zufolge könnten zwar DC – in Verbindung mit standardisierten Therapien – bei fortgeschrittenem Tumor verwendet werden, allerdings würde dies die Überlebenszeit nur wenig verlängern. Die Länge der Überlebenszeit würde von den Metastasen und der Dauer der Kombinationstherapie mit den Standardtherapien abhängen [29].

In der vorliegenden Analyse konnte gezeigt werden, dass die Behandlung Erfolg erzielt bei fortgeschrittenen Stadien des Pankreaskarzinoms in Kombinationen mit Chemotherapeutika, vor allem mit Gemcitabin. Bei den Tochtergeschwülsten waren hier

folgende Organe betroffen: Leber (bei 84 Patienten), Peritoneum (bei 30 Patienten), Lunge (16 Patienten) sowie Knochen und retroperitoneale Lymphknoten (je 5 Patienten). 38 Erkrankte hatten ein Rezidiv.

Es sind kaum prospektive und randomisierte Studien bezüglich Dendritischer Zelltherapie bei Pankreaskarzinom zu finden. Eine randomisierte Studie führten Tan et al. an Mäusen durch: Es zeigte sich, dass jene Tiere mit DC als Therapie weniger IL-4, aber mehr IFN-gamma als in der Kontrollgruppe produzierten – als Ausdruck einer immunstimulierenden und vor allem antitumorösen Wirkung. Zudem wies die Kontrollgruppe keine Hemmung des Tumorwachstums und keine längere Überlebenszeit auf [81].

4.1.3 Kombination aus Dendritischen Zellen und Gemcitabin

Es liegen nur wenige Publikationen vor, die eine Therapie aus DC und Gemcitabin beschreiben. Vereinzelt veröffentlichte Studien stellen lediglich in Aussicht, dass Gemcitabin verbunden mit Immuntherapien wie DC geeignet sein könnte [3]. Bauer testete diese Kombination in einem Tierversuch mit Mäusen aus, die mit Pankreaskarzinom-Zellen beladen wurden. Er kam zu dem Ergebnis, dass die Verbindung aus Gemcitabin und DC auch Rezidive und Metastasen verhindern könnte [5].

Hirooka beschreibt die Mischung von Gemcitabin verbunden mit der Verabreichung von DC ultraschallgesteuert in die – hier inoperablen – Tumoren selbst: drei der fünf Erkrankten sprachen auf die Therapie an. Zwei Patienten hatten eine stabile Erkrankung von mehr als einem halben Jahr, ein Patient eine Teilremission [25]. Soeda verabreichte 28 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreas-CA Gemcitabin: CD14+Monozyten und CD11c+DC proliferierten. Er schlussfolgerte, dass diese Wirkung eine Immuntherapie wie DC unterstützen könnte [74].

In einer Veröffentlichung von 2009 wurden bei elf Patienten mit Pankreas-Ca DC mit CHT verbunden. Eine alleinige Immuntherapie – also ohne CHT – erhielten sechs Erkrankte. Hier heißt es, dass die Kombination aus Zytostatika und DC keinen ersichtlichen höheren Erfolg hat als eine alleinige Verabreichung der Immuntherapie. Beide Gruppen erzielten ein medianes Überleben von neun Monaten [50].

Zu diesem Schluss kommen weder die Publikation von Kaneko noch die vorliegende Arbeit: Eine mediane Überlebenszeit von 5,9 Monaten hatten in dieser retrospektiven Analyse die zehn Patienten mit DC als alleinige Therapie, weil sie CHT ablehnten. 9,0 Monate wiesen dagegen die 124 Patienten mit der Kombination aus DC und CHT auf. Mit dieser dualen Behandlung (n=28) überlebten in der Veröffentlichung von Kaneko 50 % der Patienten 15,8 Monate und nur mit der Immuntherapie (n= 13) 50 % der Erkrankten 14,5 Monate lang [29].

4.2 Überlebenszeiten

Nur wenige Veröffentlichungen gehen konkret auf die Überlebenszeiten ein bzw. haben eine ausreichende Anzahl an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, um diese statistisch auswerten zu können. Ein medianes Überleben von neun Monaten unter Therapie mit DC – egal ob mit oder ohne CHT kombiniert – beobachtete Nakamura wie im vorigen Abschnitt beschrieben bei 17 Patienten [50].

Ein Fallbericht von Stift beschreibt einen Patienten, der über sechs Monate keinen Tumorprogress hatte [78]. Morse konnte bei drei Patienten einen Erfolg erzielen: 2,5 Jahre nach der Therapie mit DC wiesen diese kein Rezidiv auf und lebten noch [45]. 50 % der 13 Patienten überlebten in der Studie von Kaneko 14,5 Monate unter Immuntherapie. Erhielten die Erkrankten zu DC eine Chemotherapie mit Gemcitabin, so waren es bei 50 % der 28 Patienten 15,8 Monate [29]. Eine kürzere Überlebenszeit

weist die hier vorliegende Analyse bei den 134 Patienten auf: 8,9 Monate als mediane Überlebenszeit. Allerdings berichtet diese Arbeit über weitaus mehr Patienten als jene von Kaneko.

Tabelle 8: Übersicht über die medianen Überlebenszeiten bei der Gabe verschiedener Zytostatika und anderer antineoplastischer Mittel bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom (aus [11]) (5-FU = 5-Fluorouracil)

Zytostatikum	Mediane Überlebenszeit (Monate)
Gemcitabin	4,41 - 7,2
Gemcitabin + 5-FU	5,85 - 6,7
Gemcitabin + Capecitabin	7,4 - 8,4
Gemcitabin + Cisplatin	6,9 - 7,5
Gemcitabin + Erlotinib	5,7 - 6,37
Gemcitabin + Oxaliplatin	8,8
Gemcitabin + Cetuximab	7,1
Gemcitabin + Bevacizumab	8,7

Zahlreiche randomisierte Studien haben in den vergangenen Jahren Gemcitabin mit anderen Zytostatika erprobt (siehe Tabelle 8). Durch die Kombinationen konnten durchaus längere Überlebenszeiten beobachtet werden, allerdings lagen diese alle unter der medianen Überlebenszeit dieser Analyse von 8,9 Monaten.

