

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie
Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Detektion zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut von Schilddrüsenkarzinompatienten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Franziska Schwarz-Manke

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Frederik Giesel

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ehlers M, Allelein S, **Schwarz F**, Hautzel H, Kuebart A, Schmidt M, Haase M, Dringenberg T, Schott M, Increased Numbers of Circulating Tumor Cells in Thyroid Cancer Patients. Horm Metab Res 2018; 50(8):602–8.

Zusammenfassung Deutsch

Das Schilddrüsenkarzinom war im Jahr 2020 die zehnthäufigste Krebserkrankung weltweit. Zirkulierende Tumorzellen haben in den letzten Jahren als Biomarker in der Forschung insbesondere hinsichtlich der Prognoseeinschätzung oder für den individuellen Krankheitsverlauf bei verschiedenen soliden Tumoren an Bedeutung gewonnen. Die vorliegende Studie untersucht zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut von Schilddrüsenkarzinompatienten. Dafür sollte deren Quantität für differenzierte und medulläre Schilddrüsenkarzinome ermittelt und Zusammenhänge zwischen der Anzahl zirkulierender Tumorzellen und klinischen Parametern erfasst werden. Hierfür wurden insgesamt 67 Schilddrüsenkarzinompatienten (33 papilläre, 20 follikuläre, 14 medulläre) sowie 15 Kontrollpersonen mit gutartigen Schilddrüsenerkrankungen untersucht.

Es wurde festgestellt, dass Schilddrüsenkarzinompatienten eine signifikant höhere Anzahl an zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut aufwiesen als die Kontrollpersonen. Dies galt auch für die einzelnen Entitäten (follikuläres, papilläres und medulläres Schilddrüsenkarzinom) im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut mit dem initialen Tumorstadium gemäß der Tumorgroße T (nach TNM-Klassifikation) positiv korrelierte. Von besonderem Interesse war das Patientenkollektiv mit niedrigen Thyreoglobulinspiegeln $< 0,3$ ng/ml, welches klinisch als tumorfrei gilt. Insbesondere bei der Betrachtung der Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen konnten hierbei signifikant mehr zirkulierende Tumorzellen im Vergleich zu den Kontrollpersonen festgestellt werden. Gleiches traf bei der Einzelanalyse der papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinompatienten zu. Darüber hinaus konnte bei tumorfreien Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ein Zusammenhang zwischen dem initialen T-Stadium und der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen festgestellt werden. Trotz fehlender Tumormarker im Blut konnten je nach T-Stadium hohe Anzahlen an zirkulierenden Tumorzellen erfasst werden. Zudem wurden in der Gruppe der papillären Schilddrüsenkarzinome ohne Thyreoglobulinnachweis 8 Jahre nach einer Radiojodtherapie signifikant mehr zirkulierende Tumorzellen als zuvor detektiert.

Insgesamt konnten zirkulierende Tumorzellen bei Schilddrüsenkarzinompatienten nachgewiesen und signifikante Zusammenhänge zwischen zirkulierenden Tumorzellen und klinischen Parametern aufgezeigt werden, wie beispielsweise dem T-Stadium und dem Zeitpunkt der Radiojodtherapie. Insbesondere konnte dies auch bei serologisch bzw. klinisch tumorfreien Patientengruppen nachgewiesen werden, was zukünftig entscheidenden Einfluss auf das klinische Krankheits- und Therapiemonitoring haben und zur Prognoseabschätzung dienen könnte.

Zusammenfassung Englisch

Thyroid carcinoma was the tenth most common cancer worldwide in 2020. In recent years, circulating tumor cells have gained importance as biomarkers in research, especially regarding prognosis assessment or for the individual course of disease in various solid tumors. In the study presented here, circulating tumor cells in the peripheral blood of thyroid cancer patients were investigated. For this purpose, their quantity was determined for differentiated and medullary thyroid carcinomas and correlations between the number of circulating tumor cells and clinical parameters were recorded. A total of 67 thyroid carcinoma patients (33 papillary, 20 follicular, 14 medullary) and 15 control subjects with benign thyroid diseases were examined.

It was found that thyroid carcinoma patients had a significantly higher number of circulating tumor cells in the peripheral blood than the control subjects. This was also confirmed for the individual entities (follicular, papillary, and medullary thyroid carcinoma) compared to the control subjects. Furthermore, it could be shown that the number of circulating tumor cells in the peripheral blood correlated positively with the initial tumor stage according to the tumor size T (according to TNM classification). Of particular interest were patients with low thyroglobulin levels < 0.3 ng/ml, which is clinically considered tumor-free. When looking at the patients with differentiated thyroid carcinomas, significantly higher circulating tumor cells were found compared to the control patients. The same results were found in the individual analysis of papillary and follicular thyroid carcinoma patients. Furthermore, in tumor-free patients with differentiated thyroid carcinomas, an association between the initial T-stage and the number of circulating tumor cells was found. Despite the absence of tumor markers in the blood, a higher amount of circulating tumor cells were detected depending on the T-stage. Additionally, in the group of papillary thyroid carcinomas without thyroglobulin detection, significantly more circulating tumor cells could be detected 8 years after radioiodine therapy than before.

In summary, circulating tumor cells were detected in thyroid cancer patients and significant correlations between circulating tumor cells and clinical parameters could be shown, such as T-stage and timing of radioiodine therapy. This was also demonstrated in serologically or clinically tumor-free patient groups, which might become important in the future for clinical disease and therapy monitoring as well as for prognosis assessment.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
AIT	Autoimmunthyreoiditis
AK	Antikörper
ATC	<i>anaplastic thyroid cancer</i> , Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
CD45	<i>cluster of differentiation</i> 45, Unterscheidungsgruppen
CEA	carcinoembryonales Antigen
CK	<i>cytokeratin</i> , Zytokeratin
cm	Zentimeter
CPT	<i>cell preparation tube</i> , Zellvorbereitungsröhrchen
CTC	<i>circulating tumor cell</i> , zirkulierende Tumorzelle
DAPI	4,2-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DTC	<i>differentiated thyroid cancer</i> , differenzierte Schilddrüsenkarzinome
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> , epitheliale Zelladhäsionsmoleküle
Fa.	Firma
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTC	<i>follicular thyroid cancer</i> , Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
jpeg	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
M	männlich
ml	Milliliter
MRD	<i>minimal residual disease</i> , minimale Resterkrankung
ms	Millisekunden
MTC	<i>medullary thyroid cancer</i> , Medulläres Schilddrüsenkarzinom
ng	Nanogramm
MW	Mittelwert
No.	<i>Number</i> , Nummer

PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PDTC	<i>poorly differentiated thyroid cancer</i> , Gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom
PSA	prostataspezifisches Antigen
PTC	<i>papillary thyroid cancer</i> , Papilläres Schilddrüsenkarzinom
RJT	Radiojodtherapie
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
TNM	Tumorausdehnung (Tumor = T), Lymphknotenbefall (Nodus = N), Metastasen (Metastasen = M)
Tg	Thyreoglobulin
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
W	weiblich
WHO	<i>World Health Organization</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung Deutsch.....	I
Zusammenfassung Englisch.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Schilddrüsenkarzinome	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Klassifikation.....	2
1.2 Zirkulierende Tumorzellen	3
1.2.1 Eigenschaften und Detektionsmethoden.....	4
1.2.2 Klinische Relevanz	5
1.3 Schilddrüsenkarzinom und zirkulierende Tumorzellen	6
1.4 Ziele der Arbeit.....	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.2 Auswahl der Studienpatienten.....	10
2.3 Ethikvotum	12
2.4 Blutprobenentnahme und Verarbeitung	12
2.5 Immunhistochemische Färbung	12
2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie	15
2.7 Bearbeitung der ausgewählten potenziellen CTCs	16
2.8 Erfassung der Patientendaten	17
2.9 Statistische Auswertung	17
3 Auswertung	18
3.1 Deskriptive Analyse des Patientenkollektivs	18
3.1.1 Altersdurchschnitt der Patienten	18
3.1.2 Nachweis von Tumormasse.....	18
3.1.3 Thyreoglobulinspiegel in der Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome	19

3.1.4	Zeit seit letzter Radiojodtherapie in der Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome	20
3.2	Nachweis von CTCs bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen verglichen zur Kontrollgruppe.....	21
3.3	Zusammenhang zwischen CTCs und Tumorgroße bei Erstdiagnose nach TNM-Klassifikation	23
3.4	Zusammenhang zwischen CTCs und den Thyreoglobulinspiegeln differenzierter Schilddrüsenkarzinome	24
3.5	Zusammenhang zwischen Anzahl der CTCs bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen mit Tg-Spiegeln < 0,3 ng/ml und dem T-Stadium	28
3.6	Zusammenhang zwischen Anzahl der CTCs und Therapie	29
3.6.1	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	29
3.6.2	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom.....	30
3.6.3	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	30
4	Diskussion.....	31
4.1	Übergeordnete Zusammenfassung	31
4.2	Zusammenhang zwischen TNM-Klassifikation und der Anzahl der CTCs im peripheren Blut.....	31
4.3	Einfluss der Detektionsmethoden und Charakteristika der CTCs	34
4.4	Einfluss therapeutischer Maßnahmen und <i>tumor dormancy</i>	35
4.5	Rolle der CTCs bei Kontrollprobanden	37
4.6	Limitationen der Studie.....	38
4.7	Zukunftsperspektiven der CTCs	39
4.8	Schlussfolgerungen.....	40
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	42

1 Einleitung

1.1 Schilddrüsenkarzinome

1.1.1 Epidemiologie

Nach Angaben der *World Health Organization* (WHO) zählt Krebs nach Herz-Kreislauf-erkrankungen zur zweithäufigsten Todesursache weltweit mit steigender Tendenz (1). Die Inzidenz aller Krebserkrankungen liegt hierbei bei ca. 19 Millionen Erkrankten, wobei das Schilddrüsenkarzinom weltweit mit einer Inzidenz von 586.202 im Jahr 2020 an 10. Stelle steht. Frauen sind hierbei 2-3-mal häufiger betroffen als Männer. Die Mortalität liegt bei 0,44 % und ist eher gering im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen (2).

In Deutschland lag 2018 die Anzahl der Neuerkrankungen an Schilddrüsenkrebs bei insgesamt 6200, wobei ca. 2/3 Frauen davon betroffen waren. Das mittlere Erkrankungsalter betrug bei Frauen 51 und bei Männern 56 Jahre. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag bei den Frauen bei 95 % und bei den Männern bei 91 %, was jedoch je nach UICC (*Union internationale contre le cancer*) -Stadium differierte, wobei ein höheres Stadium mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit einherging. Für das Jahr 2022 wurde ein Anstieg auf insgesamt 7200 Neuerkrankungen in Deutschland prognostiziert, was einem relativen Anstieg von ca. 16 % entspricht (3).

Insgesamt ist weltweit ein Anstieg der Inzidenzraten der Schilddrüsenkarzinome, insbesondere der papillären Form, festgestellt worden, was unter anderem auf eine gesteigerte Überwachung, verbesserte Diagnostik mittels Bildgebung wie dem Ultraschall (wenn nicht sogar „Überdiagnostik“), und einem tatsächlichen Anstieg der Inzidenzzahlen zurückzuführen ist (4–11). Unter anderem hängt dies mit dem zunehmenden Auftreten und der Detektion von Mikrokarzinomen zusammen (9, 12, 13). Hinsichtlich der Mortalität zeigen sich hierbei kontroverse Zahlen, einerseits wird ein Anstieg postuliert, andererseits ein Abfall der Mortalität beschrieben (7, 10, 11).

1.1.2 Ätiologie

Als Risikofaktoren zur Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen gelten unter anderem ionisierende Strahlung, insbesondere im Kindesalter oder der Adoleszenz, sowie Struma-Erkrankungen, Adenome und familiäre Prädispositionen, z.B. in Form familiärer Syndrome,

was v.a. für das medulläre Schilddrüsenkarzinom zutrifft (14–19). Der Einfluss der Jodaufnahme wird diesbezüglich kontrovers diskutiert. In Jodmangelgebieten beispielsweise waren höhere Inzidenzzahlen der medullären sowie anaplastischen Karzinome zu verzeichnen, wohingegen papilläre Schilddrüsenkarzinome häufiger in Regionen mit einer verbesserten Jodversorgung auftraten (20–22).

1.1.3 Klassifikation

Zu den 5 häufigsten Entitäten der Schilddrüsenkarzinome zählen:

- Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC)
- Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FTC)
- Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (ATC)
- Gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom (PDTC)
- Medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC)

In der hier vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich papilläre, follikuläre sowie medulläre Schilddrüsenkarzinome untersucht. Die beiden ersten Entitäten werden als differenzierte Schilddrüsenkarzinome (DTC) zusammengefasst. Sowohl das papilläre als auch das follikuläre Schilddrüsenkarzinom gehen hierbei von den follikulären Zellen aus. Zu den Karzinomen mit Follikeldifferenzierung zählen zudem das gering differenzierte Karzinom (*poorly differentiated thyroid cancer*, PDTC), welches 2004 in der WHO-Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome ergänzt wurde, sowie das anaplastische (undifferenzierte) Karzinom (ATC) (23).

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom zählt histologisch zu den Karzinomen mit C-Zell-Differenzierung und geht von den parafollikulären Zellen aus (23, 24).

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom ist mit einem Anteil von 65-85% die häufigste Entität unter den malignen Schilddrüsentumoren (25–30). Trotz frühzeitiger lymphogener Metastasierung weist es eine sehr gute Überlebensprognose auf (30, 31). Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom tritt mit einer Häufigkeit von 5-35% der bösartigen Schilddrüsentumoren deutlich seltener auf und metastasiert bevorzugt hämatogen (25–30). Das follikuläre Karzinom unterscheidet man in minimal- und breit-invasiv wachsend, wobei die 10-Jahresüberlebensrate beim minimal-invasiven FTC bei 80-97% und beim breit-invasiven FTC nur bei ca. 35-54% liegt (25–28, 32, 33).

Metastasen sind v.a. in der Lunge und den Knochen zu finden, wobei die follikulären Karzinome häufiger in die Ferne metastasieren als die papillären Karzinome (25). Bei den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen wird Thyreoglobulin (Tg) als Tumormarker verwendet. Es dient nach der entsprechenden stadiengerechten Tumorbehandlung wie (kompletter) Thyreoidektomie und gegebenenfalls ergänzender Radiojodtherapie als Hinweis auf eine postoperativ verbliebene Resttumormasse oder als Nachweis eines Rezidivs (34, 35). Vor allem ansteigende Thyreoglobulinspiegel können postoperativ für einen Krankheitsprogress bei PTC sprechen, insbesondere wenn die Verdopplungszeit der Thyreoglobulinwerte sehr kurz ist (< 1 Jahr) (35). Zur optimalen Tumornachsorge und frühen Erfassung möglicher Rezidive oder Residuen werden daher serielle postinterventionelle Messungen der Thyreoglobulinspiegel zu unterschiedlichen Zeitpunkten benötigt (35).

Die medullären Schilddrüsenkarzinome weisen insgesamt eine moderate Überlebensprognose zwischen 55-100% auf, abhängig von Alter und Krankheitsstadium (19). Für sie werden Calcitonin und das carcinoembryonale Antigen (CEA) als Tumormarker nach Thyreoidektomie herangezogen. Calcitonin dient hierbei als sehr sensitiver Parameter sowohl für die Erstdiagnose eines medullären Schilddrüsenkarzinoms als auch als Verlaufsparemeter (19, 36, 37).

1.2 Zirkulierende Tumorzellen

Anlässlich einer steigenden Anzahl an Krebserkrankungen generell und hoher Mortalitätsraten, insbesondere durch die Metastasierung eines malignen Tumors, werden neue Biomarker gesucht. Diese sollen frühzeitig eine Metastasierung oder ein Rezidiv nachweisen und gleichzeitig auch zur Prognoseeinschätzung und Therapieplanung dienen können (38). Zudem sollten sie möglichst sensitiv und krankheitsspezifisch sowie unkompliziert, schnell und minimal-invasiv zu erheben sein.

Von besonderem Interesse beim klinischen Management von Tumorpateinten sind unter anderem die Patientengruppen, die bereits eine disseminierte Tumorerkrankung aufweisen, bei denen jedoch keine oder nur gering erhöhte Serummarker im Blut oder Metastasen in der Bildgebung festzustellen sind sogenannte *minimal residual disease* (MRD).

