

Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu
Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck

**Die Anordnung extrazellulärer Matrix, die
Gefäßdichte und Immunzellpopulationen im
Stroma bestimmen die Prognose bei Patienten
mit Pankreaskarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Petro Zgurskyi
aus Kyiv, Ukraine

Lübeck
2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Wellner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Klinger
Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2023
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.06.2023
Promotionskommission der Sektion Medizin

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	6
1.2. Histologische Charakterisierung und Klassifikation	7
1.3. Molekulare Mechanismen der Stromaentwicklung	9
1.4. Tumor-assoziierte Fibroblasten	10
1.4.1. Pankreas-Sternzellen (PSCs)	10
1.4.2. Residente (lokale) Fibroblasten	11
1.5. Immunzellen	12
1.6. Signalwege im Stroma	15
1.7. Fragestellung der Arbeit	15
2. Material und Methodik	16
2.1. Studienform	16
2.2. Dokumentation und Datenerhebung	16
2.3. Histopathologische Bewertung	16
2.4. Klassifikation der Stroma-Morphologie	17
2.5. Immunhistochemie (IHC) und Färbeprotokolle	26
2.6. Auswertung und Statistik	29
3. Ergebnisse	30
3.1. Basisparameter, Histopathologie und Stromamorphologie	30
3.2. Stromamorphologie und Histopathologie	34
3.2.1. Die Orientierung von stromalen extrazellulären Matrix (ECM) Fibern	34
3.2.2. Die Dichte der extrazellulären Matrix	35
3.2.3. Fibroblastendichte	36
3.2.4. Fibroblastenmorphologie	37
3.2.5. Die Gefäßdichte	38
3.2.6. Ungeordnete extrazelluläre Matrix und geringe Gefäßdichte	39
3.3. Überlebensanalyse	40
4. Diskussion	45
4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse	45
4.2. Diskussion der Ergebnisse	45
4.3. Fazit und Ausblick	50
5. Zusammenfassung	52

6. Literaturverzeichnis	54
7. Anhang	66
7.1. Abkürzungsverzeichnis	66
7.2. Abbildungsverzeichnis mit Quellenangaben	67
7.3. Tabellenverzeichnis mit Quellenangaben	68
7.4. Votum der Ethikkommission	69
8. Danksagungen	70
9. Lebenslauf	71

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine der aggressivsten Krebsarten [49]. Die Wahrscheinlichkeit, in Industrieländern an PDAC zu erkranken, beträgt 1 zu 64 (Männer 1 von 63, Frauen 1 von 65) [2]. Die 5-Jahres-Überlebenszeit für alle Patienten mit PDAC liegt bei 5 % und die durchschnittliche Überlebenszeit bei weniger als 11 Monaten. Das Pankreaskarzinom steht bei allen onkologischen Erkrankungen an vierter Stelle der Todesursachen [2,94]. In den nächsten zehn Jahren wird es voraussichtlich auf den zweiten Platz vorrücken [86,76]. In Deutschland werden jährlich durchschnittlich 15000 Krankheitsfälle registriert [91]. In den letzten drei Jahrzehnten konnte die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Pankreaskarzinomfälle von ca. 3 % auf ca. 7 % verbessert werden, stellt aber weiterhin die niedrigste unter allen Krebserkrankungen dar [91,98]. Ursächlich für die deutlich reduzierte Prognose der Patienten mit Pankreaskarzinom ist die rasche lokale Tumorentwicklung sowie das frühe Auftreten von Fernmetastasen [61].

Die häufigsten Symptome bei Patienten mit Pankreaskarzinom sind Asthenie, Gewichtsverlust, Ikterus und Bauchschmerzen [84]. Unter den Risiken ist Zigarettenrauchen der wichtigste prädisponierende Faktor. Etwa ein Viertel aller Patienten mit Pankreaskarzinom haben in der Vergangenheit geraucht, und derzeitige Raucher haben ein 2,2-fach höheres Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken als Menschen, die noch nie geraucht haben [69,18]. Laut einer Metaanalyse hatten Personen mit einem Pankreaskarzinom in der Familienanamnese ein fast zweifach erhöhtes Risiko, selbst ein Pankreaskarzinom zu entwickeln [34]. Ungefähr 10 % aller Pankreaskarzinome haben einen familiären Hintergrund, und BRCA2-, PALP2- und p16-Keimbahnmutationen wurden mit dem Auftreten eines familiären Pankreaskarzinoms (FPC) in Verbindung gebracht [34,41]. FPC ist definiert als Pankreaskarzinom, das bei einem Patienten auftritt, der zwei oder mehr Verwandte ersten Grades mit einem Pankreaskarzinom aufweist [12,10]. FPC wird als autosomal dominantes Merkmal mit hoher Penetranz bei Familienmitgliedern vererbt [72]. Patienten mit erblicher Pankreatitis haben ein besonders hohes Risiko, an Pankreaskarzinom zu erkranken. Meistens ist dies auf

das Vorhandensein einer Mutation im kationischen Trypsinogen-Gen (PRSS1) zurückzuführen [112].

Eine vollständige onkologische Resektion ist die einzig kurative Option bei Patienten mit Pankreaskarzinom. Nur jeder fünfte Patient zeigt bei Diagnosestellung einen resektablen Befund [91,71].

1.2. Histologische Charakterisierung und Klassifikation

Pankreaskarzinome lassen sich in Adenokarzinome, zystische, azinäre und endokrine Karzinome einteilen. Das duktale Pankreas-Adenokarzinom ist die häufigste Form und macht ungefähr 85 % aller Fälle des Pankreaskarzinoms aus [114,90]. Aktuell wird angenommen, dass die Entwicklung von normalem duktalem Epithel zum duktalem Adenokarzinom histologische Stadien intraduktaler Transformationen einschließt, die als pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanINs) bekannt sind [51,50]. Allerdings entwickeln sich nicht alle PanINs zum invasiven Adenokarzinom. Die PanIN-Unterarten sind histologisch unterscheidbar, und die für invasive Adenokarzinome charakteristischen genetischen Veränderungen können bereits bei frühen Stadien des PanIN nachgewiesen werden [51].

Die Tumorzellen des PDAC werden von einem desmoplastischen Stroma begleitet, das aus extrazellulärer Matrix, Fibroblasten, Blutgefäßen, Immunzellen, Nerven und anderen Proteinen besteht, die zusammen das Tumor-Mikromilieu bilden.

Bei Pankreaskarzinom zeigt sich häufig nur ein geringer Anteil von Tumorzellen, während der Großteil der Gesamtmasse des Tumors aus extrazellulärer Matrix (ECM) mit Fibroblasten bei einer sehr geringen Dichte von Blutgefäßen besteht [4,11] (Abbildung 1).

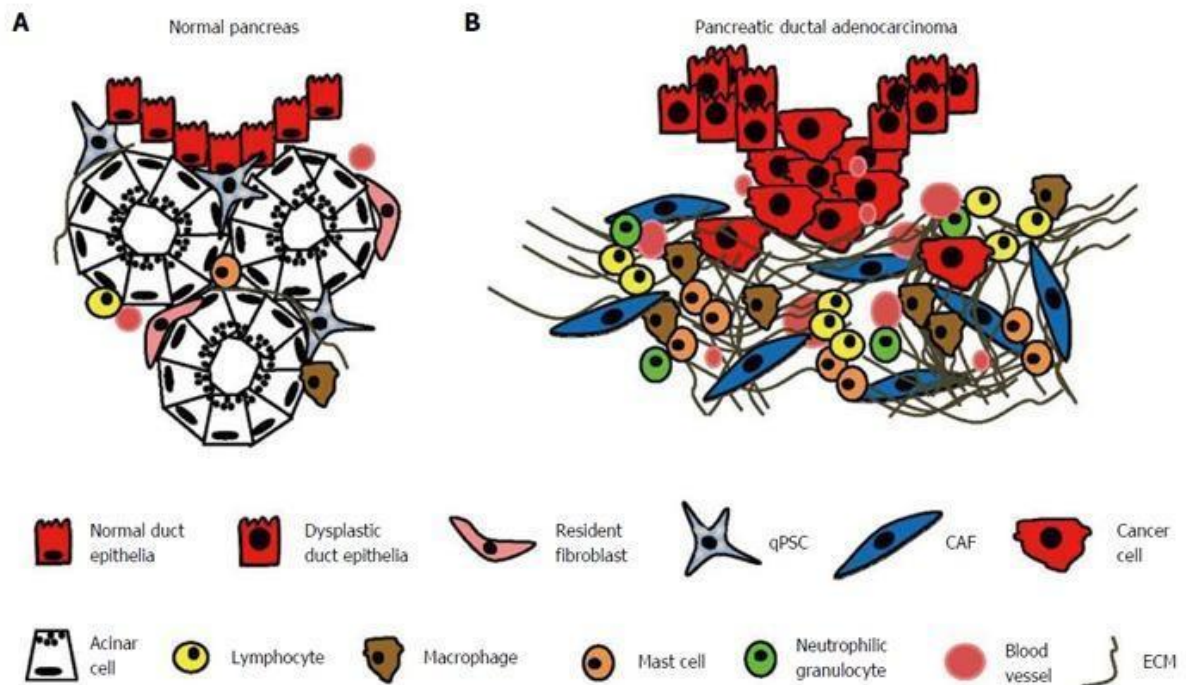


Abbildung 1. Desmoplastische Reaktion bei Pankreaskarzinom. Adaptiert nach Nielsen.

(A) Die normale exokrine Bauchspeicheldrüse besteht aus Azini mit Azinuszellen und mit Epithelzellen ausgekleideten Pankreasgängen. Im Periazinarraum befinden sich ruhende Pankreas-Sternzellen - Quiescent pancreatic stellate cells (qPSCs)- und interlobuläre Fibroblasten. Weiterhin zeigen sich wenige T-Zellen und B-Lymphozyten. Plasmazellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten treten nur sehr selten auf. Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist weitgehend auf die dünnen interlobulären Septen und Pankreasgänge beschränkt. (B) Beim Pankreaskarzinom invadieren Tumorzellen die Basalmembran der dysplastischen Pankreasgänge und breiten sich in das umgebende Gewebe aus. Diese Invasion geht mit einer ausgeprägten desmoplastischen Reaktion einher, bei der Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs) große Mengen an ECM-Proteinen synthetisieren. Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen dringen in das peritumorale Stroma ein. Es besteht ein erhöhter Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen. Dies wiederum stimuliert Neo-Angiogenese [78].

1.3. Molekulare Mechanismen der Stromaentwicklung

Verschiedene Zellen des PDAC-Mikromilieu können die Entwicklung und lokale Ausbreitung des Tumors auf unterschiedliche Weise beeinflussen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Zelltypen des PDAC-Mikromilieus und ihre Funktion. Adaptiert nach Egeblad [29].

Table 1. Noncancerous Cells of the Tumor Organ		
Cell Type	Effect on Tumors	References
Normal epithelial cells	inhibit	Dong-Le Bourhis et al., 1997
Myoepithelial cells	inhibit (invasion, growth)	Gudjonsson et al., 2002; Hu et al., 2008
Fibroblasts	promote (proliferation, angiogenesis, invasion)	Bhowmick et al., 2004; Olumi et al., 1999; Orimo et al., 2005
Mesenchymal stem cells	promote (metastasis)	Karnoub et al., 2007
Adipocytes	promote (tumor growth, survival, angiogenesis)	Iyengar et al., 2005; Landskroner-Eiger et al., 2009
Endothelial cells	promote (angiogenesis, niche?)	Ausprunk and Folkman, 1977; Calabrese et al., 2007
Perivascular cells	promote (vascularization)	Song et al., 2005
	inhibit (metastasis)	Xian et al., 2006
Bone marrow-derived cells	promote (proliferation, invasion, angiogenesis)	Coussens et al., 2000; Du et al., 2008; Lyden et al., 2001
Dendritic cells	inhibit (stimulate antitumor immunity)	Knight et al., 1985; Mayordomo et al., 1995
Myeloid-derived suppressor cells and immature myeloid cells	promote (angiogenesis, metastasis, reduce antitumor immunity)	De Palma et al., 2005; Sinha et al., 2007; Yang et al., 2004, 2008b
Macrophages, M1-like	inhibit	Sinha et al., 2005
Macrophages, M2-like	promote (invasion, angiogenesis)	DeNardo et al., 2009; Lin et al., 2001, 2006
Mast cells	promote (angiogenesis)	Coussens et al., 1999; Soucek et al., 2007; Yang et al., 2008a
Neutrophils, N1	inhibit (stimulate antitumor immunity)	Fridlender et al., 2009
Neutrophils, N2	promote (angiogenesis, reduce antitumor immunity)	Nozawa et al., 2006; Schmielau and Finn, 2001; Shojaei et al., 2008
T cells, CD4 ⁺ , T helper 2	promote (metastasis)	DeNardo et al., 2009
T cells, CD8 ⁺ , cytotoxic	inhibit (tumoricidal)	Romero et al., 1998
T cells, CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory	promote (reduce antitumor immunity)	Casares et al., 2003; Curiel et al., 2004
T cells, gamma/delta	inhibit (stimulate antitumor immunity)	Girardi et al., 2001
T cells, Th17	promote (proliferation, angiogenesis)	Numasaki et al., 2005
	inhibit (stimulate T-cell antitumor immunity)	Hirahara et al., 2001
B cells	promote (reduce antitumor immunity)	Inoue et al., 2006
B cells, immunoglobulins	promote (stimulate inflammation-associated progression)	Andreu et al., 2010
Platelets	promote (metastasis)	Camerer et al., 2004; Nieswandt et al., 1999

Die Bedeutung und Funktion einzelner Zellen des PDAC-Mikromilieus ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gerückt. Die Interaktion zwischen Akteuren des Stromas und den PDAC-Tumorzellen ist Gegenstand aktueller Forschung.

Neben Fibroblasten, die verantwortlich für die ausgeprägte Desmoplasie bei Pankreaskarzinom sind, bilden auch Immunzellen, Endothelzellen und Nervenfasern das heterogene und dynamische Stromakompartiment. ECM-Proteine, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Gewebegewächter von Metalloproteinasen (TIMPs), Zytokine und Chemokine zusammen mit zahlreichen

Wachstumsfaktoren, wie z. B. Nervenwachstumsfaktoren (NGFs), Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) - Rezeptorliganden, transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β) Isoformen und Bindegewebswachstumsfaktor (CTGF) beeinflussen die Interaktion zwischen Stroma und Tumorzellen [26,58].

Die dichte Desmoplasie bei Pankreaskarzinom führt zu einer Mindervaskularisierung und damit zu einer Tumor-Hypoxie. Chemotherapeutika können hierdurch nur geringe Konzentrationen im Tumor erreichen, es kommt zu einer Chemotherapieresistenz. Die intratumorale Hypoxie wiederum führt zu einer Induktion von Neoangiogenese, unter anderem durch die Aktivierung von Hypoxie-induzierter Faktor-1 α (HIF-1 α) [37, 95].

Viele Zelltypen sind an der desmoplastischen Reaktion bei Pankreaskarzinom beteiligt. Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs) spielen dabei eine Schlüsselrolle.

1.4. Tumor-assoziierte Fibroblasten

Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs) nehmen Einfluss auf das Wachstum und die Progression von PDAC Tumoren. Im Tumor-Mikromilieu zeigen sie häufig einen aktivierten Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp, der durch eine Spindelform und die Expression von α -smooth muscle actin (α -SMA) gekennzeichnet ist. Funktionell zeichnen sich CAFs durch die Produktion einer Vielzahl von ECM-Molekülen und Zytokinen aus. CAFs gehen aus verschiedenen ruhenden Zelltypen hervor. Pankreas-Sternzellen (PSCs) gelten als die wichtigste Quelle von CAF, ein weiterer Ursprung sind die aus dem Knochenmark hervorgehenden mesenchymalen Zellen [46,32]. Besondere Bedeutung haben Pankreas-Sternzellen und lokale Fibroblasten, deren Mechanismus wird im Folgenden genauer betrachtet.

1.4.1. Pankreas-Sternzellen (PSCs)

Im Gewebe einer gesunden Bauchspeicheldrüse befinden sich ruhende PSCs (qPSCs) im Periazinarraum. Ihre Hauptfunktion ist die Akkumulation und Speicherung von Vitamin A. Sie sind aktiv am ECM-Stoffwechsel beteiligt und produzieren Matrixmetalloproteinasen (MMPs) [83]. Im Rahmen von Gewebeschädigung wie im Fall einer Pankreatitis oder im Prozess der Karzinogenese werden qPSCs aktiviert und entwickeln einen Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp [32]. Bei der Pankreatitis sind PSC beteiligt an der

Fibrosebildung nach Ausheilung [64,16,22,23]. Es gibt verschiedene Faktoren, die qPSCs aktivieren, wie den Platelet-derived Growth Factor (PDGF), den Transforming Growth Factor Beta (TGF β) [3,107], den Tumornekrosefaktor Alpha (TNF α) und die Interleukine 1, 6 und 10 [74]. PSCs exprimieren Rezeptoren für die meisten dieser Zytokine bei chronischer Pankreatitis sowie bei PDAC [23,22,40,117]. Aktivierte PSCs produzieren wiederum PDGF und TGF β , die zur autokrinen Aktivierung beitragen [92,66].

1.4.2. Residente (lokale) Fibroblasten

Residente (lokale) Fibroblasten sind eine wichtige CAF-Quelle bei vielen Krebsarten [7]. Fibroblasten sind in physiologischem Bindegewebe reichlich vorhanden, produzieren ECM und tragen zur Homöostase des Gewebes bei. Sie sind mesodermalen Ursprungs und zeichnen sich durch eine Spindelform aus [56,79]. Eine Herausforderung bei der Untersuchung von Fibroblasten ist das Fehlen spezifischer molekularer Marker. Fibroblasten verschiedener Organsysteme zeigen ein vielfältiges Transkriptionsmuster, wie in den Genexpressionsprofilen von 50 primären menschlichen Fibroblastenkulturen gezeigt, die aus 10 verschiedenen Organsystemen von 16 Spendern gewonnen wurden [17]. Fibroblastenspezifisches Protein 1 (FSP-1) ist der bekannteste Marker für Fibroblasten [56,79,96]. In Pankreaskarzinom wurde FSP-1 sowohl in CAFs [97,36] als auch in menschlichen Pankreaskarzinom-Zellen [53,103] dokumentiert. Damit ist FSP-1 kein vollständig spezifischer Marker für residente Pankreasfibroblasten. Mehrere Studien konnten allerdings zeigen, dass eine hohe Expression von FSP-1 in Pankreaskarzinom mit einer erhöhten Tumorzell-Invasion und einem reduzierten Überleben assoziiert ist [36,53,103,68].

