

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor Prof. Dr. med. C. Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Tumorbiologische Relevanz tumorassoziierter Granulozyten im kolorektalen Adenokarzinom

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Florian Vondung
aus Mannheim

Kiel 2019

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie
 2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Susanne Sebens, Institut für experimentelle Tumorforschung
- Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2019
Zum Druck genehmigt, Kiel den 22.07.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

*Die Suche nach Glück ist die Sehnsucht nach Frieden
Die Flucht vor der Angst in die Arme der Liebe
Und das Beste was dem Mensch zu hoffen bleibt
Ist die Abwesenheit von Leid*

(Die Fantastischen Vier)

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Adenokarzinom	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Ätiologie	1
1.1.3.1 Risikofaktoren	1
1.1.3.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.3.3 Genetische Prädisposition	2
1.1.3.3.1 Familiäre adenomatöse Polypose (FAP)	2
1.1.3.3.2 Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)	2
1.1.4 Pathogenese	3
1.1.4.1 Chromosomale Instabilität	4
1.1.4.2 Mikrosatelliteninstabilität	4
1.2 Pathologie	6
1.2.1 Makroskopie	6
1.2.2 Histologie	6
1.2.3 Lokalisation	6
1.2.4 Tumorausbreitung und Metastasierung	7
1.2.5 Stadieneinteilung	7
1.3 Klinik	9
1.3.1 Prävention	9
1.3.2 Screening	10
1.3.4 Diagnostik	10
1.3.5 Tumormarker	10
1.4 Therapie	11
1.4.1 Primäres	11
1.4.2 Lymphadenektomie	11
1.4.3 Adjuvante Therapie	12
1.4.4 Metastasen	12
1.4.5 Palliative Therapie	12
1.4.6 Rezidiv	12
1.5 Prognose	13

1.5.1 Klinisch-pathologische Prognosefaktoren	13
1.5.2 Molekularpathologische Prognosefaktoren	13
1.6 Nachsorge	14
1.7 Granulozyten	14
1.7.1 Neutrophile Granulozyten	14
1.7.2 Myeloperoxidase	15
1.8 Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TAN)	16
1.8.1 Rekrutierung von TAN	16
1.8.2 Phänotypisierung von TAN	17
1.8.2.1 Antitumoraler „N1-Phänotyp“	17
1.8.2.2 Protumoraler „N2-Phänotyp“	17
1.9 TAN im KRK	19
1.10 Fragestellung und Ziel	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Patientenkollektiv	21
2.1.1 Kollektiv der qualitativen Auswertung	21
2.1.2 Kollektiv der quantitativen Auswertung	22
2.2. Probenvorbereitung	23
2.3. Materialien und Geräte	24
2.3.1 Qualitative Auswertung	24
2.3.2 Quantitative Auswertung	25
2.4 Statistische Analyse	26
3. Ergebnisse	27
3.1 Studienkohorte	27
3.2 Qualitative Auswertung	30
3.2.1 Primärtumoren	30
3.2.2 Metastasen	32
3.2.2.1 Lymphknotenmetastasen	32
3.2.2.2 Lebermetastasen	35

3.2.3 Univariate Überlebensanalyse	38
3.2.4 Multivariate Überlebensanalyse	39
3.3 Quantitative Auswertung	39
3.3.1 Messwerte	39
3.3.2 Korrelation mit dem T-Stadium	40
3.3.3.1 Primärtumoren	42
3.3.3.2 Metastasen	43
3.3.4 Überlebensanalyse	47
4. Diskussion	48
4.1 Synopsis der qualitativen und quantitativen Auswertung	48
4.1.1 TAN reichern sich spezifisch in Kompartimenten eines KRK an	48
4.1.2 TAN-Dichte korreliert mit dem Tumorstadium	48
4.2 Tumorbiologische Funktion der TAN ist lokalisationsabhängig	49
4.2.1 Primärtumoren	49
4.2.2 Metastasen	50
4.2.2.1 Lymphknotenmetastasen	50
4.2.2.2 Lebermetastasen	51
4.3 TAN als prognostischer Parameter	51
4.4 Einschränkungen und Ausblick	52
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis	54
7. Danksagung	68
Anhang I - Ethikantrag	69

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
5-FU	5-Fluorouracil
A.	Arteria
BMI	Body-Mass-Index
Bzw.	Beziehungsweise
CA 19-9	Carbohydrat Antigen 19-9
ca.	circa
CCL3	C-C Chemokine Ligand 3
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEA	Carzinoembryonales Antigen
CT	Computertomografie
CXCL	C-X-C Chemokine Ligand
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
et al.	et aliae/et alii
e.V.	eingetragener Verein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FcR	<i>crystallizable fragment receptor</i>
FS	Folinsäure
FU	Fluoruracil
g	Gramm
GCSF	Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin und Eosin
HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
HOCl	Hypochlorige Säure

IFN	Interferon
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KRK	Kolorektales Adenokarzinom
LOH	<i>Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)</i>
M	Metastase
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloprotease
MMR	DNA-Mismatch-Reparatur-Gene
MPO	Myeloperoxidase
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	Hochgradige Mikrosatelliteninstabilität
MSI-L	Niedriggradige Mikrosatelliteninstabilität
N	Nodus lymphoideus, Lymphknoten
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAT	N-Acetyltransferase
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
ng	Nanogramm
O ₂	Sauerstoff
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PML	Polymorphkernige Leukozyten
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SFZ	Sehfeldzahl
T	Tumor
TAN	Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten
TAN-N1	Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten, antitumoraler „N1-Phänotyp“
TAN-N2	Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten, protumoraler „N2-Phänotyp“
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TK	Thymidinkinase
TMA	Tissue-Microarray
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	<i>Tissue polypeptide antigen</i>

TPS	<i>Tissue specific antigen</i>
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
UICC	Union internationale contre le cancer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Adenokarzinom

1.1.1 Definition

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist ein maligner epithelialer Tumor, der im Dickdarm entsteht. Mehr als 90% der KRK sind Adenokarzinome.

1.1.2 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von etwa 63.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland ist das KRK sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung. Die ca. 30.000 Todesfälle pro Jahr und eine Letalität von 50% machen das KRK zur zweithäufigsten krebsbedingten Todesursache in Deutschland, wenngleich die Sterberate im Vergleich zur steigenden Inzidenz seit Mitte der 70er Jahre stetig abnimmt. Besonders ab dem 50. Lebensjahr ist eine gesteigerte Erkrankungsrate zu beobachten (Winawer et al., 2003). Das allgemeine Lebenszeitrisko beträgt in Deutschland 6%. Geographisch betrachtet tritt das KRK besonders häufig in den westlichen Industriestaaten auf. Weltweit ist das KRK mit ca. 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr der vierthäufigste solide Tumor (Bertz et al., 2004).

1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie des KRK ist komplex (s.u.), da eine Kombination aus endogenen und exogenen Ursachen bzw. Risikofaktoren die Entwicklung eines KRK beeinflussen.

1.1.3.1 Risikofaktoren

Etwa 70 Prozent der KRK treten sporadisch auf. Die wichtigsten Risikofaktoren sind hohes Alter, das Vorliegen von Adenomen, der Lebensstil und die Ernährung. So erhöht der regelmäßige Verzehr von rotem Fleisch, ballaststoffarmer Nahrung (Norat et al., 2002) sowie eine hohe Gesamtkalorienaufnahme (Terry et al., 2001) die Wahrscheinlichkeit an einem KRK zu erkranken. Ein gesteigertes Risiko könnte auch durch einen erhöhten Fettanteil in der Nahrung bedingt sein. Allerdings kann hierbei der Einfluss von Kofaktoren nicht ausreichend separiert werden (Ghadirian; et al., 1997). Das Risiko steigern ebenso Alkohol- (Pedersen et al., 2003) und Nikotinabusus (Reid et al., 2003), Bewegungsarmut (Wei et al., 2004) und Übergewicht (Giovannucci et al., 2003).

1.1.3.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Insbesondere die Colitis ulcerosa, ist mit einem erhöhten Risiko, ein KRK zu entwickeln assoziiert (Ekblom et al., 1990b), während bei Morbus Crohn die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines KRK nicht signifikant gesteigert ist (Askling et al., 2001), was jedoch noch nicht einheitlich bestätigt wird (Ekblom et al., 1990a und Persson et al., 1994). Außerdem scheint eine Schistosoma mansoni-Infektion einen Einfluss auf die Entstehung eines KRK zu haben, während eine chronisch-rezidivierende Divertikulitis nicht als spezifischer Risikofaktor angesehen wird (Salim et al., 2010).

1.1.3.3 Genetische Prädisposition

Fünf Prozent der KRK treten familiär gehäuft oder sogar hereditär auf. Erstgradige Verwandte eines Patienten mit einem KRK haben ein erhöhtes Risiko ebenfalls ein Karzinom zu entwickeln (Winawer et al., 1996). Das relative Risiko ist umso größer, je jünger der Verwandte bei Diagnosestellung und je größer die Zahl der erkrankten Verwandten ist (Fuchs et al., 1994). Dies gilt in gleicher Weise für das Adenom (Almendingen et al., 2003). Zu den hereditären Darmkrebsformen gehören die autosomal dominant vererbte familiäre adenomatöse Polypose des Dickdarms (FAP) und das Lynch-Syndrom (hereditäres nicht-polypöses kolorektales Krebsyndrom; HNPCC) sowie andere, seltenere Darmkrebsformen.

1.1.3.3.1 Familiäre adenomatöse Polypose (FAP)

Der FAP, einem autosomal-dominant vererbten Prädispositionssyndrom, liegt eine Keimbahnmutation im APC-Gen zu Grunde. Sie macht etwa ein Prozent aller KRK aus und ist durch die Entwicklung von 100-1000 adenomatösen Polypen im gesamten Dickdarm, bereits in der zweiten und dritten Lebensdekade gekennzeichnet. Zudem wurden vermehrt extrakolische Adenome und Adenokarzinome, vor allem des Duodenums und des Magens sowie Hepatoblastome, Schilddrüsenkarzinome, Osteome und Hirntumoren beschrieben. Wenn keine entsprechende Vorsorge bzw. chirurgische Intervention durchgeführt wird, entsteht in nahezu allen Fällen bereits im vierten Lebensjahrzehnt ein KRK. In Familien mit bekannter FAP sind daher eine genetische Beratung, Prüfung eines Mutationsnachweises im APC-Gen und jährliche Gastro- und Koloskopien indiziert. Als chirurgische Therapieoption gilt die sphinktererhaltende totale Proktokolektomie mit ileoanaler Anastomose (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2017).