Eine Möglichkeit hierfür stellen zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cell*, CTC) dar, die in den letzten Jahren in der Forschung solider Tumorerkrankungen zunehmend an Bedeutung gewonnen haben (39–42).

CTCs sind maligne Zellen, die vom Primärtumor oder von Metastasen stammen und im peripheren Blut frei zirkulieren. Sie konnten bereits im Blut von Patienten mit verschiedenen Tumoren epithelialen Ursprungs wie beispielsweise Brust-, Prostata- als auch Darmkrebs detektiert werden. Im Gegensatz dazu kommen sie nicht bzw. nur in sehr geringer Anzahl in Gesunden oder Patienten mit gutartigen Erkrankungen vor (43).

Dadurch könnte den zirkulierenden Tumorzellen eine zunehmende Bedeutung beim klinischen Management von Karzinompatienten eingeräumt werden. Sie könnten bei der Diagnostik einer Tumorerkrankung als auch zur frühzeitigen Feststellung einer Fernmetastasierung bzw. eines Rezidivs dienen. Zudem könnten sie helfen, frühzeitig das Therapieansprechen einschätzen zu können und damit langfristig die Prognose der Patienten zu verbessern (38).

1.2.1 Eigenschaften und Detektionsmethoden

Zirkulierende Tumorzellen sind sehr selten im Blut zu finden, und zwar in einer Größenordnung von 1 CTC pro ml, was eine große Herausforderung für den Nachweis dieser Zellen im Blut bedeutet (44, 45).

Zur Detektion der CTCs können sowohl ihre physikalischen Eigenschaften wie Größe, Dichtegradient oder Verformbarkeit als auch ihre biologischen / immunologischen Eigenschaften wie die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle herangezogen werden (40, 43, 45–51). Insbesondere die Expression von Zytokeratin (*cytokeratin*, CK) und epithelialer Zelladhäsionsmoleküle (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) auf den Zellen werden genutzt, um zirkulierende Tumorzellen nach Trennung der Erythrozyten von anderen Blutzellen, den mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), zu unterscheiden (40, 43, 50, 52). CTCs können hierbei mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen detektiert und wie folgt charakterisiert werden (53, 54):

- intakte Zelle mit runder bis ovaler Zellmorphologie
- sichtbarer Zellkern (positive Färbung für 4,2-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid, DAPI)
- positive Färbung für EpCAM und/oder CK
- negative Färbung für CD45 (*cluster of differentiation* 45, Oberflächenmarker für Leukozyten)

Das einzige bisher von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene automatisierte immunomagnetische Separationssystem für die klinische Routine zur Detektion und Analyse von CTCs in Patienten mit metastasiertem Brustkrebs, kolorektalem Karzinom und Prostatakrebs ist das CellSearch™ System von Veridex (39, 40, 43, 45, 46, 55–57). Es gibt jedoch verschiedene Anreicherungs- und Detektionsmethoden, die in der klinischen Forschung genutzt werden, was wiederum die Vergleichbarkeit der Studienergebnisse beeinträchtigen kann.

1.2.2 Klinische Relevanz

CTCs wurden bereits in mehreren Studien verschiedener solider Tumorformen wie Mammakarzinome, kolorektaler Karzinome und Prostatakarzinome als auch für adrenokortikale und neuroendokrine Tumore als zuverlässiges Werkzeug zur Einschätzung der Prognose sowie zum Follow-Up beschrieben (39–42, 58, 59). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Anstieg der CTCs im Blut ein frühzeitiger Hinweis für ein Tumorrezidiv bei Brustkrebs sein kann oder dass anhand der Anwesenheit von CTCs eine Unterscheidung zwischen adrenokortikalem Karzinom und adrenokortikalem Adenom möglich war (42, 58). Zudem konnten CTCs als Marker zum Therapiemonitoring herangezogen werden. Im Vergleich zur radiologischen Bildgebung konnte früher und reproduzierbarer der Krankheitsstatus unter Therapie bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs evaluiert werden (60, 61). Ähnliches konnte beim Prostatakarzinom verglichen mit dem PSA (prostataspezifisches-Antigen) -Wert festgestellt werden. Hier konnte unter anderem demonstriert werden, dass die Anzahl der CTCs posttherapeutisch einen höheren Vorhersagewert hatte als der PSA-Wert (62). Es wird außerdem diskutiert, ob zirkulierende Tumorzellen hinsichtlich bestimmter Gen- oder Proteinexpressionen im Sinne einer *liquid biopsy* charakterisiert und genutzt werden können. Anhand bestimmter Tumoreigenschaften soll dann eine zielgerichtete Therapie, sogenannte *targeted therapy*, ausgewählt und deren Effizienz überprüft werden können (38). So konnten beispielsweise CTCs aus dem peripheren Blut gewonnen und bestimmte Merkmale wie zum Beispiel der Rezeptorstatus der CTCs bestimmt werden (38, 62–64).

Es steckt somit viel Potential in der Detektion zirkulierender Tumorzellen. Zusammengefasst könnten CTCs zukünftig zur Diagnostik, Einschätzung der Prognose eines Karzinoms sowie zur frühzeitigen Rezidivdiagnostik dienen. Außerdem könnte die Bestimmung der CTCs auch zum *Monitoring* während und nach einer Therapie und der individuellen Therapiegestaltung genutzt werden.

1.3 Schilddrüsenkarzinom und zirkulierende Tumorzellen

Hinsichtlich Krebspatienten mit differenzierten und medullären Schilddrüsenkarzinomen gibt es bisher nur limitierte Daten was den Zusammenhang von zirkulierenden Tumorzellen und den Krankheitsverlauf betrifft. Eine Verlaufskontrolle nach stadiengerechter Therapie erfolgt zur Zeit neben der Bildgebung (Ultraschall oder Computertomographie) mittels Bestimmung der Tumormarker im Blut, die, wie bereits erwähnt, für das differenzierte Schilddrüsenkarzinom Thyreoglobulin und für das medulläre Schilddrüsenkarzinom Calcitonin und CEA sind. Ein Anstieg der Tumormarker im Verlauf prognostiziert einen Krankheitsprogress mit erhöhter Mortalität, insbesondere, wenn die Verdopplungszeiten kurz sind (35, 65). Jedoch können sowohl differenzierte als auch medulläre Schilddrüsenkarzinome im Rahmen einer schlechten Zelldifferenzierung keine Tumormarker produzieren oder, differenzierte Schilddrüsenkarzinome betreffend, falsche Thyreoglobulinspiegel aufgrund von Thyreoglobulinantikörpern aufweisen, sodass die Detektion eines Krankheitsprogresses erschwert wird (56, 66). Gleiches gilt für Calcitonin und das medulläre Schilddrüsenkarzinom (67).

Daher wurden in verschiedenen Studien zirkulierende Tumorzellen auch bei Schilddrüsenkarzinomen als mögliche Biomarker untersucht. Hierfür konnte unter anderem eine Überexpression von EpCAM bei differenzierten (DTC) sowie bei gering differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (PDTC) im Vergleich zum anaplastischen Karzinom (ATC) und normalen Schilddrüsengewebe nachgewiesen werden (56).

Bei Patienten mit metastasiertem medullären Schilddrüsenkarzinom war in einer Studie von Xu et al. der Nachweis von ≥ 5 CTCs mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert und hatte einen höheren Vorhersagewert verglichen zur Calcitonin- und CEA-Verdopplungszeit (68). Des Weiteren fand Qiu et al., heraus, dass der Nachweis von ≥ 5 CTCs im Blut von Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ein potentieller Prädiktionsmarker für Fernmetastasen und ≥ 7 CTCs ein möglicher Indikator für ein schlechtes Ansprechen des Tumors auf eine Radiojodtherapie mit entsprechend schlechter Prognose ist (69). Die Daten von Schmidt et al. belegen diese Aussage: hier konnte gezeigt werden, dass es 6 Wochen nach Radiojodtherapie (RJT) bei Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinomen zu einem signifikanten Abfall der CTCs im peripheren Blut kommt. Alle Patienten zeigten klinisch ein Ansprechen auf die Therapie (70). In einer kleinen Anzahl an Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom, die sich bereits einer Thyreoidektomie unterzogen hatten, konnte Sriramareddy et al., hohe CTC-Zahlen im Blut nachweisen trotz niedriger Calcitoninspiegel, was ein möglicher Hinweis auf eine schlechte Prognose sein kann und in der Verlaufskontrolle berücksichtigt werden sollte (71).

Insbesondere eine frühzeitige Rezidiverkennung dient daher der Verbesserung der Überlebensprognose von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen. Die Detektion zirkulierender Tumorzellen könnte hierbei in verschiedener Hinsicht als Biomarker dazu beitragen, jedoch gibt es noch zu wenige Studien, die dies untersuchen. Daher liegt das Ziel dieser hier vorgestellten Arbeit darin, Erkenntnisse zur Bedeutung von CTCs im peripheren Blut von Schilddrüsenkarzinompatienten zu erhalten und daraus neue Aussagen zum Krankheitsverlauf, der Prognose und/oder Therapiegestaltung zu gewinnen.

1.4 Ziele der Arbeit

In der hier vorgestellten Arbeit sollen zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut von Schilddrüsenkarzinompatienten detektiert werden.

Des Weiteren soll deren Quantität für differenzierte und medulläre Schilddrüsenkarzinome näher untersucht und Zusammenhänge zwischen der Anzahl zirkulierender Tumorzellen und klinischer Parameter (z.B. Tumorgröße, Tumormarker im Blut, Zeitpunkt einer Radiojodtherapie) erfasst werden.

Ein besonderes Augenmerk liegt auf tumorfreien Patienten ohne laborchemischen oder bildgebenden bzw. klinischen Hinweis auf ein Tumorrezidiv und dem Zusammenhang zu zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut.

Das Ziel der Studie liegt darin, Zusammenhänge zwischen der Anzahl der CTCs bei Schilddrüsenkarzinompatienten und klinischen Parametern zu erfassen und daraus neue Erkenntnisse für die Diagnostik, Prognoseabschätzung und Therapiegestaltung abzuleiten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien, Puffer und Lösungen:

Aceton,

Firma (Fa.). Merck, Darmstadt, Deutschland

antibody diluent

Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark

Demineralisiertes Wasser

Fa. Otto Fischar GmbH & CoKG, Saarbrücken, Deutschland

Erylyse

Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland

Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7, 4),

Fa. Life technologies, Carlsbad, USA

Schweineserum, normal

Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark

Tween 20

Fa. Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Antikörper/Fluoreszenzantikörper:

Alexa Fluor No. 488 *goat anti-mouse IgG*, 1:1000

Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA

Alexa Fluor No. 594 *chicken anti-rabbit IgG*, 1:1000

Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA

monoclonal mouse anti-human CD45 antibody 1:750

Fa. Abcam, Cambridge, UK

polyclonal rabbit anti-human EpCAM antibody 1:200

Fa. Abcam, Cambridge, UK

ProLong Gold antifade reagent with DAPI

Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA

Geräte und Hilfsmittel:

DAKO Pen

Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark

Deckgläser, Größe 24 x 50 mm

Fa. ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Nikon eclipse TE 300 Fluoreszenzmikroskop

Fa. Nikon, Minato, Japan

Feuchte Kammer

Fa. Simport Scientific, Quebec, Kanada

Färbetröge mit Einsatz, Natron-Kalk-Glas 76 x 26 mm

Fa. Brand, Wertheim, Deutschland

Kryoröhrchen cryo.s (cellstar)

Fa. Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Kühlschrank

Fa. Liebherr, Kirchdorf an der Iller, Deutschland

Monochrome Kamera DMK 23U274

Fa. The Imaging Source, LLC, USA

Objektträger, Größe 76 x 26 mm

Fa. ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Pipetten, verschiedene Größen (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)

Fa. Eppendorf, Weseling-Erzdorf, Deutschland

Pipettenspitzen, TipOne 0-10 µl, 10-100 µl und 101-1000 µl

Fa. StarLab GmbH, Ahrensburg Deutschland

Präparate-Mappe

Fa. Welabo VGKL, Düsseldorf, Deutschland

Sterile Probenröhrchen (Nalgene Cryoware à 2 ml + 4,5 ml)

Fa. Nalge Nunc Int.Corp., Rochester NY, USA

Tiefkühlschrank

Fa. Bosch, Gerlingen, Deutschland

Vacutainer CPT-Röhrchen (8 ml)

Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Vortex Mixer
Fa. Neolab, Heidelberg, Deutschland

Software:

GraphPad Software PRISM 6,
Fa. GraphPad Software, La Jolla, USA

Microsoft Power Point Version 97-2003
Fa. Microsoft, Redmond, USA

Microsoft Excel Version 97-2003
Fa. Microsoft, Redmond, USA

NIS Elements Version 4.00
Fa. Nikon, Minato, Japan

Photoshop CS 6
Fa. Adobe inc., San Jose, USA

2.2 Auswahl der Studienpatienten

In der Studie wurden insgesamt 67 Patienten mit differenzierten und medullären Schilddrüsenkarzinomen untersucht, die sich zwischen dem 03.06.2014 und dem 10.01.2017 im Universitätsklinikum Düsseldorf im Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie oder im Forschungszentrum Jülich vorstellten. 33 Patienten (20 Frauen) litten unter einem papillären Schilddrüsenkarzinom, 20 Patienten (13 Frauen) waren an einem follikulären und 14 Patienten (8 Frauen) an einem medullären Schilddrüsenkarzinom erkrankt.

Das mittlere Alter der PTC-Patienten lag bei Diagnosestellung im Durchschnitt bei $45,7 \pm 15,6$ Jahren und zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei $54,4 \pm 15,8$ Jahren, für die FTC-Patienten bei $53,1 \pm 17,1$ Jahren und bei $64,2 \pm 16,8$ Jahren sowie für die MTC-Patienten bei $38,3 \pm 14,1$ Jahren und $49,9 \pm 13,5$ Jahren.

Alle teilnehmenden Tumorpatienten hatten eine Thyreoidektomie und in 28 von 67 Fällen zum Zeitpunkt der Rekrutierung eine nachweisbare Tumorlast im Sinne von Lungen-, Knochen-, Leber- oder Lymphknotenbefall. Die Ausdehnung (T, als Tumorgröße und Infiltrationstiefe), der Lymphknotenbeteiligung (N) und Fernmetastasen (M) wurden mittels der 7. Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumoren erfasst.

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf Schilddrüse
T1a	Tumor 1 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf Schilddrüse
T1b	Tumor mehr als 1, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf Schilddrüse
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf Schilddrüse
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf Schilddrüse oder Tumor mit minimaler extrathyroidaler Ausbreitung (das heißt Ausbreitung in den Musculus sternothyreoideus oder perithyreoidales Weichteilgewebe)
T4a	Tumor mit Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel und Invasion einer oder mehrerer der folgenden Strukturen: subkutanes Weichgewebe, Larynx, Trachea, Ösophagus, Nervus recurrens
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszie, mediastinale Gefäße oder umschließt die Arteria carotis
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastasen in Lymphknoten des Level VI: prätracheal und paratracheal, inkl. prälaryngeale und Delphi-Lymphknoten
N1b	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen oder kontralateralen zervikalen (Level I, II, III, IV und V) oder retropharyngealen oder oberen mediastinalen Lymphknoten
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome (72).

T = Tumorgröße, N = Lymphknotenbefall, M = Metastasen

Des Weiteren wurden 15 Probanden (davon 8 Frauen) mit benignen Schilddrüsenerkrankungen wie beispielsweise einer Autoimmunthyreoiditis, Struma nodosa oder vereinzelt Schilddrüsenknoten als Kontrollgruppe untersucht. In der Kontrollgruppe hatten 5 Probanden eine Autoimmunthyreoiditis (AIT) und 10 Probanden eine Knotenstruma oder vereinzelt, nicht-bösartige Schilddrüsenknoten.

2.3 Ethikvotum

Alle Probanden erklärten sich mit der Studienteilnahme schriftlich einverstanden. Ein positives Ethikvotum zur Durchführung dieser Studie wurde unter folgender Studiennummer 4098 am 18.12.2012 erteilt, erweitert am 04.08.2014 und genehmigt am 07.08.2014.