4.3 Immunologie

Es ist in der Literatur keine Arbeit zu finden, die – wie diese Analyse – auf den Immunstatus eingeht mit: T-Lymphozyten, T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, Na-

türliche Killerzellen, B-Lymphozyten und Verhältnis T4 zu T8 mit den jeweiligen Standardabweichungen. Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit diese Zahlen auch explizit aufgearbeitet.

Andere Publikationen richten ihr Augenmerk auf vereinzelte oder andere Parameter als diese Analyse: So geht zum Beispiel Nagaraj explizit auf NK-Zellen ein, aber nicht auf die anderen Lymphozyten [49]. Bei Patienten mit Dendritischen Zellen als Therapie – hier gepulst mit Alpha-Galactosylceramide – zeigte sich eine signifikante Expansion der Interferon-Gamma produzierenden NK, was auch mit einem Tumorregress korrelierte.

Ribas beschreibt die T-Zellen hingegen als Kollektiv ohne Unterteilung [62]. Dafür bestimmt Yanagimoto eine erhöhte Anzahl an immunologischen Parametern wie TGF-beta 1, NK-Zellen sowie das Verhältnis von CD4/8 [87]. Die prospektive und randomisierte Analyse von Tan beschreibt eine vermehrte Produktion von IFN-Gamma sowie eine verminderte Freisetzung von IL-4. In einer Studie über Prostata-CA erhöhten sich signifikant die CD4+ und CD8+ T-Zellen, der Wert des Tumormarkers PSA (prostataspezifisches Antigen) sank [15].

Ebenfalls angestiegene Werte, insbesondere bei den CD8+-T-Zellen, fanden in der Veröffentlichung von Speiser zu Melanom [76]. Bei den Publikationen waren – ebenso wie in der vorliegenden Analyse – die gemessenen Parameter verändert, was auf ein Ansprechen der DC auf das Immunsystem hinwies.

4.4 Patientenzahlen

Allgemein kann man sagen, dass diese Arbeit viel größer ausgelegt war als andere Publikationen: Die vorliegende Analyse hat ein Kollektiv von 134 Patienten und hat damit – im Vergleich zu allen bisherigen Veröffentlichung mit Fallzahlen von eins bis 46 – die höchste Patientenzahl eingeschlossen [29][45][50][87]. Selbst die 25 Patienten dieser Untersuchung, bei denen der Immunstatus verfolgt wurde, überschreiten den Durchschnitt der Fallzahlen der bisherigen Studien. Somit ist die vorliegende Analyse statistisch wesentlich aussagekräftiger als alle bisher publizierten Ergebnisse: Durch diese größere Anzahl an Patienten mit einer Follow-Up-Rate von 100 % und den gewonnenen Ergebnissen lassen sich bessere Voraussagen bezüglich Ansprechen und Überlebenszeit beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom machen.

Zudem lagen Veröffentlichungen vor, die Untersuchungen an Tieren beschreiben, woraus man nicht genau schlussfolgern kann, wie DC bei erkrankten Menschen zu Lebensqualität und -verlängerung beitragen [5][80][81].

4.5 Therapiekosten im Vergleich

Die Therapiekosten (nur Medikament; berechnet je auf das mediane Überleben) pro Monat belaufen sich bei Gemzar[®] auf 1752 Euro und bei einmaliger Gabe von LANEX-DC[®], auf 552 Euro, insgesamt also auf 2304 Euro. Wird die Behandlung mit LANEX-DC[®], wiederholt liegen die Kosten dafür bei 1410 Euro; mit Gemzar[®] insgesamt dann bei 3162 Euro monatlich. Tabelle 9 gibt einen Überblick über Nebenwirkungen, mediane Überlebenszeiten, 1-JÜR sowie Therapiekosten. Die günstigste Variante liegt bei der Monotherapie mit Gemcitabin mit 1752 Euro, allerdings zeigt sich hier die kürzeste Überlebenszeit mit 5,6 Monaten [39].

Die Tabelle verdeutlicht, dass selbst die mehrmalige Gabe aus DC, die sich – hier im Vergleich – mit dem längsten medianen Überleben (13,4 Monate) sowie hohem Prozentsatz (55 %) bei der 1-JÜR auszeichnet, weniger kostet als andere Kombinationen von Zytostatika mit einer geringeren medianen Überlebenszeit sowie geringeren 1-JÜR.

Die deutliche Steigerung der medianen Überlebenszeiten rechtfertigen die Preise für die Immuntherapie. Dagegen haben neue Therapien in der Onkologie immer enorme Kostensteigerungen verursacht. Die Therapiekosten sollten zwar nicht der wesentliche Ausschlag sein, eine Therapie auszuführen. Doch steht das Gesundheitswesen unter enormem wirtschaftlichen Zwang. Da bei gleichem bis besserem Erfolg die Immuntherapie wirtschaftlich günstiger ist, wurden die Kosten in die Diskussion mit einbezogen.

Hinzu kommt, dass die oftmals gefürchtete und schwerwiegende Übelkeit sowie andere typische Nebenwirkungen unter Verabreichung von Chemotherapien bei den DC nicht auftreten [39][77].

Tabelle 9: Vergleich der einzelnen Therapien bezüglich Nebenwirkungen, 1-Jahresüberlebensrate sowie Therapiekosten beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom. Die Berechnung erfolgte anhand der gewonnenen Daten über die 134 Patienten mit Pankreaskarzinom in der palliativen Situation der vorliegenden Analyse. Diese wurden zwischen Dezember 2001 und Oktober 2010 im Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm behandelt. [39]

Therapieregime	Nebenwirkungen	Medianes Überleben	1-JÜR	Therapiekosten pro Monat (nur Medikament)
Gemzar [®] Mono	Ödeme, Übelkeit	5,6 Monate	19 %	1752 €
Gemzar [®] Tarceva	Ödeme, Übelkeit Hautausschlag, Akne	6,6 Monate	22 %	1752 € 2928 € Gesamt: 4780 €
Xeloda [®] Tarceva	Hand-Fuß Syndrom Hautausschlag, Akne	6,9 Monate	23 %	960 € 2928 € Gesamt: 3888 €
Gemzar [®] LANEX-DC [®]	Ödeme, Übelkeit keine	8,9 Monate	30 %	1752 € 552 € Gesamt: 2304 €
Gemzar [®] LANEX-DC [®] (mehrmals)	Ödeme, Übelkeit keine	13,4 Monate	55 %	1752 € 1410 € Gesamt: 3162 €

5 Zusammenfassung

Trotz neuer verbesserter Möglichkeiten in der Diagnostik wird auch heutzutage das Pankreaskarzinom erst sehr spät erkannt. Den meisten Patienten bleibt ein kurativer Ansatz vorenthalten, da es meistens erst zum Zeitpunkt der Metastasierung entdeckt wird. In der Palliativsituation liegt die mediane Überlebenszeit bei drei Monaten, unter Standardtherapien mit Zytostatika bei etwa sechs Monaten.