1.1.3.3.2 Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)

Das HNPCC, oder Lynch-Syndrom wird durch eine fehlende bzw. gestörte Expression von DNA-Reparatur-Genen (siehe 1.1.4.) verursacht und liegt etwa zwei bis fünf Prozent aller KRK zu Grunde (Salovaara et al., 2000). Sie ist das häufigste monogenetisch bedingte, autosomal-dominant vererbliche Kolonkarzinomsyndrom und ist gekennzeichnet durch das Auftreten von KRK und Endometriumkarzinomen vor dem 50. Lebensjahr. Seltener treten auch Adenokarzinome des oberen Gastrointestinaltraktes, des hepatobiliären Systems und des Urogenitalsystems auf. Als Ursache des HNPCC wurden Keimbahnmutationen in verschiedenen Genen der DNA-Mismatch-Reparaturproteine identifiziert. Infolge der defekten DNA-Reparatur lässt sich im Tumorgewebe eine genetische Instabilität (Mikrosatelliteninstabilität) nachweisen.

Zwei Präsentationsformen werden unterschieden:

- Lynch I (HNPCC I) zeigt eine Häufung der KRK innerhalb von Familien ohne Assoziation mit extrakolischen Tumoren.
- Lynch II (HNPCC II) ist durch eine familiäre Häufung von KRK mit anderen, extrakolischen Malignomen (Endometrium, Ovar, Mamma, Urothel, Pankreas, Haut, Larynx) gekennzeichnet.

Die Diagnose stützt sich auf die Familienanamnese. Hierbei müssen die im Folgenden tabellarisch dargestellten Amsterdam-Kriterien erfüllt sein (Schneider et al., 2012).

Amsterdam-Kriterien I
Mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem KRK, davon eines mit den beiden anderen erstgradig verwandt. Eine FAP muss ausgeschlossen sein.
Wenigstens zwei aufeinanderfolgende Generationen sind betroffen.
Bei mindestens einem Patienten Diagnosestellung vor dem 50. Lebensjahr.
Amsterdam-Kriterien II
Mindestens drei Familienangehörige mit HNPCC-assoziiertem Karzinom, davon eines mit den beiden anderen erstgradig verwandt. Eine FAP muss ausgeschlossen sein.
Übrige Unterpunkte wie oben genannt.

Tabelle 1.1 Amsterdam Kriterien

Besteht aufgrund der Stammbaumanalyse der Verdacht auf das Vorliegen eines HNPCC, kann mit molekulargenetischen Tests (s.u.) die Keimbahnmutation nachgewiesen werden.

Von den hereditären Formen des Kolonkarzinoms sind die familiären Häufungen von Darmkrebs zu unterscheiden, denen bislang keine definierte Keimbahnmutation zugeordnet werden konnte und die einen größeren Anteil einnehmen als die erblichen Formen. Man vermutet, dass den familiären Formen Genpolymorphismen und Lebensgewohnheiten zu Grunde liegen, die in einer Interaktion mit Umweltfaktoren zu einem erhöhten Krebsrisiko führen. Ein Beispiel ist die N-Acetyltransferase (NAT). Sie ist beteiligt am Metabolismus heterozyklischer aromatischer Amine und polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. Polymorphismen in den *NAT1*- und *NAT2*-Genen beeinflussen die Aktivität der N-Acetyltransferase und möglicherweise das Ausmaß der Risikoerhöhung bei einem regelmäßigen Verzehr roten Fleisches oder bei Nikotinabusus (Bell et al., 1995).

1.1.4 Pathogenese

Aufgrund der recht langen Lebensdauer der Dickdarmepithelien und der relativ langen Verweildauer von mutagenen Noxen im Kolon besteht im Vergleich zum Dünndarm eine größere Vulnerabilität. Bestimmte Mutationen verschaffen der Zelle und ihren Nachkommen einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellen und erlangen die Fähigkeit, sich auch unter wachstumslimitierenden Bedingungen zu vermehren. Dadurch kann sich ein bestimmter Zellklon vorrangig ausbreiten. Man nennt diesen Vorgang „Prinzip der klonalen Selektion“, was in der Regel für alle Krebsarten zutrifft (Nowell, 1976).

Die Mehrzahl der sporadischen und hereditären KRK entwickelt sich aus einer benignen Vorläuferläsion. Aus einem Mikroadenom (aberrante Kryptenfoci) entwickelt sich ein makroskopisch erkennbares Adenom, aus dem wiederum ein Karzinom entsteht. Hinweise auf eine Malignisierung geben die Größe des Adenoms und der histologische Typ. In der mikroskopischen Diagnostik werden drei

Arten von Adenomen unterschieden: Tubuläre Adenome (75%), tubulovillöse Adenome (15%) und villöse Adenome (10%). Weiterhin wird der Grad der Dysplasie in gering (low grade intraepitheliale Neoplasie, LGIN) und mittel- bis schwergradig (high grade intraepitheliale Neoplasie; HGIN) unterteilt. Die als Präkanzerose zu wertenden Adenome können mehrere Jahre gewachsen sein, bevor sie maligne entarten. Diese Adenom-Karzinom-Sequenz gilt als Exempel eines sequentiellen Karzinogenesemodells (Vogelstein et al., 1988) und ist charakterisiert durch eine schrittweise Akkumulation genetischer Alterationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen, die schließlich zu einer gestörten Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod führt. Dabei unterscheidet man zwei Grundmechanismen: Der „*gatekeeper pathway*“ entspricht einer Akkumulation von Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen. Der „*caretaker pathway*“ basiert auf einer Mutation der Mismatch-Reparatur-Gene (MMR), deren Aufgabe es ist, während der Replikation entstandene DNA-Fehler zu beheben.

1.1.4.1 Chromosomale Instabilität

Die chromosomale Instabilität wird in den meisten Fällen (ca. 85%) der sporadischen KRK gefunden. Es handelt sich hierbei um den Verlust oder Zugewinn ganzer chromosomaler Regionen. Es wird vermutet, dass Defekte in Genen mitotischer Checkpunkte (*MAD*, *BUB*) eine bedeutende Rolle in der Entstehung einer chromosomale Instabilität spielen (Cahill et al., 1998). Diese Veränderungen führen beispielsweise zu einem Verlust von Tumorsuppressor-Genen (*APC* und *DCC*), zu einer Aktivierung des *RAS-Onkogens* (Fearon et al., 1990) und einer *p53*-Mutation. Um ein Onkogen zu aktivieren, reicht bereits die Aktivierung eines Allels aus, wobei für die Alteration eines Tumorsuppressorgens beide Allele inaktiviert werden müssen (Knudson et al., 1976).

1.1.4.2 Mikrosatelliteninstabilität

Seltener (ca. 15%) liegt eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vor, die sich auf molekularer Ebene manifestiert (Grady et al., 2004). Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen, die sich aus Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenzen zusammensetzen und über das gesamte menschliche Genom verteilt sind. Durch Replikationsfehler kommt es zu Veränderungen in diesen sowohl inter- als auch intragenetisch lokalisierten DNA-Sequenzen, der sogenannten Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Liegen diese Fehler in der kodierenden Region eines Gens kann durch eine MSI ein Gen direkt inaktiviert bzw. Signalwege alteriert werden. Es konnte jedoch auch eine Überschneidung beider Formen beobachtet werden (Goel et al., 2003). Ein Beispiel ist die Alteration des *TGF- β -RII*-Gens (Markowitz et al., 1995 und Parsons et al., 1995). Das MMR-System besteht aus verschiedenen Proteinen, die für die Integrität der DNA verantwortlich sind, indem sie Basenfehlpaarungen erkennen und reparieren können. Zurzeit sind sieben Gene des MMR-Systems bekannt: *MLH1*, *MSH2*, *MLH3*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* und *PMS2* (Rüschoff et al., 1995). Ein Defekt im MMR-System geht entweder aus einer somatischen Mutation, einer Keimbahnmutation in einem MMR-Gen oder aus einer Hypermethylierung des *MLH1*-Promotors (Herman et al., 1998) hervor. Letzteres führt zu einem Expressionsverlust von *MLH1* und liegt in 70% der sporadischen KRK vor (Kane et al., 1997). Allerdings ist eine Reihe von Fällen bekannt, bei denen eine MSI vorliegt, aber kein MMR-Defekt nachgewiesen werden konnte

(Borresen et al., 1995). Dies kann dadurch erklärt werden, dass es weitere regulierende Komponenten des MMR-Systems gibt, die noch nicht entdeckt worden sind (Grandy et al., 2004). Eine MSI wird in niedriggradige (MSI-L) und hochgradige (MSI-H) Mikrosatelliteninstabilität unterteilt. Letztere zeigt eine Instabilität in zwei oder mehr Mikrosatelliten-Markern des Referenz-Panels, erstere nur in einem Marker (Boland et al., 1998). In einer Studie werden MSI-L-Tumoren mit schlechteren tumorspezifischen Überlebensraten in Verbindung gebracht (Wright et al., 2005). MSI-H-Tumoren besitzen im Unterschied zu den MSI-L- und MSS-Tumoren besondere Eigenschaften: Sie treten häufiger bei Frauen auf (Peltomaki, 2003), liegen bevorzugt im proximalen Kolon (Kim et al., 1994), zeigen häufig deutliche peri- und intratumorale Lymphozyteninfiltrate (Lynch et al., 1993), sind öfter muzinös (Bubb et al., 1996) und weisen einen diploiden DNA-Status auf (Thibodeau et al., 1993). Bei Verdacht auf eine hereditäre Form des KRK sollte bei Vorliegen einer MSI eine Keimbahnmutationssuche erfolgen. Mehr als 60% der hereditären KRK entstehen aufgrund von Keimbahnmutationen in den Genen *MLH1* (Hemminki et al., 1994) und *MSH2* (Bronner et al., 1994). Im Vergleich dazu ist das *MSH2*-Gen bei sporadischen KRK extrem selten betroffen. Die in Tabelle 1.2 dargestellten Kriterien bilden die Entscheidungsgrundlage zur Durchführung einer Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse am Tumorgewebe. Mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein (Schneider et al., 2012).