Im Falle einer Gewebeschädigung führen Zellnekrose und Apoptose zur Freisetzung von entzündlichen Zytokinen (z. B. TGF und PDGF) und Chemokinen aus lokalen Entzündungszellen, Endothelzellen oder mesenchymalen Zellen, die Fibroblasten aktivieren und zur Zellteilung stimulieren [32].

Fibroblasten können das Tumorwachstum mit mehreren Mechanismen unterstützen, darunter:

- 1) Sekretion von ECM-Komponenten zur Steigerung der internen Energieproduktion [82], interstitieller Druck, Gefäßkollaps und Arzneimittelausschluss [85].

- 2) Rekrutierung und Programmierung von Immun-Zell-Populationen zur Unterdrückung der lokalen Immunität [81,44].
- 3) Sequestrierung von intratumoralem Gemcitabin [45].
- 4) Strahlenschutz von Tumorzellen [70].

1.5. Immunzellen

Immunzellen nehmen aktiv an der stromalen Reaktion teil, und tragen zur Entwicklung und Progression von Pankreaskarzinom bei. Die Rolle der Entzündung bei der Entstehung von Pankreaskarzinom wird dadurch unterstützt, dass eine Pankreatitis oder chronische Entzündung der Bauchspeicheldrüse ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinom ist [63].

Die Mechanismen der Entwicklung der Immunantwort sind noch nicht vollständig verstanden, bisher sind wenige wirksame Immuntherapien für Pankreaskarzinom bekannt. Die Infiltration von Leukozyten in Gewebe beginnt bereits in den frühesten Stadien der präinvasiven Bildung und nimmt mit der Entwicklung bis zum invasiven Tumor zu. Aber nicht alle Arten von Immunzellen im Kontext von Pankreaskarzinom haben die Fähigkeit, die Tumorprogression zu unterdrücken. Es wird davon ausgegangen, dass eine wirksame Tumormunität von Anfang an beeinträchtigt sein kann. Suppressorzellen des Immunsystems treten in den frühen Stadien der Pankreas-Tumorentstehung auf, gehen der zellulären Antitumormunität voraus, hemmen sie und tragen wahrscheinlich zum Fortschreiten der Krankheit bei [1].

Neben Fibroblasten und Stroma-Elementen sind in der Stroma-Mikroumgebung Populationen von Immunzellen wie T-Zell-Subtypen und Tumor-assoziierte Makrophagen vorhanden, die die Kommunikation zwischen Krebszellen und der Mikroumgebung fördern [19].

Chronische Entzündungen, die sich in der Tumormikroumgebung entwickeln, fördern eine Schädigung des Genoms in der Zelle, was zur Anziehung von Populationen immunsuppressiver Zellen, wie z. B. regulatorischer T-Zellen, führt, die die lokale Immunabwehr schwächen. Am Wachstum der Tumoren sind auch immunregulatorische Zellen CD4⁺ CD25⁺ beteiligt [80].

Die Entfernung einer Subpopulation von CD25-exprimierenden T-Zellen, die 5-10 % der peripheren CD4+ T-Zellen in normalen naiven Mäusen ausmachen, führt zu einer wirksamen Anti-Tumor-Immunität bei Tieren mit Therapieresistenz. Dies verursachte in vivo starke Immunantworten auf syngene Tumoren. Die Entfernung von immunregulatorischen CD25+, CD4+ T-Zellen kann die immunologische Resistenz gegen syngene Tumoren in vivo und in vitro eliminieren, was zur spontanen Entwicklung und Anziehung spezifischer und unspezifischer Effektorzellen führt und so hilft, die Tumorprogression zu verhindern [93].

Die Infiltration spezifischer Immunzellpopulationen wirkt sich auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Pankreaskarzinom aus. So hat beispielsweise eine hohe oder niedrige CD3-T-Lymphozyten-Infiltration keinen Einfluss auf das Überleben des Patienten, was durch viele Studien bestätigt wird [67,62,100].

Die Rolle von CD4-T-Zellen ist kontroverser. Studien, die eine hohe und niedrige Lymphozytenexpression und das Verhältnis des Gesamtüberlebens untersucht haben, sind umstritten und präsentieren unterschiedliche Ergebnisse [77,119,52]. Gleichzeitig gibt es in denselben und anderen Studien einen klaren Zusammenhang zwischen dem Grad der Infiltration des Tumors durch CD4-T-Zellen und dem krankheitsfreien Überleben (DFS). Es wurde gezeigt, dass eine hohe gegenüber einer niedrigen CD4-Infiltration mit einem verbesserten DFS bei PDAC verbunden ist [77,67,52].

Ähnlich verhält es sich mit CD8+ Immunzellen, die direkt zytotoxisch gegen T-Zellen wirken [108]. In Studien, die den Zusammenhang zwischen Expressionsgrad und Gesamtüberleben von Patienten untersuchten, wurde jedoch festgestellt, dass diese beiden Indikatoren nicht miteinander korrelieren, stattdessen war der hohe CD8-Spiegel mit längerem DFS verbunden [62,24,52].

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Pankreaskarzinom. Dies sind Zellen, die eine zentrale Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunität spielen und aktiv an jedem Entzündungsprozess beteiligt sind. Sie können auf vielfältige Weise und durch unterschiedliche Reize aktiviert werden und erhalten so unterschiedliche Phänotypen und Funktionen. Es ist üblich, zwischen zwei Typen von Makrophagen zu unterscheiden: klassisch aktivierte M1-

Makrophagen und alternativ aktivierte M2-Makrophagen. M1-Makrophagen sezernieren eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Effektormolekülen. Im Gegensatz dazu sezernieren M2-Makrophagen eine Vielzahl von entzündungshemmenden Molekülen. Immunhistochemische Untersuchungen von PDAC-Resektaten zeigen eine Zunahme der Anzahl von Makrophagen und Mastzellen im Stroma im Vergleich zum normalen Pankreas [35].

Bei den meisten Tumoren erfolgt die M2-Makrophageninfiltration, die eine immunsuppressive Mikroumgebung zum Effekt haben und das Tumorwachstum fördern. Zahlreiche Studien zeigen den negativen Einfluss von tumorassoziierten M2-Makrophagen auf die Überlebensprognose von Patienten mit Pankreaskarzinom. Es wurde festgestellt, dass M2-Makrophagen (Marker CD204 und CD163) die Tumorprogression durch die Synthese angiogener und proliferativer Zytokine und Chemokine fördern. Eine hohe Dichte von M2-Makrophagen wurde mit einer großen Tumorgroße, einem frühen Lokalrezidiv, einem Rezidiv in der Leber und negativen Auswirkungen auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit Pankreaskarzinom in Verbindung gebracht [116,43].

In einer anderen Studie, in der eine systematische immunhistochemische Analyse des Stromas mit infiltrierenden Immunzellen durchgeführt wurde, wurde festgestellt, dass in 78 % der PDAC-Proben mehr M2-Makrophagen CD163+ oder CD204+ als M1-Makrophagen HLA-DR+, auch im Vergleich zu Neutrophilen (CD66b+) vorhanden waren. Univariate und multivariate Überlebensanalysen zeigten, dass hohe Mengen von Pan-Makrophagen (CD68+), M2-Makrophagen und Neutrophilen mit einem kürzeren Überleben und ein hohes Verhältnis von M1-Makrophagen zu Pan-Makrophagen mit einem längeren Überleben verbunden waren [54].

Die Infiltration von M2-Makrophagen (CD163+ und CD204+) korrelierte stärker mit Lymphknotenmetastasen als Pan-Makrophagen bei Pankreaskarzinomresektionen. Ähnlich korrelierte eine hohe Anzahl von M2-Makrophagen mit einer erhöhten Lymphgefäßdichte und einer schlechten Prognose. Daher können M2-Makrophagen eine schlechte Prognose anzeigen, teilweise aufgrund einer Zunahme von Lymphknotenmetastasen [59].

1.6. Signalwege im Stroma

Verschiedene Signalwege sind an der Tumor-Stroma-Kommunikation beteiligt. Diese Wege umfassen den MAPK-Weg (Vermittlung der Zellproliferation und -migration), den PI3K-Weg (Migration), Igel (Migration, Proliferation) transformierende Wachstumsfaktor-Beta-TGF β -verknüpfte Wege, Rho-Kinase (ECM-Produktion) [5].

Auf diese Weise bilden Fibroblasten und Tumorzellen ein komplexes Interaktionsnetzwerk und orchestrieren den Umbau der Tumormikroumgebung durch parakrine Signalübertragung und Matrixumbau [6,113].

1.7. Fragestellung der Arbeit

Zahlreiche Studien an in-vitro- und Xenograft-Modellen haben in den letzten Jahren Einblicke in die Pankreaskarzinom Tumor-Stroma-Kommunikation gegeben [11,113]. Die Datenlage zur Bedeutung von PDAC-Desmoplasie in klinischen und histopathologischen Studien ist jedoch limitiert. Aktuell gibt es keine standardisierten Klassifikationen von Stroma-Komponenten für die histopathologische Routine.

Ziel dieser Studie ist eine systematische Untersuchung der PDAC-Stroma-Morphologie. Die Hauptstromakomponenten Fibroblasten, ECM, Gefäße sowie Immunzellpopulationen sollen hierbei betrachtet werden sowie ihre Bedeutung für die Prognose von Pankreaskarzinom Patienten. Die Studie soll eine standardisierte und einfache Klassifikation von Stroma-Komponenten ermöglichen, die gut in den klinischen Alltag integrierbar ist.

2. Materialien und Methoden

2.1. Studienform

Diese Studie ist eine retrospektive histo-pathologische Studie. Patientendaten stammen aus einer prospektiv geführten klinischen Datenbank der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Die histopathologische Auswertung basiert auf formalinfixierten und paraffineingebetteten PDAC-Gewebeschnitten. Der Studienzeitraum reicht von 2011 bis 2016.

Die Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Nr. 17-118A) ausgestellt.

2.2. Dokumentation und Datenerhebung

Folgende Basis-Parameter und chirurgische Parameter wurden erhoben: Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Operation und Art der Resektion (Whipple-Operation versus Pylorus-erhaltende Pancreaticoduodenectomy (PPPD), Pankreaslinksresektion, totale Pankreatektomie (TPE)).

2.3. Histopathologische Bewertung

In die Analyse einbezogene histopathologische Parameter waren Tumorgöße, T-Stadium, N-Stadium, M-Stadium, Klassifikation nach Broders [14] und R-Status. Die TNM-Einstufung wurde gemäß der 7. Ausgabe des American Joint Committee on Cancer (AJCC) durchgeführt [28]. Die fertigen auf Objektträger montierten Präparate wurde mit dem digitalen Pathologie Objektträger-Scanner *VENTANA iScan HT slide scanner* von der Firma Roche (Basel, Schweiz) als hochau aufgelöste Fotodateien eingelesen. Für die Verarbeitung digitalisierter Gewebeschnitte wurde das Bioimage Analyse-Programm QuPath für Windows, Version 0.2.0-m9, verwendet.

Die Untersuchung der Stromamorphologie erfolgte durch einen Pathologen, zwei ausgebildete Chirurgen und einen ausgebildeten Medizinstudenten auf der Basis von Hämatoxylin und Eosin gefärbten Pankreaskarzinom-Gewebeschnitten.

Zuerst wurde jeder Gewebeschnitt bei 4-facher Vergrößerung untersucht und fünf Stroma-Lokalisationen bestimmt. Jede dieser Lokalisationen wurde bei 20-facher Vergrößerung ausgewertet.

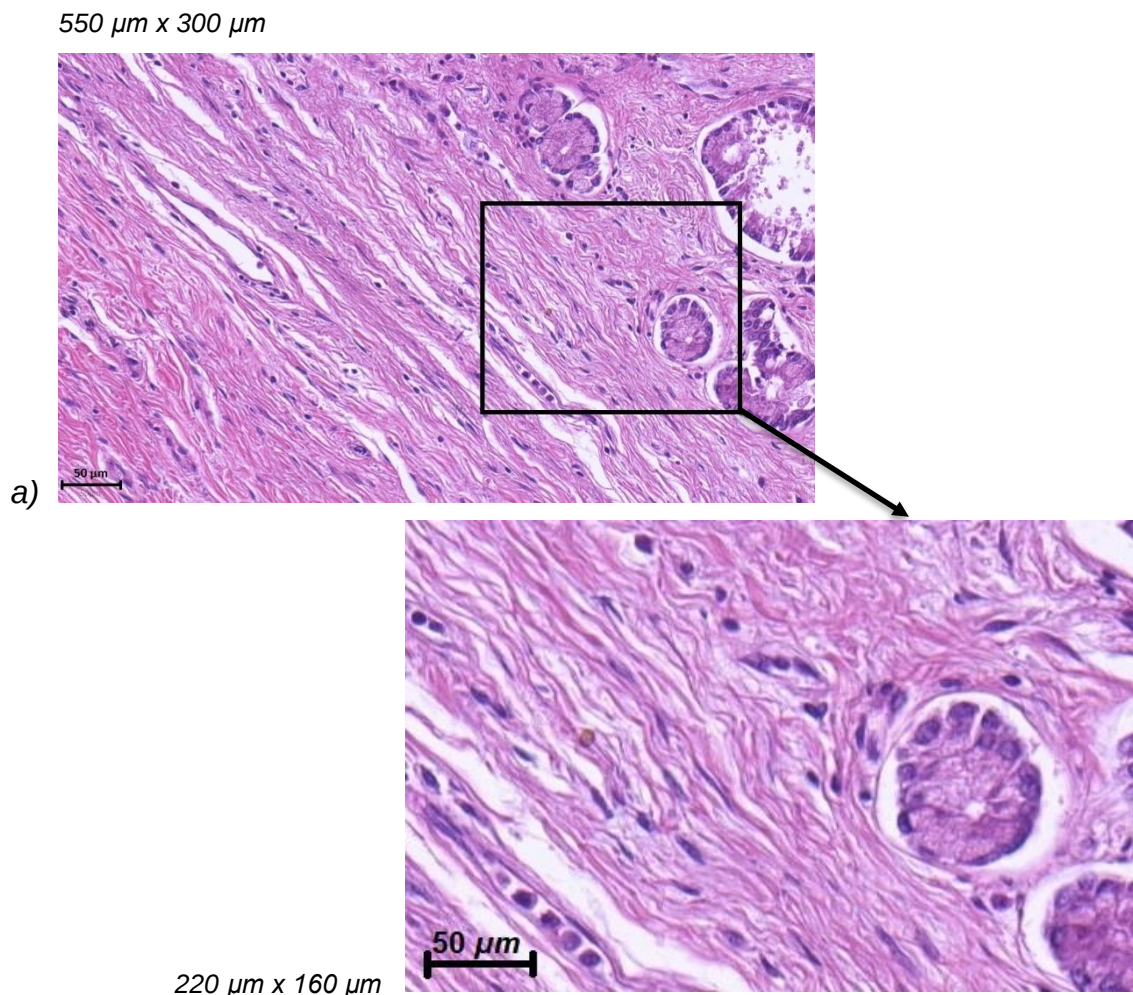
Alle PDAC-Proben wurden von allen vier Bewertenden ausgewertet. Im Falle von Meinungsverschiedenheiten wurde die Auswertung der Probe wiederholt und diskutiert.

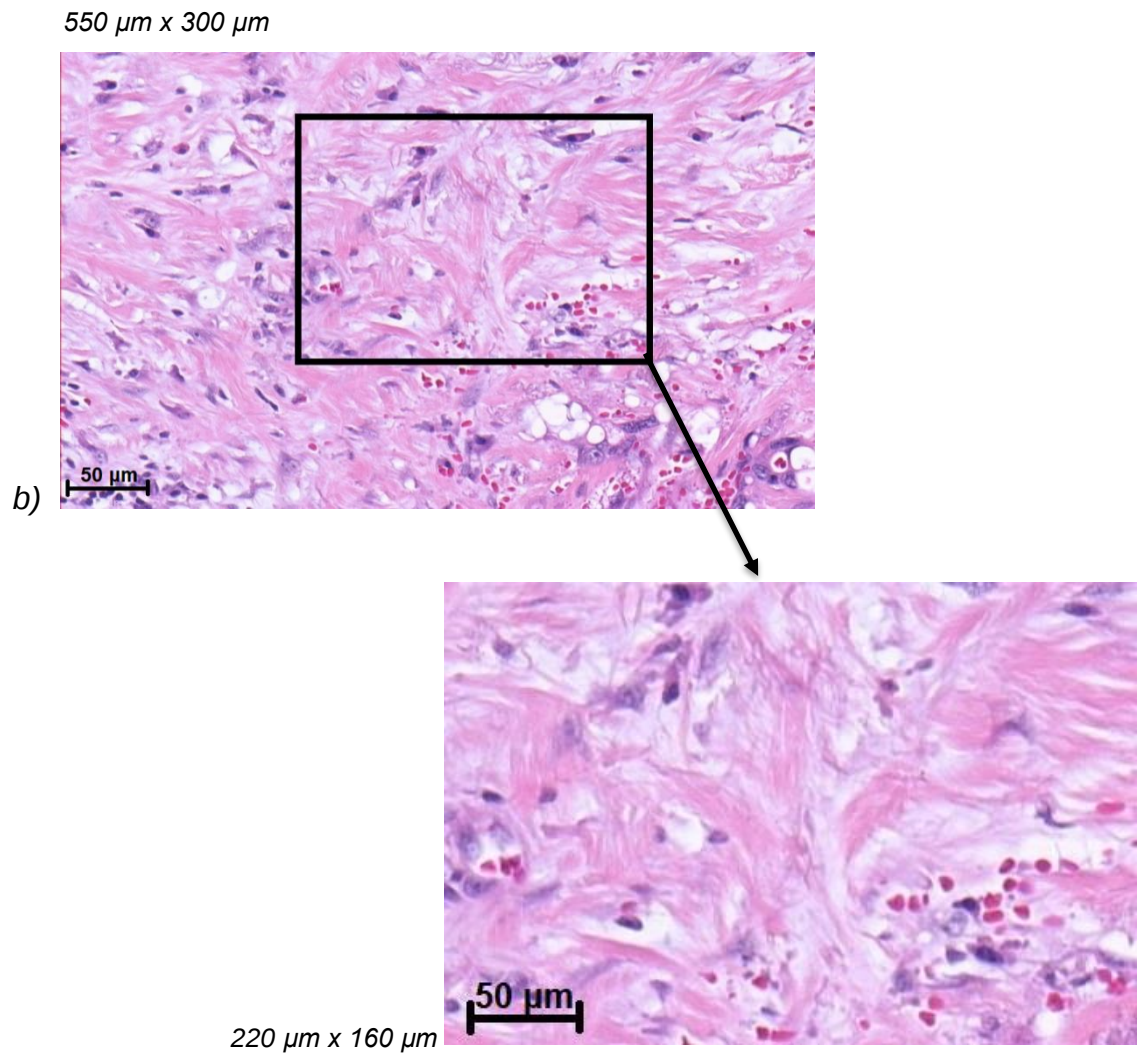
Die Kriterien der Stroma-Morphologie werden im Folgenden dargestellt.