2.4 Blutprobenentnahme und Verarbeitung

Jedem Patienten wurden 8 ml Vollblut entnommen, das anschließend 20 Minuten mit 3100 Umdrehungen bei 20° in einem Vacutainer *cell preparation tube* (CPT)-Röhrchen zentrifugiert wurde, um das Plasma, die Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten von den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und den zirkulierenden Tumorzellen (CTC) zu trennen. Danach wurden die PBMC mit den CTC extrahiert und im *phosphate buffered saline* (PBS) Puffer gespült. Zur Lyse der übrigen Erythrozyten wurde Erylyse hinzugefügt, 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die nun extrahierten Zellen wurden in einer Zählkammer quantifiziert. Insgesamt wurden 2×10^6 Zellen in 4 ml auf je 4 Objektträger verteilt und entsprechend 5×10^5 Zellen/ml auf jeweils 3 Wells pro Objektträger fixiert. Jeder Objektträger wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

2.5 Immunhistochemische Färbung

Die tiefgekühlten Objektträger mit Patientenmaterial wurden zur weiteren Bearbeitung zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Als interne Kontrolle für den Färbeprozess, wurde jeweils 1 Objektträger mit hämatopoetischen Zellen eines gesunden Erwachsenen (CD45 positive Zellen) und 1 Objektträger mit einem seriellen Schnitt einer murinen Niere (EpCAM positive Zellen) mitgefärbt.

Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten in Aceton im Tiefkühlschrank gelagert und danach 5-10 Minuten an der Luft getrocknet. Die Wells-Abgrenzungen wurden mit einem DAKO-Pen umrandet, um eine ungewollte Vermischung der Färbungen zu verhindern. Danach wurden die Objektträger insgesamt 4 mal 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen.

Danach erfolgte eine 5-minütige Waschung mit 0,1% Tween in PBS-Puffer.

Die Objektträger wurden nun in einer feuchten Kammer 1 Stunde mit Schweineserum im Verhältnis 1:20 bei RT inkubiert. Dies dient dazu unspezifische Bindungen zu mindern.

Nach einer Stunde wurde die Lösung entfernt und insgesamt 3 Antikörpermischungen angefertigt, die als primäre Antikörper zur Bindung an den entsprechenden Oberflächenmolekülen dienen sollten.

Eine Mischung enthielt nur EpCAM-Antikörper als Nachweis für Zellen epithelialen Ursprungs (Positivkontrolle für die EpCAM-Färbung), eine weitere nur CD45-Antikörper als Nachweis für Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Positivkontrolle für die CD45-Färbung), hier speziell für mononukleäre Zellen (PBMC), und eine Mischung wurde aus EpCAM- und CD45-Antikörpern (Färbung des Patientenmaterials) angefertigt.

Die EpCAM-Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:200 angefertigt. Hierfür wurden 200 µl *antibody diluent* mit 1 µl des polyklonalen *rabbit anti-human* EpCAM Antikörpers in einem Reaktionsgefäß zusammengefügt und anschließend gemischt.

Die monoklonalen *mouse anti-human* CD45-Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:750 angefertigt.

Für die Mischung aus Epcam- und CD45-Antikörper wurden 1500 µl *antibody diluent* mit 7,5 µl EpCAM-Antikörper und 2 µl CD45-Antikörper vermischt.

100 µl der entsprechenden Lösungen wurden auf die verschiedenen Wells verteilt. Dabei diente das erste Well des Objektträgers zur Kontrolle der Eigenfluoreszenz und wurde lediglich mit dem *antibody diluent* inkubiert. Auf die anderen beiden Wells des Kontrollpräparates mit den hämatopoetischen Zellen kam jeweils die CD45-Antikörperlösung. Auf die anderen Wells des Präparates mit den seriellen Schnitten der murinen Niere wurde die EpCAM-Antikörperlösung aufgetragen. Die Objektträger mit Patientenmaterial wurden jeweils mit der Mischung aus CD45- und EpCAM-Antikörpern inkubiert.

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4-6°C im Dunklen. Am folgenden Tag wurden die Antikörperlösungen dekantiert und die Objektträger 5 mal 5 Minuten mit PBS-Puffer gespült.

Währenddessen wurden die sekundären Fluoreszenzantikörpermischungen angefertigt. Für die hämatopoetischen Zellen wurde 1 µl CD45 *goat anti mouse Alexa fluor No.488* IgG mit 1000 µl *antibody diluent* vermischt (Verdünnung 1:1000). Für die seriellen Schnitte der murinen Niere wurde EpCAM *goat anti rabbit Alexa fluor No. 594* IgG im Verhältnis 1:1000 verwendet.

Für die Patientenpräparate wurden der o.g. CD45-Fluoreszenzantikörper und der o.g. EpCAM-Fluoreszenzantikörper entsprechend einer Verdünnung von 1:1000 angefertigt und im nächsten Schritt auf die jeweiligen Präparate aufgetragen.

Auf den Objektträger mit den hämatopoetischen Zellen (PBMC) wurde auf alle 3 Wells jeweils nur CD45-Fluoreszenzantikörper appliziert. Auf den Objektträger mit den seriellen Schnitten einer murinen Niere wurde nur EpCAM-Fluoreszenzantikörper appliziert. Auf die Probandenpräparate wurde die Mischung beider Fluoreszenzantikörper aufgetragen. Die Aufteilung ist nachfolgend tabellarisch dargestellt.

	<i>Positivkontrolle für CD45</i>	<i>Positivkontrolle für EpCAM</i>	<i>Patientenpräparate</i>
<i>Präparat</i>	PBMC eines gesunden Probanden	Serieller Schnitt einer murinen Niere	PBMC der Patienten
<i>Primärer Antikörper</i>	CD45, 1:750	EpCAM, 1:200	CD45, 1:750 und EpCAM, 1:200
<i>Sekundäre Fluoreszenzantikörper</i>	CD45, 1:1000	EpCAM, 1:1000	CD45, 1:1000 und EpCAM, 1:1000

Tabelle 2: Schematische Darstellung der Antikörperapplikationen auf die jeweiligen Präparate unter Angabe der entsprechenden Mischverhältnisse

CD45 = *cluster of differentiation 45*, EpCAM = *epithelial cell adhesion molecule*, PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*

In der folgenden Abbildung ist zudem exemplarisch ein Objektträger der Patientenpräparate dargestellt.

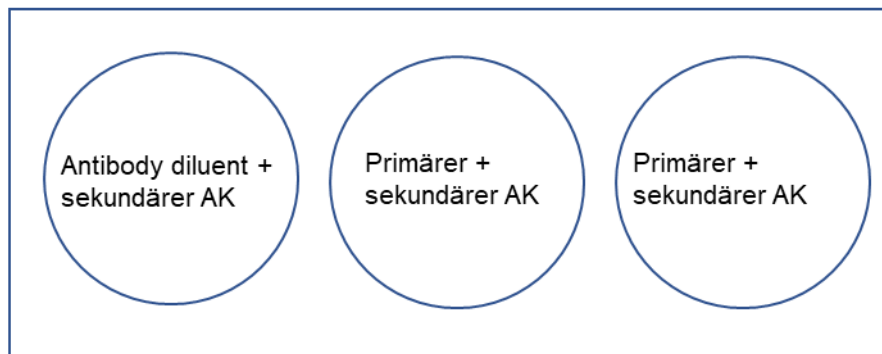


Abb. 1: Darstellung der Verteilung der primären und sekundären Antikörper

Verteilung der primären und sekundären Antikörper auf die 3 Wells der Objektträger mit PBMC der Schilddrüsenkarzinompatienten. PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, AK = Antikörper

Die Präparate wurden abgedeckt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Präparate in 3 Waschschritten à 5 Minuten mit PBS-Puffer gespült. Die Objektträger wurden schließlich getrocknet. Im nächsten Schritt wurden 2-3 Tropfen „*ProLong Gold antifade reagent with DAPI*“ auf je ein Well pipettiert, um Zellkerne für die Fluoreszenzmikroskopie ersichtlich zu machen, und diese mit 24 x 50 mm großen Deckgläsern abgedeckt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur konnten die Objektträger in einer geschlossenen lichtgeschützten Sammelmappe bis zum Mikroskopieren im Kühlschrank bei 4-6°C gelagert werden.

2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Nikon eclipse TE 300 Mikroskop mit monochromer Kamera mit der Software NIS Elements Version 4.00 verwendet. Zunächst mussten die Kontrollpräparate mit der hämatopoetischen Zellreihe und dem seriellen Schnitt einer murinen Niere mikroskopiert werden, um zu überprüfen, ob die primären und sekundären Antikörper richtig gebunden hatten und die Immunfluoreszenzfärbung gelungen war. Danach wurden alle Patientenpräparate sorgfältig Abschnitt für Abschnitt durchgesehen.

Eine Zelle wurde als zirkulierende Tumorzelle definiert, wenn sie folgende Eigenschaften erfüllte:

- EpCAM-Färbung positiv (sprich intensive rote Immunfluoreszenzfarbe)
- CD45-Färbung negativ (kein grünlicher Anteil)
- rund bis ovale Zellform mit vorhandenem Zellkern, was einer positiven DAPI-Färbung (blaue Färbung) entsprach

Trafen auf eine Zelle die gesuchten Merkmale zu, wurde diese Zelle fotografiert. Hierbei wurde für jede spezifische Färbung ein eigenes Foto abgespeichert, also ein Foto in der EpCAM-Fluoreszenz mit 200 millisekunden (ms) Belichtungszeit, eins in CD45-Fluoreszenz mit 40 ms Belichtungszeit und eins in DAPI mit 2 ms Belichtungszeit und hohem Farbkontrast. Das bereits untersuchte Patientenpräparat wurde an den 2. unabhängigen Untersucher weitergegeben und innerhalb von 2 Tagen erneut mikroskopiert.

2.7 Bearbeitung der ausgewählten potenziellen CTCs

Die fotografierten und im „jpeg“ (*joint photographic experts group*) -Format abgespeicherten potenziellen zirkulierenden Tumorzellen wurden zur Bearbeitung mit Photoshop als einzelne Dateien geöffnet, hierbei jeweils die 3 Bilder einer Zelle (EpCAM, CD45 und DAPI). Die 3 Bilder wurden zur endgültigen Beurteilung, ob eine „Zielzelle“ (also eine zirkulierende Tumorzelle) vorliegt, in Helligkeit und Kontrast angepasst und „übereinander“ (*overlay*) gelegt. Die verschiedenen Zellbilder wurden erneut im „jpeg“-Format abgespeichert.

Die einzelnen Bilder wurden nun in einer Power-Point-Präsentation nebeneinander aufgereiht, sortiert und für positiv (CTC) oder negativ (keine CTC) befunden und entsprechend markiert. Eine Zelle wurde als CTC identifiziert, wenn sie den oben genannten immunhistochemischen Kriterien (EpCAM-Färbung positiv, CD45-Färbung negativ und DAPI-Färbung positiv) entsprach. Praktisch bedeutete dies, eine intensiv rot gefärbte Zelle mit blauem Zellkern und fehlender Grünfärbung, im *overlay* als intensiv rot/orange Zelle dargestellt, entsprach der gesuchten Zielzelle, einer zirkulierenden Tumorzelle.

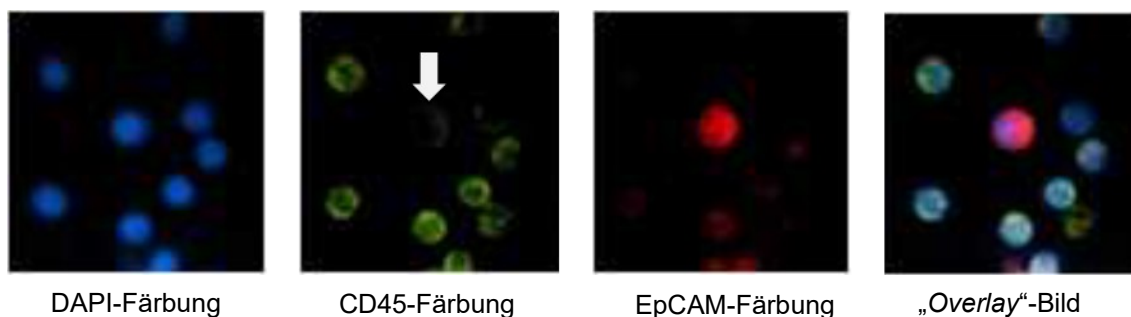


Abb. 2: Immunfluoreszenzbilder einer CTC

Darstellung einer CTC in der Immunfluoreszenzmikroskopie in 100facher Vergrößerung. DAPI = 4,2-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid, CD45 = *cluster of differentiation* 45, EpCAM = *epithelial cell adhesion molecule*, adaptiert nach Ehlers et al. (73)

Der 2. Untersucher führte diese Schritte in gleicher Reihenfolge durch. Die Endergebnisse, also die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen für den jeweiligen Probanden, wurden am

Schluss der gesamten Bearbeitung in einer Excel-Tabelle erfasst. Dabei sollte die maximale Differenz der detektierten zirkulierenden Tumorzellen der beiden unabhängigen Untersucher bei ≤ 3 Zellen liegen, ansonsten wurden andere Präparate des gleichen Probanden erneut gefärbt und bearbeitet oder aus der Auswertung entfernt.

2.8 Erfassung der Patientendaten

Neben der Erfassung der identifizierten zirkulierenden Tumorzellen wurden folgende Patientendaten und Parameter erhoben:

- Geburtsdatum
- Geschlecht
- Art des Tumors (medullär, papillär oder follikulär)
- Datum der Erstdiagnose der Erkrankung
- Tumorstadium (nach TNM-Klassifikation der 7. Auflage) inklusive Metastasenlokalisationen (wenn Information vorhanden)
- Datum der Blutentnahme
- Informationen zum Verlauf bzw. zur Therapie der Erkrankung
- Thyreoglobulin- bzw. Calcitoninwerte im Verlauf und zum Zeitpunkt der Blutentnahme
- zeitlicher Abstand zur (letzten) Therapie wie Schilddrüsenoperation und der letzten stattgefundenen Radiojodtherapie

2.9 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels Graphpad Prism software (PRISM 6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ definiert. Nicht-parametrische Daten wurden bei Vergleichen von 2 Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test oder bei einem Gruppenvergleich mittels dem Kruskal-Wallis Test und Dunn's Vergleichstest erfasst und ausgewertet. Daten mit einer Normalverteilung wurden mittels t-Test, ANOVA-Test und Dunnett Test analysiert. Für die Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bei normal verteilten oder Spearman bei nicht normalverteilten Daten bestimmt, wobei $r = 1$ für einen positiven, $r = -1$ für einen negativen und 0 für keinen Zusammenhang steht.

3 Auswertung

3.1 Deskriptive Analyse des Patientenkollektivs

Von den 67 untersuchten Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen litten 33 (49%) unter einem papillären Schilddrüsenkarzinom. 20 (30%) Patienten waren an einem follikulären und 14 (21%) Patienten an einem medullären Schilddrüsenkarzinom erkrankt (73).

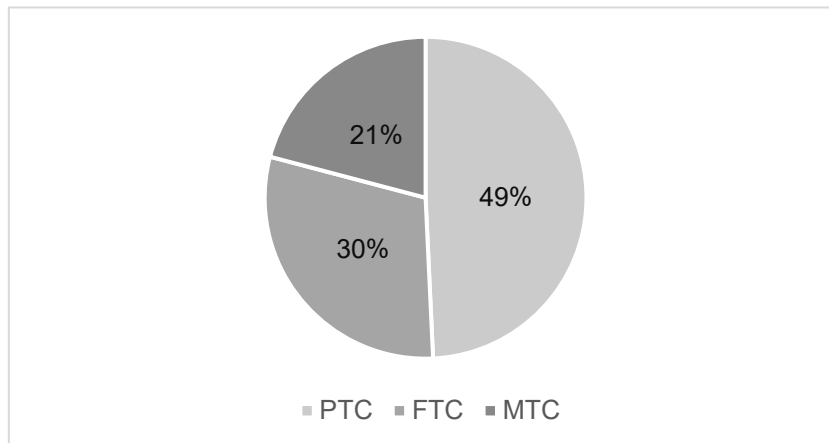


Abb. 3: Untersuchtes Patientenkollektiv

Untersuchtes Patientenkollektiv aufgeteilt nach Entität in Prozent. PTC = papilläres Schilddrüsenkarzinom, FTC = follikuläres Schilddrüsenkarzinom, MTC = medulläres Schilddrüsenkarzinom

3.1.1 Altersdurchschnitt der Patienten

Das mittlere Alter der Schilddrüsenkarzinompatienten mit papillärem Karzinom lag bei Diagnosestellung im Durchschnitt bei $45,7 \pm 15,6$ Jahren und zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei $54,4 \pm 15,8$ Jahren, für die Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom bei $53,1 \pm 17,1$ Jahren und bei $64,2 \pm 16,8$ Jahren sowie für die medullären Schilddrüsenkarzinompatienten bei $38,3 \pm 14,1$ Jahren und $49,9 \pm 13,5$ Jahren. Die Probanden der Kontrollgruppe waren durchschnittlich $55,7 \pm 18,8$ Jahre alt zum Zeitpunkt der Blutentnahme (73).