Revidierte Bethesda-Kriterien (2004)
KRK, diagnostiziert vor dem 50. Lebensjahr.
Synchrone oder metachrone, HNPCC-assoziierte Tumoren: Endometrium, Magen, Ovar, Pankreas, Ureter, Nierenbecken, Gallengänge, Gehirn (Glioblastome), Haut (Talgdrüsenadenome und Kera-toakanthome), Dünndarm.
KRK mit „MSI-H Histologie“: Vorliegen von tumorinfiltrierenden Lymphozyten, Crohn-ähnlicher lymphozytärer Reaktion, muzinöser/ siegelringzelliger Differenzierung oder medullärem Wachstumsmuster, diagnostiziert vor dem 60. Lebensjahr.
KRK (unabhängig vom Alter) und ein Verwandter ersten Grades mit HNPCC-assoziiertem Tumor, diagnostiziert vor dem 50. Lebensjahr.
KRK (unabhängig vom Alter) und mindestens zwei Verwandte ersten oder zweiten Grades, bei denen ein HNPCC-assoziiertes Tumor diagnostiziert wurde (unabhängig vom Alter).

Tabelle 1.2 Bethesda-Kriterien

1.2 Pathologie

1.2.1 Makroskopie

Das makroskopische Erscheinungsbild eines KRK ist vielgestaltig. Es werden folgende Formen unterschieden: exophytisch-polypöse (prädominant intraluminal und stenosierend wachsend), endophytische (prädominant intramural wachsend, sog. linitis plastica-Pattern), muzinös-zerfallende und diffus infiltrierende Karzinome. Die zumeist festen (siehe Abbildung 1.1), bei muzinösen Tumoren gelatinösen Schnittflächen zeigen eine recht homogene, grau-weiße bis gelbliche Farbe.



Abbildung 1.1 Makroskopischer Befund eines KRK mit Infiltration der Tunica muscularis propria (modifiziert nach Gross Pathology, The University of Chicago, 2018)

1.2.2 Histologie

90% aller KRK sind Adenokarzinome. Seltener kommen adenosquamöse, reine Plattenepithelkarzinome oder undifferenzierte Karzinome vor. Neuroendokrine Neoplasien, mesenchymale Tumoren und Lymphome sind Raritäten. Adenokarzinome werden gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation nach ihrer Histomorphologie und bei muzinösen Karzinom zusätzlich nach molekularpathologischen Eigenschaften (MSI-Status) in die zwei Dignitätsstufen low-grade (gut bis mäßiggradig differenziert) und high-grade (schlecht differenziert) unterteilt.

1.2.3 Lokalisation

Die einzelnen Abschnitte des Kolons sind nicht gleich häufig betroffen. 60% der Tumoren befinden sich im aboralen Anteil des Dickdarms, jenseits der Flexura coli sinistra und 25% im Caecum. Der Rest verteilt sich auf die übrigen Darmabschnitte. Der Anteil der Karzinome im Caecum und Colon

ascendens ist in den vergangenen Jahren gestiegen. Zurzeit ist nicht abschließend geklärt, ob diese Entwicklung Ausdruck einer echten Inzidenzzunahme, oder lediglich eine Verschiebung des Verhältnisses der distalen zu den proximalen Kolonkarzinomen ist. Gründe dafür könnten das Altern der Bevölkerung, Veränderungen des Lebensstils und die häufigere Durchführung einer Vorsorge-Koloskopie sein (Benedix et al., 2010).

1.2.4 Tumorausbreitung und Metastasierung

KRK können *per continuitatem* in das perikolische Fettgewebe einwachsen und je nach Lokalisation Nachbarstrukturen, wie Vagina, Uterus, Harnblase, Magen, Leber oder Milz infiltrieren. Bei Perforation in die freie Bauchhöhle können Tumorimplantate in anderen Organen des Bauchraums auftreten. Auch in einem frühen Tumorstadium ist eine Lymph- oder Hämangiosis carcinomatosa möglich, woraus eine systemische Erkrankung mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen resultieren kann.

1.2.5 Stadieneinteilung

Die Dokumentation der Tumorausdehnung erfolgt nach den Kriterien der TNM-Klassifikation (Wittekind et al., 2017). Hierzu werden die Infiltrationstiefe des Primärtumors, der Nodalstatus (nach Untersuchung von mindestens 12 Lymphknoten aus dem Operationspräparat) und der Metastasierungsstatus angegeben. Siehe hierzu Tabelle 1.3.

Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ, Infiltration der Lamina propria (ohne feststellbare Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa)
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
T4a	Tumor perforiert viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in einem bis drei regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in zwei bis drei regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in vier oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in vier bis sechs regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in sieben oder mehr regionären Lymphknoten
Fernmetastasen	
MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten) ohne Peritonealmetastasen
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

Tabelle 1.3 TNM-Klassifikation

Zusätzlich werden die (fakultativen) Deskriptoren Lymphgefäßinvasion, Veneninvasion und perineurale Invasion angegeben. Tabelle 1.4 zeigt die Systematik der Residualtumor-Klassifikation.

Residualtumor	
R0	Weder mikroskopisch noch makroskopisch erkennbarer Residualtumor
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
R2	Makroskopisch nachweisbarer Residualtumor (lokaler Tumorrest, bzw. belassene Lymph- oder Fernmetastasen)

Tabelle 1.4 Residualtumor-Klassifikation

Aus den oben beschriebenen TNM-Angaben erfolgt die Stadieneinteilung gemäß „Union internationale contre le cancer“ (UICC), deren Systematik in Tabelle 1.5 dargestellt wird.

Stadium	Primärtumor	Nodalstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-4	N1	M0
	T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2a	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
IVB	Jedes T	Jedes N	M1b
IVC	Jedes T	Jedes N	M1c

Tabelle 1.5 UICC-Klassifikation

1.3 Klinik

Die häufigsten Symptome eines KRK sind perianale Blutungen, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten und unspezifische Bauchschmerzen. Auch unspezifische Krankheitszeichen wie Gewichtsverlust oder Symptome einer Anämie können auf ein KRK hinweisen. Da einige Patienten keine Symptome aufweisen, nehmen die Screening-Untersuchungen einen hohen Stellenwert ein.

1.3.1 Prävention

In der aktuellen S3-Leitlinie werden Empfehlungen für eine protektive Lebensführung ausgesprochen, die regelmäßige körperliche Aktivität, eine Gewichtsreduktion bei Übergewicht sowie eine Nikotinkarenz beinhalten. Wie die Leitlinienkonferenz feststellte, haben Personen mit einem höheren körperlichen Aktivitätsgrad weniger kolorektale Adenome und ein geringeres Karzinomrisiko. Dagegen sind ein hoher BMI und Nikotinabusus mit einem höheren Risiko für kolorektale Adenome und Karzinome assoziiert. Bezüglich der Ernährungsgewohnheiten werden eine Ballaststoffzufuhr von mindestens 30g pro Tag, nicht täglicher Verzehr von rotem bzw. verarbeitetem Fleisch und eine Limitierung des Alkoholkonsums empfohlen, da eine vermehrte Ballaststoffaufnahme und eine höhere Zufuhr von Obst und Gemüse mit einer geringeren Häufigkeit von kolorektalen Adenomen und Karzinomen assoziiert ist (Ghadirian et al., 1997). Bei täglichem Konsum von rotem bzw. verarbeitetem Fleisch und hohem Alkoholkonsum, insbesondere bei reduzierter Folsäurezufuhr konnte da-

gegen ein erhöhtes Karzinomrisiko festgestellt werden (Giovannucci et al., 2003).

1.3.2 Screening

Screeninguntersuchungen der asymptomatischen Bevölkerung kommen vor dem Hintergrund der Adenom-Karzinom-Sequenz eine enorme Bedeutung zur Senkung der Inzidenz und Mortalität des KRK zu. Da 95% der Erkrankungen nach dem 50. Lebensjahr gefunden werden, wird der Beginn von Vorsorgeuntersuchungen bei asymptomatischen Patienten ab diesem Zeitpunkt empfohlen. Studien zeigten, dass die jährliche Testung auf okkultes fäkales Blut in drei konsekutiven Stühlen zu einer Senkung der Mortalität des KRK um 16-23% führt (Towler et al., 1998 und Faivre et al., 2004). Grundlage für die Stuhltestung auf okkultes Blut ist die Tatsache, dass KRK häufiger bluten als die physiologische Schleimhaut. Beim Vorliegen eines positiven Hämoccult-Testes sollte eine Koloskopie oder Sigmoidoskopie erfolgen. Diese bieten den Vorteil, Adenome früh zu erkennen und vor einer möglichen Malignisierung zu entfernen. So kann die Inzidenz des KRK durch Polypektomie um 66-90% reduziert werden (Citarda et al., 2001). Die Koloskopie ist dabei mit der höchsten Sensitivität und Spezifität als Goldstandard anzusehen (Schmiegel et al., 2004).

1.3.4 Diagnostik

Durch einen Kolonkontrastmitteleinlauf wird der Dickdarm röntgenologisch untersucht. Hierdurch können vor allem stenosierende Prozesse (z.B. mechanischer Ileus) im Darm erkannt werden. Bei Verdacht auf eine Perforation ist ein Kolonkontrasteinlauf kontraindiziert. Eine etablierte Technik zum präoperativen Staging und zur OP-Vorbereitung ist die Computertomographie des Abdomens. In Studien betrug die Sensitivität für die Beurteilung der Tiefeninfiltration ca. 80%, für das Vorhandensein von Lymphknoten etwa 70% (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2017). Auch die virtuelle Koloskopie mittels Computertomografie (CT-Kolonografie) ist eine Alternative zur Endoskopie im Rahmen von Screening- bzw. Krebsvorsorgeuntersuchungen. Zwar ist die Sensitivität geringer (erkennbar sind polypöse Läsionen ab einer Größe von 6 mm), aber die Bereitschaft, sich dieser Untersuchung zu unterziehen, dürfte bei einigen Patienten aufgrund der geringeren Invasivität höher sein.