Neben erprobten Chemotherapien (CHT) mit Gemcitabin, 5-FU (5-Fluorouracil) oder Kombinationen aus Zytostatika sollten deshalb neue Behandlungen betrachtet werden: Immuntherapien, insbesondere jene mit Dendritischen Zellen (DC), die bezüglich Immunologie und Überlebenszeit analysiert werden. DC wurden in diesem individuellen Heilversuch mittels eines speziellen Verfahrens aus Eigenblut der Patienten im Labor über sieben Tage angezchtet und den Erkrankten subcutan zweimalig in einem mehrwöchigen Abstand zurück gespritzt. Hierbei sollte auch analysiert werden, inwieweit das Verfahren mit DC den Immunstatus verändert. Dieser wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, wodurch man die einzelnen Lymphozyten sowie deren Werte messen und unterteilen konnte in: T-Lymphozyten, CD-4-positive Helferzellen, CD-8-positive T-Suppressorzellen, Natürliche Killerzellen und B-Zellen (CD = cluster of differentiation).

In diese Analyse wurden nur jene Patienten im fortgeschrittenen Stadium eingeschlossen, deren Lebenserwartung über sechs Wochen lag. 124 der 134 Patienten erhielten neben der Immunisierung mit DC alle ein Zytostatikum in Mono- oder Kom-

binationstherapie mit einem anderen Zytostatikum. Hier kamen zum Einsatz: Gemcitabin, 5-FU, Oxaliplatin und Mitomycin, wobei am Häufigsten Gemcitabin verabreicht wurde. Zehn Erkrankte lehnten eine CHT ab und entschieden sich für DC als alleinige Behandlung. Ein signifikant längeres Überleben ergab aber die Kombination aus CHT mit DC ($p=0,044$): 9,0 Monate (ohne CHT: 5,9 Monate). Erhielten Patienten DC sogar mehrere Male, konnte eine signifikant längere mediane Überlebenszeit ($p=0,027$) von 13,4 Monaten beobachtet werden. Das mediane Überleben aller Patienten lag bei 8,9 Monaten. Die Überlebenszeit wurde jeweils ab Erstimmunisierung berechnet.

Die immunologische Analyse ergab bei 25 Auswertungen das zu erwartende Ergebnis, dass nicht nur die Überlebenszeit verlängert werden konnte, sondern auch die entsprechenden Zellen angestiegen waren. Jeweils vor und nach Therapie wurden bei 25 Patienten Immunstatus und -funktion bestimmt. Wissenschaftlich-statistisch bedeutet dies: Signifikant waren die Ergebnisse bei den T-Lymphozyten ($p<0,03$), CD-8-positiven Helferzellen ($p<0,001$) und der Ratio von T4 zu T8 ($p<0,05$).

Die Therapiekosten liegen für die Verabreichung aus DC mit CHT höher als bei einer Monotherapie mit Gemcitabin. Im Vergleich zu Kombinationen aus erprobten Zytostatika gegen Pankreaskarzinom berechnet sich aber selbst die mehrmalige Gabe von DC mit Gemcitabin günstiger. Zudem zeichnet sich in der vorliegenden Arbeit diese Kombination – neben deutlich weniger unerwünschten Reaktionen – mit einer erhöhten 1-JÜR (55 %) sowie einem längeren medianen Überleben (13,4 Monate) aus. Desweiteren verbesserte sich die Immunsituation deutlich. Diese preiswerte Behandlung reiht sich somit nicht in andere Therapieverfahren ein. Um mehr Langzeitergebnisse zu erhalten, sind dennoch weitere Untersuchungen bzw. prospektive, randomisierte Studien mit einer großen Anzahl an Patienten notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- [1] ABBAS, A. ; LICHTMAN, A.: *Cells and Tissues of the Immune System. In: ABBAS, A. ; LICHTMAN, A. (HRSG) Cellular and Molecular Immunology, 5. Edition, Elsevier Saunders, Amsterdam Philadelphia, S. 16–39 (2005)*
- [2] ABBAS, A. ; LICHTMAN, A.: *Laboratory Techniques Commonly Used in Immunology. In: ABBAS, A.; LICHTMAN, A. (HRSG) Cellular and Molecular Immunology, 5. Edition, Elsevier Saunders, Amsterdam Philadelphia, S. 522–534 (2005)*
- [3] BANG, S. ; KIM, H.S. ; CHOO, Y.S. ; PARK, S.W. ; CHUNG, J.B. ; SONG, S.Y.: Differences in immune cells engaged in cell-mediated immunity after chemotherapy for far advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 32: 29–36 (2006)
- [4] BARROU, B. ; BENOIT, G. ; OULDKACI, M. ; CUSSENOT, O. ; SALCEDO, M. ; AGRAWAL, S. ; MASSICARD, S. ; BERCOVICI, N. ; ERICSON, M.L. ; THIOUNN, N.: Vaccination of prostatectomized prostate cancer patients in biochemical relapse, with autologous dendritic cells pulsed with recombinant human PSA. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 53: 453–460 (2004)
- [5] BAUER, C. ; BAUERNFEIND, F. ; STERZIK, A. ; ORBAN, M. ; SCHNURR, M. ; LEHR, H.A. ; ENDRES, S. ; EIGLER, A. ; DAUER, M.: Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut* 56: 1275–1282 (2007)