2.4. Klassifikation der Stroma-Morphologie

Die Ausrichtung der extrazellulären Matrix als eine der führenden Stroma-Komponenten wurde als parallele Ausrichtung oder als ungeordnete Ausrichtung von ECM-Strängen bewertet, siehe Abb. 2a-b.

Abbildung 2a-b. Anordnung extrazellulärer Matrix. 20-fache und 40-fache Vergrößerung

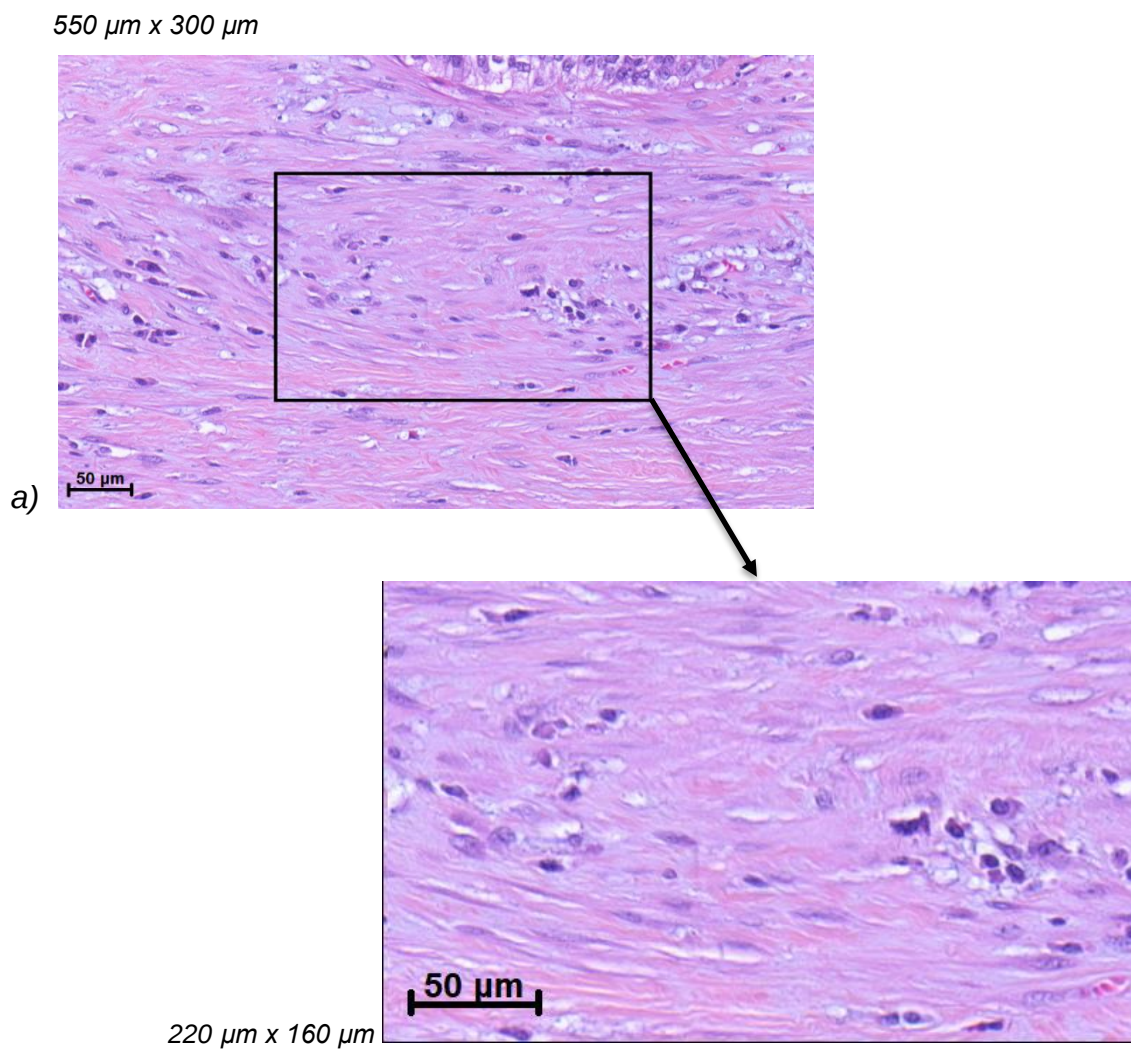




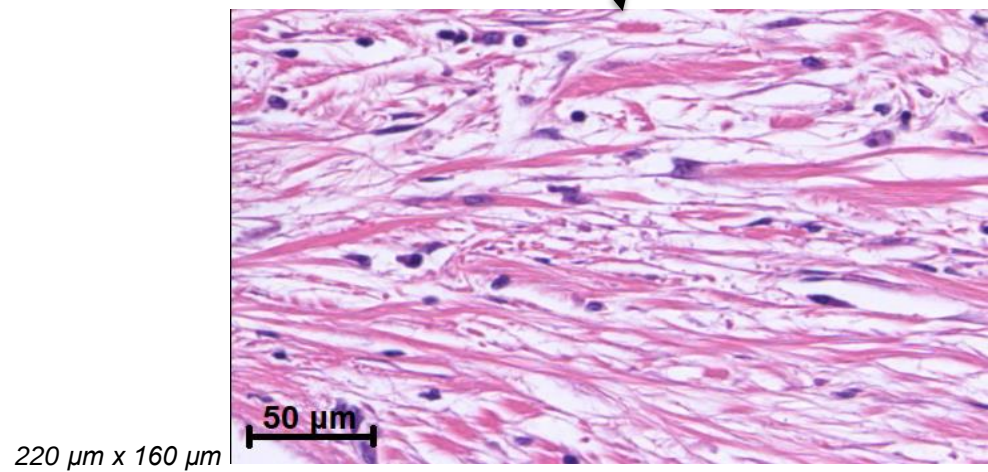
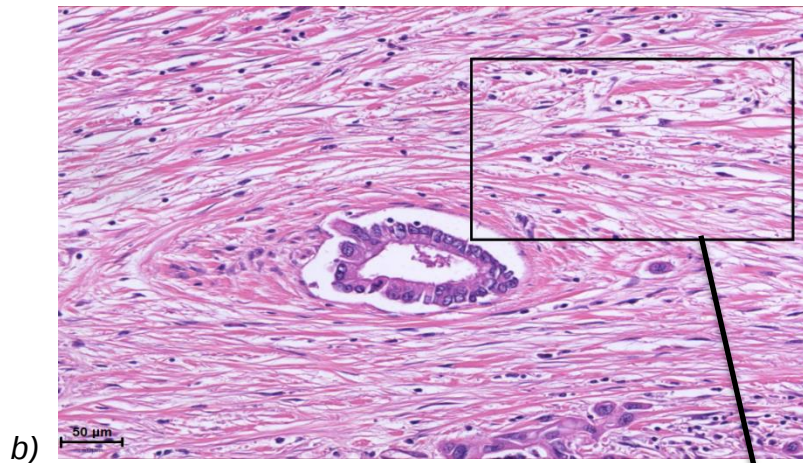
- a - eine parallele Ausrichtung von ECM-Strängen. Ausschnittvergrößerung zeigt längliche parallel ausgerichtete extrazelluläre Matrixfasern;
- b - ungeordnete Ausrichtung von ECM-Strängen. Ausschnittvergrößerung zeigt extrazelluläre Matrixfasern, die in einem Winkel von mehr als 45° ausgerichtet sind.

Weiterhin wurde die Dichte der ECM-Stränge bewertet. Es erfolgte die Klassifikation nach niedriger oder hoher Dichte, Abb. 3a-b.

Abbildung 3a-b. Dichte der ECM-Stränge. 20-fache und 40-fache Vergrößerung



550 μm x 300 μm

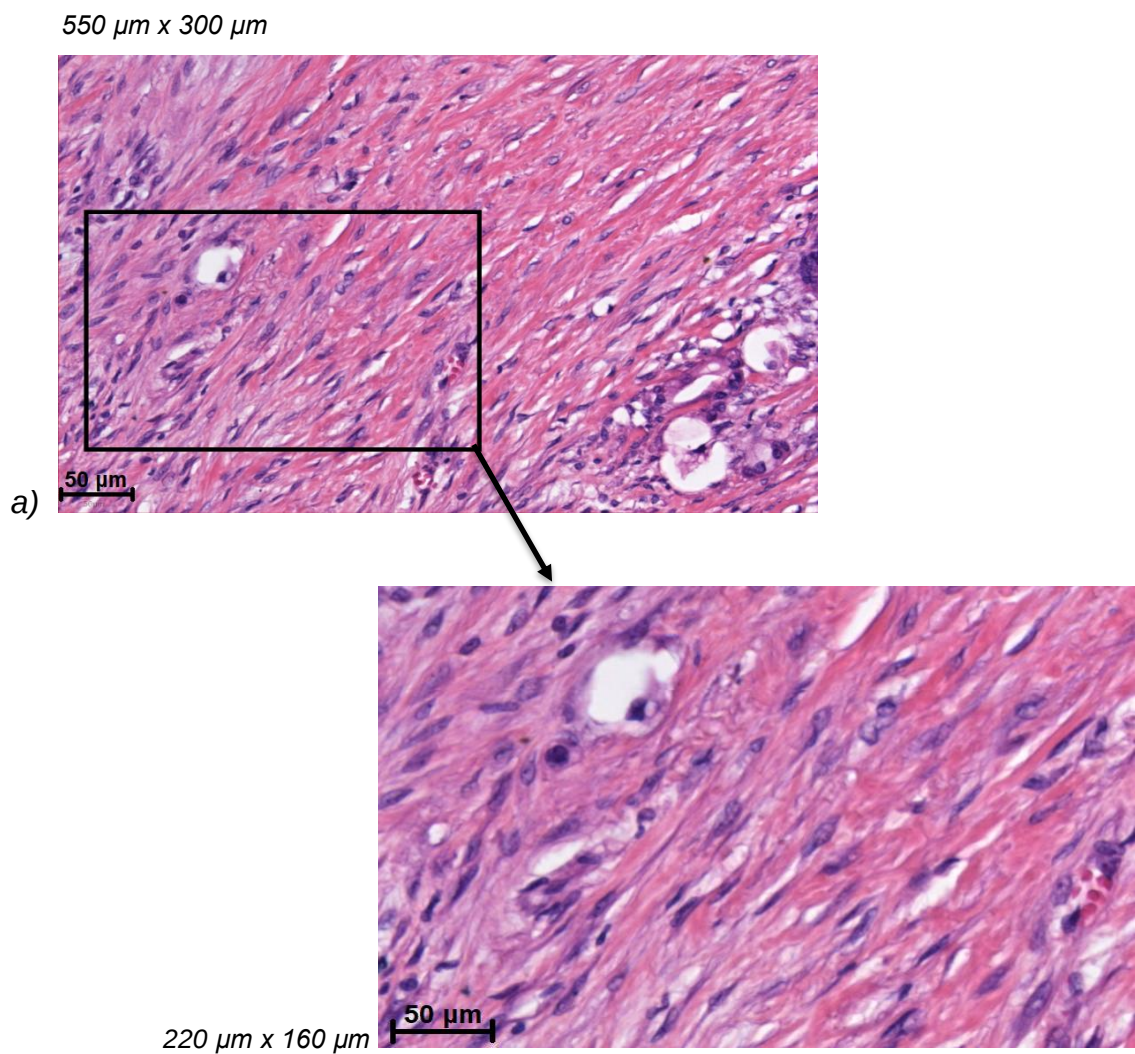


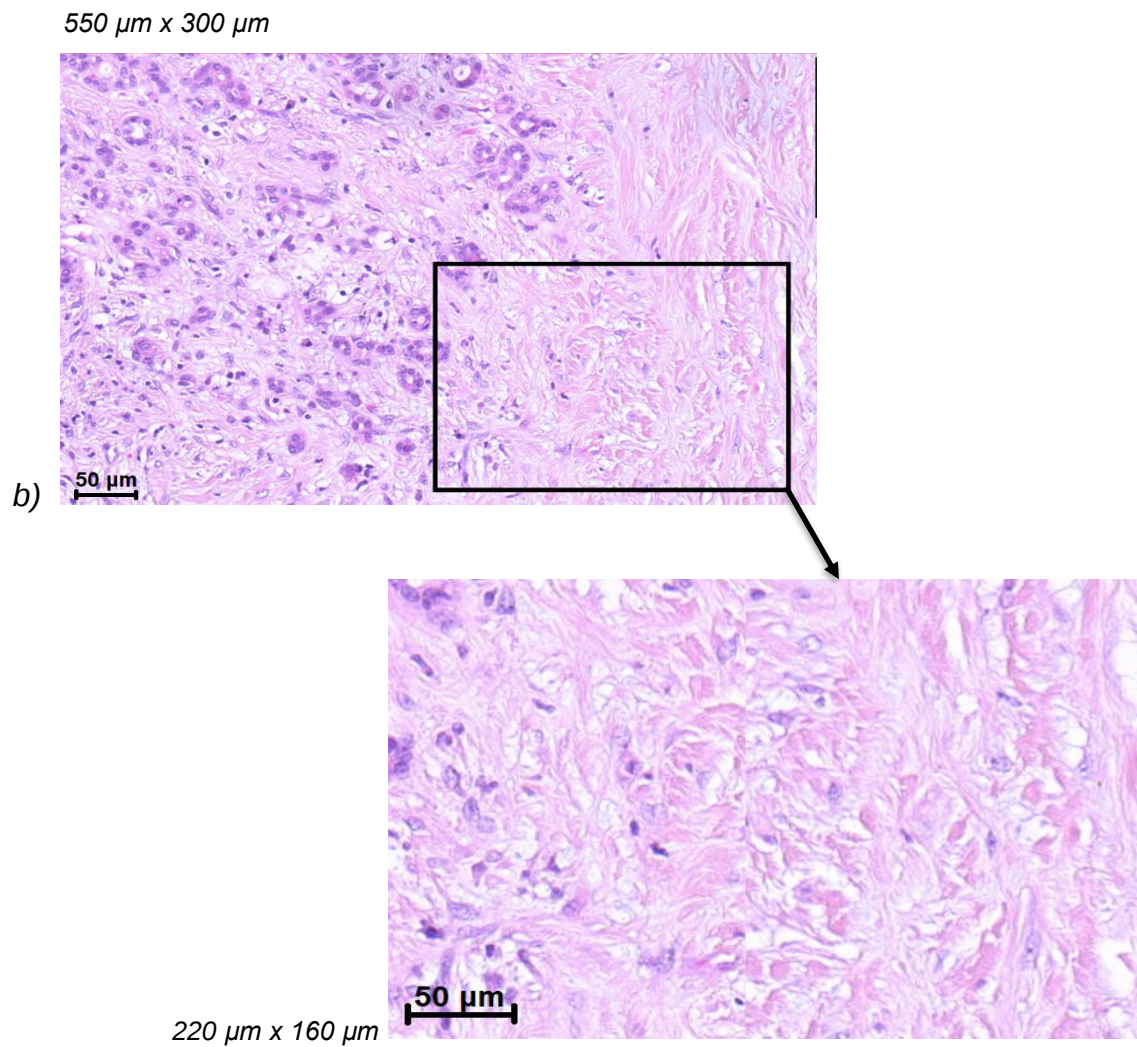
a - hohe Stromadichte, Ausschnittvergrößerung zeigt dichte Bündel extrazellulärer Matrix;

b - niedrige Stromadichte, Ausschnittvergrößerung zeigt dünne längliche extrazelluläre Matrixfasern und zeigt Lücken zwischen den einzelnen Fasern.

Es erfolgte ebenfalls die morphologische Bewertung von Fibroblasten. Die Dichte der stromalen Fibroblasten wurde entweder als niedrig oder als hoch definiert, Abb. 4a-b.