1.3.5 Tumormarker

Das karzinoembryonale Antigen (CEA) ist ein Oberflächen-Glykoprotein aus der Immunglobulin-superfamilie. CEA wird vor allem von malignen Zellen gebildet und teils in deren Zellmembran eingebaut, teils sezerniert. Es fungiert als interzelluläres Adhäsionsmolekül zur Aggregation von Kolonkarzinomzellen, kann aber auch bei gutartigen Erkrankungen und bei Rauchern erhöht sein. Daher ist es aufgrund der zu geringen Spezifität nicht als Screeningparameter geeignet (Pfannschmidt et al., 2003), wird aber als Tumormarker zur Verlaufsbeobachtung von Karzinomen verwendet, da die Höhe der Serumkonzentration mit dem Tumorstadium und dem Langzeitüberleben (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2017) korreliert.

Als ergänzender Tumormarker kann das Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA19-9) untersucht werden. In

einer Studie wurden die präoperativen Serumspiegel von CEA, CA19-9, Thymidinkinase (TK), Tissue polypeptide Antigen (TPA) und Tissue specific Antigen (TPS) gemessen, um die Signifikanz auf das krankheitsfreie Intervall sowie das Patientenüberleben zu analysieren. Dabei stellten sich TPA und TPS als verlässliche Prognosemarker heraus (Treska et al., 2009).

1.4 Therapie

Diagnostik, Prognose und therapeutische Maßnahmen unterscheiden sich je nach histologischem Typ zum Teil grundlegend. Die hier beschriebenen Therapiemöglichkeiten beziehen sich nur auf das Adenokarzinom des Kolons.

1.4.1 Primarius

Die kurative Operation besteht in der Resektion des tumortragenden Darmabschnittes mit dem regionalen Lymphabflussgebiet, gegebenenfalls unter Mitnahme adhärenter Organe. Da Kolonkarzinome vorwiegend zirkulär wachsen, empfiehlt das Leitlinienprogramm Onkologie eine minimale Resektionsgrenze von 2 cm. Je nach Lokalisation des Tumors werden folgende Standardoperationen durchgeführt: Bei Karzinomen des Caecum, der Appendix und des Colon ascendens wird eine Hemikolektomie rechts mit Ileo-Transversostomie durchgeführt. Bei Lokalisation im Colon transversum oder nahe einer der Flexuren erfolgt die erweiterte Hemikolektomie rechts bzw. links. Insbesondere bei Tumorlokalisierung im Bereich der Riolan-Anastomose ist eine subtotale Kolektomie mit Ileo-Sigmoideostomie in Erwägung zu ziehen, da hier eine lymphogene Metastasierung sowohl entlang der A. mesenterica superior als auch der A. mesenterica inferior erfolgen kann. Beim Karzinom des rektosigmoidalen Übergangs und beim Rektumkarzinom wird eine anteriore Rektumresektion unter Mitnahme der A. rectalis superior und A. rectalis media durchgeführt. Die Qualität des Operationspräparates wird durch den Pathologen dokumentiert (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2017).

1.4.2 Lymphadenektomie

Je nach Tumorlokalisierung kann der Lymphabfluss in eine oder in mehrere Richtungen erfolgen. Ein sicherer Ausschluss regionärer Lymphknotenmetastasen ist allein durch sorgfältige histopathologische Untersuchung möglich. Die Häufigkeit regionärer Lymphknotenmetastasen wird maßgeblich von Tumortyp, Differenzierungsgrad, Lymphgefäßinvasion und Invasionstiefe bzw. Tumorgöße bestimmt. Beim Kolonkarzinom erfolgt die Lymphadenektomie zum einen als diagnostische Maßnahme zur Bestimmung des UICC-Stadiums und somit zur Entscheidung über die Notwendigkeit einer adjuvanten Chemotherapie, zum anderen als therapeutische Maßnahme zur Vermeidung eines Lokalrezidivs. Weiterhin soll durch die Entfernung aller befallenen Lymphknoten eine eventuelle sekundäre Metastasierung aus nicht resezierten Metastasen vermieden werden. In einer systematischen Übersichtsarbeit zum Stellenwert der Lymphknotenpräparation beim Kolonkarzinom ergab sich, dass eine geringe Anzahl an entfernten und untersuchten Lymphknoten bei Patienten mit einem KRK der UICC-Stadien II und III mit einer schlechteren Prognose korreliert (Chang et al. 2007).

1.4.3 Adjuvante Therapie

Eine adjuvante Chemotherapie gemäß aktueller Studienlage wird je nach Tumortyp, Tumorgöße und Lokalisation ab UICC-Stadium II empfohlen und zielt darauf ab, klinisch nicht auffindbare Mikrometastasen zu vernichten und damit das Rezidivrisiko zu reduzieren (Graeven et al., 2000).

1.4.4 Metastasen

Bei 50% der Patienten mit einem KRK des UICC-Stadiums III treten im Verlauf Fernmetastasen auf (Grivicich et al., 2001). Die Überlebensraten sind in Tabelle 1.6 angegeben. Als Therapieoptionen bestehen, abhängig von Begleiterkrankungen, dem Allgemeinzustand und der Molekularbiologie des KRK eine vollständige Metastasenresektion oder eine lokale bzw. systemische Chemotherapie. Eine Strahlentherapie ist bei Knochen- oder Hirnmetastasen möglich (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2017).

1.4.5 Palliative Therapie

In einigen Fällen ist aufgrund einer ausgedehnten Metastasierung oder des schlechten Allgemeinzustandes der Patienten bzw. wegen lokaler Inoperabilität eine kurative Operation nicht möglich. Dennoch sollte die Darmpassage sichergestellt werden, um weiteren Komplikationen, wie Ileus, Blutung und Perforation vorzubeugen. Zudem besteht vor allem für ein KRK im UICC-Stadium IV die Option einer palliativen Chemotherapie gemäß der aktuellen Leitlinie, welche bei einigen Patienten eine Verbesserung des Allgemeinzustandes und der Lebensqualität bewirkt (Glimelius et al., 1994). Dabei reduziert sich die Ein-Jahres-Mortalitätsrate um bis zu 31% (Jonker et al., 2000). Die Anwendung von monoklonalen Antikörpern in Kombination mit fluoropyrimidinhaltigen Therapeutika (Schmiegel et al., 2004) oder der Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren stellen eine weitere Option dar.

1.4.6 Rezidiv

Ein Karzinomrezidiv liegt vor, wenn beim Primäreingriff eine Resektion in sano (R0-Status) erreicht wurde. Andernfalls (R1 bzw. R2-Status) handelt es sich um einen Progress des Residualtumors. Ein Rezidiv kann als lokoregionäres Rezidiv intraluminal und extraluminal auftreten oder sich als systemisches Rezidiv durch Fernmetastasen (Leber, Lunge, Knochen etc.) manifestieren. Lokoregionäre Rezidive treten in ca. vier Prozent nach Resektion eines KRK, vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien, bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen und inadäquater chirurgischer Technik bei Resektion des Primärkarzinoms auf. Rezidive können unter kurativer Intention erneut reseziert werden. Alternativ ist eine Chemo- oder Strahlentherapie zu diskutieren.

Die Diagnose erfolgt zumeist im Rahmen der Nachsorgeuntersuchung, häufig durch einen Anstieg des CEA-Wertes (Eckardt et al., 1997).

1.5 Prognose

1.5.1 Klinisch-pathologische Prognosefaktoren

In besonderem Maße wird die Prognose des KRK vom Ausbreitungsstadium, dem Nodalstatus und dem Grading beeinflusst (Graeven et al., 2000). Auch die Qualität und die Art des gewählten Therapieverfahrens beeinflussen das rezidivfreie Überleben. Nach R0-Resektion überleben mehr als 70% aller Patienten fünf oder mehr Jahre, nach R1- bzw. R2-Resektionen weniger als 10% (Benedix et al., 2010).

UICC-Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
Stadium I	81-100%
Stadium II	74-91%
Stadium III	49-76%
Stadium IV	6-16%

Tabelle 1.6 Stadienabhängige 5-Jahres-Überlebensraten nach kurativer Resektion eines KRK

1.5.2 Molekularpathologische Prognosefaktoren

Als möglicher prognostischer Marker wurde der Verlust der Heterozygotie (LOH) auf dem Chromosom 18q beschrieben. Drei potentielle Tumorsuppressorgene sind hierbei identifiziert worden (*DCC*, *Smad4*, *Smad2*). Ein LOH von 18q scheint für das Stadium II des KRK mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein (Carethers et al., 1998). So ähnelt deren klinischer Verlauf dem eines KRK im Stadium III, wohingegen sich Tumoren ohne 18q-LOH wie Tumoren des Stadium I verhalten.

Das *KRAS*-Gen ist als weiterer Marker für die Prognose des KRK von Bedeutung. *KRAS*-Mutationen treten in etwa 50% aller KRK auf (Bos et al., 1998). Sie korrelieren mit einer schlechten Prognose, der Invasionstiefe und dem Tumorstadium (Cerottini et al., 1998). Im Stadium II macht sich der Unterschied hinsichtlich der Prognose am deutlichsten bemerkbar (Ahnen et al., 1998). Aber auch für das Stadium III zeigen einige Studien eine schlechte Prognose im Zusammenhang mit einer *KRAS*-Mutation (Pricolo et al., 1996). Von Bedeutung für eine Prädiktion des Remissionsverhaltens sind die Ergebnisse einiger Studien, nach denen eine adjuvante Chemotherapie für Patienten mit *KRAS*-positiven Tumoren im Stadium II oder III keinen Überlebensvorteil zu bringen scheint (Ahnen et al., 1998). Bezüglich der palliativen Therapie nach erfolgloser 5-FU-haltiger Chemotherapie wiesen Patienten mit *KRAS*-positiven Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose auf (Nemunaitis et al., 1997).