3.1.2 Nachweis von Tumormasse

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme lagen bei 28 von 67 Patienten Tumormasse bzw. Metastasen in unterschiedlichen Organen, unter anderem in Lunge, Knochen, Leber

und/oder Lymphknoten, vor, was 42% der Patienten entspricht. Hiervon waren jeweils 10 von 20 Patienten (50%) mit follikulärem, 10 von 33 Patienten (30%) mit papillärem und 8 von 14 Patienten (57%) mit medullärem Schilddrüsenkarzinom betroffen (73).

3.1.3 Thyreoglobulinspiegel in der Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome

Zudem wurden in der Gruppe der papillären Schilddrüsenkarzinome 21 Patienten (64%) mit einem Thyreoglobulinwert $< 0,3$ ng/ml, 4 Patienten (12%) mit einem Thyreoglobulinwert zwischen 0 - 5 ng/ml (moderat erhöhte Spiegel) und 8 (24%) Patienten mit hohen Thyreoglobulin-Spiegeln (≥ 5 ng/ml) erfasst. Bei einem Patienten waren in der krankheitsfreien Gruppe mit Thyreoglobulinwerten $< 0,3$ ng/ml Thyreoglobulinantikörper nachgewiesen worden. Bei der Auswertung der Daten der follikulären Schilddrüsenkarzinome konnten 8 Patienten (40%) mit einem Thyreoglobulinwert von $< 0,3$ ng/ml, 2 (10%) mit einem moderaten Spiegel und 7 (35%) mit hohen Thyreoglobulinspiegeln von > 5 ng/ml ermittelt werden. Bei 3 (15%) Patienten konnten diesbezüglich keine Thyreoglobulinspiegel in der Dokumentation gefunden werden.

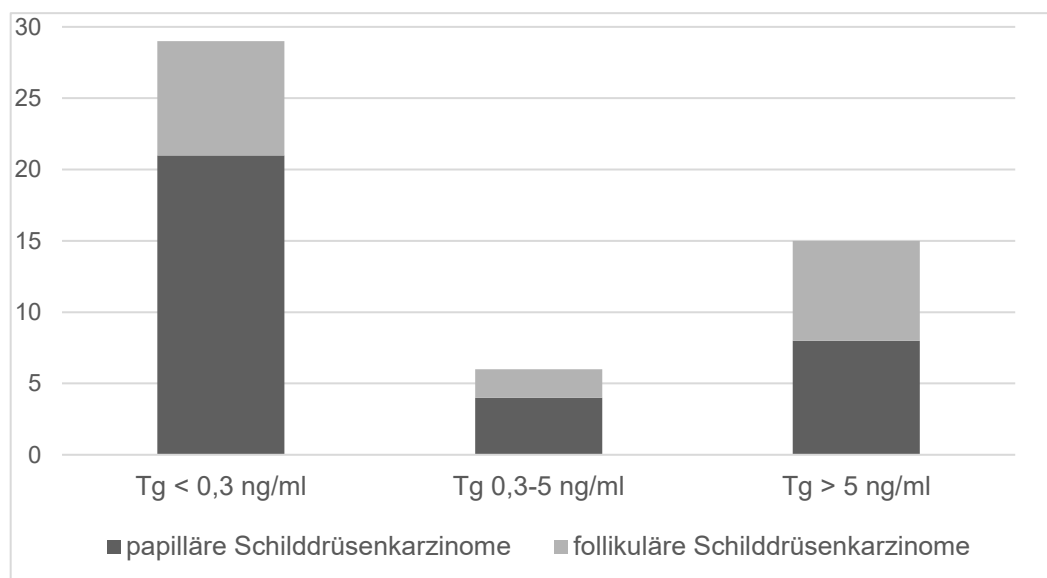


Abb. 4: Anzahl der Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom

Anzahl der untersuchten Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom aufgeteilt nach Tg-Spiegeln. Tg = Thyreoglobulin

3.1.4 Zeit seit letzter Radiojodtherapie in der Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome

Des Weiteren wurde für die differenzierten Schilddrüsenkarzinome die Zeit in Monaten seit der letzten Radiojodtherapie der Patienten erfasst.

In der Gruppe der Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom lagen die durchgeführten Therapien zwischen 0 und 237 Monaten zurück, bei einem Patienten war es unklar und bei 2 Patienten lag die Auswertung noch vor der Radiojodtherapie. Durchschnittlich lagen die Therapien 76 Monate zurück.

In der Gruppe der follikulären Schilddrüsenkarzinompatienten lagen die letzten Radiojodtherapien zwischen 0 und 248 Monaten zurück. Bei 2 Patienten gab es keine Angaben. Durchschnittlich war eine Zeitspanne von 53 Monaten seit der letzten Radiojodtherapie vergangen.

	<i>Papilläres Schilddrüsenkarzinom</i>	<i>Follikuläres Schilddrüsenkarzinom</i>	<i>Medulläres Schilddrüsenkarzinom</i>
<i>Anzahl (n)</i>	33	20	14
<i>Alter (in Jahren) bei Erstdiagnose:</i>	45,7 ± 15,6	53,1 ± 17,1	38,3 ± 14,1
<i>Blutentnahme:</i>	54,4 ± 15,8	64,2 ± 16,8	49,9 ± 13,5
<i>CTC (Mittelwerte ± SD)</i>	2,3 ± 2,2	3,4 ± 4,6	1,3 ± 1,6
<i>Geschlecht (m / w)</i>	13 / 20	7 / 13	6 / 8
<i>Durchschnittliche Zeitspanne seit letz- ter RJT</i>	76 Monate	53 Monate	/
<i>Thyreoglobulinwert</i>			
<i>Tg < 0,3 ng/ml</i>	21 Patienten	8 Patienten	/
<i>Tg 0,3- 5 ng/ml</i>	4 Patienten	2 Patienten	/
<i>Tg > 5 ng/ml</i>	8 Patienten*	7 Patienten**	/

Tabelle 3: Übersicht zur Aufteilung des Patientenkollektivs nach Tumorentität n = Anzahl, CTC = circulating tumor cell, SD = Standardabweichung, m = männlich, w = weiblich, RJT = Radiojodtherapie, Tg = Thyreoglobulin

*1 Patient nachweislich mit Thyreoglobulinantikörpern

** 3 Patienten ohne Dokumentation

3.2 Nachweis von CTCs bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen verglichen zur Kontrollgruppe

Qualitativ konnten sowohl in der Kontroll- als auch in der Gruppe der Schilddrüsenkarzinompatienten CTCs nachgewiesen werden. Erhoben wurde nun, ob sich die Anzahl der nachgewiesenen CTCs der Schilddrüsenkarzinompatienten und der Kontrollgruppe signifikant unterschieden.

Die durchschnittliche Anzahl der identifizierten CTCs in der Gruppe der Schilddrüsenkarzinompatienten lag zwischen 0 und 15 mit einem Mittelwert (MW) von $2,4 \pm 3,1$ CTC. In der Kontrollgruppe konnten zwischen 0 und 1,5 CTCs gefunden werden mit einem Mittelwert von $0,2 \pm 0,42$ (73).

In der Gruppenauswertung nach Kruskal-Wallis mit anschließendem Dunn's Vergleichstest ergaben sich signifikante Unterschiede für die CTC-Werte der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe der papillären Schilddrüsenkarzinome als auch zu den follikulären Schilddrüsenkarzinomen, nicht jedoch für die medullären Schilddrüsenkarzinome.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich in der Einzelanalyse im Mann-Whitney-U-Test, eine signifikant höhere Anzahl an CTCs der Patienten aller Schilddrüsenkarzinomarten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $p = < 0,0001$. Dies konnte gleichermaßen bei den einzelnen Tumorentitäten festgestellt werden. Verglichen zur Kontrollgruppe ergaben sich somit MW von $2,3 \pm 2,2$ CTCs; $p < 0,0001$ innerhalb der papillären Schilddrüsenkarzinome, MW von $3,4 \pm 4,6$ CTCs, $p = 0,0049$ bei den follikulären und MW von $1,3 \pm 1,6$ CTCs, $p = 0,009$ bei den medullären Schilddrüsenkarzinomen (73).

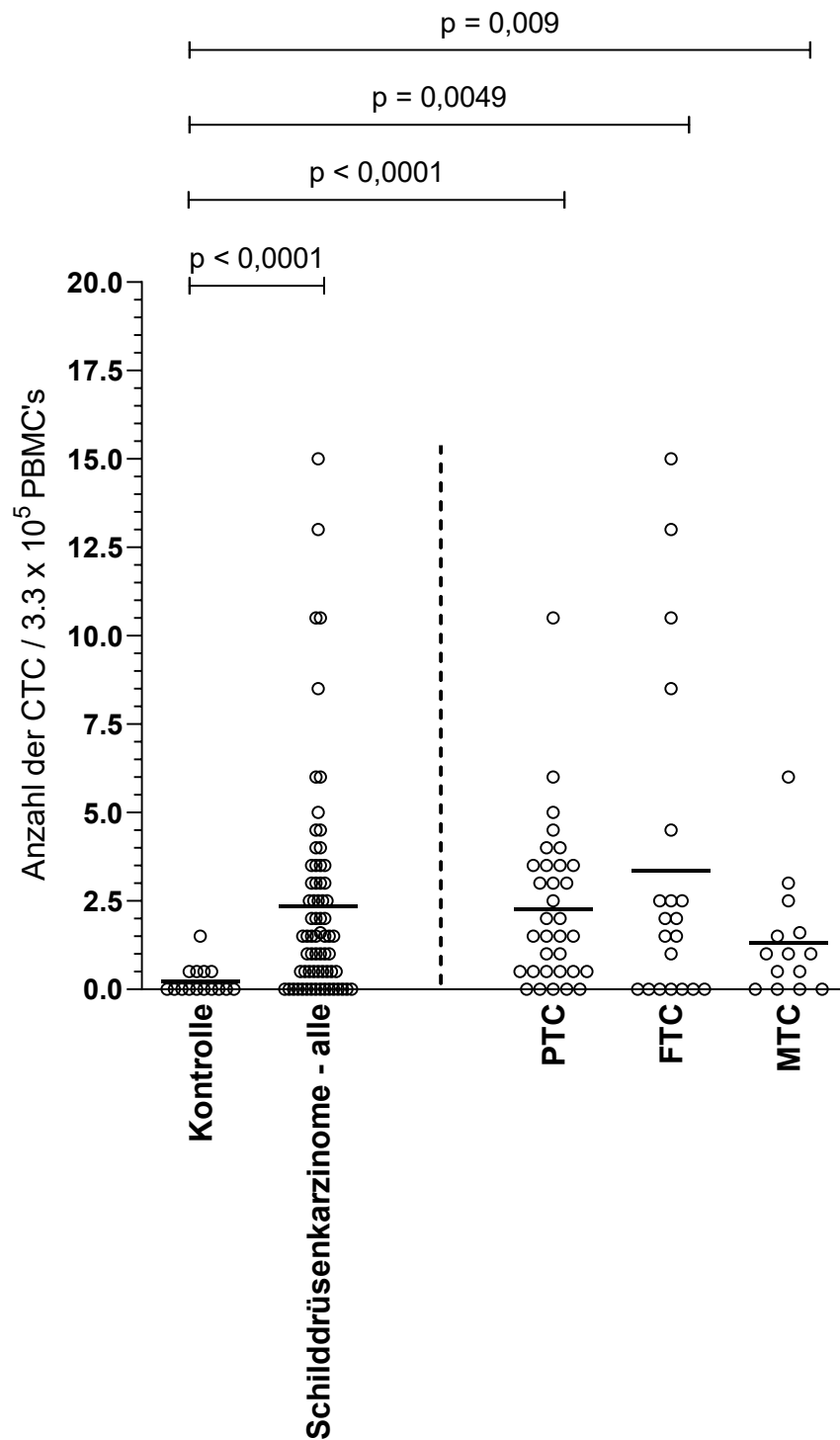


Abb. 5: Anzahl CTCs aller Schilddrüsenkarzinompatienten und einzelner Entitäten im Vergleich zur Kontrollgruppe

Anzahl CTCs aller Schilddrüsenkarzinompatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe und auf einzelne Entitäten aufgeteilt mit Angabe der jeweiligen Signifikanzen. PTC = papilläres Schilddrüsenkarzinom, FTC = follikuläres Schilddrüsenkarzinom, MTC = medulläres Schilddrüsenkarzinom, p = Signifikanz, CTC = circulating tumor cell, PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, adaptiert nach Ehlers et al. (73)

Kein signifikanter Zusammenhang konnte in der Auswertung der T-Stadien der einzelnen Tumorentitäten (follikulär, papillär oder medullär) zu den CTCs festgestellt werden (73).

In weiteren Berechnungen konnte zudem kein Zusammenhang zwischen Lymphknotenbefall (N) oder dem Vorhandensein von Metastasen (M) weder im Vergleich zur Erstdiagnose noch im Vergleich zum Zeitpunkt der Blutentnahme und der detektierten CTCs festgestellt werden (73).

3.4 Zusammenhang zwischen CTCs und den Thyreoglobulinspiegeln differenzierter Schilddrüsenkarzinome

In der Gruppenanalyse nach Kruskal-Wallis und Dunn's Vergleichstest zeigten sich bereits signifikante Unterschiede in der Anzahl der CTCs bei den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen, der krankheitsfreien Patienten, die definitionsgemäß einen Thyreoglobulinspiegel $< 0,3$ ng/ml aufwiesen, und Patienten mit Thyreoglobulinspiegeln ≥ 5 ng/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe (73).

In der Einzeltestung nach Mann-Whitney-U konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an CTC bei den krankheitsfreien Patienten (Anzahl zwischen 0 und 10,5 mit einem MW von $2,7 \pm 3,0$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Anzahl zwischen 0 und 1,5) mit einem Mittelwert von $0,2 \pm 0,4$, mit $p = 0,0002$ bestätigt werden (73).

Patienten mit moderaten Thyreoglobulinspiegeln, zwischen 0,3 und 5 ng/ml, zeigten insgesamt die geringste Anzahl an CTCs, zwischen 0 und 2, was einem Mittelwert von $0,8 \pm 0,8$ entsprach und keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,089$) zur Kontrollgruppe bot (73).

Hingegen ergaben sich bei Patienten mit hohen Thyreoglobulinspiegeln ≥ 5 ng/ml, die höchste Anzahl an nachgewiesenen CTCs mit 0 bis 15 CTC, was einem Mittelwert von $3,5 \pm 4,5$ entspricht. Hierbei bestand ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0005$) zur Kontrollgruppe (73).

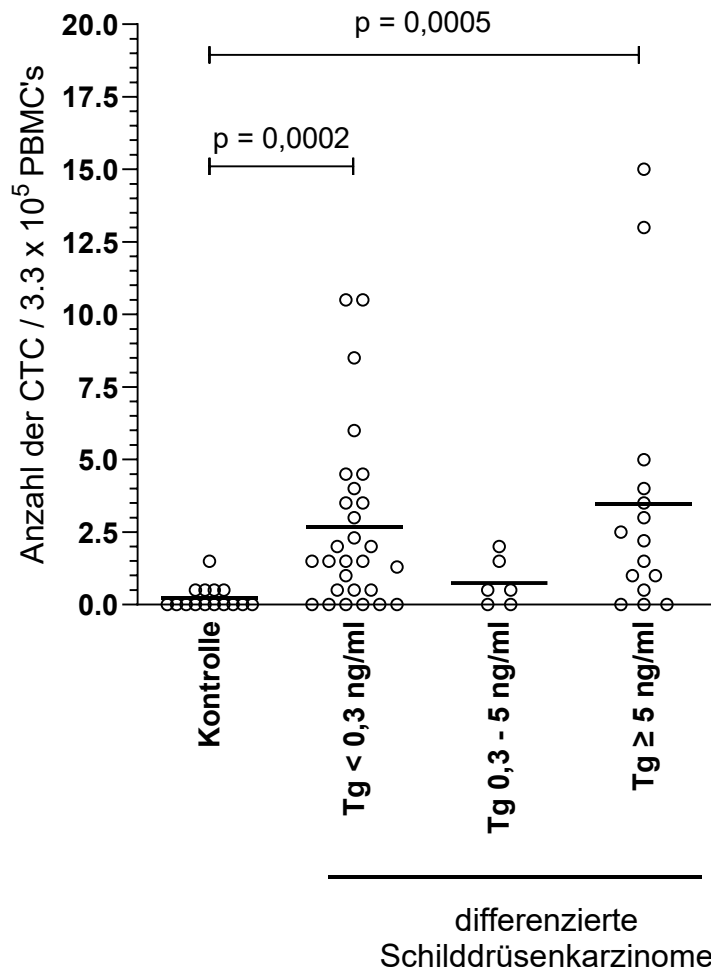


Abb. 7: Anzahl der CTCs bei Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen

Anzahl der CTCs bei Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen aufgeteilt nach Tg-Spiegeln im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Angabe der signifikanten Ergebnisse. Tg = Thyroglobulin, p = Signifikanz, CTC = circulating tumor cell, PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, adaptiert nach Ehlers et al. (73)

Bei der einzelnen Betrachtung papillärer und follikulärer Karzinome ergab sich ein ähnliches Bild wie oben beschrieben.