- [6] BÜCHLER, M.W. ; MALFERTHEINER, P. ; UHL, W.H.: *Pankreaserkrankungen: Akute Pankreatitis, chronische Pankreatitis, Tumore des Pankreas, 1. Auflage.* Karger, Basel, S. 125 (1996)
- [7] BEGER, H.G. ; POCH, B. ; SCHWARZ, M. ; GANSAUGE, F.: Pancreatic cancer. The relative importance of neoadjuvant therapy. *Der Chirurg 74*: 202–207 (2003)
- [8] BEGER, H.G. ; RAU, B. ; GANSAUGE, F. ; LEDER, G. ; SCHWARZ, M. ; POCH, B.: Pancreatic Cancer – Low Survival Rates. *Deutsches Ärzteblatt International 105*: 655–656 (2008)
- [9] BURRIS, H. ; STORNILO, A.M.: Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer 33*: 18–22 (1997)
- [10] CARRASCO, J. ; PEL, A. van ; NEYNS, B. ; LETHÉ, B. ; BRASSEUR, F. ; RENK-VIST, N. ; BRUGGEN, P. van d. ; BAREN, N. van ; PAULUS, R. ; THIELEMANS, K. ; BOON, T. ; GODELAINE, D.: Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of non-vaccine anti-tumor cells. *The Journal of Immunology 180*: 3585–3593 (2008)
- [11] CHUA, Y. ; CUNNINGHAM, D.: *Palliative chemotherapy for advanced pancreatic cancer.* In: BEGER, H.G.; WARSHAW, A.; BÜCHLER, M.W.; KAZAREK, R.; LERCH, M.; NEOPTOLEMOS, J.; SHIRATORI, K.; WHITCOMB, D.; RAU, B. (HRSG) *The Pancreas, 2. Edition*, Blackwell Publishing, Malden Oxford Victoria, S. 749–756 (2008)
- [12] CUNNINGHAM, D. ; CHAU, I. ; STOCKEN, D. ; DAVIES, C. ; DUNN, J. ; VALLE, J. ; SMITH, D. ; STEWARD, W. ; HARPER, P. ; NEOPTOLEMOS, J.: Phase III randomised comparison of gemcitabine (GEM) versus gemcitabine plus cape-

- citabine (GEM-CAP) in patients with advanced pancreatic cancer. *European Journal of Cancer* 27: 5513–5518 (2009)
- [13] DI LORENZO, G. ; BUONERBA, C. ; KANTOFF, P.W.: Immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8: 551–561 (2011)
- [14] DRAUBE, A. ; KLEIN-GONZÁLEZ, N. ; MATTHEUS, S. ; BRILLANT, C. ; HELLMICH, M. ; ENGERT, A. ; BERGWELT-BAILDON, M. von: Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systemic review and meta-analysis. *Public Library of Science One* 6: 18801 (2011)
- [15] FRANK, M.O. ; KAUFMAN, J. ; TIAN, S. ; SUÁREZ-FARIÑAS, M. ; PARVEEN, S. ; BLACHÈRE, N.E. ; MORRIS, M.J. ; SLOVIN, S. ; SCHER, H.I. ; ALBERT, M.L. ; DARNELL, R.B.: Harnessing naturally occurring tumor immunity: a clinical vaccine trial in prostate cancer. *Public Library of Science One* 5: 12367 (2010)
- [16] FRANKI, S.N. ; STEWARD, K.K. ; BETTING, D.J. ; KAFI, K. ; YAMADA, R.E. ; TIMMERMAN, J.M.: Dendritic cells loaded with apoptotic antibody-coated tumor cells provide protective immunity against B-cell lymphoma in vivo. *Blood* 111: 1504–1511 (2008)
- [17] FRIESS, H. ; KLEEFF, J. ; FISCHER, L. ; MÜLLER, M. ; BÜCHLER, M.W.: Surgical standard therapy for cancer of the pancreas. *Der Chirurg* 74: 183–190 (2003)
- [18] GANSAUGE, F.: (2010 persönliche Mitteilung)
- [19] GEIGER, J.D. ; HUTCHINSON, R.J. ; HOHENKIRK, L.F. ; MCKENNA, E.A. ; YANIK, G.A. ; LEVINE, J.E. ; CHANG, A.E. ; BRAUN, T.M. ; MULÉ, J.J.: Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells

- can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Research* 61: 8513–8519 (2001)
- [20] GONZALEZ-CARMONA, M.A. ; LUKACS-KORNEK, V. ; TIMMERMAN, A. ; SHABANI, S. ; KORNEK, M. ; VOGT, A. ; YILDIZ, Y. ; SIEVERS, E. ; SCHMIDT-WOLF, I.G. ; CASELMANN, W.H. ; SAUERBRUCH, T. ; SCHMITZ, V.: CD40ligand-expressing dendritic cells induce regression of hepatocellular carcinoma by activating innate and acquired immunity in vivo. *Hepatology* 48: 157–168 (2008)
- [21] HEINEMANN, V. ; LABIANCA, R. ; HINKE, A. ; LOUVET, C.: Increased survival using platinum analog combined with gemcitabine as compared to single-agent gemcitabine in advanced pancreatic cancer: pooled analysis of two randomized trials, the GERCOR/GISCAD intergroup study and a German multicenter study. *Annals of Oncology* 18: 1652–1659 (2007)
- [22] HERNANDO, J.J. ; PARK, T.W. ; FISCHER, H.P. ; ZIVANOVIC, O. ; BRAUN, M. ; PÖLCHER, M. ; GRÜNN, U. ; LEUTNER, C. ; PÖTZSCH, B. ; KUHN, W.: Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor-alpha for relapsed metastatic ovarian cancer. *The Lancet Oncology* 8: 451–454 (2007)
- [23] HERRMANN, R. ; BODOKY, G. ; RUHSTALLER, T. ; GLIMELIUS, B. ; SALETTI, P. ; BAJETTA, E. ; SCHUELLER, J. ; BERNHARD, J. ; DIETRICH, D. ; SCHEITHAUER, W.: Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 25: 4010 (2005)
- [24] HIGANO, C.S. ; SCHELLHAMMER, P.F. ; SMALL, E.J. ; BURCH, P.A. ; NEMUNAITIS, J. ; YUH, L. ; PROVOST, N. ; FROHLICH, M.W.: Integrated data from