Auch das *p53*-Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 17p scheint Einfluss auf die Prognose des KRK zu nehmen. Ein LOH dieses Chromosoms wird in ca. 75% aller KRK gefunden, eine somatische Mutation in ca. 40-60% (Forslund et al., 2001). Einige Studien verbinden ein LOH von *p53* und eine *p53*-Mutation mit einer schlechten Prognose von KRK der Stadien II und III (Bouzourene et al., 2000). Ebenso wird der *p53*-Autoantikörper, der im Serum von bis zu 25% aller KRK-Patienten nachweisbar ist, mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Soussi et al., 2000).

Der Mutation des *BRAF*-Gens, die in 5-15% der KRK nachweisbar ist, kommt eine besondere Bedeutung zu. *BRAF*-Mutationen treten im proximalen Kolon häufiger auf als in den anderen Kolonabschnitten (Naguib et al. 2010). Etwa 90% aller *BRAF*-Mutationen bestehen in einer Thymidin-zu-Adenin-Transversion auf dem Nukleotid 1799, im Codon 600 des Exon 15 im *BRAF*-Gen (Wang et al. 2003). Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch (p.V600E) im aktiven Zentrum des Proteins und damit zu einer erhöhten Aktivität der Kinase im Vergleich zum Wildtyp (Davies et al. 2002 und Wan et al. 2004). *BRAF*-Mutationen besitzen eine starke prognostische Relevanz und gehen mit einer schlechten Prognose einher (Roth et al., 2010). Seit einigen Jahren werden in der Therapie des KRK Antikörper eingesetzt, die gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gerichtet sind (z.B. Cetuximab oder Panitumumab). Auf diese Therapieoption hat der Nachweis einer *BRAF*-Mutation Einfluss. So wurde gezeigt, dass eine anti-EGFR gerichtete Therapie des metastasierten KRK nur beim Vorliegen eines *KRAS*- und *BRAF*-Wildtyps wirksam ist (Di Nicolantonio et al., 2008).

1.6 Nachsorge

Die Nachsorgeuntersuchungen nach einer kurativen Operation zielen im Wesentlichen auf eine Früherkennung von Tumorrezidiven, Zweittumoren und Metastasen, die Kontrolle und Behandlung der direkten Operationsfolgen, die psychosoziale Betreuung der Patienten und die Beurteilung der Therapiequalität ab. Stadienabhängige, leitliniengerechte Tumornachsorgeprogramme sollen den Nutzen einer kurativen Primärtherapie sichern. Aufwand und Effektivität dieser Nachsorge werden kontrovers diskutiert, u.a. weil eine hohe Compliance von wesentlicher Bedeutung ist (Scholmerich et al., 1996). Zum Nachweis eines Tumorrezidivs tragen die postoperative Anamnese, die klinische Untersuchung und die Parameter des Routinelabors wenig bei. Die Bestimmung der Tumormarker CEA und CA 19-9, eine Abdomensonographie, eine Röntgenaufnahme des Thorax und die endoskopischen Untersuchungen zeigten dagegen eine recht hohe diagnostische Relevanz (Secco et al., 2002).

1.7 Granulozyten

Granulozyten werden im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Diese differenzieren weiter in myeloide Stammzellen, aus denen die Granulozyten hervorgehen. Charakteristisch für die Granulozyten sind die intrazytoplasmatischen Sekretvakuolen, die verschiedene Enzyme (z.B. Myeloperoxidase) speichern.

1.7.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten (siehe Abbildung 1.2) sind hochspezialisierte, sich nicht weiter teilende Zellen mit einer kurzen Lebensspanne von drei bis zehn Tagen, gehören zur Gruppe der polymorphkernigen Leukozyten (PML) und machen 50 bis 70% der Leukozyten aus. Im Knochenmark durch-

laufen sie verschiedene Stadien der Reifung (Bainton et al., 1971). Daraufhin werden sie in den Blutstrom abgegeben, in dem sie kurze Zeit zirkulieren, bevor sie aktiv ins Gewebe auswandern (Harris et al., 2000). Extraluminal können sie sich zu einer Noxe hin bewegen und „neutrophil extracellular traps“ (NET) bilden. Durch diesen Mechanismus können auch extrazelluläre Pathogene bekämpft werden, indem die neutrophilen Granulozyten eine netzartige Struktur bilden (Brinkmann et al., 2007). So spielen sie als zentraler Effektor der angeborenen Immunantwort während akuter Entzündungsreaktionen eine Schlüsselrolle beim Schutz gegen mikrobielle Infektionen. Sie führen die unspezifische Elimination von Erregern, Fremdpartikeln oder Gewebetrümmern durch und sind die ersten Immunzellen, die im weitesten Sinne verletztes oder infiziertes Gewebe infiltrieren (Smith et al., 1994). Nach Opsonierung eines Fremdorganismus wird dieser in eine phagozytäre Vakuole aufgenommen und meist umgehend vernichtet (Segal et al., 1981). Dies geschieht durch das Verschmelzen von Lysosomen mit der phagozytären Vakuole. Hierbei bedient sich die Zelle zweier mikrobizider Strategien: einer oxidativen und einer nicht-oxidativen (Ganz et al., 1999).

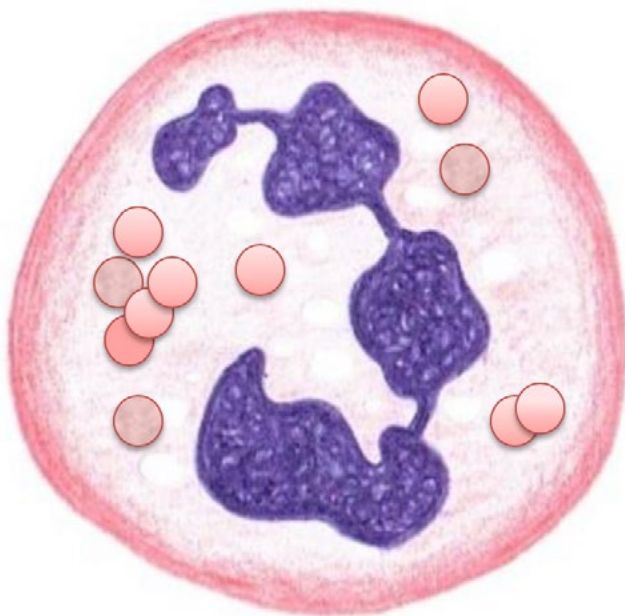


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung eines neutrophilen Granulozyten mit segmentiertem Zellkern und intrazytoplasmatischen Granula

1.7.2 Myeloperoxidase

Das Enzym Myeloperoxidase (MPO) wird von einem einzelnen Gen kodiert, welches 11 Introns und 12 Exons enthält (Yamada et al., 1987). Die MPO-Synthese findet während der Granulozytenreifung im Knochenmark statt und ist vollendet, bevor die Zellen die periphere Blutbahn erreichen (Eiserich et al., 2002). Nach der Synthese eines initial 80 kD großen Transkriptionsproduktes wird diese Frühform über mehrere enzymatische Schritte in das aktive Protein umgewandelt (Pinnix et al., 1994) und in Granula gespeichert. Sie ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen zellulären Immunabwehr (Arnhold et al. 2010), stellt mit einem Anteil von etwa fünf Prozent des Proteingehaltes von PML eines der am häufigsten vorkommenden Proteine dieser Zellen dar und ist eines der am stärksten

von aktivierten PML sezernierten Enzyme (Winterbourn et al., 2000). MPO wird in die extrazelluläre Matrix sezerniert, während inflammatorischer Prozesse aber auch im Serum nachgewiesen (Klebanoff, 1999). Sie trägt zur oxidativen Abwehr von Mikroorganismen bei, indem sie hochreaktive, antimikrobiell wirksame Sauerstoffradikale produziert (Hampton et al., 1998). Hauptsächlich katalysiert MPO die Umwandlung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu hypochlorischer Säure (HOCl-) (Pattison et al., 2012). In geringerem Maß wird MPO auch von aktivierten Monozyten und gewebsständigen Makrophagen sezerniert (Pattison et al., 2012).

1.8 Tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TAN)

Solide Tumoren bestehen aus Tumor- und Stromazellen. Das Tumorstroma enthält Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäße und in vielen Fällen Immunzellen. Diese tumorinfiltrierenden Immunzellen erzeugen ein dauerhaft entzündliches Milieu, das mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht wird (Hanahan et al., 2011). Aufgrund dieser Tumor-Begleitreaktion können Karzinome auch als nicht heilende Wunde bezeichnet werden (Dvorak et al., 1986). Neben Lymphozyten und Makrophagen finden sich auch neutrophile Granulozyten in einer Vielzahl von Tumoren (Jensen et al., 2009, Trellakis et al., 2011, Reid et al., 2011 und Halazun et al., 2009). Diese werden als tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TAN) bezeichnet.