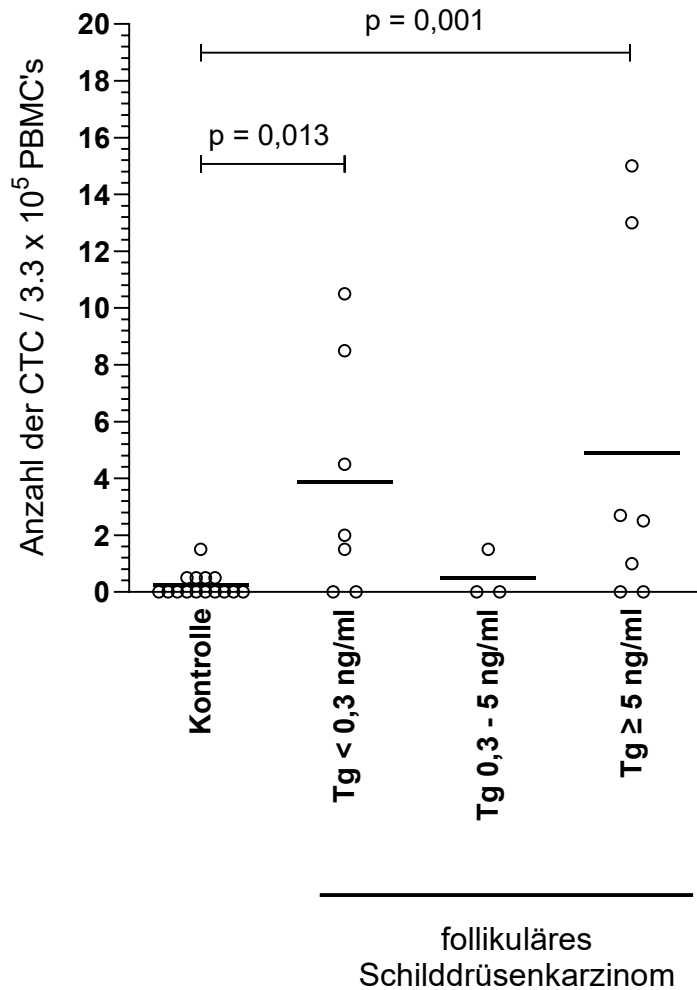


Abb. 8: Anzahl der CTCs bei Patienten mit follikulären Schilddrüsenkarzinomen

Anzahl der CTCs bei Patienten mit follikulären Schilddrüsenkarzinomen aufgeteilt nach Tg-Spiegeln im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Angabe der signifikanten Ergebnisse. Tg = Thyreoglobulin, p = Signifikanz, CTC = circulating tumor cell, PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, adaptiert nach Ehlers et al. (73)

Von den 20 Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom konnten bei 3 Patienten keine Daten zu den Thyreoglobulinspiegeln erhoben werden.

Wie man aus der Abbildung entnehmen kann, ergaben sich signifikante Unterschiede in den ermittelten CTCs zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Tg < 0,3 ng/ml (Mittelwert von $3,8 \pm 4,18$ mit $p = 0,013$) und Tg ≥ 5 ng/ml (Mittelwert von $4,9 \pm 6,34$ mit $p = 0,001$) innerhalb der Gruppe der follikulären Schilddrüsenkarzinompatienten im Mann-Whitney-U Test.

Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen den einzelnen Gruppen (Tg < 0,3 ng/ml, Tg 0,3-5 ng/ml und Tg ≥ 5 ng/ml) ermittelt werden.

Für die Gruppe der papillären Schilddrüsenkarzinompatienten verhielt es sich wie folgt:

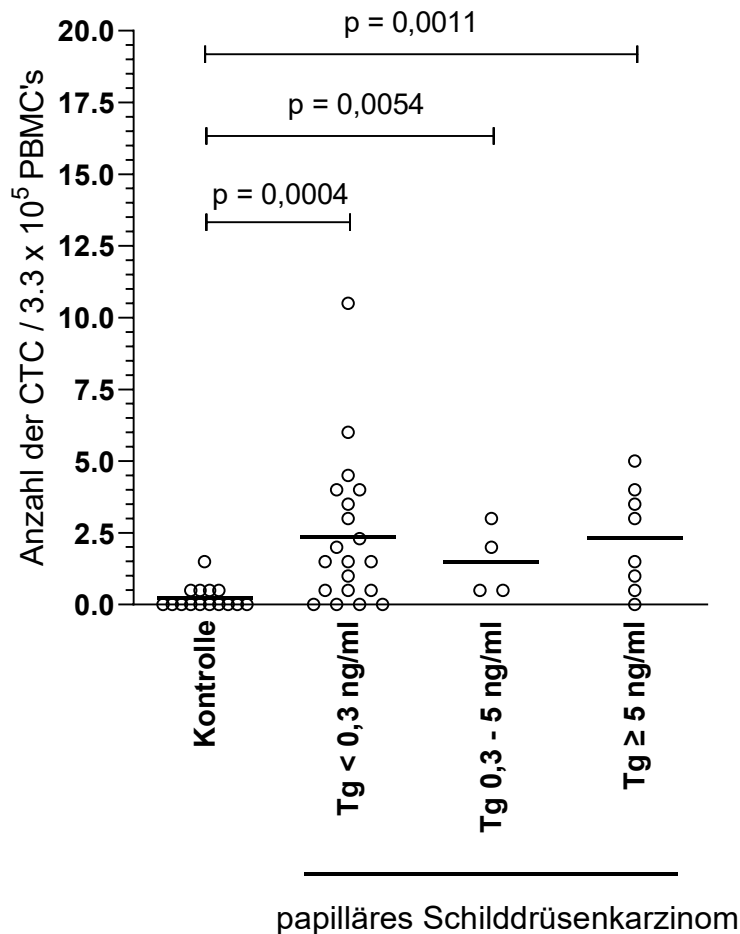


Abb. 9: Anzahl der CTCs bei Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinomen

Anzahl der CTCs bei Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinomen aufgeteilt nach Tg-Spiegeln im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Angabe der signifikanten Ergebnisse. Tg = Thyreoglobulin, p = Signifikanz, CTC = circulating tumor cell, PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, adaptiert nach Ehlers et al. (73)

Wie in der Abbildung zu sehen ist, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl der CTCs der Kontrollgruppe und der jeweiligen Gruppe der papillären Schilddrüsenkarzinome mit Tg < 0,3 ng/ml (Mittelwert von $2,34 \pm 2,6$ mit $p = 0,0004$), Tg 0,3 – 5 ng/ml (Mittelwert von $1,5 \pm 1,22$ mit $p = 0,0054$) und Tg ≥ 5 ng/ml (Mittelwert von $2,3 \pm 1,81$ mit $p = 0,0011$) im Mann-Whitney-U Test.

Konkordant zur Gruppe der follikulären Schilddrüsenkarzinompatienten ergaben sich zwischen den einzelnen Gruppen (Tg < 0,3 ng/ml, Tg 0,3 – 5 ng/ml und Tg ≥ 5 ng/ml) der papillären Schilddrüsenkarzinome keine signifikanten Unterschiede.

3.5 Zusammenhang zwischen Anzahl der CTCs bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen mit Tg-Spiegeln < 0,3 ng/ml und dem T-Stadium

Es ergab sich ein Zusammenhang in der Analyse der Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen und Thyreoglobulinspiegeln < 0,3 ng/ml, die serologisch als tumorfrei gelten, und der Anzahl der detektierten CTCs mit dem initialen T-Stadium gemäß TNM-Klassifikation wie unten dargestellt.

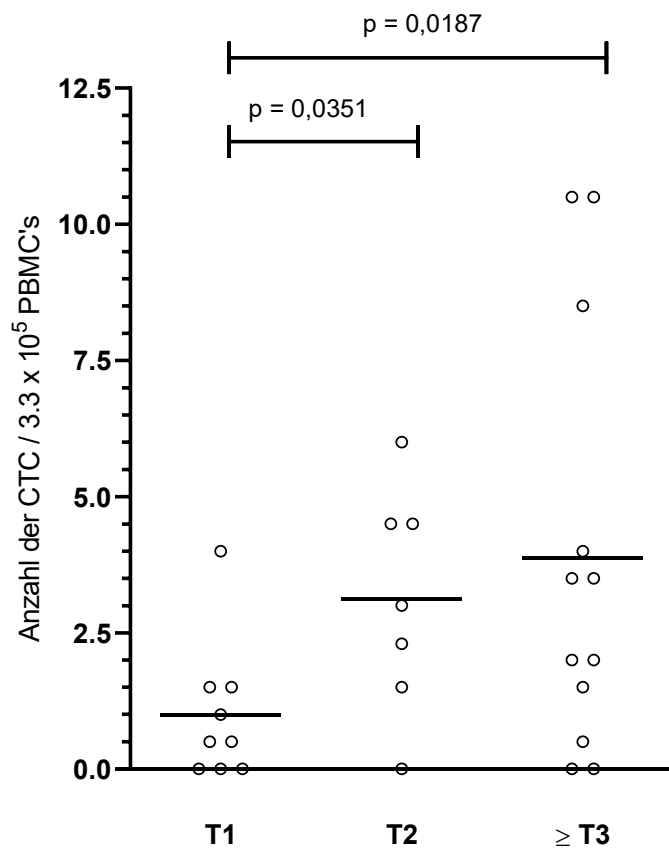


Abb. 10: Anzahl der CTCs bei Patienten mit DTC und Tg-Spiegeln < 0,3 ng/ml

Anzahl der CTCs bei Patienten mit DTC und Tg-Spiegeln < 0,3 ng/ml aufgeteilt auf T-Stadien T1, T2 und T ≥ 3 unter Angabe der signifikanten Ergebnisse. Tg = Thyreoglobulin, ng = Nanogramm, ml = Milliliter, T = Tumorgroße, p = Signifikanz, CTC = *circulating tumor cell*, PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, DTC = differenzierte Schilddrüsenkarzinome, adaptiert nach Ehlers et al. (73)

Zwischen der Gruppe T1 und T2 (T1: MW $0,9 \pm 1,2$ CTCs; T2: $3,1 \pm 2,0$ CTCs mit $p = 0,0351$) sowie T1 und ≥ T3 (≥ T3: MW $3,9 \pm 4,0$ CTCs mit $p = 0,0187$) ergaben sich im Mann-Whitney-U Test jeweils signifikante Unterschiede in der Anzahl der detektierten CTCs (73).

3.6 Zusammenhang zwischen Anzahl der CTCs und Therapie

3.6.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom

Zunächst wurde erörtert, ob ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der letzten Radiojodtherapie und der Anzahl der CTCs bestehe, was jedoch nicht bestätigt werden konnte (Spearman Korrelation $r = 0,34$; $p = 0,0821$).

In einer vorherigen Studie wurden 8 Jahre (entspricht 96 Monaten) als mittlerer Zeitpunkt eines Rezidivs bei papillärem Schilddrüsenkarzinom beschrieben, sodass wir diesen Zeitpunkt zum Vergleich der CTC-Anzahlen heranzogen (74). Zudem wurden nur tumor- bzw. krankheitsfreie Patienten, die definitionsgemäß einen Thyreoglobulinspiegel $< 0,3$ ng/ml nachwiesen, untersucht. Hierbei konnten im Mann-Whitney-U Test signifikant mehr CTCs in der Gruppe der Patienten, bei denen die Radiojodtherapie > 96 Monate zurücklag (MW von $4,6 \pm 3,1$ CTC), als bei denen, deren Therapie ≤ 96 Monate zurücklag (MW von $1,0 \pm 1,0$; $p = 0,0014$), festgestellt werden (73).

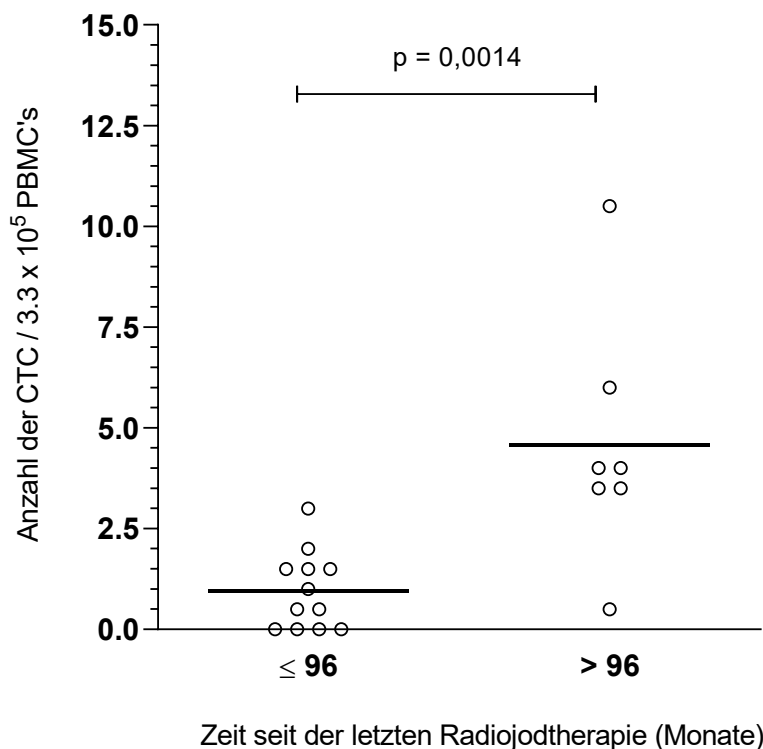


Abb. 11: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Zeit seit der letzten Radiojodtherapie bei tumor-freien PTC-Patienten und Anzahl der CTCs

Darstellung des Zusammenhangs zwischen Zeit seit der letzten Radiojodtherapie bei tumor-freien PTC-Patienten und Anzahl der CTCs unter Angabe der signifikanten Ergebnisse. PTC = papilläres Schilddrüsenkarzinom, p = Signifikanz, CTC = circulating tumor cell, PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*, adaptiert nach Ehlers et al. (73)

3.6.2 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom

Bei den follikulären Schilddrüsenkarzinomen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der letzten Radiojodtherapie und der Anzahl der CTCs weder bei Thyreoglobulinwerten $< 0,3$ ng/ml noch bei Tg $> 0,3$ ng/ml festgestellt werden (73).

3.6.3 Medulläres Schilddrüsenkarzinom

Auch für das medulläre Schilddrüsenkarzinom konnte kein Zusammenhang zwischen der letzten Therapie (Operation) und der CTC-Anzahl nachgewiesen werden (73).

4 Diskussion

4.1 Übergeordnete Zusammenfassung

In der hier präsentierten Studie konnten CTCs im peripheren Blut von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen detektiert werden. Es konnte zudem ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl der CTCs und dem T-Stadium festgestellt werden. Insbesondere Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ohne Nachweis von Tg als Tumormarker im Blut (Tg-Spiegel $< 0,3$ ng/ml), die serologisch als tumorfrei galten, wiesen signifikant mehr CTCs (MW $2,7 \pm 3,0$) mit einer weiten Spannbreite von 0 - 10,5 CTC im Vergleich zu gesunden Probanden (MW $0,2 \pm 0,4$) auf. Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen dem initialen T-Stadium und der erfassten CTCs bei tumorfreien Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ermittelt werden. Bei Patienten mit T1-Stadium ergab sich ein signifikanter Unterschied der detektierten CTCs im Vergleich zu Patienten mit Stadium T2 und $\geq T3$. Des Weiteren wurde für Patienten mit PTC und Tg-Spiegeln $< 0,3$ ng/ml ein signifikanter Anstieg der Anzahl der CTCs festgestellt, wenn die Radiojodtherapie länger als 96 Monate zurücklag.