Abbildung 4a-b. Die Fibroblastendichte. 20-fache und 40-fache Vergrößerung

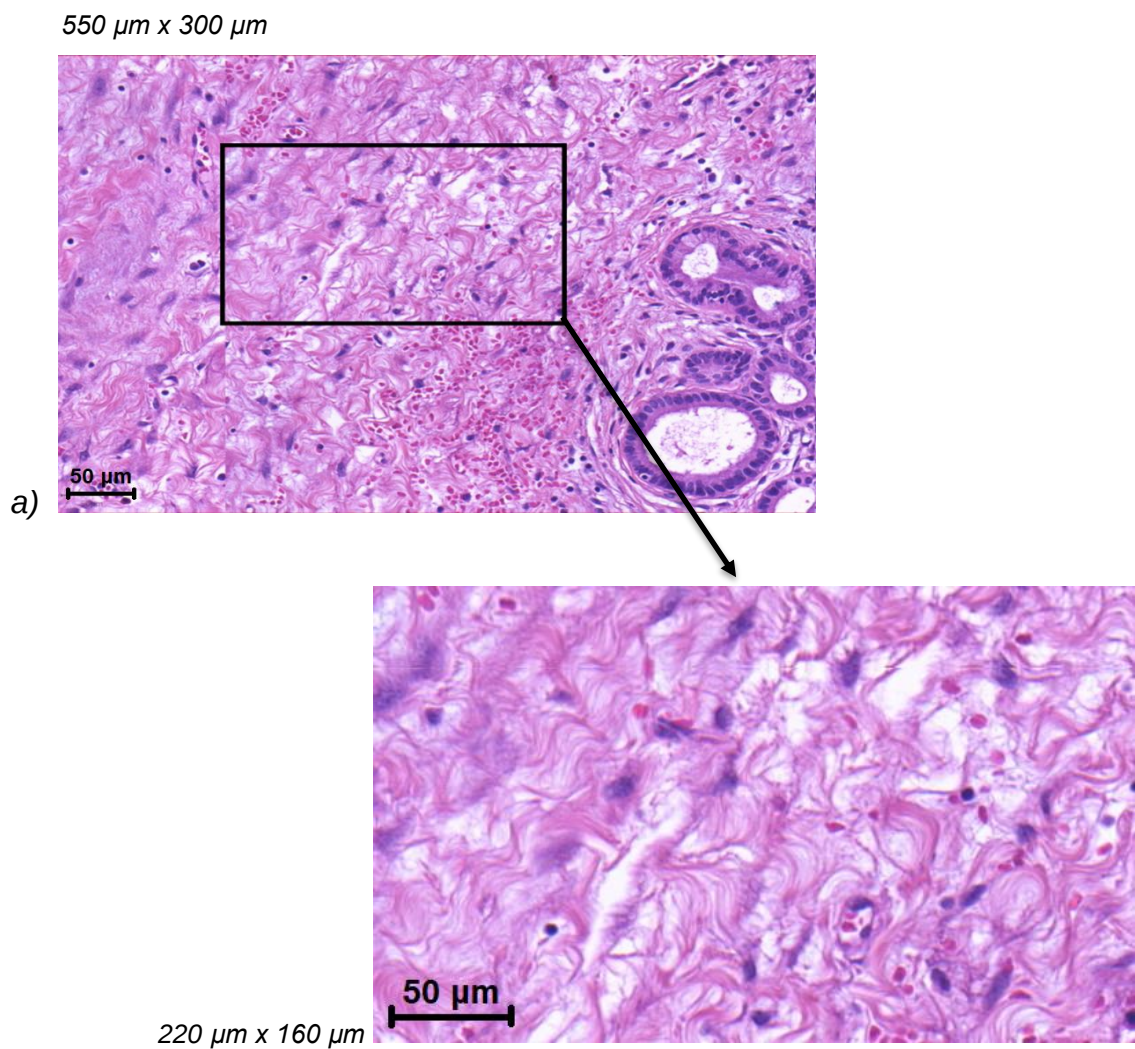


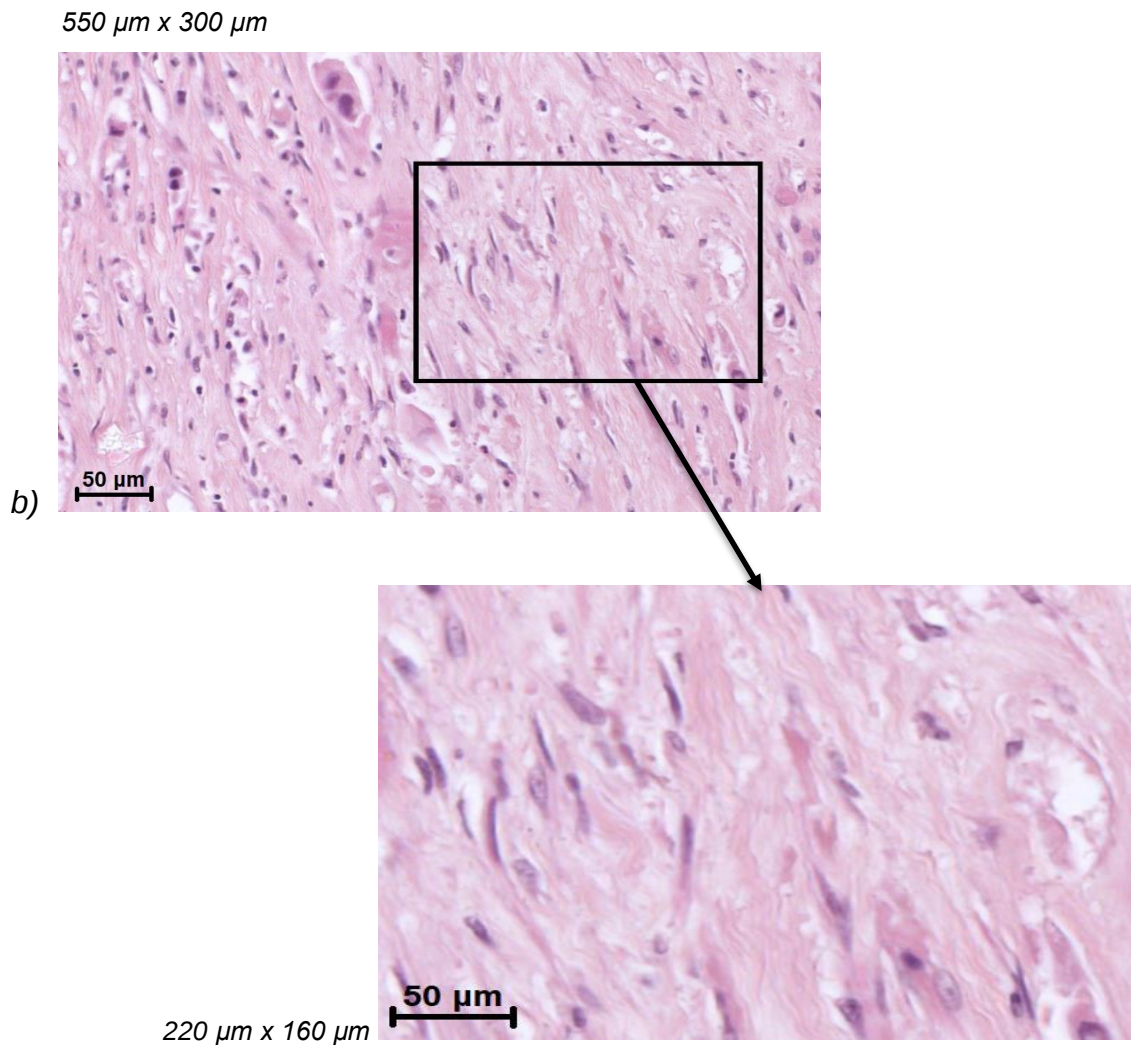


- a - hohe Fibroblastendichte. Ausschnittvergrößerung zeigt dicht angeordnete Fibroblasten;
- b - niedrige Fibroblastendichte. Ausschnittvergrößerung zeigt selten verstreute Fibroblasten in den Stromabereichen.

Die Morphologie der stromalen Fibroblasten wurde entweder als rund oder spindelförmig definiert, Abb. 5a-b.

Abbildung 5a-b. Die Fibroblastenmorphologie. 20-fache Vergrößerung und 40-fache Vergrößerung





a - Ausschnittvergrößerung zeigt runde, aktive Fibroblasten. Heller Zellkern, viel Zytoplasma.

b - Ausschnittvergrößerung zeigt spindelförmig geformte Fibroblasten. Besitzen einen kleinen, dunklen, länglichen Kern, wenig Zytoplasma.

Zum Beispiel betrachten wir einen pathologischen Schnitt. Zunächst untersuchen wir es bei einer 4-fachen Vergrößerung, identifizieren fünf Abschnitte des Stromas mit einem Perimeter von 7000-8000 Mikrometern, die die Tumorzellen umgeben. Die Wahl der Stellen richtet sich hauptsächlich nach der Ausrichtung der extrazellulären Matrix (parallel oder ungeordnet) und es wird eine Stelle ausgewählt, die für diesen Anteil des pathologischen Schnitts repräsentativ ist. Nachdem die 5 Stellen mit der höchsten Repräsentation ausgewählt wurden, werden die weitere Parameter wie Morphologie, Anzahl der Fibroblasten etc. bewertet.

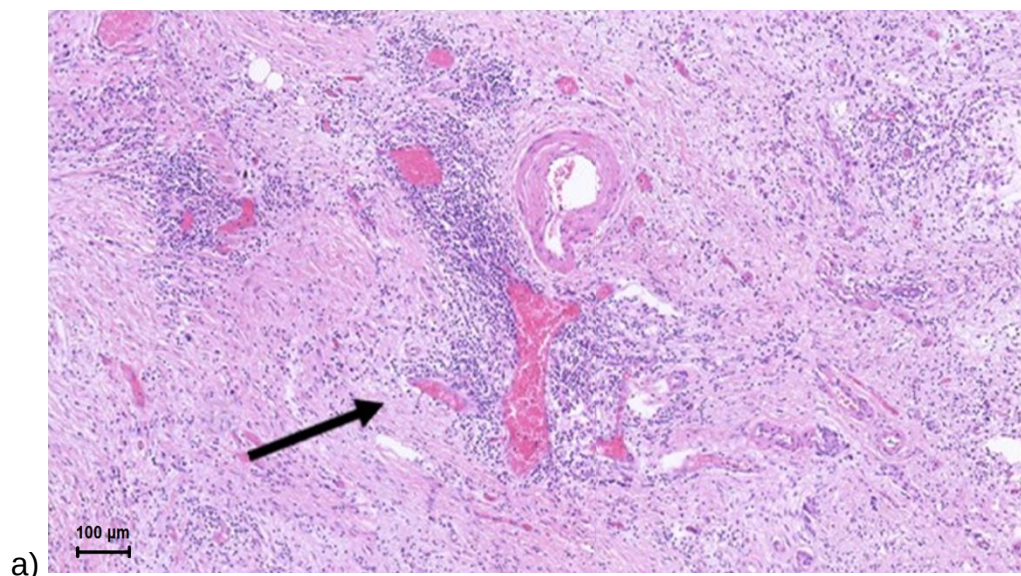
So erhalten wir 5 Stellen mit einer bestimmten Charakteristik. Zum Beispiel, erste Stelle: die Ausrichtung der extrazellulären Matrix ist ungeordnet, Fibroblasten sind rund, Fibroblastendichte ist hoch und die Dichte des Stromas ist auch hoch.

Für alle genannten Merkmale wurde das häufigste Morphologiemerkmal in allen 5 Lokalisationen als dominantes Merkmal gewertet. Beispielsweise ist die Ausrichtung der extrazellulären Matrix in 3 von 5 Stellen parallel. Das heißt, wir bewerten diesen Gewebeschnitt als Schnitt mit der parallelen Ausrichtung.

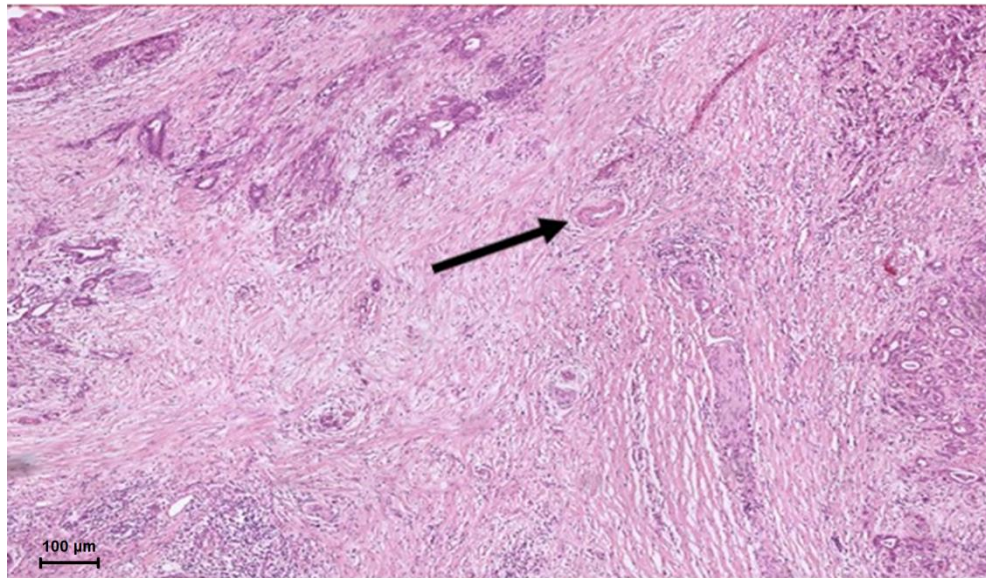
Es erfolgte weiterhin eine Untersuchung der Stroma-Gefäßdichte. Die Klassifikation wurde gemäß Weidner [109] modifiziert. Bei 20-facher Vergrößerung wurden die vier Stroma-Lokalisationen mit den meisten Mikrogefäßen bestimmt. Wir zählen zu den Mikrogefäßen die Kapillaren, Arteriolen und Venolen mit einem Durchmesser von weniger als 150 Mikrometern. Die Anzahl dieser Mikrogefäße wurde für jede Lokalisation bei 100-facher Vergrößerung gezählt und der Mittelwert für alle 4 Lokalisationen berechnet. Die Gefäßdichte wurde gemäß dem jeweiligen Medianwert der Mikrogefäße dichotomisiert, um die Variable Gefäßdichte zu bilden, Abb. 6a-b.

Abbildung 6a-b. Die Gefäßdichte. 10-fache Vergrößerung

1300 μm x 750 μm



1300 µm x 750 µm



- a - hohe Gefäßdichte. Pfeil zeigt auf dicht angeordnete Mikrogefäße;
b - niedrige Gefäßdichte. Pfeil zeigt auf wenige verstreute Mikrogefäße.

2.5. Immunhistochemie (IHC) und Färbeprotokolle

Die immunhistologische Färbung wurde von Herrn PD Dr. Dr. med. Peter Bronsert am Institut für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Freiburg durchgeführt. Alle Proben wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom in 0,3 µm dicke Leerschnitte angefertigt. Alle notwendigen Daten zu den verwendeten Antikörpern, Verdünnungen und Volumen sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Die Auswertung erfolgte für vier Antikörpern CD4, CD3, CD163 und p53. Zur Visualisierung wurde das EnVision-System von der Firma DAKO (Glostrup, Dänemark) benutzt. Die Bewertung erfolgte nach Inkubation unterschiedlicher Dauer, die auch in den Tabellen angegeben ist.

Protokoll Anti-CD163-Färbung

Art	Code-Nr.	Name	Ansatz	Volumen (µl)	Inkubationszeit (min)
Demaskierungspuffer		pH 9	1:10		20
Blockierung	SM801	EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent	RTU	100	5
Primärantikörperinkubation	EDHu-1	Anti-CD163	1:500	100	30
Sekundärreagenz	SM805	EnVision FLEX + Rabbit-Linker	RTU	100	15
Tertiärreagenz	SM802	EnVision FLEX/HRP	RTU	100	20
Chromogen	SM803	EnVision FLEX DAB + Substrat Buffer	1:51	100	5
Antikörperverdünnungspuffer	SM803			100	5

Protokoll Anti-CD3-Färbung

Art	Code-Nr.	Name	Ansatz	Volumen (µl)	Inkubationszeit (min)
Demaskierungspuffer		pH 9	1:10		20
Blockierung	SM801	EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent	RTU	100	5
Primärantikörperinkubation	IR503	Anti-CD3	RTU	100	30
Sekundärreagenz	SM805	EnVision FLEX + Rabbit-Linker	RTU	100	15
Tertiärreagenz	SM802	EnVision FLEX/HRP	RTU	100	20
Chromogen	SM803	EnVision FLEX DAB + Substrat Buffer	1:51	100	5
Antikörperverdünnungspuffer	SM803			100	5

Protokoll Anti-CD4-Färbung

Art	Code-Nr.	Name	Ansatz	Volumen (µl)	Inkubationszeit (min)
Demaskierungspuffer		pH 9	1:10		20
Blockierung	SM801	EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent	RTU	100	5
Primärantikörperinkubation	IR649	Anti-CD4	RTU	100	20
Sekundärreagenz	SM804	EnVision FLEX + Mouse-Linker	RTU	100	15
Tertiärreagenz	SM802	EnVision FLEX/HRP	RTU	100	20
Chromogen	SM803	EnVision FLEX DAB + Substrat Buffer	1:51	100	5
Antikörperverdünnungspuffer	SM803			100	5