- 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 115: 3670–3679 (2009)
- [25] HIROOKA, Y. ; ITOH, A. ; KAWASHIMA, H. ; HARA, K. ; NONOGAKI, K. ; KASUGAI, T. ; OHNO, E. ; ISHIKAWA, T. ; MATSUBARA, H. ; ISHIGAMI, M. ; KATANO, Y. ; OHMIYA, N. ; NIWA, Y. ; YAMAMOTO, K. ; KANEKO, T. ; NIEDA, M. ; YOKOKAWA, K. ; GOTO, H.: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 38: 69–74 (2009)
- [26] ISHII, H. ; FURUSE, J. ; NAGASE, M. ; YOSHINO, M.: Impact of gemcitabine on the treatment of metastatic pancreatic cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 20: 62–66 (2005)
- [27] ISHIKAWA, O. ; WADA, H. ; OHIGASHI, H. ; DOKI, Y. ; YOKOYAMA, S. ; NOURRA, S. ; YAMADA, T. ; SASAKI, Y. ; IMAOKA, S. ; KASUGAI, T. ; MATSUNAGA, T. ; TAKENAKA, A. ; NAKAIZUMI, A.: Postoperative cytology for drained fluid from the pancreatic bed after “curative“ resection of pancreatic cancers: does it predict both the patient’s prognosis and the site of cancer recurrence? *Annals of Surgery* 238: 103–110 (2003)
- [28] JANKOWSKA, O. ; KRAWCZYK, P. ; WOJAS-KRAWCZYK, K. ; SAGAN, D. ; MILANOWSKI, J. ; ROLINSKI, J.: Phenotype of dendritic cells generated in the presence of non-small cell lung cancer antigens-preliminary report. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 46: 465–470 (2008)
- [29] KANEKO, T. ; GOTO, S. ; KATO, A. ; AKEYAMA, A. ; TOMONAGA, M. ; FUJIMOTO, K. ; MIYAMOTO, Y. ; ERIGUCHI, M. ; EGAWA, K.: Efficacy of immunocell therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Anticancer Research* 25: 3709–3714 (2005)

- [30] KANTOFF, P.W. ; HIGANO, C.S. ; SHORE, N.D. ; BERGER, E.R. ; SMALL, E.J. ; PENSON, D.F. ; REDFERN, C.H. ; FERRARI, A.C. ; DREICER, R. ; SIMS, R.B. ; XU, Y. ; FROHLICH, M.W. ; SCHELLHAMMER, P.F.: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 363: 411–422 (2010)
- [31] KAWAKAMI, Y. ; OKADA, T. ; AKADA, M.: Development of immunotherapy for pancreatic cancer. *Pancreas* 28: 320–325 (2004)
- [32] KONTANI, K. ; TAGUCHI, O. ; OZAKI, Y. ; HANAOKAI, J. ; SAWAI, S. ; INOUE, S. ; ABE, H. ; HANASAWA, K. ; FUJINO, S.: Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin. *International Journal of Molecular Medicine* 12: 493–502 (2003)
- [33] KUROSAKI, I. ; HATAKEYAMA, K.: The clinical efficacy of adjuvant systemic chemotherapy with gemcitabine in node-positive pancreatic cancer. *Hepato-gastroenterology* 51: 634–637 (2004)
- [34] LAER, D. von ; MODRAU, B. ; DIETRICH, M. ; KERN, P.: Leukocyte differentiation antigens in the bone marrow of patients with HIV-related disease. *Acta haematologica* 92: 197–203 (1994)
- [35] LAETHEM, J.L. van ; DEMOLS, A. ; GAY, F. ; CLOSON, M.T. ; COLLETTE, M. ; POLUS, M. ; HOUBIERS, G. ; GASTELBLUM, P. ; GELIN, M. ; HOUTTE, P.V. ; CLOSSET, J.: Postoperative adjuvant gemcitabine and concurrent radiation after curative resection of pancreatic head carcinoma: a phase II study. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 56: 974–980 (2003)
- [36] LANKISCH, P.G. ; ASSMUS, C. ; MAISONNEUVE, P. ; LOWENFELS, A.B.: Epidemiology of pancreatic diseases in Lüneburg County. *Pancreatology* 2: 469–477 (2000)

- [37] LAWRENCE, T.S. ; CHANG, E.Y. ; HAHN, T.M. ; HERTEL, L.W. ; SHEWACH, D.S.: Radiosensitization of pancreatic cancer cells by 2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 34: 867–872 (1996)
- [38] LAWRENCE, T.S. ; CHANG, E.Y. ; HAHN, T.M. ; SHEWACH, D.S.: Delayed radiosensitization of human colon carcinoma cells after a brief exposure to 2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine (Gemcitabine). *Clinical Cancer Research* 3: 777–782 (1997)
- [39] LISTE, Rote: *Zytostatika, andere neoplastische Mittel und Protektiva*. Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main, S. 1756–1857 (2011)
- [40] LOUVET, C. ; LABIANCA, R. ; HAMMEL, P. ; LLEDO, G. ; ZAMPINO, M.G. ; ANDRÉ, T. ; ZANIBONI, A. ; DUCREUX, M. ; AITINI, E. ; TAÏEB, J. ; FAROUX, R. ; LEPERE, C. ; GRAMONT, A. de: Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *Journal of Clinical Oncology* 23: 3509–3516 (2005)
- [41] LÜTTGES, J. ; STIGGE, C. ; PACENA, M. ; KLÖPPEL, G.: Rare ductal adenocarcinoma of the pancreas in patients younger than age 40 years. *Cancer* 100: 173–182 (2004)
- [42] MCGINN, C.J. ; ZALUPSKI, M.M.: Radiation therapy with once-weekly gemcitabine in pancreatic cancer: current status of clinical trials. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 56: 10–15 (2003)
- [43] MOORE, M.J. ; GOLDSTEIN, D. ; HAMM, J. ; FIGER, A. ; HECHT, J.R. ; GALLINGER, S. ; AU, H.J. ; MURAWA, P. ; WALDE, D. ; WOLFF, R.A. ; CAMPOS, D. ; LIM, R. ; DING, K. ; CLARK, D. ; VOSKOGLOU-NOMIKOS, T. ; PTASYSKI,