4.2 Zusammenhang zwischen TNM-Klassifikation und der Anzahl der CTCs im peripheren Blut

In dieser Arbeit konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Tumorausdehnung, ausgedrückt als T nach der 7. TNM-Klassifikation (72), und der Anzahl der CTCs im peripheren Blut festgestellt werden. Im untersuchten Patientenkollektiv befanden sich jedoch fünf statistische Ausreißer (Stadien T3 und T4), bei welchen bis zu 15 CTCs nachgewiesen wurden. Zwei davon wiederum hatten Fernmetastasen, unter anderem in der Lunge, sodass diese aus den Berechnungen nicht ausgeschlossen wurden (73).

In anderen Studien konnte bereits ein positiver Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und der Anzahl der detektierten CTCs im peripheren Blut der Erkrankten nachgewiesen werden, unter anderem bei Leber-, Magen- und adrenokortikalem Karzinom (58, 75, 76).

Gleiches konnte auch kürzlich in Studien zum Mamma- und bei kolorektalem Karzinom festgestellt werden, nicht jedoch bei Prostata- oder dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (77–82). Die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse bedarf näherer Untersuchungen.

Zhang et al. erklärten den fehlenden Zusammenhang beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit einer möglicherweise fehlenden Detektion der CTCs und der geringen Patientengröße (63 Patienten) sowie einer kurzen Follow-Up Zeit (81). Bei der vorliegenden Studie war die Größe des Patientenkollektivs mit 67 ähnlich, jedoch konnte hier ein Zusammenhang festgestellt werden. Inwiefern die angewandte Detektionsmethode oder die Tumorentität ausschlaggebend für die unterschiedlichen Ergebnisse ist, bleibt unklar. Ein größeres Patientenkollektiv als Nachweis der Zuverlässigkeit der Methode wäre wünschenswert, erfordere jedoch größere zeitliche und personelle Kapazitäten, da die Aufarbeitung der Proben manuell erfolgt und immer zwei Untersucher die Objektträger in kurzen zeitlichen Abständen hintereinander mikroskopieren.

Die Tumorgröße wurde als ein Risikofaktor zur Entwicklung zentraler Lymphknotenmetastasen bei papillären Mikrokarzinomen der Schilddrüse beschrieben und war zudem mit einem erhöhten Rezidivrisiko bei papillären Schilddrüsenkarzinomen assoziiert (83–86). Inwiefern dies möglicherweise ein Grund für eine vermehrte Anzahl von CTCs im Blut darstellt, verbleibt zu überprüfen.

Für FTC-Patienten konnte zudem gezeigt werden, dass die Tumorgröße mit einer kürzeren Überlebenszeit (je größer, desto kürzer) und die Präsenz von Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose mit einer geringeren Überlebensrate assoziiert waren (87). Insofern könnte die minimal-invasive Bestimmung der CTCs im peripheren Blut einen Weg aufweisen, diese Risiken ohne großen Aufwand abzuschätzen.

Auch bei den serologisch tumorfreien DTC-Patienten ergaben sich signifikante Unterschiede bei der CTC-Anzahl zwischen den T-Stadien. Patienten mit initialem T1-Stadium wiesen eine signifikant geringere CTC-Anzahl im Blut auf im Vergleich zu Patienten mit T2- und $\geq$ T3-Stadium. Stadium T3 und T4 wurden hierbei zusammengefasst, da es nur 3 Werte für T4 gab. Das bedeutet, dass selbst bei serologisch tumorfreien Patienten mit initial fortgeschrittenem Tumorstadium noch hohe Anzahlen an CTCs festgestellt werden konnten (73). Bis auf einen Patienten mit PTC hatten alle anderen Patienten des untersuchten Kollektivs keinen Tumornachweis zum Zeitpunkt der Blutentnahme, sodass sich die Frage stellt, wieso die Patienten mit initial höheren T-Stadien bei serologisch fehlendem Tumornachweis tendenziell mehr CTCs im Blut aufwiesen. Womöglich handelt es sich um verbliebene (schlafende) Tumorzellen, die im Verlauf zu einem Rezidiv führen könnten. Inwiefern die ermittelte CTC-Anzahl prognostische Bedeutung hat, kann nur in prospektiven Langzeitstudien geklärt werden.

Die hier erhobenen Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Tumorausdehnung und der Anzahl der CTCs im peripheren Blut von Schilddrüsenkarzinompatienten hin. Zusammenfassend kann man festhalten, dass bei größerer Tumorausdehnung mehr CTCs im Blut der Patienten zu finden waren, was sich teilweise mit anderen Studienergebnissen deckt und mit weiteren Krankheitsparametern verknüpft werden sollte. Die Bestimmung der CTCs könnte daher als zusätzlicher unabhängiger Faktor zur Krankheitsüberwachung als auch der Prognoseabschätzung beim Schilddrüsenkarzinom dienen.

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv ergab sich hingegen kein Zusammenhang zwischen dem N- (Lymphknotenbefall) und M- (Metastasen) Stadium und der CTCs. Kontroverse Daten diesbezüglich ergaben sich auch in anderen Studien zum Beispiel zum kolorektalen Karzinom, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus als auch dem Mammakarzinom (77, 78, 80, 81, 88).

In einer Studie von Xu et al. 2016 wurde ebenfalls keine erhöhte CTC-Anzahl bei metastasierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomen detektiert. Erklärt wurde dies aufgrund einer verminderten oberflächlichen (extrazellulären) Membranexpression von EpCAM, welche durch das CellSearch-System detektiert wird, und stattdessen einer erhöhten nukleären EpCAM-Akkumulation der CTCs (68). Diese Tatsache konnte bereits zuvor bei aggressiv verlaufenden PTC nachgewiesen werden (89).

In der hier vorgestellten Studie hat das EpCAM-Expressionsmuster hingegen keinen Einfluss auf die Ergebnisse, da die hier genutzte Methodik nicht die extrazelluläre EpCAM-Expression zur Anreicherung von CTCs nutzt. Jedoch weisen sich gerade die zur Metastasierung neigenden Tumorzellen durch eine vermehrte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) aus und sind für die Detektion anhand epithelialer Oberflächenmarker möglicherweise nicht erfassbar (90–92). Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Zusammenhang zwischen detektierten CTCs und der Metastasierung bzw. dem M-Stadium sein.

Ein weiterer Grund für den fehlenden Zusammenhang zwischen dem Metastasen-Stadium und der CTCs könnte, zumindest bei der Auswertung der PTC, an der v.a. lymphogenen Ausbreitung und eher selten auftretenden Fernmetastasierung liegen (93). Damit ergibt sich jedoch die Frage, ob die CTC-Bestimmung bei Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinomen zur Prognostik überhaupt geeignet ist, da diese Entität sich eher durch ein langsames Tumorstadium und einen seltenen krankheitsbezogenen Tod auszeichnet (31, 94, 95). Bekannte Risikofaktoren für eine erhöhte Rezidiv- und Todesrate sind unter anderem Fernmetastasen, Tumorstadium und Lymphknotenbeteiligung (74).

Aufgrund der unterschiedlichen Tumorbilogie hinsichtlich Ausbreitung und Metastasierung der Subtypen (MTC, PTC und FTC) der Schilddrüsenkarzinome wird daher auch postuliert, eine getrennte Auswertung erhobener Studiendaten vorzunehmen, was in dieser Arbeit teilweise Berücksichtigung fand (87, 93). Damit könnte das Aussagepotential der detektierten CTCs hinsichtlich der Krankheitsprognose für die jeweilige Tumorentität verbessert werden.

4.3 Einfluss der Detektionsmethoden und Charakteristika der CTCs

Ein weiterer Grund für die kontroversen Ergebnisse früherer Studien hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen TNM-Klassifikation und Anzahl der CTCs könnten die in den Studien teilweise sehr unterschiedlichen Detektionsmethoden mit entsprechend variabler Sensitivität und Spezifität sein, was die Vergleichbarkeit der Aussagen generell einschränkt. Dies konnte beispielsweise in einer systematischen Übersichtsarbeit von Tonozzi et al. für Schilddrüsenkarzinome nachgewiesen werden. Hier zeigten sich in verschiedenen Studien Sensitivitäten zwischen 20 % bis 90,9 % sowie Spezifitäten von 77,8 % bis 100 % für den Nachweis von CTCs, was unter anderem durch die verschiedenen angewandten Methoden und die unterschiedlichen Tumorsubtypen (medullär, papillär und follikulär) begründet wurde (96).

Des Weiteren muss man berücksichtigen, dass EpCAM als Oberflächenprotein nicht nur auf Tumorzellen von Karzinomen, sondern auch auf „normalen“ Epithelzellen unter anderem dem Gastrointestinaltrakt, den Gallenwegen, der Harnblase und dem Follikel-epithel der Schilddrüse nachzuweisen ist (97–99). Karzinomzellen können EpCAM ausbilden und an der Zelloberfläche exprimieren, auch wenn sie normalerweise kein EpCAM als Oberflächenmolekül tragen (100). Die Detektionsmethoden sollten wünschenswerterweise eine eindeutige Differenzierung von Tumorzellen und Epithelzellen mit EpCAM-Expression gewährleisten.

Unter anderem findet die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), die, wie bereits erwähnt, Einfluss auf die Metastasierung eines Tumors hat und somit auch für die weitere Prognose der Erkrankung entscheidend ist, je nach Detektionsmethode keine Berücksichtigung (91, 101, 102). Dadurch werden die vorhandenen CTCs im Blut womöglich nicht erfasst und somit unterschätzt (92).

Des Weiteren weisen sich die unterschiedlichen Tumorarten bzw. Tumorzellen auch durch unterschiedliche Charakteristika hinsichtlich der Expression von EpCAM oder anderer

Oberflächenmoleküle aus (103–105). Selbst der einzigen durch die FDA zugelassenen Detektionsmethode mittels der CellSearch Plattform von Veridex (zugelassen für Mamma-, Prostata- und kolorektales Karzinom) mangelt es unter anderem aufgrund der Heterogenität der CTCs und der geringen Anzahl im peripheren Blut an Sensitivität und Spezifität (92, 103, 106, 107). Dies trifft insbesondere dann zu, wenn die Tumorzellen nur wenige epitheliale Marker exprimieren wie z.B. beim Nierenzellkarzinom, wo sich die epithelunabhängige Methode mit ISET (*isolation by size of epithelial tumor cells*) als probater erwies (103). Eine Diskrepanz der CTC-Anzahl je nach Tumortyp und Detektionsmethode konnte bereits in anderen Studien aufgezeigt werden (108). In einer Studie von Yu et al. konnte bei Patienten mit Mammakarzinom gezeigt werden, dass die Detektion von CTCs mit mesenchymalen Merkmalen mit einem Krankheitsprogress assoziiert ist (109). Um daher die erhobenen Daten besser vergleichen und zur validen Prognoseeinschätzung heranziehen zu können, wäre eine einheitliche Detektionsmethode oder eine Kombination aus mehreren Methoden mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Erfassung der CTCs wünschenswert. Denkbar wäre zum Beispiel eine Kombination aus einer biochemischen und biophysikalischen Detektionsmethode zu etablieren, die einerseits kosteneffektiv ist und andererseits einen hohen Durchsatz bietet (106).

4.4 Einfluss therapeutischer Maßnahmen und *tumor dormancy*

In unseren Daten zeigte sich, dass CTCs noch lange Zeit nach abgeschlossener Therapie (z.B. Operation und Radiojodtherapie) im peripheren Blut nachweisbar waren, was unter anderem bereits für Patienten mit Mammakarzinom beschrieben wurde (110, 111). Pachmann et al. 2005 beschrieb das 13 von 16 ihrer Patienten in kompletter Remission CTCs auch noch über 1 Jahr nach erfolgter Therapie aufwiesen (110).

Dies ist konsistent mit unseren erhobenen Daten, wobei in der hier vorgestellten Studie CTCs noch mehrere Jahre (bis zu 19 Jahren) nach erfolgreicher Therapie im Patientenblut festgestellt werden konnten (73). Im Vergleich zu den Kontrollprobanden zeigten sich bei den DTC mit fehlendem serologischen Tumornachweis ($Tg < 0,3 \text{ ng/ml}$) signifikant mehr CTCs im Blut, was sowohl für PTC als auch für FTC in der Einzelbetrachtung bestätigt werden konnte. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Tumorzellen um „ruhende“ Tumorzellen, die das Auftreten eines Rezidivs frühzeitig anzeigen, was wiederum für die Therapie und Prognose entscheidend sein könnte.

Dies führt zur Diskussion über den Mechanismus des sogenannten *tumor dormancy*. Unter *tumor dormancy* versteht man den „ruhenden“ Zustand eines Tumors, der lange nach

der eigentlichen Tumorentfernung bzw. stattgefundener Therapie und klinisch fehlendem Tumornachweis, entweder lokal oder systemisch als Rezidiv auftreten kann (112, 113). Bei Patienten mit Mammakarzinom tritt bei 20 % der klinisch tumorfreien Patienten zwischen 7 bis 25 Jahren ein Rezidiv auf, ähnliches wurde ebenfalls für das Schilddrüsenkarzinom beschrieben (113, 114). Insbesondere wird dies beim gut-differenzierten Schilddrüsenkarzinom mit, wenn überhaupt, später Metastasierung und langsamen Tumorprogress, als Mechanismus eines Rezidivs angenommen (115).

Diskutiert wird, ob es sich dabei um CTCs handelt, die langlebig, sich in einem „schlafenden“ Zustand befinden, und deswegen noch Jahre später im Blut nachweisbar sind oder ob CTCs von replizierenden Tumorzellen aus dem Gewebe stammen und von da aus wieder ins Blut gelangen (110, 112, 116). Ein wichtiger Aspekt ist, dass man davon ausgeht, dass dieser „schlafende“ Zustand für die Therapieresistenz mancher Karzinome verantwortlich ist (112).

Die genauen Hintergründe und Mechanismen zu *tumor dormancy* und die exakte Rolle der CTCs bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen, insbesondere um entsprechende therapeutische Schritte einzuleiten und damit die Prognose bei Patienten mit metastasierten Schilddrüsenkarzinomen zu verbessern.

Grogan et al. 2013 untersuchte 269 Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinomen über eine Zeit von 27 Jahren bezüglich der Rezidiv- und krebsassoziierten Todesrate, welche bei 28 % und 9 % lagen. Die Zeitspanne bis zum Rezidivereignis lag bei durchschnittlich 8,1 Jahren und beim tumor-assoziierten Tod bei 9,0 Jahren (74). In unseren Daten ließen sich bei krankheitsfreien PTC-Patienten, bei denen die Radiojodtherapie > 96 Monate (entspricht 8 Jahren) zurücklag, ebenfalls signifikant höhere Anzahlen an CTCs als bei den Patienten < 96 Monate, nachweisen. Dies könnte möglicherweise auf einen kritischen Zeitpunkt beim Follow-Up von PTC-Patienten hindeuten (73). Unsere Daten zeigen das Potenzial der CTC-Bestimmung hinsichtlich einer Prognosevorhersage bei dieser Patientengruppe auf, sollten jedoch in weiterführenden Studien näher untersucht werden. CTC-Messungen konnten bereits für Patientinnen mit Mammakarzinom als unabhängige Faktoren für die Prognose und die Überlebenswahrscheinlichkeit herangezogen werden (117, 118).

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei den Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen, und fehlendem Tumormarkernachweis (Tg-Spiegel < 0,3 ng/ml) eine CTC-Anzahl zwischen 0 - 10,5 festgestellt mit einem MW von $2,7 \pm 3,0$ CTC, was sogar höher lag als die CTC-Anzahl bei Patienten mit moderat erhöhten Tg-Spiegeln (0,3 - 5

ng/ml) und signifikant höher als bei den Kontrollprobanden. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich jedoch im Vergleich der Gruppen anhand des T-Stadiums und der „Aggressivität“ des Tumors (Thyreoglobulinspiegel, Anzahl der Radiojodtherapien, applizierte Radiojodmenge). Einfluss auf die Ergebnisse könnte der Zeitpunkt der letzten Radiojodtherapie gehabt haben. Denn die Radiojodtherapien bei den Patienten mit $Tg < 0,3$ ng/ml (tumorfrei) lagen signifikant länger zurück als bei der Gruppe der $Tg 0,3 - 5$ ng/ml, nämlich $80,6 \pm 82,4$ Monate vs. $16,7 \pm 22,9$ Monate ($p = 0,0185$) (73). Zudem war die Gruppe der DTC mit moderaten Tg-Spiegeln ($Tg 0,3 - 5$ ng/ml) mit 6 Patienten eher klein, sodass ein signifikanter Unterschied womöglich nicht erfasst wurde.