1.8.1 Rekrutierung von TAN

Die Migration neutrophiler Granulozyten aus dem Blut in den Tumor erfolgt, wie bei Wundreaktionen unter dem Einfluss spezifischer Chemokine (z.B. CCL3 und CXCL6), Zytokine (z. B. TNF- α und IFN- γ) und Zelladhäsionsmoleküle (Jablonska et al., 2010). Diese chemotaktischen Signale werden sowohl von Tumorzellen als auch vom Tumorstroma produziert (Kruger et al., 2015). Interleukin 8 (IL-8) ist einer der am besten untersuchten Neutrophilen-Lockstoffe und wird in verschiedenen Karzinomen und Tumorzelllinien (Mamma-, Kolon-, Cervix-, Bronchial-, Prostata-, Ovar- und Nierenzellkarzinom) verstärkt produziert (Xie, 2001). Weiterhin können bioaktive Lipide wie Sphingosin-1-Phosphat (S1P) die Chemotaxis und intratumorale Aktivierung von TAN fördern (Arnold et al., 2004, Florey et al., 2009). In ähnlicher Weise sind der Hypoxie-induzierte Faktor 1- α und seine nachgeschalteten Produkte wie CXCL12, VEGF oder MMP9 an der Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt (Jablonska et al., 2010, Wenger et al., 2002). VEGF ist zusätzlich zu seiner proangiogenen Funktion während des Tumorwachstums in der Lage, die Adhäsion von Neutrophilen an postkapillare Venolen zu induzieren (Christoffersson et al., 2012, Grunewald et al., 2006). Diese und weitere Signale stimulieren TAN, Faktoren freizusetzen, die die extrazelluläre Matrix der Tumormikroumgebung umgestalten oder direkt auf Tumorzellen selbst einwirken (Nauseef et al., 2014). Speziell im KRK ist die Bedeutung des inflammatorischen Tumorbegleitinfiltrates Gegenstand aktueller Studien mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der prognostischen Relevanz von TAN (Anitei et al., 2014, Drosier et al., 2013, Rao et al., 2012 und Roncucci et al., 2008).

1.8.2 Phänotypisierung von TAN

1.8.2.1 Antitumoraler „N1-Phänotyp“

TAN-N1 begrenzen das Tumorwachstum und die Metastasierung. Dies wird über verschiedene Mechanismen erreicht, einschließlich direkter und antikörperabhängiger Zytotoxizität sowie durch die Aktivierung von T-Zellen und dendritischen Zellen. Die direkte Zytotoxizität von Neutrophilen wurde erstmals in den 1970er Jahren beobachtet (Bubenik et al., 1970). Die meisten antimikrobiellen Moleküle von TAN sind für eukaryotische Zellen unschädlich. Durch den NADPH-Oxidase-Komplex erzeugte Superoxide, H₂O₂ und HOCl sind aber direkt an der gegen die Tumorzellen wirkenden Zytotoxizität beteiligt (Dissemond et al., 2003, Zivkovic et al., 2005).

Tumorspezifische Antikörper können erfolgreich als antitumorale Therapie verwendet werden, da Immunzellen über Fc-Rezeptoren (FcR) antikörpermarkierte Tumorzellen erkennen und zerstören können. Neutrophile Granulozyten exprimieren mehrere FcR, beispielsweise FcγRI (CD64), FcγRIIIa (CD32), FcγRIIIa (CD16a) und FcγRIIIb (CD16b) und können so über eine antikörperabhängige Zytotoxizität Tumorzellen vernichten (Kushner et al., 1992, Valerius et al., 1993). TAN können über die Rekrutierung von anderen Immunzellen und ihre Fähigkeit Antigene zu präsentieren, auch eine adaptive, antitumorale wirksame Immunantwort stimulieren. Dies wurde durch Experimente belegt, die zeigten, dass TAN über INF-β mit CD8-positiven T-Zellen interagieren und so eine antitumorale Immunantwort initiieren (Fridlender et al., 2009).

1.8.2.2 Protumoraler „N2-Phänotyp“

In Umgebung von Tumoren kann die protektive Funktion von TAN modifiziert werden, um über eine Vielzahl von Mechanismen, wie Anpassung der extrazellulären Matrix, Unterstützung von Tumorzellinvasion, Angiogenese, Lymphangiogenese und Immunsuppression das Tumorwachstum und die Metastasierung zu fördern (Jablonska et al., 2010, Andzinski et al., 2015). Ein Grund dafür sind vom Tumor sezernierte Faktoren, die eine Wundreparatur-Reaktion der TAN induzieren, die wiederum sekundär die Tumorprogression unterstützt (Whalen et al., 1990). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TAN Prostaglandin E₂-vermittelt eine erhöhte Proliferation präneoplastischer Zellen bewirken (Antonio et al., 2015). Einer der protumoralen Mechanismen von TAN wird über die Sekretion von Zytokinen vermittelt (Tecchio et al., 2013). In Abhängigkeit vom Tumormilieu sezernieren TAN Wachstumsfaktoren wie EGF, TGFβ, PDGF, HGF, VEGF und Onkostatin M (Jablonska et al., 2010, McCourt et al., 2001, Queen et al., 2005).

EGF ist an der Progression verschiedener Karzinomtypen beteiligt (Normanno et al., 2006) und induziert die Neoangiogenese, eine erhöhte Zellproliferation, eine verminderte Apoptose und erhöht die Tumorzellmotilität (Arteaga, 2002), indem sein Rezeptor (EGFR) verstärkt von Tumorzellen exprimiert wird (Normanno et al., 2006; Salomon et al., 1995).

Auch TGFβ, ein potenter Lockstoff für Neutrophile, wird in Tumorzellen hochreguliert (Wojtowicz-Praga et al., 2003) und spielt eine wichtige Rolle für die Tumorprogression und Metastasierung (Bierie

et al., 2010). Tumorsezerniertes TGF β wird als inaktiver Komplex an die extrazelluläre Matrix gebunden und durch granulozytäre Enzyme wie Elastase und MMP9 (Bierie et al., 2010) oder durch reaktive Sauerstoffradikale aktiviert (Barcellos-Hoff et al., 1996). Somit können TAN zur Tumorprogression beitragen (Sionov et al., 2015).

Ein anderer, für Monozyten und Neutrophile chemotaktisch wirksamer Wachstumsfaktor ist der „*platelet derived growth factor*“ (PDGF; Deuel et al., 1982). PDGF unterstützt in Zusammenspiel mit genetischen Veränderungen die Tumorentstehung und spielt eine Rolle beim Tumorwachstum und der Metastasierung (Uhrbom et al., 1998).

Der „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) ist ein potentes proangiogenes Signalmolekül, dient aber auch als Chemokin für Neutrophile. Er spielt eine Schlüsselrolle in der Initiation einer pathologischen Neoangiogenese und erhöht die vaskuläre Permeabilität. Dies wurde unter anderem dadurch gezeigt, dass die Hemmung der VEGF-Signalgebung die Angiogenese in Tumoren blockiert, was zu einer Regression des Tumorwachstums führt (McMahon et al., 2000, Senger et al., 2010).

Onkostatin M ist ein weiteres Zytokin, das von Neutrophilen sezerniert wird (Grenier et al., 1999). Sein proinflammatorischer Effekt entsteht durch Induktion der Adhäsion von Granulozyten und verstärkter Chemokinproduktion von Endothelzellen (Kerfoot et al., 2001).

Zusätzlich können Neutrophile Zytokine sezernieren, die die Tumorentwicklung und -ausbreitung beeinflussen: TNF α , IL-6 und IL-17 fördern das Tumorwachstum durch Modifikation von intra- und peritumoralen Stromazellen (Moore et al., 1999, Gu et al., 2011). Von TAN produzierter TNF α kann das Überleben von Tumorzellen durch die Induktion von NF κ B-abhängigen antiapoptotischen Molekülen fördern (Luo et al., 2004), direkt die Angiogenese verstärken (Sainson et al., 2008) und die Expression von VEGF in Tumorzellen induzieren (Jing et al., 2011). IL-6 verstärkt ebenfalls die Angiogenese und die Expression von VEGF (Tzeng et al., 2013).

Eine vereinfachte, schematische Darstellung der bidirektionalen TAN-Differenzierung unter dem Einfluss von T-Lymphozyten bzw. dem Tumorgewebe ist der Abbildung 1.3 zu entnehmen.

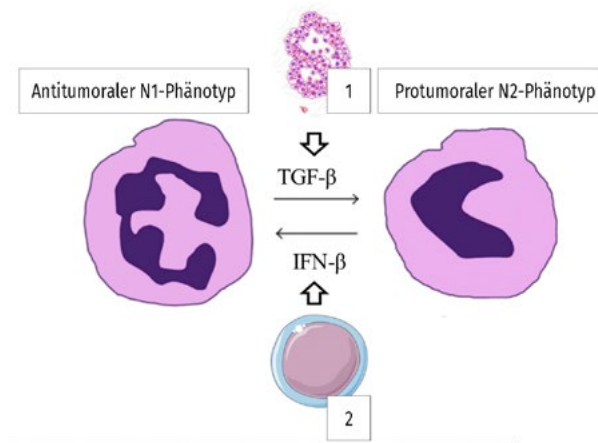


Abbildung 1.3 TAN-Phänotypen (modifiziert nach Granot et al., 2015).

1 Epithel- und Stromazellen eines KRK | 2 CD8-positiver T-Lymphozyt

1.9 TAN im KRK

Wie in anderen soliden Tumoren werden auch im KRK Infiltrate verschiedener Immunzellen gefunden: Zellen des angeborenen Immunsystems, wie neutrophile Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Makrophagen (Atreya et al., 2008) und Zellen des adaptiven Immunsystems. Diese kommen in verschiedenen Kompartimenten (Tumoroberfläche, Tumorzentrum, Invasionsfront und peritumoral) des KRK vor. Die folgende Abbildung 1.4 zeigt ein KRK mit entzündlichen Infiltraten im Stroma des Tumorzentrums und im Bereich der Invasionsfront in unterschiedlicher Dichte.