- M. ; PARULEKAR, W.: Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* 25: 1960–1966 (2007)
- [44] MORSE, M.A. ; CLAY, T.M. ; COLLING, K. ; HOBEIKA, A.C. ; GRABSTEIN, K. ; CHEEVER, M.A. ; LYERLY, H.K.: HER2 dendritic cell vaccines. *Clinical Breast Cancer* 3: 164–172 (2003)
- [45] MORSE, M.A. ; NAIR, S.K. ; BOCZKOWSKI, D. ; TYLER, D. ; HURWITZ, H.I. ; PROIA, A. ; CLAY, T.M. ; SCHLOM, J. ; GILBOA, E. ; LYERLY, H.K.: The feasibility and safety of immunotherapy with dendritic cells loaded with CEA mRNA following neoadjuvant chemoradiotherapy and resection of pancreatic cancer. *International Journal of Gastrointestinal Cancer* 32: 1–6 (2002)
- [46] MOSCA, P.J. ; HOBEIKA, A.C. ; CLAY, T.M. ; MORSE, M.A. ; LYERLY, H.K.: Dendritic cell vaccines. *Frontiers in Bioscience* 12: 4050–4060 (2007)
- [47] MURPHY, K. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M.: *The Adaptive Immune Response*. In: MURPHY, K. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. (HRSG) *Janeways immunobiology, 7. Edition*, Garland Science, Taylor & Friends Group New York, Milton Park, S. 323–495 (2008)
- [48] MURPHY, K. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M.: *Immunologists Toolbox*. In: MURPHY, K. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. (HRSG) *Janeways immunobiology, 7. Edition*, Garland Science, Taylor & Friends Group New York, Milton Park, S. 735–782 (2008)
- [49] NAGARAJ, S. ; ZISKE, C. ; STREHL, J. ; MESSMER, D. ; SAUERBRUCH, T. ; SCHMIDT-WOLF, I.G.: Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide

- induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo. *International Immunology* 18: 1279–1283 (2006)
- [50] NAKAMURA, M. ; WADA, J. ; SUZUKI, H. ; TANAKA, M. ; KATANO, M. ; MORISAKI, T.: Long-term Outcome of Immunotherapy for Patients with Refractory Pancreatic Cancer. *Anticancer Research* 29: 831–836 (2009)
- [51] NEOPTOLEMOS, J.P. ; RARATY, M.G. ; GHANEH, P. ; HICKEY, H. ; STOCKEN, D.D. ; DUNN, J.A. ; FRIESS, H. ; BÜCHLER, M.W.: Adjuvant and additive therapy for cancer of the pancreas. *Der Chirurg* 74: 191–201 (2003)
- [52] NIESS, J.H. ; BRAND, S. ; GU, X. ; LANDSMAN, L. ; JUNG, S. ; MCCORMICK, B.A. ; VYAS, J.M. ; BOES, M. ; PLOEGH, H.L. ; FOX, J.G. ; LITTMANN, D.R. ; REINECKER, H.C.: CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307: 254–258 (2005)
- [53] NISHIYAMA, T. ; TACHIBANA, M. ; HORIGUCHI, Y. ; NAKAMURA, K. ; IKEDA, Y. ; TAKESAKO, K. ; MURAI, M.: Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific Mage-3 peptide. *Clinical Cancer Research* 7: 23–31 (2001)
- [54] OSADA, T. ; CLAY, T. ; HOBEIKA, A. ; LYERLY, H.K. ; MORSE, M.A.: NK cell activation by dendritic cell vaccine: a mechanism of action for clinical activity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 55: 1122–1131 (2006)
- [55] OZTOP, I. ; YILMAZ, U. ; YAVUZSEN, T. ; YAREN, A. ; TARHAN, O. ; SAGOL, O. ; COKER, A. ; ALAKAVUKLAR, M.: Gemcitabine combined with infusional 5-fluorouracil and high-dose leucovorin for the treatment of advanced carcinoma of the pancreas. *Chemotherapy* 50: 127–132 (2004)
- [56] PELZER, U. ; KUBICA, K. ; STIELER, J. ; SCHWANER, I. ; HEIL, G. ; GÖRNER, M. ; MÖLLE, M. ; HILBIG, A. ; DÖRKEN, B. ; RIESS, H. ; OETTL, H.: A

- randomized trial in patients with gemcitabine refractory pancreatic cancer. Final results of the CONKO 003 study. *Journal of Clinical Oncology* 26: 4508 (2008)
- [57] PLATE, J.M. ; PLATE, A.E. ; SHOTT, S. ; BOGRAD, S. ; HARRIS, J.E.: Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 54: 915–925 (2005)
- [58] POCH, B. ; LOTSPEICH, E. ; RAMADANI, M. ; GANSAUGE, S. ; BEGER, H.G. ; GANSAUGE, F.: Systemic immune dysfunction in pancreatic cancer patients. *Langenbeck's Archives of Surgery* 392: 353–358 (2007)
- [59] POPPEL, H. van ; JONIAU, S. ; GOOL, S.W. van: Vaccine therapy in patients with renal cell carcinoma. *European urology* 55: 1333–1342 (2009)
- [60] RANDOLPH, G.J. ; ANGELI, V. ; SWARTZ, M.A.: Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Reviews Immunology* 5: 617–628 (2005)
- [61] RIBAS, A.: Genetically modified dendritic cells for cancer immunotherapy. *Current Gene Therapy* 5: 619–628 (2005)
- [62] RIBAS, A. ; BUTTERFIELD, L.H. ; GLASPY, J.A. ; ECONOMOU, J.S.: Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 21: 2415–2432 (2003)
- [63] RIDOLFI, L. ; PETRINI, M. ; FIAMMENGHI, L. ; GRANATO, A.M. ; ANCARANI, V. ; PANCISI, E. ; SCARPI, E. ; GUIDOBONI, M. ; MIGLIORI, G. ; SANNA, S. ; TAUCERI, F. ; VERDECCHIA, G.M. ; RICCOBON, A. ; VALMORRI, L. ; RIDOLFI, R.: Unexpected high response rate to traditional therapy after dendritic cell-based vaccine in advanced melanoma: update of clinical outcome and subgroup analysis. *Clinical and Developmental Immunology* 2010: 504979 (2010)