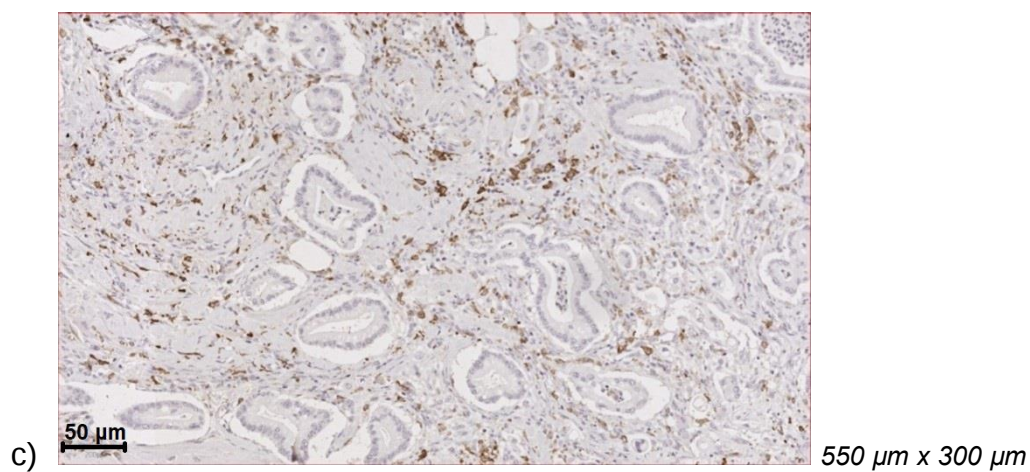
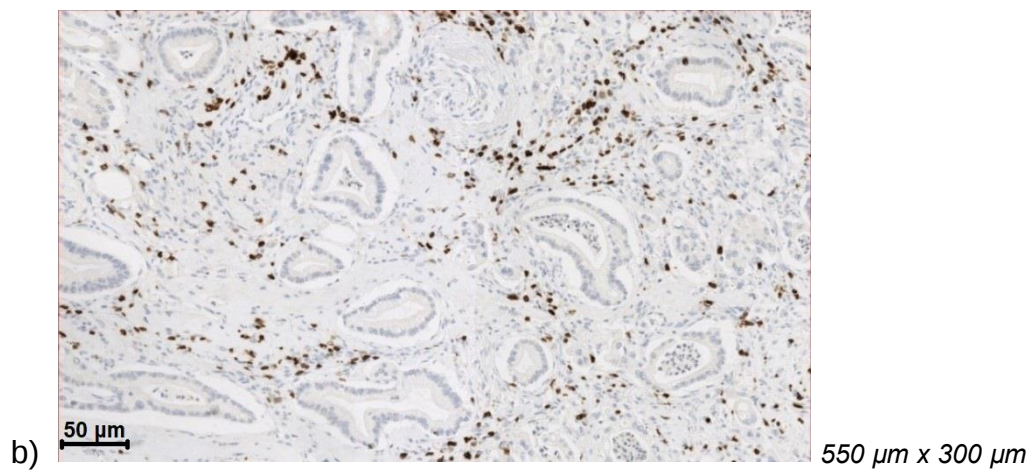
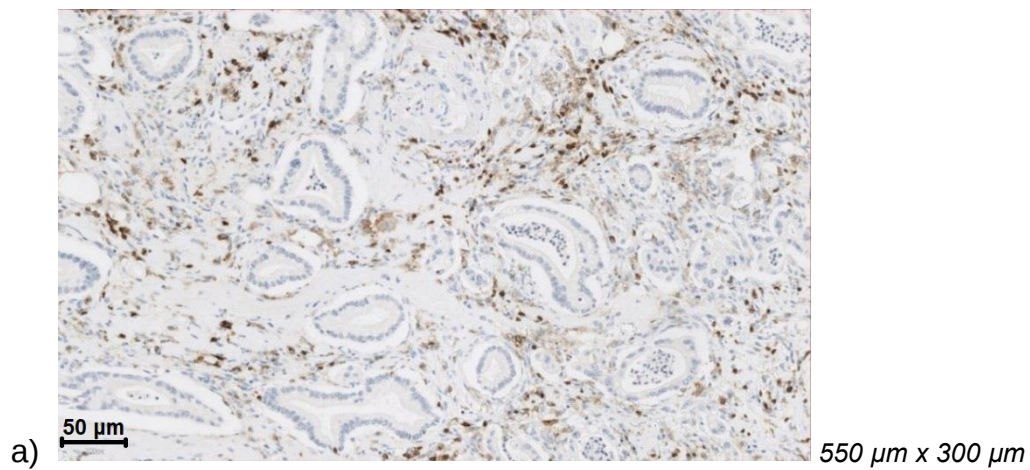
Protokoll Anti-p53-Färbung

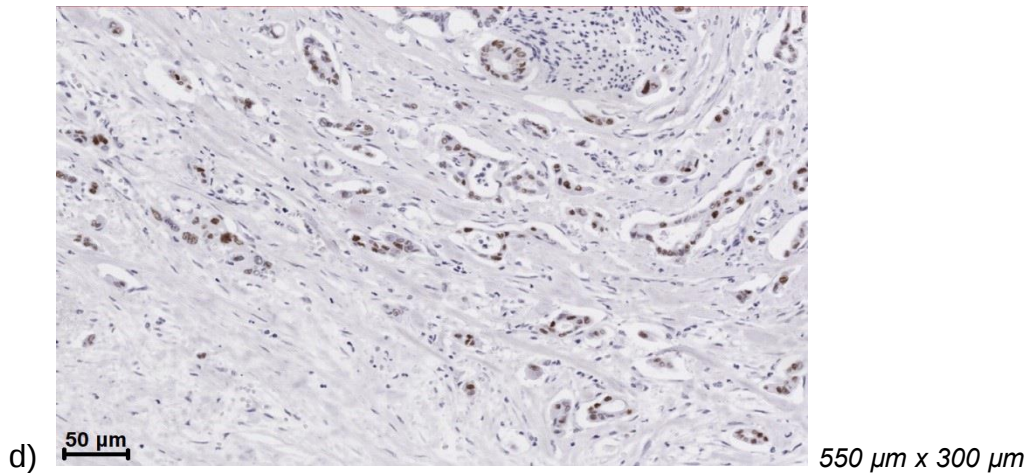
Art	Code-Nr.	Name	Ansatz	Volumen (µl)	Inkubationszeit (min)
Demaskierungspuffer		pH 6	1:10		20
Blockierung	SM801	EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent	RTU	100	5
Primärantikörperinkubation	IR616	Anti-p53	RTU	100	20
Tertiärreagenz	SM802	EnVision FLEX/HRP	RTU	100	20
Chromogen	SM803	EnVision FLEX DAB + Substrat Buffer	1:51	100	5
Antikörperverdünnungspuffer	SM803			100	5

Eine immunhistochemische Färbung der T-Zellmarker CD3, CD4 und des Makrophagenmarkers CD163 wurde durchgeführt, um stromale Immunzellpopulationen zu identifizieren (Abb. 7a-c). Die Anzahl der CD3- und CD4-positiven Zellen in allen Stromabereichen wurde bewertet und ein Verhältnis von

CD4- zu CD3-positiven Zellzahlen wurde berechnet. Das CD4/CD3-Verhältnis wurde unter Verwendung des 75-Perzentil-Cut-offs dichotomisiert, wie zuvor beschrieben [21].

Abbildung 7a-d. Immunzellpopulationen. 20-fache Vergrößerung





- a - Immunhistochemie-Färbung für CD4;
- b - Immunhistochemie-Färbung für CD3;
- c - Immunhistochemische Färbung für CD163;
- d - Immunhistochemische Färbung für p53.

Die Zahl CD163-positiver Zellen in den jeweiligen Stromabereichen wurden erhoben und die Zellzahlen mittels der medianen Zellzahl dichotomisiert. Darüber hinaus wurde eine immunhistochemische Färbung von p53 durchgeführt und die Gesamtzahl der p53-positiven Zellen pro Objektträger berechnet. Die p53-positive Zelldichte wurde gemäß dem 25-Perzentil dichotomisiert.

2.6. Auswertung und Statistik

Die Datenauswertung, Diagrammerstellung und statistische Berechnungen erfolgten mit IBM SPSS Statistics für Windows, Version 25.0. Kontinuierliche und kategoriale Variablen wurden als Median / Streuung bzw. absolute / relative Häufigkeit ausgedrückt. Statistische Tests zur Prüfung von Gruppenunterschieden wurden mittels Chi-Quadrat-Test oder Student-T-Test durchgeführt. Die Korrelationsanalyse wurde unter Verwendung des zweiseitigen Spearman-Rangtests durchgeführt. Zu vergleichenden Überlebenszeitanalyse wurden die Kaplan-Meier-Methode sowie das Cox-Regressions-Modell herangezogen. Das Signifikanz Niveau wurde auf $p < 0,05$ (zweiseitig) festgelegt. Alle angegebenen Konfidenzintervalle (CI) sind 95 % Intervalle.

3. Ergebnisse

3.1. Basisparameter, Histopathologie und Stromamorphologie

Insgesamt wurden 108 Patienten identifiziert, die im Zeitraum von 2011 bis 2016 eine onkologische Pankreaskarzinom-Resektion erhielten. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 17,5 Monate. Das mittlere Alter bei der Operation betrug 67 Jahre und reichte von 40 bis 86 Jahre. Eine Operation nach Whipple wurde bei 33 (30,6 %) Patienten durchgeführt, 55 (50,6 %) erhielten eine pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie (PPPD), bei 6 (5,6 %) Patienten erfolgte eine Pankreaslinksresektion und 14 (13,0 %) erhielten eine totale Pankreatektomie.

Die mittlere Tumorgroße betrug 3,0 cm und lag im Bereich von 0,8 bis 9,0 cm. Das häufigste T-Stadium war T2 (54,6 %). Die Mehrzahl der Patienten zeigte eine lokale Lymphknotenmetastasierung (68,4 %). 6 (5,6 %) Patienten hatten Fernmetastasen. Das häufigste Grading nach Broders war G2 (54,6 %). 23 Patienten (21,3 %) zeigten einen R1 Status. 33 (30,6 %) Patienten hatten eine parallele Ausrichtung von ECM-Strängen, während 79 (69,4 %) Patienten eine ungeordnete Ausrichtung zeigten. Nur 7 (6,5 %) von 41 Patienten mit heterogener Stromaausrichtung hatten hauptsächlich parallele Stromafasern, während 34 (31,5 %) Patienten eine hauptsächlich zufällige Orientierung der Stromafasern aufwiesen. Um die Genauigkeit der Beurteilung der Stromaausrichtung in H&E-Objektträgern zu bestimmen, wiederholten wir die Analyse der Stromafaserausrichtung nach der Färbung auf Kollagen I. Bei 31,8 % der Patienten wurde eine parallele Ausrichtung und bei 68,2 % eine zufällige Orientierung der Stromafasern festgestellt. Folglich ist die Genauigkeit der Stromafaserbewertung in H&E-gefärbten Objektträgern ausreichend und eine weitere Färbung von Kollagen I bringt keine zusätzlichen Vorteile. Die Dichte der ECM-Stränge war bei 62 (57,4 %) Patienten hoch und bei 46 (42,6 %) Patienten niedrig. 82 (75,9 %) Patienten hatten eine niedrige Fibroblastendichte, während 26 (24,1 %) eine hohe Fibroblastendichte zeigten. Die Fibroblastenmorphologie war bei 52 (48,1 %) Patienten rund, 56 (51,9 %) zeigten eine spindelförmige Fibroblastenmorphologie. Eine genaue Differenzierung von runden Fibroblasten und Immunzellen in H&E-Objektträgern kann schwierig sein. Nach dem Anfärben auf Immunzellpopulationen (CD3, CD4, CD163) wurde die Beurteilung der Fibroblastenmorphologie wiederholt. Das identifizierte Muster der

Fibroblastenmorphologie wurde nur in 2 von 108 Fällen verändert. Die mittlere Gefäßdichte betrug 10 Mikrogefäße pro Stroma-Lokalisation. 57 (52,8 %) Patienten zeigten eine niedrigere Mikrogefäßdichte als 10 Mikrogefäß- / Stroma-Lokalisation, während 51 (47,2 %) eine höhere Mikrogefäßdichte hatten. 27 (26,4 %) Patienten wiesen ein hohes CD4/CD3-Verhältnis auf, während 53 (50,0 %) eine hohe Dichte an CD163-positiven Zellen aufwiesen. 77 (71,8 %) Patienten hatten eine hohe Dichte an p53-positiven Zellen. Details der Basisparameter, der Histopathologie und der Stromamorphologie sind in Tabelle 2 gezeigt.

Bei Patienten mit Pankreatoduodenektomie wiesen 30 Patienten eine parallele Ausrichtung auf und 58 Patienten zeigten eine zufällige Ausrichtung der Stromafasern. Bei Patienten mit distaler Pankreatektomie (5 vs. 1 Patienten) und totaler Pankreatektomie (12 vs. 2 Patienten) war die Rate der Patienten mit zufälliger Orientierung der Stromafasern höher als bei Patienten, bei denen die Pankreatoduodenektomie stattgefunden hatte.

Bei 43 von 88 Patienten mit Pankreatoduodenektomie (48,8 %) wurde eine hohe Mikrogefäßdichte festgestellt. Bei Patienten mit distaler Pankreatektomie betrug die Rate der Patienten mit hoher Mikrogefäßdichte 2 von 6 (33,3 %). 6 von 14 Patienten (42,8 %) mit totaler Pankreatektomie wiesen eine hohe Mikrogefäßdichte auf.

Tabelle 2. Basisparameter und Histopathologie

<i>Basisparameter</i>	
Parameter	<i>Median (range) oder n (%)</i>
Total n	108
Alter	67 (40-86)
Geschlecht	
weiblich	41 (38.0)
männlich	67 (62.0)
Operationstechnik	
Operation nach Whipple	33 (30.6)
PPPD	55 (50.6)
TPE	14 (13.0)
Pankreaslinksresektion	6 (5.6)
	3.0 (0.8-9.0)
T Stadium	
T1	10 (17.6)
T2	59 (54.6)
T3	19 (17.6)
T4	11 (10.2)
N Stadium	
N0	33 (30.6)
N1	50 (46.3)
N2	25 (23.1)
M1	6 (5.6)
Grading	
G 1	5 (4.6)
G 2	59 (54.6)
G 3	43 (39.8)
G 4	1 (0.9)
R-Status	
R 0	85 (78.7)
R +	23 (21.3)

PPPD: Pylorus erhaltene pancreatoduodenectomy (Pylorus-preserving pancreatoduodenectomy);
TPE: Total pancreatectomy.

Tabelle 3. Stromamorphologie und Immunhistochemie

<i>Basisparameter</i>	
Parameter	Median (range) oder n (%)
Ausrichtung der ECM-Stränge	
parallel	33 (30.6)
ungeordnet	75 (69.4)
Dichte der ECM-Stränge	
niedrig	62 (57.4)
hoch	46 (42.6)
Fibroblastendichte	
niedrig	82 (75.9)
hoch	26 (24.1)
Fibroblastenmorphologie	
rund	52 (48.1)
spindelförmig	56 (51.9)
Gefäßdichte	
niedrig	57 (52.8)
hoch	51 (47.2)
CD4/CD3-Verhältnis	
niedrig	81 (73.6)
hoch	27 (26.4)
CD 163 positive Zelldichte	
<median 5368 Zellen	53 (50.0)
>median 5368 Zellen	53 (50.0)
p53 positive Zelldichte	
niedrig	31 (28.2)
hoch	77 (71.8)

3.2. Stromamorphologie und Histopathologie

3.2.1. Die Orientierung von stromalen extrazellulären Matrix (ECM) Strängen

Patienten mit ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge zeigten größere Tumoren (3,62mm vs. 2,87mm, $p = 0,037$) und einen Trend zu einem höheren T-Stadium (T3/4 33,3 % vs. T3/4 15,2 %, $p = 0,064$). Bei Patienten mit ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge wurde mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Lymphknotenmetastasierung festgestellt (76,0 % gegenüber 54,5 %, $p = 0,040$) sowie eine höhere Raten an R1-Resektionen (27,7 % gegenüber 9,1 %, $p = 0,008$). Details sind in Tabelle 4 gezeigt.

Die Ausrichtung der Stromafasern korrelierte nicht mit dem CD4/CD3-Verhältnis (CC -0,053, $p=0,593$), der Dichte von CD163-positiven Zellen (CC -0,15, $p=0,882$) oder der Dichte von p53-positiven Zellen (CC -0,99, $p=0,317$).