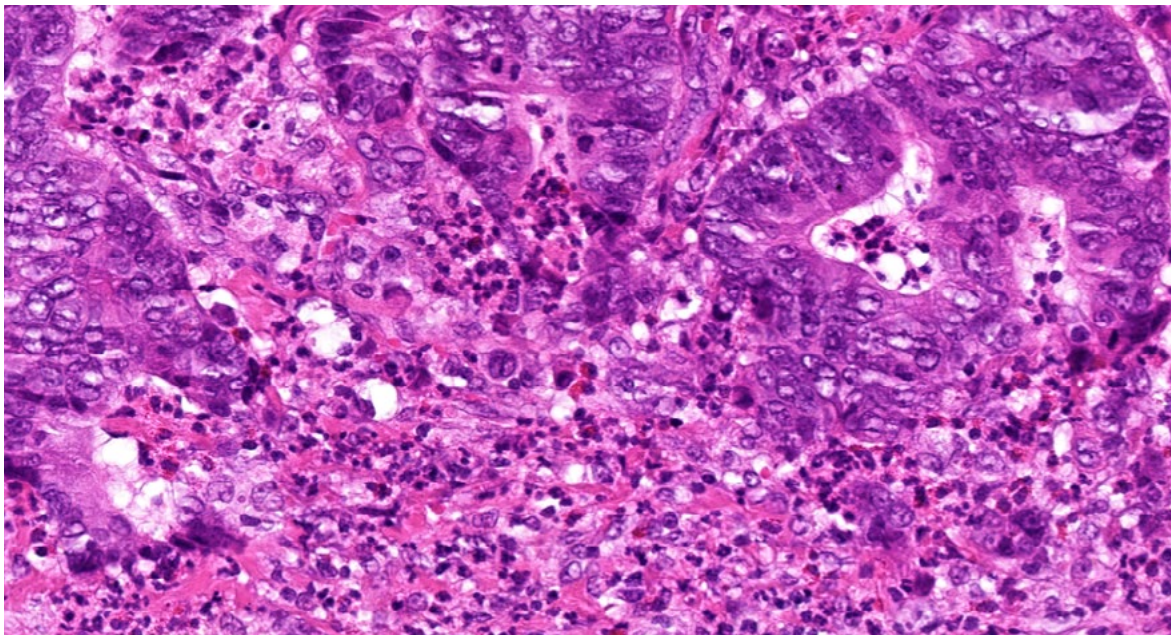


Abbildung 1.4 Übersicht eines KRK mit TAN (Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Originalvergrößerung 200-fach)

Bislang ist ungeklärt, ob das Verteilungsmuster der TAN Ausdruck einer unspezifischen Entzündung z.B. auf luminale Erreger ist, oder tatsächlich ein tumorspezifisches Phänomen darstellt, dem auch eine tumorbiologische Bedeutung zukommt, indem die tumorbegleitende Entzündung über eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Mediatoren die Tumorentwicklung verstärkt (Terzic et al., 2010). Diese Tumor-Mikroumgebung ist ein komplexes System, das eine entscheidende Rolle in der Tumorinitiation bis hin zur Metastasierung spielt. Neutrophile Granulozyten wurden lange als terminal differenzierte Effektorzellen angesehen, die während der akuten Phase einer Entzündungsreaktion und Abwehr von Pathogenen eine Rolle spielen. Jüngere Untersuchungen relativieren diese eingeschränkte Sichtweise und zeigen, dass neutrophile Granulozyten mit verschiedenen Zellpopulationen interagieren und eine große Anzahl von Zytokinen und Effektormolekülen produzieren, die in die Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort eingreifen (Galdiero et al., 2013). Einige Studien legen nahe, dass der Nachweis von zahlreichen TAN mit einem schnelleren Tumorstadium und daher einer schlechten Prognose assoziiert ist (Jensen et al., 2009). Da TAN abhängig vom Tumormilieu eine protumorale oder auch antitumorale Funktion einnehmen, gibt es allerdings bezüglich ihrer prognostischen Bedeutung widersprüchliche Daten (Roncucci et al., 2008), möglicherweise auch weil die Immunreaktion stadienabhängig eine räumliche und zeitliche Heterogenität aufweist und eine relevante Bedeutung für die Prognose haben kann (Mlecnik et al., 2011).

1.10 Fragestellung und Ziel

In dieser Dissertation wurde die Hypothese geprüft, dass die Häufigkeit und das räumliche Verteilungsmuster von Tumor-assoziierten neutrophilen Granulozyten (TAN) in verschiedenen Tumorkompartimenten des KRK (Tumoroberfläche, Tumorzentrum, Invasionsfront und peritumoral) mit klinisch-pathologischen Parametern korrelieren und Ausdruck einer tumorbiologischen Bedeutung der TAN beim KRK ist.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel wurden Paraffinblöcke mit Tumorgewebe von Patienten, bei denen zwischen 1997 und 2009 ein KRK diagnostiziert und reseziert wurde herausgesucht. Folgende Patientenmerkmale wurden erhoben: Art der Operation, Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Geschlecht, Anzahl der Primärtumoren (synchrones oder metachrones KRK), Tumorgöße, Tumorlokalisation, Tumortyp, Grading, Eindringtiefe, Residualtumorstatus, Anzahl der resezierten Lymphknoten, Anzahl der Lymphknoten mit Metastasen und Vorhandensein von Lebermetastasen. Diese Fälle wurden in drei Subgruppen eingeteilt:

- 1) Patienten mit KRK ohne Lymphknoten- oder Lebermetastasen
- 2) Patienten mit KRK und histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen, ohne Lebermetastasen
- 3) Patienten mit KRK und histologisch gesicherten Lymphknoten- und Lebermetastasen.

Ausschlusskriterien wurden wie folgt definiert:

- 1) Die Histologie identifizierte einen anderen Tumortyp als ein Adenokarzinom.
- 2) Die Patienten waren einer perioperativen Chemo- oder Strahlentherapie unterzogen worden.
- 3) Der Tumor befand sich in der Nähe einer zuvor erstellten Anastomose.
- 4) Das Tumorgewebe war nicht ausreichend repräsentativ.

Jedes der resezierten KRK wurde unter fachärztlicher Aufsicht zugeschnitten und von Fachärzten für Pathologie histologisch begutachtet. Die Sterbedaten der Patienten wurden beim epidemiologischen Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein bezogen. Follow-up-Daten der noch lebenden Patienten wurden aus Krankenakten und mit Hilfe der Hausärzte recherchiert. Alle Patientendaten wurden vor Aufnahme in die Studie pseudonymisiert. Die Studie ist von der örtlichen Ethikkommission (D 468/17) genehmigt worden.

2.1.1 Kollektiv der qualitativen Auswertung

Eingeschlossen wurden 189 Patienten. Der Altersmedian lag bei 71 Jahren. 107 (56,6%) KRK waren im aboralen Bereich (Rektum bis Sigma) und 80 (42,3%) im oralen Bereich lokalisiert. Bei zwei Patienten (1,1%) konnte keine Lokalisation angegeben werden. 123 KRK (69,1%) zeigten eine gute bzw. mäßige Differenzierung (low-grade), 55 KRK (29,1%) eine geringe Differenzierung (high-grade), bei 11 KRK (5,8%) war keine Graduierung dokumentiert. Bei 108 (57,1%) Patienten war keine (L0), bei 81 (42,9%)

eine Lymphangiosis (L1) und bei 159 (84,1%) Patienten keine (V0), bei 30 (15,9%) eine Hämangiosis carcinomatosa (V1) nachweisbar. Eine Perineuralscheideninfiltration (Pn1) fand sich in 15 (7,9%) und keine Perineuralscheideninfiltration (Pn0) in 118 (62,4%) Fällen, in 56 Fällen (29,6%) war dies nicht dokumentiert (PnX). 162 (85,7%) KRK waren in sano reseziert (pR0). In 12 (6,3%) Fällen waren mikroskopisch (pR1) oder makroskopisch (pR2) Tumorresiduen nachweisbar. In 15 (7,9%) Fällen wurde kein R-Status (pRX) dokumentiert. Die weiteren klinisch-pathologischen Parameter sind in Tabelle 2.1 angegeben.

Variable	Wert	Anzahl	Prozent
Alter	< 71	96	50,8
	≥ 71	93	49,2
Geschlecht	männlich	103	54,5
	weiblich	86	45,5
T-Stadium	T1	5	2,6
	T2	30	15,9
	T3	107	56,6
	T4a/b	47	24,9
N-Stadium	N0	61	32,3
	N1a/b/c	56	29,6
	N2a/b	72	38,1
M-Stadium	MX	91	48,1
	M1	98	51,9
UICC-Stadium	I	25	13,2
	IIa/b/c	34	18,0
	IIIa/b/c	32	16,9
	IVa/b/c	98	51,9

Tabelle 2.1 Übersicht des Kollektivs für die qualitative Auswertung

2.1.2 Kollektiv der quantitativen Auswertung

Eingeschlossen wurden 214 Patienten. Der Altersmedian lag bei 71 Jahren. 115 (54,5%) KRK waren im aboralen Bereich (Rektum bis Sigma) und 96 (45,5%) im oralen Bereich lokalisiert. Bei 3 (1,4%) Patienten konnte keine Lokalisation angegeben werden. 147 KRK (72,1%) zeigten eine gute oder mäßige Differenzierung (low-grade), 57 (26,6%) KRK eine geringe Differenzierung (high-grade). Bei 133 Patienten (62,1%) war keine (L0), bei 81 (37,9%) eine Lymphangiosis carcinomatosa (L1) und bei 182 (85,0%) keine (V0), bei 32 (15,0%) eine Hämangiosis carcinomatosa (V1) nachweisbar. Eine Perineuralscheideninfiltration (Pn1) fand sich in 14 (9,3%) und keine Perineuralscheideninfiltration (Pn0) in 137 (90,7%) Fällen. 184 KRK (93,9%) konnten in sano reseziert (pR0) werden. In 12 Fällen (5,6%) waren mikroskopisch (pR1) oder makroskopisch (pR2) Tumorresiduen nachweisbar. Die weiteren klinisch-pathologischen Parameter sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Variable	Wert	Anzahl	Prozent
Alter	< 71	108	51,2
	≥ 71	103	48,1
Geschlecht	männlich	113	52,8
	weiblich	101	47,2
T-Stadium	T1	6	2,8
	T2	35	16,4
	T3	121	56,5
	T4a/b	52	24,3
N-Stadium	N0	74	34,6
	N1a/b/c	62	29,0
	N2a/b	78	36,4
M-Stadium	MX	114	53,3
	M1	100	46,7
UICC-Stadium	I	30	14,0
	IIa/b/c	41	19,2
	IIIa/b/c	43	20,1
	IVa/b/c	100	46,7

Tabelle 2.2 Übersicht des Kollektivs der quantitativen Auswertung

2.2. Probenvorbereitung

Großflächenschnitte der KRK und ihrer korrespondierenden Lymphknoten- und Lebermetastasen wurden in neutral gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von jedem Paraffinblock wurden an einem Rotationsmikrotom zwei bis drei Mikrometer dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die mit Xylol entparaffinierten, in absteigender Alkoholreihe rehydrierten und mit destilliertem Wasser gespülten Gewebsschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und auf ihre histomorphologischen Merkmale hin untersucht. Zum MPO-Nachweis im Zytoplasma der TAN wurden weitere, zwei bis drei Mikrometer dicke Paraffinschnitte auf Superfrost Plus Objektträger (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) aufgezogen, über Nacht im Brutschrank (Modell B322, Bender & Hobein, München) bei 54°C getrocknet und anschließend automatisiert in einem Bond MAX-Färbeautomaten (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) nach Herstellerangaben gefärbt. Verwendet wurde ein gebrauchsfertiges Bond Polymer Refine Detection Kit (*Polyclonal Rabbit Anti-Human Myeloperoxidase, Unconjugated, Ig fraction*) der Firma DAKO (Santa Clara, USA) mit einer Primärantikörperverdünnung von 1:2000 in Antibody-Diluent. Die gefärbten Präparate wurden anschließend mit Hilfe des Eindeckgerätes Promounter RCM 2000 (MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) mit Deckgläsern (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) versehen.