- [64] RIESS, H. ; HELM, A. ; NIEDERGETHMANN, M. ; SCHMIDT-WOLF, I. ; MOIK, M. ; HAMMER, C. ; ZIPPEL, K. ; WEIGANG-KÖHLER, K. ; STAUCH, M. ; OETTLE, H.: A randomised, prospective, multicenter, phase III trial of gemcitabine, 5-flourouracil (5-FU), folinic acid vs. gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology* 23: 4009 (2005)
- [65] RODRIGUEZ, J. ; WARSHAW, A. ; FERNÁNDES-DEL CASTILLO, C.: *Clinical assessment and staging of pancreatic cancer. In: BEGER, H.G.; WARSHAW, A.; BÜCHLER, M.W.; KAZAREK, R.; LERCH, M.; NEOPTOLEMOS, J.; SHIRATORI, K.; WHITCOMB, D.; RAU, B. (HRSG) The Pancreas, 2. Edition, Blackwell Publishing, Malden Oxford Victoria, S. 643–647 (2008)*
- [66] RUTKOWSKI, S. ; DE VLEESCHOUWER, S. ; KAEMPGEN, E. ; WOLFF, J.E. ; KÜHL, J. ; DEMAEREL, P. ; WARMUTH-METZ, M. ; FLAMEN, P. ; CALENBERGH, F. van ; PLETS, C. ; SÖRENSEN, N. ; OPITZ, A. ; GOOL, S.W. van: Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study. *British Journal of Cancer* 91: 1656–1662 (2004)
- [67] SAHA, A. ; BHATTACHARYA-CHATTERJEE, M. ; FOON, K.A. ; CELIS, E. ; CHATTERJEE, S.K.: Stimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide on dendritic cell-based immunotherapy of colon cancer in CEA/HLA-A2 transgenic mice. *International Journal of Cancer* 124: 877–888 (2009)
- [68] SANTIN, A.D. ; BELLONE, S. ; GOKDEN, M. ; CANNON, M.J. ; PARHAM, G.P.: Vaccination with HPV-18 E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *The New England Journal of Medicine* 346: 1752–1753 (2002)
- [69] SCHIEL, R. ; BELTSCHIKOW, W. ; STEINER, T. ; STEIN, G.: Diabetes, insulin, and risk of cancer. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 28: 169–175 (2006)

- [70] SCHMITZ-WINNENTHAL, F.H. ; VOLK, C. ; Z'GRAGGEN, K. ; GALINDO, L. ; NUMMER, D. ; ZIOUTA, Y. ; BUCUR, M. ; WEITZ, J. ; SCHIRRMACHER, V. ; BÜCHLER, M.W. ; BECKHOVE, P.: High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Research* 65: 10079–10087 (2005)
- [71] SCHNURR, M. ; GALAMBOS, P. ; SCHOLZ, C. ; DAUER, M. ; KRUG, A. ; HARTMANN, G. ; EIGLER, A. ; ENDRES, S.: Dendritische Zellen – Träger tumorge-richteter Immuntherapie. *Deutsches Ärzteblatt Köln* 99: 2408–2416 (2002)
- [72] SCHOTT, M. ; SEISSLER, J. ; LETTMANN, M. ; FOUXON, V. ; SCHERBAUM, W.A. ; FELDKAMP, J.: Immunotherapy for medullary thyroid carcinoma by dendritic cell vaccination. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86: 4965–4969 (2001)
- [73] SHAPIRO, H.M. ; LEIF, R.C.: *Practical flow cytometry, 4. Edition*. Wiley Online Library, Berlin, S. 9–24 (2003)
- [74] SOEDA, A. ; MORITA-HOSHI, Y. ; MAKIYAMA, H. ; MORIZANE, C. ; UENO, H. ; IKEDA, M. ; OKUSAKA, T. ; YAMAGATA, S. ; TAKAHASHI, N. ; HYODO, I. ; TAKAUE, Y. ; HEIKE, Y.: Regular dose of gemcitabine induces an increase in CD14+ monocytes and CD11c+ dendritic cells in patients with advanced pancreatic cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 39: 797–806 (2009)
- [75] SONG, S.Y. ; KIM, H.S.: Strategies to improve dendritic cell-based immunotherapy against cancer. *Yonsei Medical Journal* 45: 48–52 (2004)
- [76] SPEISER, D.E. ; SCHWARZ, K. ; BAUMGAERTNER, P. ; MANOLOVA, V. ; DEVEVRE, E. ; STERRY, W. ; WALDEN, P. ; ZIPPELIUS, A. ; CONZETT, K.B. ; SENTI, G. ; VOELTER, V. ; CEROTTINI, J.P. ; GUGGISBERG, D. ; WILLERS, J. ; GELDHOF, C. ; ROMERO, P. ; KÜNDIG, T. ; KNUTH, A. ; DUMMER, R. ; TREF-

ZER, U. ; BACHMANN, M.F.: Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. *Journal of Immunotherapy* 33: 845–858 (2010)

[77] STEIGER, J.: (2010 persönliche Mitteilung)

[78] STIFT, A. ; FRIEDL, J. ; DUBSKY, P. ; BACHLEITNER-HOFMANN, T. ; BENKOE, T. ; BROSTJAN, C. ; JAKESZ, R. ; GNANT, M.: In vivo induction of dendritic cell-mediated cytotoxicity against allogeneic pancreatic carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 22: 651–656 (2003)

[79] STIFT, A. ; FRIEDL, J. ; DUBSKY, P. ; BACHLEITNER-HOFMANN, T. ; SCHUELLER, G. ; ZONTSICH, T. ; BENKOE, T. ; RADELBAUER, K. ; BROSTJAN, C. ; JAKESZ, R. ; GNANT, M.: Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *International Journal of Oncology* 21: 135–142 (2003)

[80] TAKIGAWA, Y. ; AKIYAMA, Y. ; MARUYAMA, K. ; SUGIYAMA, K. ; UCHIDA, E. ; KOSUGE, T. ; UEDA, M. ; KITAJIMA, M. ; YAMAGUCHI, K.: Antitumor effect induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against peritoneal dissemination of the hamster pancreatic cancer. *Cancer Letters* 215: 179–186 (2004)

[81] TAN, G. ; WANG, Z.Y. ; WANG, X.G. ; CHENG, L. ; YIN, S.: Immunotherapeutic effects of beta-elemene combined with interleukin-23 gene-modified dendritic cells on murine pancreatic carcinoma. *Ai Zheng* 25: 1082–1086 (2006)

[82] THARA, E. ; DORFF, T.B. ; PINSKI, J.K. ; QUINN, D.I.: Vaccine therapy with sipuleucel-T (Provenge) for prostate cancer. *Maturitas* 69: 296–303 (2011)

[83] TOH, H.C. ; WANG, W.W. ; CHIA, W.K. ; KVISTBORG, P. ; SUN, L. ; TEO, K. ; PHOON, Y.P. ; SOE, Y. ; TAN, S.H. ; HEE, S.W. ; FOO, K.F. ; ONG, S. ; KOO, W.H. ; ZOCCA, M.B. ; CLAESSION, M.H.: Clinical Benefit of Allogeneic