Tabelle 4. Die Orientierung von stromalen extrazellulären Matrix (ECM) Fibern

	Parallele Ausrichtung von ECM-Strängen	Ungeordnete Ausrichtung von ECM-Strängen	
	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>p-Wert</i>
Tumor größe	2.87 (0.21)	3.62 (0.16)	0.037
T Stadium			
T1-2	28 (84.8)	50 (66.7)	
T3-4	5 (15.2)	25 (33.3)	0.064
N Stadium			
N0	15 (45.5)	18 (24.0)	
N+	18 (54.5)	57 (76.0)	0.040
M Stadium			
M0	31 (93.9)	71 (94.7)	
M1	2 (6.1)	4 (5.3)	1.000
Grading			
G1-2	23 (69.7)	41 (54.7)	
G3-4	10 (30.3)	34 (45.3)	0.202
R Status			
R0	30 (90.9)	55 (73.3)	
R1	3 (9.1)	20 (27.7)	0.008

3.2.2. Die Dichte der extrazellulären Matrix

Patienten mit einer hohen Dichte der ECM-Stränge zeigten häufiger ein niedriges Grading (G1-2) (67,7 % vs. 47,8 % $p = 0,048$). Andere Indikatoren wie das T-Stadium (T1-2 74.2 % vs. T1-2 69.6 %), eine lokale Lymphknoten-Infiltration (N+ 67.7 % vs. N+ 71.7 %), das Vorhandensein von Fernmetastasen (M1 4.8 % vs. M1

6.5 %) und der R Status (R0 62.9 % vs. R0 71.1 %) zeigen keine signifikanten Unterschiede. Details sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5. Dichte der ECM-Stränge

	Hohe Dichte der ECM-Stränge	Niedrige Dichte der ECM-Stränge	
	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>p-Wert</i>
T Stadium			
T1-2	46 (74.2)	32 (69.6)	0.666
T3-4	16 (25.8)	14 (30.4)	
N Stadium			
N0	20 (32.3)	13 (28.3)	0.679
N+	42 (67.7)	33 (71.7)	
M Status			
M0	59 (95.2)	43 (93.5)	0.698
M1	3 (4.8)	3 (6.5)	
Grading			
G1-2	42 (67.7)	22 (47.8)	0.048
G3-4	20 (32.3)	24 (52.2)	
R Status			
R0	39 (62.9)	32 (71.1)	0.413
R1	23 (37.1)	13 (28.9)	

3.2.3. Fibroblastendichte

Es zeigte sich ein Trend zur Ausbreitung des Tumors auf die Lymphknoten bei Patienten mit hoher Fibroblastendichte (74,4 % vs. 53,8 %). Andere Parameter wie: T-Stadium (T1-2 72.0 % vs. T1-2 73.1 %), Vorhandensein von Fernmetastasen (M0 92.7 % vs. M0 100 %), Tumordifferenzierung (G1-2 59.8 % vs. G1-2 57.7 %) und

R-Status (R0 64.6 % vs. R0 72.0 %) zeigten keine Assoziation mit der Fibroblastendichte. Weitere Details sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6. Fibroblastendichte

	Hohe Fibroblastendichte	Niedrige Fibroblastendichte	
	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>p-wert</i>
T Stadium			
T1-2	59 (72.0)	19 (73.1)	
T3-4	23 (28.0)	7 (26.9)	0.563
N Stadium			
N0	21 (25.6)	12 (46.2)	
N+	61 (74.4)	14 (53.8)	0.091
M Status			
M0	76 (92.7)	26 (100)	
M1	6 (7.3)	0 (0)	0.332
Grading			
G1-2	49 (59.8)	15 (57.7)	
G3-4	33 (40.2)	11 (42.3)	1.000
R Status			
R0	53 (64.6)	18 (72.0)	
R1	29 (35.4)	7 (28.0)	0.630

3.2.4. Fibroblastenmorphologie

Die Fibroblastenmorphologie zeigte keine Assoziation mit weiteren histopathologischen Parametern. Weitere Details sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. Fibroblastenmorphologie

	Spindelartige Fibroblastenmorphologie	Große runde Fibroblastenmorphologie	
	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>p-wert</i>
T Stadium			
T1-2	39 (75.0)	39 (69.6)	
T3-4	13 (25.0)	17 (30.4)	0.668
N Stadium			
N0	16 (30.8)	17 (30.4)	
N+	36 (69.2)	39 (69.6)	1.000
M Status			
M0	48 (92.3)	54 (96.4)	
M1	4 (7.7)	2 (3.6)	0.425
Grading			
G1-2	29 (55.8)	35 (62.5)	
G3-4	23 (44.2)	21 (37.5)	0.558
R Status			
R0	36 (69.2)	35 (63.6)	
R1	16 (30.8)	20 (36.4)	0.683

3.2.5. Gefäßdichte

Es zeigte sich ein Trend für eine höhere Rate an Lymphknotenmetastasierung bei Patienten mit niedriger Gefäßdichte (77,2 % gegenüber 60,8 %, $p = 0,094$). Hinsichtlich des T-Stadiums (T1-2 70.2 % vs. T1-2 74.5 %), der Tumordifferenzierung (G1-2 66.7 % vs. G1-2 51.0 %), des Resektionsstatus (R0 63.2 % vs. R0 70.0 %) oder des Vorhandenseins von Fernmetastasen (M1 3.5 % vs. M1 7.8 %) zeigten sich keine Unterschiede für Patienten mit niedriger im Vergleich zu hoher Gefäßdichte. Details werden in Tabelle 8 gezeigt.

Tabelle 8. Mikrogefäßdichte

	Niedrige Mikrogefäßdichte	Hohe Mikrogefäßdichte	
	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>n (%) / Mittelwert (SE)</i>	<i>p-wert</i>
T Stadium			
T1-2	40 (70.2)	38 (74.5)	0.671
T3-4	17 (28.8)	13 (25.5)	
N Stadium			
N0	13 (22.8)	20 (39.2)	0.094
N+	44 (77.2)	31 (60.8)	
M Status			
M0	55 (96.5)	47 (92.2)	0.418
M1	2 (3.5)	4 (7.8)	
Grading			
G1-2	38 (66.7)	26 (51.0)	0.118
G3-4	19 (33.3)	25 (49.0)	
R Status			
R0	36 (63.2)	35 (70.0)	0.282
R1	21 (36.8)	15 (30.0)	

3.2.6. Ungeordnete extrazelluläre Matrix und geringe Gefäßdichte

Die Kombination von ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge mit einer geringen Anzahl von Mikrogefäßen zeigte eine Assoziation mit der Ausbreitung des Tumors auf lokale Lymphknoten (61,8 % vs. 82,5 %, $p = 0,031$). Andere Parameter wie das T Stadium (T1-2 76.5 % vs. T1-2 65.0 %), R-Status (R0 70.6 % vs. R0 57,5 %), das Vorhandensein von Fernmetastasen (M1 7.4 % vs. M1 2,5 %) und die Tumordifferenzierung (G1-2 58.8 % vs. G1-2 60,0 %) zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Details sind in Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9. Ungeordnete Ausrichtung der ECM-Stränge und niedrige Gefäßdichte

	Nicht vorhanden	Vorhanden	p-Wert
	n (%) / Mittelwert (SE)	n (%) / Mittelwert (SE)	
Tumorgröße	3.34 (0.17)	3.47 (0.22)	0.797
T Stadium			
T1-2	52 (76.5)	26 (65.0)	0.266
T3-4	16 (23.5)	14 (35.0)	
N Stadium			
N0	26 (38.2)	7 (17.5)	0.031
N+	42 (61.8)	33 (82.5)	
M Status			
M0	63 (92.6)	39 (97.5)	0.409
M1	5 (7.4)	1 (2.5)	
Grading			
G1-2	40 (58.8)	24 (60.0)	1.000
G3-4	28 (41.2)	16 (40.0)	
R Status			
R0	48 (70.6)	23 (57.5)	0.209
R1	20 (29.4)	17 (52.5)	

3.3. Überlebensanalyse

Das mediane Gesamtüberleben (OS) betrug bei allen Patienten 15,4 Monate. Details der Überlebensanalyse sind in Tabelle 10 und 11 gezeigt. N-Stadium (N0 39,1 Monate vs. N + 24,1 Monate, $p = 0,022$), R-Status (R0 30,9 Monate vs. R + 23,8 Monate, $p = 0,022$) und Ausrichtung der ECM-Stränge (parallele Ausrichtung 42,0 Monate vs. ungeordnete Ausrichtung 22,0 Monate, $p = 0,046$) zeigten sich als prognostische Parameter. Bei Patienten mit hoher Gefäßdichte (36,0 Monate gegenüber 26,0 Monaten, $p = 0,061$) zeigte sich ein Trend zu einem verbesserten

Gesamtüberleben. Für Patienten mit heterogener vs. homogener Ausrichtung der Stromafasern (28 Monate versus 33 Monate, $p=0,167$) wurde kein Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt. Ein hohes CD4/CD3-Verhältnis war mit reduzierten Gesamtüberlebensraten (16 Monate vs. 33 Monate, $p=0,040$) verbunden. Patienten mit hoher Stromadichte von CD163-Zellen hatten eine schlechte Prognose (27 Monate vs. 34 Monate, $p=0,039$). In der multivariablen Analyse wurde die Kombination aus zufälliger Ausrichtung der Stromafasern und niedriger Mikrogefäßdichte (HR 1,592, 95 % CI 1,098–2,733, $p = 0,029$) als unabhängige prognostische Faktor festgestellt. Eine hohe CD4/CD3-Verhältnis (HR 2,044, 95 % CI 1,203–3,508, $p = 0,028$) und eine hohe Dichte an CD163-positiven Zellen (HR 1,596, 95 % CI 1,367–1,968, $p=0,036$) verblieben auch als unabhängige prognostische Faktoren.

Tabelle 10. Überlebensanalyse bei Basisparameter und Histopathologie

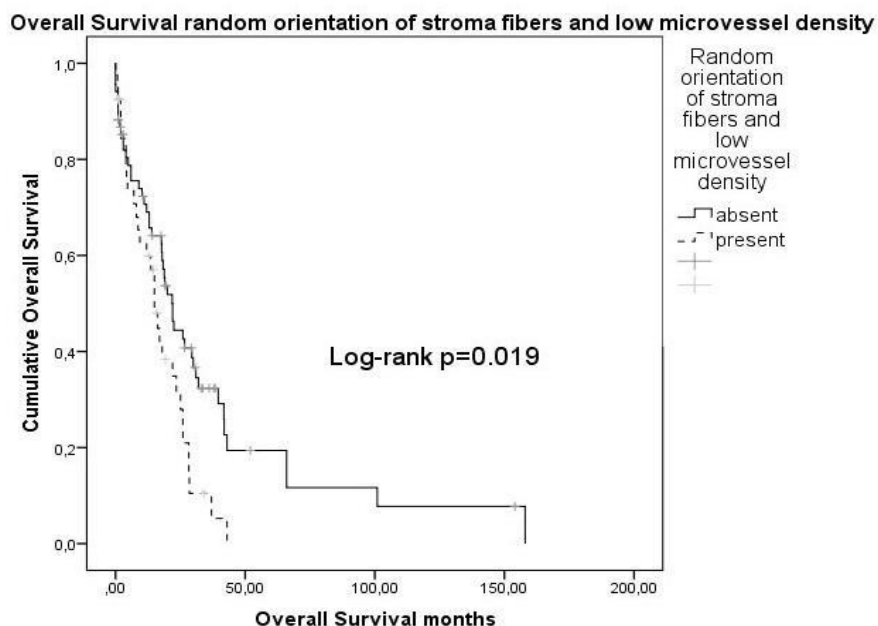
Analyse des Gesamtüberlebens								
	Univariate				Multivariate			
Parameter	HR	95% Konfidenzintervall	p-Wert		HR	95% Konfidenzintervall	p-Wert	
Alter								
< median 67								
> median 67	1.519	0.970	2.831	0.068				
Geschlecht								
weiblich								
männlich	1.608	1.016	2.542	0.142				
Tumorgroße in cm								
< median 3.0								
> median 3.0	1.348	1.159	2.114	0.036	1.225	0.773	1.942	0.388
T Stadium								
T1/2								
T3/4	0.732	0.440	1.217	0.723				
N Stadium								
N0								
N+	1.568	1.260	2.621	0.022	1.366	0.791	2.359	0.357
M Status								
M0								
M1	1.024	0.425	3.404	0.727				
Grading								
G 1/2								
G 3/4	1.627	1.032	2.532	0.336				
R-Status								
R 0								
R 1	1.343	1.136	2.157	0.022	1.215	0.750	1.967	0.430

Tabelle 11. Überlebensanalyse bei Stromamorphologie und Immunhistochemie

Ausrichtung der ECM-Stränge									
parallel									
ungeordnet	1.443	1.280	2.364	0.046	1.220	0.719	2.072	0.079	
Dichte der ECM-Stränge									
niedrig									
hoch	1.001	0.633	1.518	0.998					
Fibroblastendichte									
niedrig									
hoch	1.350	0.817	2.232	0.241					
Fibroblastenmorphologie									
rund									
spindelförmig	1.002	0.643	1.561	0.994					
Gefäßdichte									
niedrig									
hoch	0.602	0.345	1.050	0.061	0.568	0.279	1.157	0.119	
Ungeordnete Ausrichtung von ECM-Strängen und niedrigem Gefäßdichte									
nicht vorhanden									
vorhanden	1.748	1.098	2.785	0.019	1.592	1.098	2.733	0.029	
CD4/CD3-Verhältnis									
niedrig									
hoch	1.686	1.024	2.777	0.040	2.044	1.203	3.508	0.028	
CD 163 positive Zelldichte									
niedrig									
hoch	0.620	0.394	0.975	0.039	1.596	1.367	1.968	0.036	
p53 positive Zelldichte									
niedrig									
hoch	0.974	0.582	1.689	0.919					

Patienten mit ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge und niedriger Gefäßdichte hatten im Vergleich zu Patienten ohne diese Stroma-Merkmale (16,2 Monate gegenüber 36,0 Monaten, $p = 0,019$) ein deutlich reduziertes Gesamtüberleben (siehe Abb. 8). In der multivariablen Analyse zeigte sich nur die Kombination der ungeordneten Ausrichtung der ECM-Stränge mit einer geringen Gefäßdichte (HR 1,592, 95 % CI 1,098-2,733, $p = 0,029$) als unabhängiger Prognosefaktor.

Abbildung 8. Gesamtüberleben bei ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge und geringer Gefäßdichte



Ungeordnete Ausrichtung von ECM-Strängen und niedrigem Gefäßdichte

----- vorhanden

— nicht vorhanden

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Diese vorliegende Studie ermöglicht eine systematische Untersuchung der PDAC-Stromamorphologie und bietet damit einen einfachen Klassifizierungs-Algorithmus, der ohne Mehraufwand in die klinische Routine integrierbar ist.

Sowohl die Ausrichtung der ECM-Stränge, die Gefäßdichte als auch die Verteilung von Immunzellpopulationen spielen eine Rolle für die Prognose der Patienten mit PDAC. Die ungeordnete Ausrichtung der ECM-Stränge allein korreliert mit der lokalen Tumorprogression und der lokoregionalen Tumor-Invasion. Die Kombination aus ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge und geringer Gefäßdichte ist unabhängiger negativer Prognosefaktor. Immunzellinfiltrate, insbesondere ein hohes CD4/CD3-Verhältnis und eine hohe Anzahl von CD163-positiven tumorassoziierten Makrophagen bestimmen die Prognose.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Im Jahr 1986 verglich Dvorak die Narbenbildung im Rahmen von Tumor- und Wundheilungsprozessen und beschrieb so viele Ähnlichkeiten zwischen Karzinogenese und Granulation konventioneller Wunden. Der Autor beschrieb dabei Tumoren als Wunden, die nicht „heilen“ [27]. Im Gegensatz zu regelrechter Wundheilung und Narbenbildung sei der Prozess im Krebsgewebe nicht selbstlimitierend, sondern führe zu Tumorprogression und Invasion. Diese Hypothese wird zunehmend durch aktuelle Daten, insbesondere für Pankreaskarzinom, gestützt. Überwiegend fibrotische Bereiche, die als Desmoplasie bezeichnet werden, sind ein charakteristisches Merkmal von Pankreaskarzinom. Während der Karzinogenese werden lokal ruhende Pankreas-Sternzellen in einen aktiven Myofibroblasten-Phänotyp umgewandelt, der große Mengen an extrazellulärer Matrix wie Kollagenen, Lamininen und Fibronektinen sekretiert [6,73]. Aktivierte Tumor-assoziierte Fibroblasten und extrazelluläre Matrixproteine sind Hauptbestandteile der PDAC-Desmoplasie. Die Desmoplasie bildet hierbei eine „Nische“ für PDAC-Tumorzellen, und spielt eine wichtige Rolle bei der Förderung von Tumorprogression sowie lokaler und systemischer Tumorzellinvasion [80]. In dieser sogenannten Tumorzell-Nische findet ein aktiver

Austausch von Signalen zwischen Zellen des Stromas und Tumorzellen statt. Diese Interaktion fördert nicht nur die Weiterentwicklung und Aufrechterhaltung des desmoplastischen Stromas, sondern auch eine lokale Immunsuppression, die es den Tumorzellen ermöglicht, einer gegen sie gerichteten Immunantwort zu entkommen. Stromakomponenten unterstützen weiterhin Wege der Metastasierung, indem sie Neo-Angiogenese und die Entwicklung von motilen Tumorzellen, beispielsweise über den Weg der epithelialen-zu-mesenchymalen Transition, stimulieren [88].

Die ungeordnete Ausrichtung der ECM-Stränge ist ein morphologischer Indikator für Granulation und starke Stroma-Aktivierung bei Pankreaskarzinom. In der aktuellen Studie wurde dieses spezielle morphologische Stroma-Merkmal bei der Mehrheit der Patienten (69,4 %) identifiziert. Die ungeordnete Ausrichtung der ECM-Stränge korrelierte mit der Tumorgröße und der Lymphknoteninvasion, was die lokale Progression und die lokoregionale Invasion widerspiegelte. Die zufällige Orientierung der Stromafasern war auch mit randpositiven Resektionen bei PDAC-Patienten verbunden. Diese Assoziation unterstützt die Hypothese einer lokalen Tumorprogression durch übermäßige Desmoplasie, die schließlich einer vollständigen Resektion weniger zugänglich ist. Die ungeordnete Ausrichtung der ECM-Stränge war auch mit R1-Resektionen bei PDAC-Patienten assoziiert, was die Hypothese einer lokalen Tumorprogression durch überschüssende Desmoplasie stützt. Diese Desmoplasie sowie die lokoregionale Tumorzellausbreitung stellt dabei ein Problem für die vollständige onkologische Resektion dar. Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass eine ausgeprägte Fibrose am Resektionsrand die vollständige kurative Resektion erschwert [110]. Patienten mit ausgeprägter Fibrose direkt am Resektionsrand zeigten weiterhin ein deutlich reduziertes Gesamtüberleben. Die PDAC-Desmoplasie spielt also auch in der klinischen Praxis eine Rolle und beeinträchtigt die Resektabilität von Pankreaskarzinom Tumoren. Eine aktuelle Studie untersuchte den Einfluss der Stromafaserorientierung auf das Gesamtüberleben bei Pankreaskarzinom [25]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der aktuellen Studie fanden die Autoren einen Zusammenhang zwischen paralleler Ausrichtung der Stromafasern und einem beeinträchtigten Gesamtüberleben. Als Einschränkung wurden ausschliesslich TMAs, aber nicht ganze Objektträger von PDAC-Proben untersucht, und Hauptbereiche des Tumors wurden möglicherweise vernachlässigt. Die aktuelle Studie zeigte bei 37,3 % der Patienten eine

intratumorale Heterogenität. Ein dominantes stromales Ausrichtungsmuster konnte nur durch die Beurteilung verschiedener Regionen des Objektträgers aufgedeckt werden. Darüber hinaus wurde die Mikrogefäßmorphologie in der zitierten Studie nicht bewertet. Die Autoren verwendeten eine komplexe, mehrstufige Bildgebungstechnik, um Fasern zu visualisieren und ihre Ausrichtung zu bestimmen. Diese Stromafaser-Bewertungsmethode wird in der klinischen Standardroutine schwer zu implementieren sein. Im Gegensatz dazu ist die in der aktuellen Studie beschriebene Beurteilung der Stromaausrichtung eine einfache visuelle Klassifikation, die schnell in die pathologische Standarddiagnostik integriert werden kann.