Der Nachweis von CTCs in serologisch tumor-freien Patienten könnte insbesondere für schlecht-differenzierte und metastasierte differenzierte Schilddrüsenkarzinome ohne erhöhte Thyreoglobulinwerte im Blut oder mit nachweislichen Thyreoglobulin-Antikörpern zum Monitoring der Krankheitsaktivität hilfreich sein. Ein Patient (initiales TNM-Stadium T3N1MX) in unserer Kohorte mit papillärem Schilddrüsenkarzinom wies beispielsweise keine erhöhten Thyreoglobulinspiegel ($Tg < 0,2$ ng/ml) oder Thyreoglobulin-Antikörper auf und hatte zum Zeitpunkt der Blutentnahme als Mittelwert 3,5 CTCs im Blut mit klinisch eindeutigen Krankheitsprogress (wachsende Lymphknoten- und Lungenmetastasen). Aufgrund einer Operation im Verlauf konnte keine erneute Blutentnahme als Follow-Up erfolgen. Dieses Beispiel weist jedoch auf die Einsatzmöglichkeiten der CTC-Bestimmung als alternative Überwachungsmethode zur Ermittlung Tumormarker-negativer Patienten mit Krankheitsprogress hin (73).

4.5 Rolle der CTCs bei Kontrollprobanden

Wie bereits in anderen Studien ermittelt, fanden wir nur wenige CTCs im Blut unserer Kontrollprobanden (zwischen 0 - 1,5 CTC, MW $0,2 \pm 0,42$), die eine Struma, Autoimmuntyreoiditis oder gutartige Schilddrüsenknoten aufwiesen. Diese Tatsache wurde bereits in vorherigen Untersuchungen bei Patienten mit inflammatorischen oder benignen Erkrankungen gleichermaßen beschrieben (43, 77, 119, 120). Da auch diese Kontrollprobanden vereinzelt CTCs im Blut aufwiesen, sollte hier weiter untersucht werden, welcher Entität die gefundenen Zellen angehören. Handelt es sich möglicherweise um bereits vorhandene Tumorzellen, die sich in einem frühen Stadium einer beginnenden Tumorerkrankung befinden, oder sind es andere Zellen, die ähnliche Charakteristika aufweisen, was somit die Detektion der eigentlichen CTCs beeinträchtigen könnte. In einer Studie von Ilie et al. wurden beispielsweise bereits einige

Jahre zuvor CTCs im Blut von Risikopatienten mit COPD detektiert. Diese wurden jährlich überwacht und im Verlauf konnten Lungentumoren in frühen Stadien der Krankheit entdeckt und entfernt werden (121). Um diese Fragen eindeutig zu klären, bedarf es prospektiver Langzeitstudien und näherer Charakterisierungen dieser Zellen, wie bereits vorgeschlagen wurde (120).

4.6 Limitationen der Studie

Unsere Studie weist ebenfalls Limitationen auf. Ein Faktor spielt beispielsweise der unkalkulierbare Einfluss therapeutischer Interventionen wie Operationen oder systemische Therapien bezüglich des Überlebens potentieller Tumorzellen, die langfristig (für Jahre) in der Blutzirkulation überleben und vorkommen können (41, 110, 122, 123). Da die meisten der untersuchten Patienten vor der Blutentnahme operiert oder bestrahlt wurden, kann man diese Einflussfaktoren in unserer Untersuchung nicht ausschließen bzw. einkalkulieren. Weitere Studien sollten daher darauf zielen, die Auswirkung dieser Therapien anhand unterschiedlicher Messzeitpunkte vor, während und nach der jeweiligen Therapie zu untersuchen, um damit einen besseren Einblick bezüglich der Bedeutung von CTCs in Schilddrüsenkarzinomen zu bekommen. In der Publikation von Schmidt et al. 2021 konnte bereits gezeigt werden, dass die Anzahl der CTCs in Patienten mit DTC 6 Wochen nach Radiojodtherapie signifikant sank und die Detektion von CTCs möglicherweise als effizientes Instrument zum Therapiemonitoring dienen könnte (70).

Des Weiteren zeigte sich in der Korrelationsanalyse ein positiver Zusammenhang zwischen dem T-Stadium und der Anzahl der CTCs, wobei die Korrelation auf 5 statistische Ausreißer mit Stadien T3 und T4 zurückzuführen war. Da bei 2 Patienten Fernmetastasen nachzuweisen waren, wurden diese nicht exkludiert (73).

Wie bereits erwähnt, wäre die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs zur Untermauerung der Ergebnisse und verbesserten Repräsentation wünschenswert. Durch die teilweise kleinen Kohorten kann nicht ausgeschlossen werden, dass signifikante Unterschiede nicht erkannt wurden. Beispielsweise gab es nur bei 60 % des untersuchten Patientenkollektivs Informationen zur Metastasierung. Jedoch bedarf die hier angewandte Methodik einen großen zeitlichen und personellen Aufwand, da die Verarbeitung der Proben manuell erfolgt und das Mikroskopieren der Objektträger durch 2 Untersucher in kurzen Abständen hintereinander erfolgen muss. Des Weiteren werden mehr Daten zum Follow-Up benötigt, um die Bedeutung der CTCs für die Krankheitsprognose besser untersuchen zu können.

4.7 Zukunftsperspektiven der CTCs

Aufgrund der zunehmenden Anzahl an Krebserkrankungen weltweit bedarf es weiterer Untersuchungen sowohl des Metastasierungsprozesses als auch der Therapiestrategien, um langfristig die Prognose von Krebspatienten zu verbessern. Ein Potenzial hierfür bieten die CTCs, die in den letzten Jahren zunehmend erforscht wurden. Zukünftig wäre eine Verbesserung der Detektionsmethoden unter Berücksichtigung der EMT, *tumor dormancy* und anderer morphologischer Aspekte der einzelnen CTCs wünschenswert, um damit die Aussagekraft hinsichtlich der Krankheitsprädiktion zu verbessern (44, 124). Des Weiteren könnte die Bestimmung von CTCs im Blut als *liquid biopsy* Verwendung finden und vor, während und nach einer Therapie als Surrogatmarker des Therapieansprechens und zum Krankheitsmonitoring dienen (125, 126). Zudem wäre es wünschenswert die CTCs molekular näher zu charakterisieren, um individualisierte und zielgerichtete Therapiestrategien entwickeln zu können (127).

Wir konnten aufzeigen, dass signifikant mehr CTCs im peripheren Blut von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu Kontrollpatienten mit gutartigen Schilddrüsenerkrankungen festgestellt werden konnten. Dies ließe auf die Möglichkeit schließen, CTC-Bestimmungen als Screeningelement zur Tumorsuche bei beispielsweise Risikopatienten zu verwenden, wie es Ilie et al. zum Lungenkarzinom untersuchte, oder zur Differenzierung von benignen oder malignen Veränderungen im Gewebe wie in der Studie von Pinzani et al. zum adrenokortikalen Karzinom heranzuziehen (58, 121). Allerdings bedarf es hierfür einer hohen Sensitivität sowie Spezifität der Detektionsmethoden, um eine Überdiagnostik zu vermeiden.

Zudem konnte ein positiver Zusammenhang zwischen dem T-Stadium, der Tumorausdehnung, und der Anzahl der detektierten CTCs nachgewiesen werden. Dies konnte insbesondere auch für die serologisch und klinisch tumorfreien Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom aufgezeigt werden.

Darüber hinaus konnten bei tumorfreien PTC-Patienten ohne serologischen Tumornachweis signifikant mehr CTCs im peripheren Blut festgestellt werden, wenn die Radiojodtherapie > 8 Jahre zurücklag, im Vergleich zu den Patienten, bei denen die Therapie kürzer zurücklag.

Daraus ließe sich ableiten, dass CTCs zum Krankheitsmonitoring und Follow-Up sowie als zusätzliches Werkzeug in der Tumordiagnostik und -therapie des Schilddrüsenkarzinoms dienen könnten. Um dies in der klinischen Anwendung zu etablieren, bedarf es jedoch noch weiterer repräsentativer Studien.

4.8 Schlussfolgerungen

Zirkulierende Tumorzellen sind zum besseren Verständnis der Tumorbilogie bei verschiedenen soliden Tumorarten bereits seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Forschungen. Sie könnten als Biomarker dem klinischen Management einer Tumorerkrankung dienen und sind zudem einfach und minimal-invasiv durch eine Blutentnahme zu erheben.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Detektion von CTCs bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen mittels einer immunfluoreszierenden Methode untersucht. Es konnten hierbei signifikant mehr CTCs im peripheren Blut von Schilddrüsenkarzinompatienten als bei den Kontrollpatienten mit gutartigen Schilddrüsenerkrankungen festgestellt werden. Dies konnte für die untersuchten einzelnen Entitäten (FTC, MTC und PTC) gleichermaßen nachgewiesen werden, was bereits erhobene Daten anderer Studien zu CTCs für andere solide Tumorarten bestätigt.

Des Weiteren konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Tumorausdehnung und der Anzahl der CTCs festgestellt werden. Je größer also ein Tumor in der Ausdehnung war, desto mehr CTCs konnten durchschnittlich im Blut detektiert werden. Die Bestimmung der CTCs im Blut könnte daher dem weiteren Krankheitsmanagement und der Prognoseabschätzung dienen. Dies deckt sich jedoch nur teilweise mit Studienergebnissen zu anderen Tumorarten, was teilweise auf unterschiedliche Detektionsmethoden, die nicht oder nur unzureichend miteinander vergleichbar sind, zurückzuführen ist. Des Weiteren werden CTCs, die sich beispielsweise in einer EMT befinden, möglicherweise durch epitheliale Detektionsmethoden nicht erfasst, sodass es anderer, z.B. kombinierter Methoden bedarf.

Vor allem bei Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom, die serologisch als tumorfrei gelten, konnten in der hier aufgeführten Arbeit im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr CTCs nachgewiesen werden. Zudem wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Tumorausdehnung und der Anzahl der CTCs aufgezeigt. Dies könnte die Bedeutung der CTCs bei Patienten ohne serologischen oder klinischen Tumornachweis als Prognosemarker oder zur Therapiekontrolle verstärken, sollte jedoch zukünftig noch näher untersucht werden.

Außerdem konnten im Blut von Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom signifikant mehr CTCs im Blut festgestellt werden, wenn die Radiojodtherapie mehr als 96 Monate (8 Jahre) zurücklag, was möglicherweise für einen kritischen Zeitpunkt in der Tumornachsorge mit einem erhöhten Rezidivrisiko spricht. Diese Hypothese sollte überprüft

werden, insbesondere hinsichtlich der Dynamik der CTC-Detektion vor, während und nach einer Radiojodtherapie, um daraus zukünftig entsprechende therapeutische Schlüsse ziehen zu können.

Insgesamt konnte mittels der hier vorgestellten Arbeit nachgewiesen werden, dass sich signifikant mehr CTCs im Blut von Schilddrüsenkarzinompatienten als im Blut von Kontrollpatienten befinden und durch die detektierte Anzahl möglicherweise Schlüsse auf die Tumorgroße und einen -progress gezogen werden können. Limitierend ist jedoch sowohl die Tumorbiologie mit EMT und *tumor dormancy* als auch die angewandte Methodik, die die Erfassung aller CTCs im Blut unterschätzen kann. Zudem war der Einfluss therapeutischer Interventionen des hier untersuchten Patientenkollektivs unkalkulierbar.

Erstrebenswert wäre die Detektionsmethoden unter Berücksichtigung der Charakteristika der CTCs zu verbessern, um damit die Anwendung der CTCs als Biomarker nicht nur in der Forschung, sondern auch im klinischen Management von soliden Tumorerkrankungen und hier speziell dem Schilddrüsenkarzinom zu etablieren.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* 2019; 9(4):217–22.
2. 900-world-fact-sheets [cited 2021 Mar 6]. Available from: URL: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
3. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018 [cited 2022 Apr 2]. Available from: URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c73_schilddruese.pdf?__blob=publicationFile.
4. Li M, Maso LD, Vaccarella S. Global trends in thyroid cancer incidence and the impact of overdiagnosis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2020; 8(6):468–70.
5. Vaccarella S, Dal Maso L, Laversanne M, Bray F, Plummer M, Franceschi S. The Impact of Diagnostic Changes on the Rise in Thyroid Cancer Incidence: A Population-Based Study in Selected High-Resource Countries. *Thyroid* 2015; 25(10):1127–36.
6. Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, Wild CP, Plummer M, Dal Maso L. Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis. *N Engl J Med* 2016; 375(7):614–7.
7. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, Garavello W, Bertuccio P, Levi F et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. *Int J Cancer* 2015; 136(9):2187–95.
8. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980–2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(3):784–91.
9. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA* 2006; 295(18):2164–7.
10. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974–2013. *JAMA* 2017; 317(13):1338–48.
11. Deng Y, Li H, Wang M, Li N, Tian T, Wu Y et al. Global Burden of Thyroid Cancer From 1990 to 2017. *JAMA Netw Open* 2020; 3(6):e208759.
12. Soares P, Celestino R, Da Gaspar Rocha A, Sobrinho-Simões M. Papillary thyroid microcarcinoma: how to diagnose and manage this epidemic? *Int J Surg Pathol* 2014; 22(2):113–9.

13. Leenhardt L, Grosclaude P, Chérié-Challine L. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004; 14(12):1056–60.
14. Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, Malakhova I, Shibata Y, Khrouch V et al. Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(10):724–32.
15. Bhatti P, Veiga LHS, Ronckers CM, Sigurdson AJ, Stovall M, Smith SA et al. Risk of second primary thyroid cancer after radiotherapy for a childhood cancer in a large cohort study: an update from the childhood cancer survivor study. *Radiat Res* 2010; 174(6):741–52.
16. Preston-Martin S, Franceschi S, Ron E, Negri E. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? *Cancer Causes Control* 2003; 14(8):787–9.
17. Malchoff CD, Malchoff DM. Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer Control* 2006; 13(2):106–10.
18. Franceschi S, Preston-Martin S, Dal Maso L, Negri E, La Vecchia C, Mack WJ et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. IV. Benign thyroid diseases. *Cancer Causes Control* 1999; 10(6):583–95.
19. Kebebew E, Ituarte PHG, Siperstein AE, Duh Q-Y, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 2000; 88(5):1139–48.
20. Zimmermann MB, Galetti V. Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: a comprehensive review of animal and human studies. *Thyroid Res* 2015; 8:8.
21. Feldt-Rasmussen U. Iodine and cancer. *Thyroid* 2001; 11(5):483–6.
22. Cao L-Z, Peng X-D, Xie J-P, Yang F-H, Wen H-L, Li S. The relationship between iodine intake and the risk of thyroid cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(20):e6734.
23. Schmid KW, Sheu S-Y, Tötsch M, Görges R, Bockisch A, Mann K. Pathologie des Schilddrüsenkarzinoms. *Onkologie* 2005; 11(1):29–39.
24. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J, editors. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. (World Health Organization classification of tumours8 (in the 4th edition)).
25. Machens A, Holzhausen H-J, Dralle H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. *Cancer* 2005; 103(11):2269–73.

26. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer* 1998; 83(12):2638–48.
27. Schlumberger Martin Jean. Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. *N Engl J Med* 1998; (338):297–306.
28. Lundgren CI, Hall P, Ekbom A, Frisell J, Zedenius J, Dickman PW. Incidence and survival of Swedish patients with differentiated thyroid cancer. *Int J Cancer* 2003; 106(4):569–73.
29. Figge J. Epidemiology of Thyroid Cancer. In: Wartofsky L, editor. *Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000. p. 77–83.
30. Schmid KW. Pathogenese, Klassifikation und Histologie von Schilddrüsenkarzinomen. *Onkologie* 2010; 16(7):644–56.
31. Mazzaferri EL. Long-term outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma: effect of therapy. *Endocr Pract* 2000; 6(6):469–76.
32. Asari R, Koperek O, Scheuba C, Riss P, Kaserer K, Hoffmann M et al. Follicular thyroid carcinoma in an iodine-replete endemic goiter region: a prospectively collected, retrospectively analyzed clinical trial. *Ann Surg* 2009; 249(6):1023–31.
33. D'Avanzo A, Treseler P, Ituarte PHG, Wong M, Streja L, Greenspan FS et al. Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis. *Cancer* 2004; 100(6):1123–9.
34. Kloos RT, Mazzaferri EL. A single recombinant human thyrotropin-stimulated serum thyroglobulin measurement predicts differentiated thyroid carcinoma metastases three to five years later. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(9):5047–57.
35. Miyauchi A, Kudo T, Miya A, Kobayashi K, Ito Y, Takamura Y et al. Prognostic impact of serum thyroglobulin doubling-time under thyrotropin suppression in patients with papillary thyroid carcinoma who underwent total thyroidectomy. *Thyroid* 2011; 21(7):707–16.
36. Guesgen C, Willms A, Zwad A, Waldeck S, Wieler H, Schwab R. Investigation of factors potentially influencing calcitonin levels in the screening and follow-up for medullary thyroid carcinoma: a cautionary note. *BMC Clin Pathol* 2013; 13(1):27.
37. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A et al. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. The GETC Study Group. Groupe d'étude des tumeurs à calcitonine. *Clinical endocrinology* 1998; 48(3):265–73.

38. Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 2013; 62(5):931–9.
39. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(19):3213–21.
40. Cristofanilli Massimo, Budd G. Thomas, Ellis Matthew J., Stopeck Alison, Matera Jeri, Miller M. Craig et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2004; (351):781–91.
41. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(23):7053–8.
42. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008; 26(8):1208–15.
43. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20):6897–904.
44. Paterlini-Bréchet P. Circulating Tumor Cells: Who is the Killer? *Cancer Microenviron* 2014; 7(3):161–76.
45. Sun Y-F, Yang X-R, Zhou J, Qiu S-J, Fan J, Xu Y. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(8):1151–73.
46. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012; 63:199–215.
47. Gertler R, Rosenberg R, Fuehrer K, Dahm M, Nekarda H, Siewert JR. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162:149–55.
48. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schütze K et al. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells. *The American Journal of Pathology* 2000; 156(1):57–63.
49. Cristofanilli M. The biological information obtainable from circulating tumor cells. *The Breast* 2009; 18:S38-S40.
50. Kagan, M., Howard, D., Bendele, T, Mayes, J., Silvia, J., Repollet, M., Doyle, J., Allard, J., Tu, N., Bui, T., Russell, T., Rao, C., Hermann, M., Rutner H., Terstappen, L.W.M.M. A

sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *Journal of Clinical Ligand Assay* 25 2002; (25):104–10. Available from: URL: https://www.researchgate.net/profile/afroza-begum-4/post/how_to_prepare_tissue_for_merfish_imaging_on_confocal/attachment/61082f012897145fbd65e0d5/as%3a1052413221937152%401627926273075/download/jclinligassay2002.pdf.

51. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450(7173):1235–9.

52. Nel I, Jehn U, Gauler T, Hoffmann A-C. Individual profiling of circulating tumor cell composition in patients with non-small cell lung cancer receiving platinum based treatment. *Transl Lung Cancer Res* 2014; 3(2):100–6.

53. Coumans FAW, Ligthart ST, Uhr JW, Terstappen LWMM. Challenges in the enumeration and phenotyping of CTC. *Clin Cancer Res* 2012; 18(20):5711–8.

54. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, Rao C, McConnell J, Terstappen LW et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(8):4589–94.

55. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3):920–8.

56. Ensinger C, Kremser R, Prommegger R, Spizzo G, Schmid KW. EpCAM overexpression in thyroid carcinomas: a histopathological study of 121 cases. *J Immunother* 2006; 29(5):569–73.

57. Bono JS de, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19):6302–9.

58. Pinzani P, Scatena C, Salvianti F, Corsini E, Canu L, Poli G et al. Detection of circulating tumor cells in patients with adrenocortical carcinoma: a monocentric preliminary study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(9):3731–8.

59. Ehlers M, Allelein S, Haase M, Willenberg HS, Knoefel WT, Schott M. Circulating tumor cells in patients with neuroendocrine neoplasms. *Horm Metab Res* 2014; 46(10):744–5.

60. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(21):6403–9.

61. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(5):329–40.
62. Scher HI, Morris MJ, Basch E, Heller G. End points and outcomes in castration-resistant prostate cancer: from clinical trials to clinical practice. *J Clin Oncol* 2011; 29(27):3695–704.
63. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh R-F et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One* 2010; 5(9):e12517.
64. Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods* 2010; 50(4):289–97.
65. Laure Giraudet A, Al Ghulzan A, Aupérin A, Leboulleux S, Chehboun A, Troalen F et al. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *European Journal of Endocrinology* 2008; 158(2):239–46.
66. Spencer CA. Clinical review: Clinical utility of thyroglobulin antibody (TgAb) measurements for patients with differentiated thyroid cancers (DTC). *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(12):3615–27.
67. Alves TG, Kasamatsu TS, Yang JH, Meneghetti MCZ, Mendes A, Kunii IS et al. Macrocalcitonin Is a Novel Pitfall in the Routine of Serum Calcitonin Immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(2):653–8.
68. Xu JY, Handy B, Michaelis CL, Waguespack SG, Hu MI, Busaidy N et al. Detection and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Metastatic Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(11):4461–7.
69. Qiu Z-L, Wei W-J, Sun Z-K, Shen C-T, Song H-J, Zhang X-Y et al. Circulating Tumor Cells Correlate with Clinicopathological Features and Outcomes in Differentiated Thyroid Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2018; 48(2):718–30.
70. Schmidt M, Antke C, Mattes-György K, Hautzel H, Allelein S, Haase M et al. Radioiodine therapy reduces the frequency of circulating tumour cells in patients with differentiated thyroid cancer. *Clinical endocrinology* 2021; 94(6):1004–11.
71. Sriramareddy SN, Hamoir E, Chavez M, Louis R, Beckers A, Willems L. Tumor cells may circulate in medullary thyroid cancer patients independently of serum calcitonin. *Endocrine-Related Cancer* 2018; 25(12):L59-L63.
72. Sobin LH, editor. *TNM classification of malignant tumours*. 7. ed. Chichester: Wiley-Blackwell; 2010. (World Health Organization classification of tumours).

73. Ehlers M, Allelein S, Schwarz F, Hautzel H, Kuebart A, Schmidt M et al. Increased Numbers of Circulating Tumor Cells in Thyroid Cancer Patients. *Horm Metab Res* 2018; 50(8):602–8.
74. Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, Weiss RE, Degroot LJ, Simon CA et al. A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up. *Surgery* 2013; 154(6):1436–46; discussion 1446–7.
75. Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang X-F, Qian H-H et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(11):3783–93.
76. Wu CH, Lin SR, Hsieh JS, Chen FM, Lu CY, Yu FJ et al. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: evaluation of their prognostic significance. *Dis Markers* 2006; 22(3):103–9.
77. Jin L, Zhao W, Zhang J, Chen W, Xie T, Wang L et al. Evaluation of the diagnostic value of circulating tumor cells with CytoSorter® CTC capture system in patients with breast cancer. *Cancer Med* 2020; 9(5):1638–47.
78. Chen F, Wang S, Fang Y, Zheng L, Zhi X, Cheng B et al. Feasibility of a novel one-stop ISET device to capture CTCs and its clinical application. *Oncotarget* 2017; 8(2):3029–41.
79. KOLOSTOVA K, BROUL M, Schraml J, CEGAN M, MATKOWSKI R, FIUTOWSKI M et al. Circulating tumor cells in localized prostate cancer: isolation, cultivation in vitro and relationship to T-stage and Gleason score. *Anticancer Res* 2014; 34(7):3641–6.
80. Wang L, Zhou S, Zhang W, Wang J, Wang M, Hu X et al. Circulating tumor cells as an independent prognostic factor in advanced colorectal cancer: a retrospective study in 121 patients. *Int J Colorectal Dis* 2019; 34(4):589–97.
81. Zhang Y, Li J, Wang L, Meng P, Zhao J, Han P et al. Clinical significance of detecting circulating tumor cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma by EpCAM-independent enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization. *Mol Med Rep* 2019; 20(2):1551–60.
82. Yang Y, Li J, Jin L, Wang D, Zhang J, Wang J et al. Independent Correlation Between Ki67 Index and Circulating Tumor Cells in the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2017; 37(8):4693–700.
83. Yu X, Song X, Sun W, Zhao S, Zhao J, Wang Y-G. Independent Risk Factors Predicting Central Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Horm Metab Res* 2017; 49(3):201–7.

84. Baek S-K, Jung K-Y, Kang S-M, Kwon S-Y, Woo J-S, Cho S-H et al. Clinical risk factors associated with cervical lymph node recurrence in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2010; 20(2):147–52.
85. Guo K, Wang Z. Risk factors influencing the recurrence of papillary thyroid carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(9):5393–403.
86. Ito Y, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F et al. Risk factors for recurrence to the lymph node in papillary thyroid carcinoma patients without preoperatively detectable lateral node metastasis: validity of prophylactic modified radical neck dissection. *World J Surg* 2007; 31(11):2085–91.
87. Melo TG de, Zantut-Wittmann DE, Ficher E, Da Assumpção LVM. Factors related to mortality in patients with papillary and follicular thyroid cancer in long-term follow-up. *J Endocrinol Invest* 2014; 37(12):1195–200.
88. Zhang Y, Deng H, Chen G, Tang Z, Mao J, Mi Y et al. Clinicopathological and prognostic value of circulating tumor cells in esophageal carcinoma: a meta-analysis. *Annals of Palliative Medicine* 2020; 9(6):4271–82.
89. He HC-H, Kashat L, Kak I, Kunavisarut T, Gundelach R, Kim D et al. An Ep-ICD based index is a marker of aggressiveness and poor prognosis in thyroid carcinoma. *PLoS One* 2012; 7(9):e42893.
90. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1417–9.
91. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012; 12(1):178.
92. Okabe T, Togo S, Fujimoto Y, Watanabe J, Sumiyoshi I, Orimo A et al. Mesenchymal Characteristics and Predictive Biomarkers on Circulating Tumor Cells for Therapeutic Strategy. *Cancers (Basel)* 2020; 12(12):3588.
93. Schmid KW. Lymphknoten- und Organmetastasen des Schilddrüsenkarzinoms. Metastasen in der Schilddrüse. *Pathologe* 2015; 36 Suppl 2(2):171–5.
94. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American Journal of Medicine* 1994; 97(5):418–28.
95. Hay ID. Papillary thyroid carcinoma. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 1990; 19(3):545–76.

96. Tonozzi TR, Kammesheidt A, Braunstein GD. Liquid Biopsies in Endocrine Neoplasia—A Systematic Review. *US Endocrinology* 2019; 15(1):39.
97. Trzpis M, McLaughlin PMJ, Leij LMFH de, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *The American Journal of Pathology* 2007; 171(2):386–95.
98. Huang L, Yang Y, Yang F, Liu S, Zhu Z, Lei Z et al. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *Int J Mol Med* 2018 [cited 2021 Dec 30]; 42(4):1771–85.
99. Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 1987; 47(11):2883–91.
100. Balzar M, Winter MJ, Boer CJ de, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* 1999; 77(10):699–712.
101. Chen W, Li Y, Yuan D, Peng Y, Qin J. Practical value of identifying circulating tumor cells to evaluate esophageal squamous cell carcinoma staging and treatment efficacy. *Thorac Cancer* 2018; 9(8):956–66.
102. Han D, Chen K, Che J, Hang J, Li H. Detection of Epithelial-Mesenchymal Transition Status of Circulating Tumor Cells in Patients with Esophageal Squamous Carcinoma. *Bio-med Res Int* 2018; 2018:7610154.
103. Bai M, Zou B, Wang Z, Li P, Wang H, Ou Y et al. Comparison of two detection systems for circulating tumor cells among patients with renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol* 2018; 50(10):1801–9.
104. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4):265–73.
105. Li H, Song P, Zou B, Liu M, Cui K, Zhou P et al. Circulating Tumor Cell Analyses in Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(38):e1565.
106. Lei KF. A Review on Microdevices for Isolating Circulating Tumor Cells. *Micromachines (Basel)* 2020; 11(5).
107. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LWMM. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol* 2016; 10(3):395–407.
108. Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br J Cancer* 2011; 105(6):847–53.

109. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013; 339(6119):580–4.
110. Pachmann K. Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15):5657; author reply 5657-8.
111. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24):8152–62.
112. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11):834–46.
113. Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(30):12396–400.
114. Rajan N, Khanal T, Ringel MD. [Duplikat] Progression and dormancy in metastatic thyroid cancer: concepts and clinical implications. *Endocrine* 2020; 70(1):24–35.
115. Ringel MD. Metastatic dormancy and progression in thyroid cancer: targeting cells in the metastatic frontier. *Thyroid* 2011; 21(5):487–92.
116. Phay JE, Ringel MD. Metastatic mechanisms in follicular cell-derived thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2013; 20(6):R307-19.
117. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(7):1420–30.
118. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LWMM. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol* 2010; 2010:617421.
119. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Annals of Oncology* 2000; 11(7):785–92.
120. Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vendrell J-P, Maudelonde T et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012; 58(5):936–40.
121. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud J-M, Padovani B et al. "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2014; 9(10):e111597.
122. Camara O, Kavallaris A, Nöschel H, Rengsberger M, Jörke C, Pachmann K. Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells. *World J Surg Oncol* 2006; 4:67.

123. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118(8):2013–9.
124. Dianat-Moghadam H, Azizi M, Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Heidarifard M, Nouri M et al. The Role of Circulating Tumor Cells in the Metastatic Cascade: Biology, Technical Challenges, and Clinical Relevance. *Cancers (Basel)* 2020; 12(4).
125. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017 [cited 2022 Dec 14]; 14(9):531–48. Available from: URL: https://www.cancer-id.eu/fileadmin/websites/cancer-id/Publications/Siravegna_et_al_2017_review_liquid_biopsy_management_of_cancer.pdf.
126. Deutsch TM, Riethdorf S, Fremd C, Feisst M, Nees J, Fischer C et al. HER2-targeted therapy influences CTC status in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2020; 182(1):127–36. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7274999/>.
127. Franken A, Behrens B, Reinhardt F, Yang L, Rivandi M, Marass F et al. Multiparametric Circulating Tumor Cell Analysis to Select Targeted Therapies for Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)* 2021; 13(23).

Danksagung

An dieser Stelle geht mein großer Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. M. Schott, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt und mir die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht hat. Außerdem möchte ich mich für die Unterstützung und konstruktive Kritik im Rahmen der Erarbeitung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei meiner Co-Betreuerin Frau Dr. rer. nat. M. Ehlers für Ihre engmaschige Begleitung bedanken. Sie stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite, ohne Sie wäre die Arbeit nicht in diesem Maße gelungen.

Außerdem gilt mein Dank dem gesamten Team des Fachbereichs der speziellen Endokrinologie, hier im Besonderen zu nennen Frau Ursula Dötter und Frau Roswitha Charko für Ihren hervorragenden technischen Support, sowie den Mitarbeitern der Abteilung für Nuklearmedizin, insbesondere Herrn PD Dr. H. Hautzel und Frau Dr. Mattes-György. Diese Arbeit wäre ohne Ihre Hilfe und Bereitschaft nicht zu verwirklichen gewesen.

Ein ganz besonderer Dank gilt zudem Frau E. Bleck, die mir die Möglichkeit bot, in Ruhe und zu jederzeit am praktischen Teil der Dissertation zu arbeiten, was im Arbeitsalltag sonst schwierig zu meistern gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben, genauso wie allen Studienteilnehmern, ohne die diese wissenschaftliche Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in jeglichen Lebensabschnitten begleitet und stets bedingungslos unterstützt haben. Ein ganz besonderer Dank gilt zudem meinem Ehemann J. Manke ohne den diese Arbeit wahrscheinlich nicht existieren würde. Er hat mich stets motiviert, ge“*challenged*“ und gab mir den Freiraum zur Erstellung dieser Dissertation. Ich freue mich schon auf die weiteren Herausforderungen, die wir zusammen meistern werden. Zuletzt möchte ich noch meinem Sohn danken, der zwar nicht zur raschen Vollendung beitrug, aber ein guter Grund für diese war.