Melanoma Cell Lysate – Pulsed Autologous Dendritic Cell Vaccine in MAGE-Positive Colorectal Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 15: 7266–7736 (2009)

- [84] WANG, F. ; GUPTA, S. ; HOLLY, E.A.: Diabetes mellitus and pancreatic cancer in a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15: 1458–1463 (2006)
- [85] WATSON, J.V.: *Introduction to Flow Cytometry, 1. Edition*, Cambridge University Press, Cambridge, S. 203–204 (1991)
- [86] XIONG, H.Q. ; ABBRUZZESE, J.L.: Adjuvant therapy for pancreatic cancer: current status and future directions. *Surgical Oncology Clinics of North America* 13: 737–749 (2004)
- [87] YANAGIMOTO, H. ; TAKAI, S. ; SATOI, S. ; TOYOKAWA, H. ; TAKAHASHI, K. ; TERAKAWA, N. ; KWON, A.H. ; KAMIYAMA, Y.: Impaired function of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *Clinical Immunology* 114: 52–60 (2005)

Abbildungsverzeichnis

1	Verteilung von markierten Leukozyten im Vollblut	18
2	Schema einer FACS-Analyse	19
3	Schematische Darstellung des Prinzips zur Herstellung Dendritischer Zellen	22
4	Dendritische Zellen unter dem Invertoskop	23
5	Durchflusszytometrische Phänotypisierung von DC	24
6	Dendritische Zellen am siebten Tag der Herstellung	29
7	Überlebenswahrscheinlichkeit ab Erstimmunisierung	32
8	Überlebenswahrscheinlichkeit nach Zeitpunkt Therapiebeginn	33
9	Überlebenswahrscheinlichkeit nach Behandlungszyklen	34
10	Lymphozytenwerte vor und nach der DC-Therapie	37

Tabellenverzeichnis

1	TNM-Stadien für das Pankreaskarzinom nach AJCC	3
2	Stadien nach UICC	4
3	Patientenübersicht	15
4	Übersicht über die Metastasierung	16
5	Übersicht über die Ansprechrate	30
6	Übersicht über die Überlebensrate	31
7	Einfluss von Tumorstadium, Operation und Metastasen	36
8	Überlebenszeiten bei verschiedenen Zytostatika	46
9	Therapienvergleich	50

Danksagung

Danksagungen sind so eine Sache, denn es ist schwierig, wem mehr und wem weniger gedankt werden soll bzw. dass niemand vergessen wird, der hier seinen Platz verdient. Wem ich aber sicher und vor allem danken möchte, sind PD Dr. Bertram Poch, meinem Doktorvater, sowie PD Dr. Frank Gansauge, dem Betreuer der vorliegenden Arbeit. Sie haben ihre Doktorandin nicht im Stich gelassen. Insbesondere PD Dr. Poch hat sich viel Zeit genommen, die einzelnen Punkte durchzuarbeiten und diese mit Tipps und Anregungen zu versehen.

Desweiteren gilt mein Dank den anderen Kollegen vom Zentrum für onkologische, endokrinologische und minimalinvasive Chirurgie in Neu-Ulm: PD Dr. med. Michael Schwarz sowie Prof. em. Dr. med. Hans G. Beger. Helga Baur, Chefsekretärin und Praxismanagerin des oben genannten Zentrums, danke ich für die hervorragende dokumentarische Arbeit mit Follow-Up der Daten.

Auch das zuständige Labor, Cabion Technologies in Ulm, möchte ich nicht unterschlagen. Dort ist die Forschungsgruppe Pankreaskarzinom untergebracht und dort wurden die Auswertungen vorgenommen. Ich danke Geschäftsführer Jörn Steiger sowie der medizinisch-technischen Angestellten Cornelia Schulz für die Unterstützung in den technischen Belangen.

Ein besonderer Dank gilt Diplom-Informatiker Kai Poguntke, der mich professionell unterstützt hat, dieser Promotionsarbeit das würdige Aussehen zu verleihen.

Im privaten Bereich danke ich besonders meinen Eltern sowie meinem Bruder, die mich immer wieder zum Weitermachen animiert haben und ein offenes Ohr für mich hatten.

Zusammenfassend danke ich allen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Merci beaucoup!

Lebenslauf

Name	Yvonne Simone Neuhäusler
Anschrift	Uhlandstraße 7, 89165 Dietenheim
Kontakt	Tel: 0170 9042587, E-Mail: yvonne.neuhaeusler@gmx.de
Geburtsdatum / -ort	04. 10. 1978 in Illertissen
Familienstand	ledig

Ausbildung

1985–1989	Grundschule Dietenheim-Regglisweiler
1989–1994	Albert-Einstein-Gymnasium Ulm
1994–1998	Kolleg der Schulbrüder Illertissen; 1998: Abitur
1999–2001	Volontariat und Trainee beim Führungsnachwuchskräfte- Programm beim Medienhaus Schwäbischer Verlag
2002	Redakteurin bei der Schwäbischen Zeitung
WS 2002–WS 2008	Medizinstudium an der Universität Ulm (2004 Physikum, 2008 2. Ärztliche Prüfung)
2003–2009	Aushilfstätigkeit beim Zentrum für onkologische, endokrinolo- gische und minimalinvasive Chirurgie, Neu-Ulm
SS 2004	Physikum / Ärztliche Vorprüfung
seit 2005	Promotion bei Cabion-Technologies / Forschungsgruppe Pan- kreaskarzinom, Ulm
2005–2006	Famulatur im BWK Ulm, Abteilung Allgemein- und Viszeral- chirurgie, Universität Ulm, Abteilung für Radiologie und Rönt- gendiagnostik, HNO-Abteilung des Uniklinikums Ulm sowie Allgemeinmediziner in Dietenheim
2007–2008	PJ in der Klinik am Eichert Göppingen (Chirurgie und Innere) und am Uniklinikum Ulm (Dermatologie und Allergologie)
seit Februar 2009	Assistenzärztin in der Frauenklinik der Klinik am Eichert in Göppingen

Name: Yvonne Simone Neuhäusler

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe keine Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen.

Es laufen keine Strafverfahren gegen mich.

Ulm, den

Yvonne Simone Neuhäusler