Patienten mit paralleler Ausrichtung der ECM-Stränge hatten kleinere Tumoren mit einer geringeren Rate an Lymphknotenmetastasen und höheren Raten von kurativen R0-Resektionen. Eine mögliche Hypothese ist, dass die desmoplastische Transformation während der Karzinogenese bei diesen Patienten weniger ausgeprägt war. Dies könnte mit geringerer Stimulation der Tumorprogression durch das lokale Stroma assoziiert sein. Die Ausrichtung von ECM-Strängen zeigte sich als prognostischer Parameter mit einem erheblichen Unterschied im Gesamtüberleben für Patienten mit ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge (22 Monate) im Gegensatz zu Patienten mit paralleler Ausrichtung von ECM-Strängen (42 Monate). Dieses Stroma-Merkmal konnte jedoch nicht als unabhängiger Prognoseparameter identifiziert werden. Neben der Ausrichtung der ECM-Stränge waren auch die histopathologischen Variablen Tumorgroße, N-Status und R-Status, die alle jeweils mit der Ausrichtung der ECM-Stränge korrelieren, prognostische Faktoren in der univariaten Analyse. Höchstwahrscheinlich führte diese Verbindung dazu, dass sich die Variable "Ausrichtung der ECM-Stränge" in der multivariaten Analyse nicht mehr signifikant zeigte.

Studien zur Desmoplasie im Bereich des Kolonadenokarzinoms [104], des Lungenkarzinom [65] und bei Brustkrebs [15] zeigen ähnliche Daten.

In der vorliegenden Studie war die Dichte der ECM-Stränge nicht mit Tumorprogression oder dem Gesamtüberleben assoziiert. In einem In-vitro-Modell konnte gezeigt werden, dass dichtes Stroma das Wachstum von PDAC-Tumorzellen begrenzt und zeitgleich den Prozess der epithelialen-zu-mesenchymalen Transition induziert [11]. Die einzige klinische Studie zur Bewertung des prognostischen Effekts der Stroma-Dichte auf die PDAC-Prognose

wurde vor kurzem von Torphy et al. [102] veröffentlicht. Die Autoren konnten eine verbesserte progressionsfreie und Gesamtüberlebensrate bei Patienten mit dichtem Stroma zeigen. Dieser Effekt galt allerdings nur für Patienten, die keine adjuvante Therapie erhalten hatten. In der vorliegenden Studie wurde routinemäßig eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt.

Fibroblasten-Dichte und -Morphologie waren in der vorliegenden Studie ebenfalls nicht mit dem Gesamtüberleben verbunden. In In-vitro-Modellen kann die Transformation von runden ruhenden Fibroblasten zu aktivierten spindelartig geformten Myofibroblasten genauso wie die gesteigerte Proliferation von Fibroblasten durch Co-Kultivierung mit PDAC-Tumorzellen erreicht werden [4,11].

Man kann vermuten, dass diese Prozesse bei reifen PDAC-Tumoren nicht verifiziert werden können, aber in der frühen Karzinogenese vorhanden sind. Zusätzlich zu aktiven und inaktiven Fibroblasten konnten aktuelle Studien Fibroblasten-Subtypen identifizieren, die teilweise immunsuppressive oder Stammzell-induzierende Eigenschaften aufweisen [75,20,60]. Diese Subtypen können nicht allein durch morphologische Analyse identifiziert werden.

Für Pankreaskarzinom konnte bisher keine prognostische Relevanz der Morphologie und der Anzahl der Fibroblasten in klinischen Studien gezeigt werden. In anderen Tumorentitäten wiederum spielen diese morphologischen Kriterien eine entscheidende Rolle. Beispielsweise ist das Vorhandensein runder „unreifer“ Fibroblasten im Stroma des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus (ESCC) ein starker Prognosefaktor, der auch mit einer erhöhten Gefäßdichte und einer Makrophagen-Infiltration in Zusammenhang steht [39].

Tumor-Hypoxie ist ein wichtiges Merkmal von Pankreaskarzinom, und das Gesamtüberleben nimmt mit dem Ausmaß der hypoxischen Regionen in PDAC-Tumoren ab. Im Gegensatz zu anderen soliden Malignitäten ist die Hypoxie bei Pankreaskarzinom besonders ausgeprägt [30,47]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die große Menge Hyaluron im Stroma, die durch Flüssigkeitsansammlungen den interzellulären Druck erhöht. Dies wiederum führt zur Kompression von Mikrogefäßen. Als direkte Folge wird die Diffusion von Nährstoffen und Chemotherapeutika erschwert [111]. Unter diesen Bedingungen zeigt sich eine deutlich aggressivere Tumorzellinvasion [106].

PDAC-Tumorzellen sind einer begrenzten Sauerstoffversorgung ausgesetzt und entwickeln einen invasiven und chemoresistenten Phänotyp [33,31]. Die

ausgeprägte PDAC-Desmoplasie fördert wiederum die Tumor-Hypoxie durch lokale Verdrängung von Kapillaren [33,89,9].

Neben der mikrovaskulären Kompression selbst zeichnet sich das PDAC-Stroma durch eine geringe Gefäßdichte aus [4,57]. Hypoxie innerhalb des Tumors steht in direktem Zusammenhang mit Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung. [13,48]. Neo-Angiogenese zeigte sich bei zahlreichen Neoplasien wie dem kolorektalen Karzinom [99], Brustkrebs [109,87,105], dem Magenkarzinom [120] oder Lungenkrebs [42] mit einer schlechten Prognose verbunden. Neo-Angiogenese spielt ebenfalls eine Rolle bei Pankreaskarzinom. In einer Studie von Barău et al. [8] wurde gezeigt, dass die größte Anzahl neu gebildeter kleiner Gefäße intratumoral aufzufinden ist, was das Vorhandensein neo-angiogenetischer Prozesse bei Pankreaskarzinom bestätigt. Zusätzlich zeigte sich peritumoral im Vergleich zum normalem Pankreasgewebe eine höhere Gefäßdichte. Hier wird deutlich, dass neo-angiogenetische Prozesse über die eigentliche Tumorregion hinausgehen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die mikrovaskuläre Dichte in Pankreaskarzinom selbst nicht mit der Ausbreitung des Tumors auf die Lymphknoten korreliert. Das bestätigt auch unsere Studie. In einer weiteren Studie [118] konnte keine Assoziation zwischen Gefäßdichte und dem rezidivfreien oder dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse unserer Studie. Insgesamt scheinen die jeweils einzelnen Stromakomponenten nur eine untergeordnete klinische Bedeutung zu haben. Als einziger unabhängiger Prognosefaktor ergab sich in unserer Studie die Kombination aus Ausrichtung der ECM-Stränge und geringer Gefäßdichte.

Desmoplasie und Hypoxie zusammen halten sich als Mechanismen gegenseitig aufrecht, dies führt zu gesteigerter Tumorinvasivität bei Pankreaskarzinom. Diese Verbindung wird durch die aktuelle Studie gestützt. Die ungeordnete Ausrichtung der ECM-Stränge und eine geringe Gefäßdichte waren mit Lymphknotenmetastasierung verbunden. Darüber hinaus erwies sich die Kombination aus zufälliger Orientierung der Stromafasern und geringer Mikrogefäßdichte in dieser Studie als unabhängiger negativer prognostischer Parameter. Folglich scheint die Kombination von ausgeprägter Desmoplasie und Hypoxie ein wichtiger histologischer Aspekt der PDAC-Mikroumgebung zu sein, der mit einer schlechten Prognose verbunden ist. Infolgedessen scheint die Kombination von ausgeprägter Desmoplasie und Hypoxie ein klinisch

entscheidender und prognostisch relevanter Aspekt des PDAC-Mikromilieus zu sein.

Tumordinfiltrierende Lymphozyten sind Teil der PDAC-Mikroumgebung und beeinflussen nachweislich die Tumorprogression und sogar die Patientenprognose [52,38]. CD3 ist ein Co-T-Zell-Rezeptor, der für die Aktivierung sowohl von zytotoxischen als auch von Helfer-T-Zellen benötigt wird. Kürzlich wurde eine Korrelation zwischen hohen CD3-Zellzahlen und günstigen pathologischen Eigenschaften nachgewiesen [21]. Eine vor kurzem durchgeführte Metaanalyse betonte die Bedeutung von Lymphozytenverhältnissen und empfahl, CD3-positive Infiltrate im Verhältnis zu allen CD4-positiven T-Helferzellen zu bewerten [38]. Unsere Studie zeigte eine schlechte Prognose bei Patienten mit hohen CD4/CD3-Verhältnissen. Diese Ergebnisse stimmen mit einer aktuellen Studie überein, die ein reduziertes krankheitsfreies und Gesamtüberleben bei Patienten mit hohen CD4/CD3-Verhältnissen zeigt [21].

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bilden eine Untergruppe der PDAC-Immunmikroumgebung. Diese Zellen zeichnen sich durch eine positive CD163-Expression aus und orchestrieren die Tumorevasion aus der Immunüberwachung durch entzündungshemmende Zytokinsignale [101]. In unserer Studie waren hohe Stroma-Infiltrate von CD163-positiven Zellen mit einem reduzierten Gesamtüberleben verbunden. Dies bestätigt die Zahlen früherer Studien, die ein schlechtes Ergebnis bei PDAC-Patienten mit hohen CD163-Zellzahlen zeigten [55,115].

4.3. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend präsentieren wir ein einfaches morphologisches Klassifikations-System für das PDAC-Stroma. Die Ausrichtung der ECM und die Gefäßdichte waren mit dem Stadium der Tumorentwicklung, der lokalen und regionalen Invasion sowie der Resektabilität des Tumors verbunden. Die Kombination von ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge und einer geringen Gefäßdichte ist ein unabhängiger Prognoseparameter für Patienten mit Pankreaskarzinom. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Hypoxie und schwere Desmoplasie eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Pankreaskarzinom spielen und die Hauptstromakomponenten sind, die das Überleben von Patienten bestimmen. Hohe CD4/CD3-Stroma-Verhältnisse und hohe Infiltrate von tumorassoziierten

Makrophagen waren mit einem reduzierten Gesamtüberleben verbunden. Die Bewertung der Stroma-Morphologie kann ein Schritt sein, um zukünftig Patienten für eine spezifische Stroma-gerichtete Therapie auszuwählen.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Desmoplasie ist ein Hauptmerkmal des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC). Ziel der Studie war es, ein einfaches Klassifizierungsmodell zur Bewertung der Stroma-Morphologie zu entwickeln.

Methodik: Die Studie umfasste Patienten mit onkologischen Pankreasresektionen aus einer prospektiv geführten Datenbank. Histologische Proben wurden auf morphologische Stroma-Merkmale wie Ausrichtung der extrazellulären Matrix (ECM), ECM-Dichte, Fibroblastendichte, Fibroblastenmorphologie, Gefäßdichte und Verteilung von Immunzellpopulationen untersucht.

Ergebnisse: Im Zeitraum von 2011 bis 2016 wurden insgesamt 108 Patienten identifiziert, die eine onkologische PDAC-Resektion erhielten. Das Durchschnittsalter betrug 67 Jahre und 62 % der Patienten waren männlich. In Bezug auf Stroma-Merkmale zeigten insgesamt 33 (30,6 %) Patienten eine parallele Ausrichtung der ECM-Stränge, während 75 (69,4 %) eine ungeordnete Ausrichtung der ECM-Stränge hatten. Im Vergleich zur parallelen Ausrichtung war die zufällige Orientierung der stromalen ECM-Fibern mit größeren Tumoren (Median 3,62 cm gegenüber Median 2,87 cm, $p = 0,037$), einer lokalen Lymphknotenmetastasierung (76,0 % gegenüber 54,5 %, $p = 0,040$), positivem R-Status (41,9 % gegenüber 15,2 %, $p = 0,008$) und einem Trend zu höheren Raten von T3/4 Tumoren (33,3 % gegenüber 15,2 %, $p = 0,064$) verbunden. In der univariaten Analyse hatten Patienten mit paralleler Ausrichtung der stromalen ECM-Stränge eine verbesserte Gesamtüberlebensrate im Vergleich zu Patienten mit ungeordneter Ausrichtung der ECM-Stränge (42 Monate gegenüber 22 Monaten, $p = 0,046$). Die Kombination aus zufälliger Orientierung der stromalen ECM-Fibern und geringer Gefäßdichte war mit einer Beeinträchtigung der Gesamtüberlebensrate verbunden (16 Monate gegenüber 36 Monaten, $p = 0,019$). Ein hohes CD4/CD3-Verhältnis (16 Monate vs. 33 Monate, $p=0,040$) und eine hohe Stromadichte von CD163-positiven Zellen waren mit einem reduzierten Gesamtüberleben verbunden (27 Monate vs. 34 Monate, $p=0,039$). In der multivariablen Analyse wurde die Kombination aus zufälliger Orientierung der Stromafasern und niedriger Mikrogefäßdichte (HR 1,592, 95 % CI 1,098–2,733, $p = 0,029$), einem hohen CD4/CD3-Verhältnis (HR 2,044, 95 % CI 1,203–3,508, $p = 0,028$) und eine hohe Dichte an CD163-positiven Zellen

(HR 1,596, 95 % CI 1,367-1,968, $p=0,036$) als unabhängige prognostische Faktoren festgestellt.

Schlussfolgerung: Die Ausrichtung der stromalen ECM-Fibern und die Gefäßdichte sind einfache histomorphologische Merkmale, die als Surrogatmarker für das Ausmaß der lokalen Tumorprogression dienen und die Prognose bei PDAC-Patienten bestimmen. Ein hohes CD4/CD3-Verhältnis und CD163-positive Zellzahlen bestimmen eine schlechte Prognose.

6. Literaturverzeichnis

1. Alifano M, Mansuet-Lupo A, Lococo F, Roche N, Bobbio A, Canny E, et al. Systemic inflammation, nutritional status and tumor immune microenvironment determine outcome of resected non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2014;9: e106914.
2. American Cancer Society. Key statistics for pancreatic cancer. Cancer.org <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/key-statistics.html> (2018).
3. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, et al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*. 1999;44: 534–541.
4. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 2004;29: 179–187.
5. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol*. 2012;3: 344.
6. Apte MV, Xu Z, Pothula S, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too! *Pancreatology*. 2015;15: S32–8.
7. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2014;4: 62.
8. Barău A, Ruiz-Sauri A, Valencia G, Gómez-Mateo MDC, Sabater L, Ferrandez A, et al. High microvessel density in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with high grade. *Virchows Arch*. 2013;462: 541–546.
9. Baril P, Gangeswaran R, Mahon PC, Caulee K, Kocher HM, Harada T, et al. Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the $\beta 4$ integrin and the PI3k pathway. *Oncogene*. 2007. pp. 2082–2094. doi:10.1038/sj.onc.1210009
10. Bartsch DK, Gress TM, Langer P. Familial pancreatic cancer—current knowledge. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9: 445–453.

11. Bolm L, Cigolla S, Wittel UA, Hopt UT, Keck T, Rades D, et al. The Role of Fibroblasts in Pancreatic Cancer: Extracellular Matrix Versus Paracrine Factors. *Transl Oncol.* 2017;10: 578–588.
12. Brand RE, Lerch MM, Rubinstein WS, Neoptolemos JP, Whitcomb DC, Hruban RH, et al. Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut.* 2007;56: 1460–1469.
13. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 1996;56: 941–943.
14. Broders AC Sr. Malignant neoplasia of normally situated and heterotopic lymphoid tissue and its numerical microscopic grading. *Tex State J Med.* 1953;49: 234–240.
15. Cardone A, Tolino A, Zarcone R, Borruto Caracciolo G, Tartaglia E. Prognostic value of desmoplastic reaction and lymphocytic infiltration in the management of breast cancer. *Panminerva Med.* 1997;39: 174–177.
16. Casini A, Galli A, Pignatola P, Frulloni L, Grappone C, Milani S, et al. Collagen type I synthesized by pancreatic periacinar stellate cells (PSC) co-localizes with lipid peroxidation-derived aldehydes in chronic alcoholic pancreatitis. *J Pathol.* 2000;192: 81–89.
17. Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 12877–12882.
18. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of Oncology.* 2012. p. 2773. doi:10.1093/annonc/mds491
19. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res.* 2007;67: 9518–9527.
20. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med.* 2011;17: 500–503.
21. Delayre T, Guilbaud T, Resseguier N, Mamessier E, Rubis M, Moutardier V, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes and cancer-

- associated fibroblasts in patients with pancreatic adenocarcinoma of the body and tail undergoing resection. *Br J Surg*. 2020;107: 720–733.
22. Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B, Klöppel G. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines. *Mod Pathol*. 2006;19: 1019–1026.
 23. Detlefsen S, Sipos B, Zhao J, Drewes AM, Klöppel G. Autoimmune pancreatitis: expression and cellular source of profibrotic cytokines and their receptors. *Am J Surg Pathol*. 2008;32: 986–995.
 24. Diana A, Wang LM, D’Costa Z, Allen P, Azad A, Silva MA, et al. Prognostic value, localization and correlation of PD-1/PD-L1, CD8 and FOXP3 with the desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016;7: 40992–41004.
 25. Drifka CR, Loeffler AG, Mathewson K, Keikhosravi A, Eickhoff JC, Liu Y, u. a. Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection. *Oncotarget*. 15. November 2016;7(46):76197–213.
 26. Dunér S, Lopatko Lindman J, Ansari D, Gundewar C, Andersson R. Pancreatic cancer: the role of pancreatic stellate cells in tumor progression. *Pancreatology*. 2010;10: 673–681.
 27. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med*. 1986;315: 1650–1659.
 28. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17: 1471–1474.
 29. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18: 884–901.
 30. Elaileh A, Saharia A, Potter L, Baio F, Ghafel A, Abdelrahim M, et al. Promising new treatments for pancreatic cancer in the era of targeted and immune therapies. *Am J Cancer Res*. 2019;9: 1871–1888.
 31. Erickson LA, Highsmith WE Jr, Fei P, Zhang J. Targeting the hypoxia pathway to treat pancreatic cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9: 2029–2031.

32. Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 2012;61: 172–178.
33. Erkan M, Kurtoglu M, Kleeff J. The role of hypoxia in pancreatic cancer: a potential therapeutic target? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;10: 301–316.
34. Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter AM, Klöppel G. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol*. 2014;20: 13833–13841.
35. Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, et al. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004;57: 630–636.
36. Farrow B, Rowley D, Dang T, Berger DH. Characterization of tumor-derived pancreatic stellate cells. *J Surg Res*. 2009;157: 96–102.
37. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2012;18: 4266–4276.
38. Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105: 93–103.
39. Ha SY, Yeo S-Y, Xuan Y-H, Kim S-H. The prognostic significance of cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9: e99955.
40. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, et al. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol*. 1999;155: 1087–1095.
41. Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95: 214–221.
42. Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, dAmato TA, Tung MY, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer Correlates With Neoangiogenesis and a Poor Prognosis. *Annals of Surgical Oncology*. 2001. pp. 72–79. doi:10.1007/s10434-001-0072-y

43. Hao N-B, Lü M-H, Fan Y-H, Cao Y-L, Zhang Z-R, Yang S-M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012: 948098.
44. Helm O, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, et al. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One.* 2014;9: e94357.
45. Hessmann E, Patzak MS, Klein L, Chen N, Kari V, Ramu I, et al. Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut.* 2018;67: 497–507.
46. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170: 1807–1816.
47. Hirakawa T, Yashiro M, Doi Y, Kinoshita H, Morisaki T, Fukuoka T, et al. Pancreatic Fibroblasts Stimulate the Motility of Pancreatic Cancer Cells through IGF1/IGF1R Signaling under Hypoxia. *PLoS One.* 2016;11: e0159912.
48. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996;56: 4509–4515.
49. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, et al. SEER cancer statistics review, 1975--2012. Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2015;2015.
50. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol.* 2001;25: 579–586.
51. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6: 2969–2972.
52. Hwang HK, Kim H-I, Kim SH, Choi J, Kang CM, Kim KS, et al. Prognostic impact of the tumor-infiltrating regulatory T-cell (Foxp3+)/activated cytotoxic T lymphocyte (granzyme B+) ratio on resected left-sided pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 2016;12: 4477–4484.

53. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Fujita H, Nakata K, et al. S100A4 mRNA is a diagnostic and prognostic marker in pancreatic carcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2009;13: 1852–1858.
54. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2013;108: 914–923.
55. Jamieson NB, Mohamed M, Oien KA, Foulis AK, Dickson EJ, Imrie CW, et al. The relationship between tumor inflammatory cell infiltrate and outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2012;19: 3581–3590.
56. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6: 392–401.
57. Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Martin Brown J, et al. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. 2000. pp. 919–922. doi:10.1016/s0360-3016(00)00803-8
58. Korc M. Pancreatic cancer–associated stroma production. *Am J Surg*. 2007;194: S84–S86.
59. Kurahara H, Shintani H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2011;167: e211–9.
60. Ligorio M, Sil S, Malagon-Lopez J, Nieman LT, Misale S, Di Pilato M, et al. Stromal Microenvironment Shapes the Intratumoral Architecture of Pancreatic Cancer. *Cell*. 2019;178: 160–175.e27.
61. Lillemoe KD, Yeo CJ. Pancreatic cancer: State-of-the-art care. *CA Cancer J Clin*. 2000. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/canjclin.50.4.241>
62. Lohneis P, Sinn M, Bischoff S, Jühling A, Pelzer U, Wislocka L, et al. Cytotoxic tumour-infiltrating T lymphocytes influence outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2017;83: 290–301.
63. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 1993;328: 1433–1437.

64. Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, et al. Platelet-Derived Growth Factors Stimulate Proliferation and Extracellular Matrix Synthesis of Pancreatic Stellate Cells: Implications in Pathogenesis of Pancreas Fibrosis. *Lab Invest*. 2000;80: 47–55.
65. Maeshima AM, Niki T, Maeshima A, Yamada T, Kondo H, Matsuno Y. Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma. *Cancer*. 2002;95: 2546–2554.
66. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007. pp. 1186–1197. doi:10.1158/1535-7163.mct-06-0686.
67. Mahajan UM, Langhoff E, Goni E, Costello E, Greenhalf W, Halloran C, et al. Immune Cell and Stromal Signature Associated With Progression-Free Survival of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2018;155: 1625–1639.e2.
68. Mahon PC, Baril P, Bhakta V, Chelala C, Caulee K, Harada T, et al. S100A4 contributes to the suppression of BNIP3 expression, chemoresistance, and inhibition of apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2007;67: 6786–6795.
69. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig Dis*. 2010;28: 645–656.
70. Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O, Masamune A, Brunner TB. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through β 1-integrin signaling. *Cancer Res*. 2011;71: 3453–3458.
71. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 2018;24: 4846–4861.
72. Meckler KA, Brentnall TA, Haggitt RC, Crispin D, Byrd DR, Kimmey MB, et al. Familial fibrocystic pancreatic atrophy with endocrine cell hyperplasia and pancreatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2001;25: 1047–1053.
73. Melstrom LG, Salazar MD, Diamond DJ. The pancreatic cancer microenvironment: A true double agent. *Journal of Surgical Oncology*. 2017. pp. 7–15. doi:10.1002/jso.24643

74. Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002;50: 535–541.
75. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*. 2015;47: 1168–1178.
76. National Cancer Institute SEER. Cancer stat facts:common cancer sites. SEER <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/common.html> (2018)
77. Nejati R, Goldstein JB, Halperin DM, Wang H, Hejazi N, Rashid A, et al. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *Pancreas*. 2017;46: 1180–1187.
78. Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol*. 2016;22: 2678–2700.
79. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014;211: 1503–1523.
80. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999;59: 3128–3133.
81. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu C-C, Simpson TR, et al. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell*. 2015;28: 831–833.
82. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005;8: 241–254.
83. Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu M-J, Pirola R, Korsten M, et al. Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*. 2003;52: 275–282.
84. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol*. 2005;7: 189–197.

85. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2012;21: 418–429.
86. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014;74: 2913–2921.
87. Ravazoula P, Hatjikondi O, Kardamakis D, Maragoudakis M, Bonikos D. Angiogenesis and metastatic potential in breast carcinoma. *The Breast*. 1996. pp. 418–421. doi:10.1016/s0960-9776(96)90107-1
88. Ren B, Cui M, Yang G, Wang H, Feng M, You L, et al. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2018;17: 108.
89. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2014;25: 735–747.
90. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*. 2014. pp. 2140–2141.
91. Seufferlein T, Porzner M, Becker T, Budach V, Ceyhan G, Esposito I, et al. [S3-guideline exocrine pancreatic cancer]. *Z Gastroenterol*. 2013;51: 1395–1440.
92. Shek FW-T, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SLF, Williams EJ, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol*. 2002;160: 1787–1798.
93. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999;163: 5211–5218.
94. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67: 7–30.
95. Spivak-Kroizman TR, Hostetter G, Posner R, Aziz M. Hypoxia triggers hedgehog-mediated tumor–stromal interactions in pancreatic cancer. *CancerRes*. 2013. Available: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/73/11/3235.short>

96. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* 1995;130: 393–405.
97. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther.* 2006;5: 1640–1646.
98. Sun H, Ma H, Hong G, Sun H, Wang J. Survival improvement in patients with pancreatic cancer by decade: A period analysis of the SEER database, 1981–2010. *Sci Rep.* 2014;4: 6747.
99. Svagzdys S, Lesauskaite V, Pavalkis D, Nedzelskienė I, Pranys D, Tamelis A. Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer.* 2009. doi:10.1186/1471-2407-9-95
100. Tewari N, Zaitoun AM, Arora A, Madhusudan S, Ilyas M, Lobo DN. The presence of tumour-associated lymphocytes confers a good prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma: an immunohistochemical study of tissue microarrays. *BMC Cancer.* 2013;13: 436.
101. Tjomsland V, Niklasson L, Sandström P, Borch K, Druid H, Bratthäll C, et al. The desmoplastic stroma plays an essential role in the accumulation and modulation of infiltrated immune cells in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011: 212810.
102. Torphy RJ, Wang Z, True-Yasaki A, Volmar KE, Rashid N, Yeh B, et al. Stromal Content Is Correlated With Tissue Site, Contrast Retention, and Survival in Pancreatic Adenocarcinoma. *JCO Precis Oncol.* 2018;2018. doi:10.1200/PO.17.00121
103. Tsukamoto N, Egawa S, Akada M, Abe K, Saiki Y, Kaneko N, et al. The expression of S100A4 in human pancreatic cancer is associated with invasion. *Pancreas.* 2013;42: 1027–1033.
104. Ueno H, Jones AM, Wilkinson KH, Jass JR, Talbot IC. Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut.* 2004;53: 581–586.
105. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret G-Y. Microvessel Density as a Prognostic Factor in Women with Breast Cancer. *Cancer Research.* 2004. pp. 2941–2955. doi:10.1158/0008-5472.can-03-1957

106. Vasseur S, Tomasini R, Tournaire R, Iovanna JL. Hypoxia induced tumor metabolic switch contributes to pancreatic cancer aggressiveness. *Cancers*. 2010;2: 2138–2152
107. Vonlaufen A, Phillips PA, Yang L, Xu Z, Fiala-Beer E, Zhang X, et al. Isolation of quiescent human pancreatic stellate cells: a promising in vitro tool for studies of human pancreatic stellate cell biology. *Pancreatology*. 2010;10: 434–443.
108. Wahab ZA, Metzgar RS. Human cytotoxic lymphocytes reactive with pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas*. 1991;6: 307–317.
109. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1995. pp. 169–180. doi:10.1007/bf00666038
110. Wellner UF, Krauss T, Csanadi A, Lapshyn H, Bolm L, Timme S, et al. Mesopancreatic Stromal Clearance Defines Curative Resection of Pancreatic Head Cancer and Can Be Predicted Preoperatively by Radiologic Parameters: A Retrospective Study. *Medicine*. 2016;95: e2529.
111. Whatcott CJ, Han H, Posner RG, Hostetter G, Von Hoff DD. Targeting the Tumor Microenvironment in Cancer: Why Hyaluronidase Deserves a Second Look. *Cancer Discovery*. 2011. pp. 291–296. doi:10.1158/2159-8290.cd-11-0136.
112. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*. 1996;14: 141–145.
113. Whittle MC, Hingorani SR. Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Mechanisms and Therapeutic Targets. *Gastroenterology*. 2019;156: 2085–2096.
114. Winter JM, Cameron JL, Campbell KA, Arnold MA, Chang DC, Coleman J, et al. 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J Gastrointest Surg*. 2006;10: 1199–210; discussion 1210–1.
115. Xu J-Y, Wang W-S, Zhou J, Liu C-Y, Shi J-L, Lu P-H, et al. The Importance of a Conjoint Analysis of Tumor-Associated Macrophages and Immune Checkpoints in Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2019;48: 904–912.

116. Yoshikawa K, Mitsunaga S, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, et al. Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer Sci.* 2012;103: 2012–2020.
117. Yuzawa S, Kano MR, Einama T, Nishihara H. PDGFR β expression in tumor stroma of pancreatic adenocarcinoma as a reliable prognostic marker. *Med Oncol.* 2012;29: 2824–2830.
118. Zee JA van der, van der Zee JA, van Eijck CHJ, Hop WCJ, van Dekken H, Dicheva BM, et al. Angiogenesis: A prognostic determinant in pancreatic cancer? *European Journal of Cancer.* 2011. pp. 2576–2584. doi:10.1016/j.ejca.2011.08.016.
119. Zhang J, Wang YF, Wu B, Zhong ZX, Wang KX, Yang LQ, et al. Intraepithelial Attack Rather than Intratumorally Infiltration of CD8+T Lymphocytes is a Favorable Prognostic Indicator in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Curr Mol Med.* 2017;17: 689–698.
120. Zhao H-C. Microvessel density is a prognostic marker of human gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology.* 2006. p. 7598. doi:10.3748/wjg.v12.i47.7598

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee of Cancer
BRCA2	Breast Cancer 2 - Gen
CAF	Cancer associated fibroblast
CTGF	Connective tissue growth factor
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor
ESCC	Esophageal squamous-cell carcinoma
HIF-1a	Hypoxie-induzierter Faktor-1a
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NGF	Nerve growth factor
FPC	Family Pancreatic cancer
FAP	Fibroblast activation protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSP-1	Fibroblast specific Protein 1
OS	Overall survival
PALP2	Partner And Localizer of BRCA2 - Gen
PanIN	Pancreatische intraepitheliale Neoplasie
PDAC	Pankreatisches Duktales Adenokarzinom

PC	Pancreatic cancer
PDGF	Platelet-derived growth factor
aPSC	Active pancreatic stellate cells
qPSC	Quiescent pancreatic stellate cells
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TPE	Total pancreatectomy
α -SMA	Alpha smooth muscle actin
PPPD	Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy

7.2. Abbildungsverzeichnis mit Quellenangaben

Abbildung 1 Desmoplastische Reaktion bei PDAC (1)

Abbildung 2 Die Orientierung von stromalen extrazellulären Matrix (ECM) Fibern

Abbildung 3 Die Stromal-ECM-Dichte

Abbildung 4 Die Fibroblastendichte

Abbildung 5 Die Fibroblastenmorphologie

Abbildung 6 Die Mikrogefäßdichte

Abbildung 7 Die Immunzellpopulationen

Abbildung 8 Gesamtüberleben der Kombination der zufälligen Orientierung von stromalen ECM-Fibern und der geringen Mikrogefäßdichte

Quellen: 1 - Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. World J Gastroenterol. 2016;22: 2678–2700.

7.3. Tabellenverzeichnis mit Quellenangaben

Tabelle 1 Nichtkrebszellen des Tumororgans (1)

Tabelle 2 Basisparameter und Histopathologie

Tabelle 3 Stromamorphologie und Immunhistochemie

Tabelle 4 Die Orientierung von stromalen extrazellulären Matrix (ECM) Fibern

Tabelle 5 Stromamatrixdichte

Tabelle 6 Fibroblastendichte

Tabelle 7 Fibroblastenmorphologie

Tabelle 8 Mikrogefäßdichte

Tabelle 9 Zufällige Orientierung von stromalen ECM-Fibern und niedrige
Mikrogefäßdichte

Tabelle 10 Überlebensanalyse Basisparameter und Histopathologie

Tabelle 11 Überlebensanalyse bei Stromamorphologie und Immunhistochemie

Quellen: 1 - Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. Dev Cell. 2010;18: 884–901.

7.4. Votum der Ethikkommission



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
PD Dr. med. Ulrich Wellner
Klinik für Chirurgie

im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 17-118A
Datum: 10. April 2017

**Multizentrische retrospektive interdisziplinäre Analyse zur Borderline Resectability
periampullärer Adenokarzinome
Ihr Schreiben vom 06. April 2017**

Sehr geehrter Herr Dr. Wellner,

mit Ihrem o.g. Schreiben informieren Sie die Ethik-Kommission über Ihr geplantes Vorhaben.

Es werden ausschließlich anonymisierte Daten verarbeitet.

Die Ethik-Kommission nimmt das von Ihnen in Ihrem Anschreiben beschriebene Vorhaben zur Kenntnis.
Eine Behandlung im normalen Antragsverfahren wird nicht für notwendig erachtet.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

8. Danksagungen

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. Ulrich Wellner und Frau Dr. Louisa Bolm für die große Hilfe und Betreuung beim Schreiben dieser Arbeit bedanken. Ich bedanke mich bei Ihnen auch für die Gelegenheit, von Ihnen Teamwork in der Wissenschaft zu lernen. Ihr Beispiel hat mich zu meiner weiteren Entwicklung angeregt.

Auch möchte ich Herr PD Dr. Peter Bronsert für die Unterstützung danken.

Weiter bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des UKSH Campus Lübeck.

Vielen Dank an meine ganze Familie für ihre Unterstützung und Inspiration. Besonders dankbar bin ich meiner Mutter, die manchmal mehr an mich glaubt als ich selbst und mich in allen schwierigen Situationen unterstützt.

9. Lebenslauf

Name: Zgurskyi
Vorname: Petro
Geburtsdatum: 09.07.1995
Geburtsort: Kyiv, Ukraine



Schulbildung und Hochschulstudium

04/2019 - heute	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
September 2012 – Juli 2016	Studium der Humanmedizin an der Nationalen O.O. Bogomoletz Medizinuniversität

Promotion

10/2018 - heute	Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
-----------------	---

Stipendien

Mai 2012	Ehrenstipendien „Akademiestipendium“ und „Internationaler Hilfsfonds Pantelejmon Kulisch“
November 2013	Preis für Erfolge beim Studium und gesellschaftliche Aktivität des Bürgermeisters der Stadt Kiew
Mai 2014 - November 2015	Hauptmitglied des Studierendenbeirats der Universität
September 2015	Stipendium für Studium und gesellschaftliche Aktivität,

verliehen durch den Bürgermeister
der Stadt Kiew

September 2021

DAAD Preis für hervorragende
Leistungen ausländischer
Studierender

Sprachen

Deutsch

fließend in Wort und Schrift

Englisch

fließend in Wort und Schrift

Ukrainisch

Muttersprache

Russisch

Muttersprache

Publikationen:

Bolm L, Zghurskyi P, Lapshyn H, Petrova E, Zemskov S, Vashist YK, et al.
Alignment of stroma fibers, microvessel density and immune cell populations
determine overall survival in pancreatic cancer—An analysis of stromal
morphology. PLOS ONE. 2020. p. e0234568. doi:10.1371/journal.pone.0234568