2.3. Materialien und Geräte

2.3.1 Qualitative Auswertung

Alle Schnittpräparate wurden mit einem Mikroskop (Modell BX45, Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) zunächst bei 100-facher Vergrößerung begutachtet, um das Färbeergebnis zu überprüfen und passende Areale für die Auswertung zu wählen. Ausgesucht wurden Areale die einerseits ein ausreichend starkes Färbeergebnis zeigten, sodass auch Bereiche mit wenigen TAN sicher detektiert werden konnten und die andererseits eine gute Fixierung vorwiesen, sodass Zytomorphologie und Zellkerne der TAN sicher erkannt und Färbeartefakte ausgeschlossen werden konnten. Innerhalb eines Tumors wurden die folgenden Kompartimente getrennt bewertet: Tumoroberfläche, Tumorzentrum (unterteilt in die Kompartimente intraepithelial, Stroma und luminal), Invasionsfront und der Bereich Peritumoral (an die Invasionsfront angrenzendes tumorfreies Gewebe). In jedem dieser Bereiche wurde der Gehalt an TAN in einem zunächst explorativen Ansatz qualitativ bewertet. Der Nachweis von klar identifizierbaren, dicht liegenden TAN wurde hierbei als positiv gewertet. Wenn auch bei höherer Vergrößerung TAN nicht identifizierbar waren, galt dies als negativ. In gleicher Weise wurden TAN in Lymphknoten- und Lebermetastasen bewertet, hier jedoch ohne das Kompartiment Tumoroberfläche. Ein Beispiel für ein KRK mit einer hohen TAN-Dichte an der Tumoroberfläche und im Bereich der Invasionsfront und geringerer TAN-Dichte im Tumorzentrum zeigt die Abbildung 2.1.

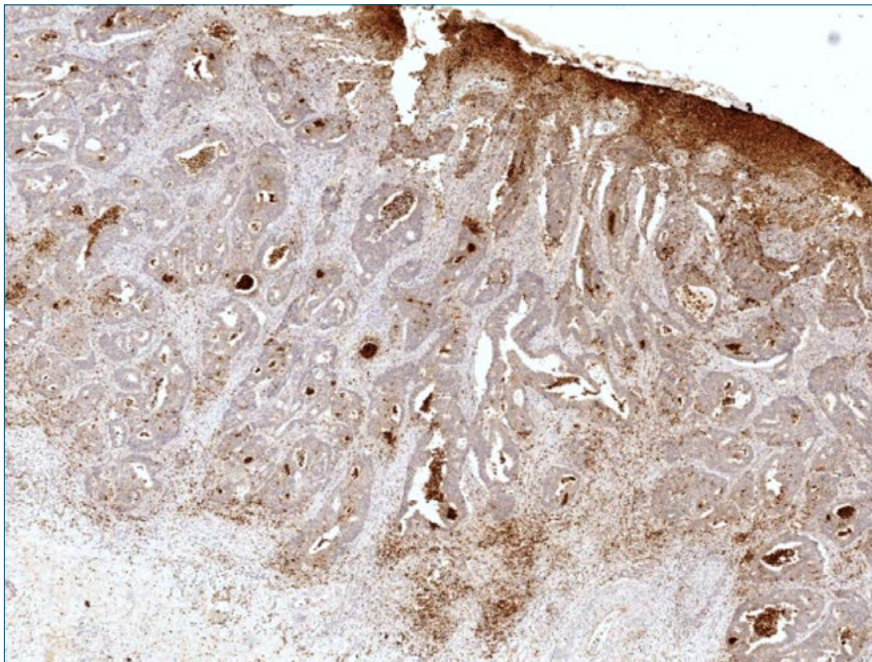


Abbildung 2.1 Übersicht eines KRK mit Anti-Myeloperoxidase-Immunfärbung (Originalvergrößerung 100-fach)

Die so ermittelten Werte wurden in eine SPSS-Datenbank als 0 (entsprechend kein Nachweis von TAN) bzw. 1 (Nachweis von TAN) und 999 („missing value“, nicht auswertbar) mit klinischen, histopathologischen und überlebensbezogenen Daten aller untersuchten Tumoren eingetragen. Gründe

für ein nicht auswertbares Kompartiment waren, dass der relevante Tumorbereich nicht auf dem Schnitt erfasst war sowie unterschiedliche Schnitt- oder Färbeartefakte.

2.3.2 Quantitative Auswertung

In einem zweiten Schritt wurde eine objektive, quantifizierende Analyse durchgeführt. Die anti-MPO-gefärbten Schnittpräparate wurden in einem Objektträger-Scanner (Modell SCN 400, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) hochauflösend digitalisiert. Die so erzeugten Scan-Dateien wurden mit dem Programm NetBeans Platform 8.1 (Oracle Corporation, Redwood City, USA) digital mikroskopiert. In jedem Tumor wurden dann vier Bereiche durch farbige unterschiedliche Polygone definiert: Je ein bis maximal vier türkisfarbene Polygone an der Tumoroberfläche, je ein bis maximal vier gelbe Polygone im Tumorzentrum (die Kompartimente intraepithelial, luminal und Stroma umfassend), je ein bis maximal vier orangefarbene Polygone im Bereich der Invasionsfront und je ein bis maximal vier blaue Polygone peritumoral. Diese Areale sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

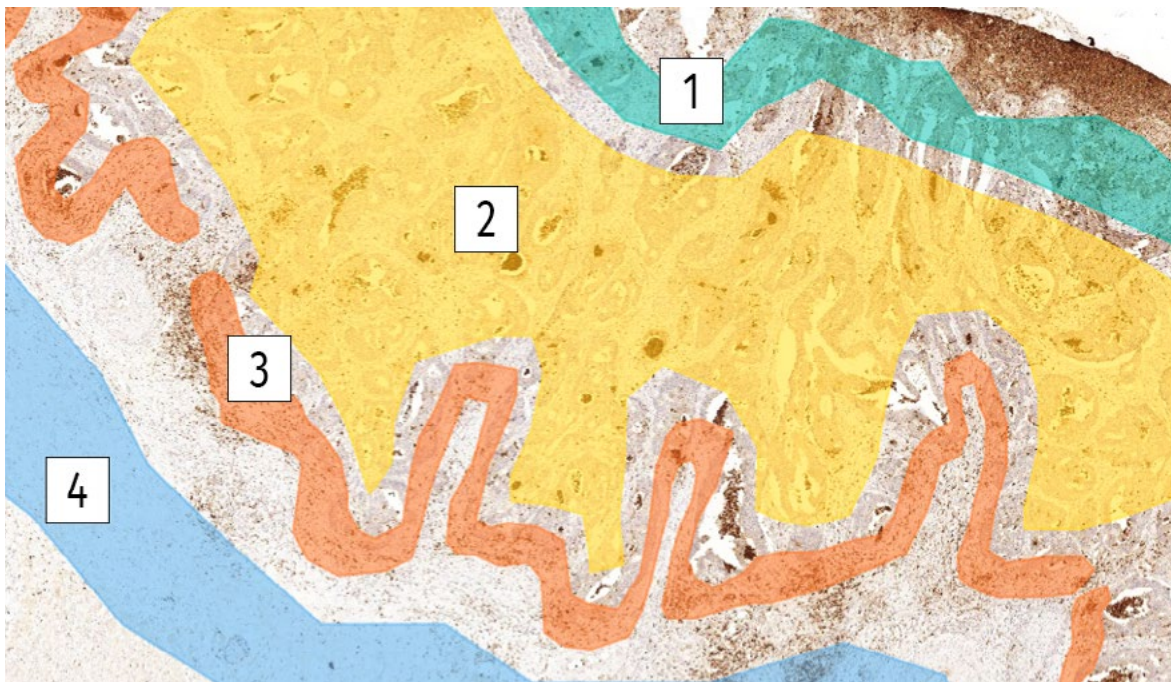


Abbildung 2.2: KKR mit durch farbige Polygone definierten Tumorkompartimenten (Anti-Myeloperoxidase -Immunfärbung; Originalvergrößerung 100-fach); 1 Tumoroberfläche (türkis) | 2 Tumorzentrum (gelb) | 3 Invasionsfront (orange) | 4 Peritumorales Gewebe (blau).

Diese definierten Tumorareale wurden daraufhin mittels des Bildanalyseprogramms Definiens® (Imprint Definiens AG, München, Deutschland) auf ihre TAN-Dichte untersucht, wobei die Zellerkennungsparameter des Auswerte-Algorithmus anhand der zytomorphologischen Parameter eines neutrophilen Granulozyten so kalibriert wurden, dass eine automatisierte Erkennung von TAN anhand der nukleären Färbung gewährleistet war. Als TAN erkannte Granulozyten wurden von Definiens® als gelbe Punkte (Abbildung 2.3) dargestellt.

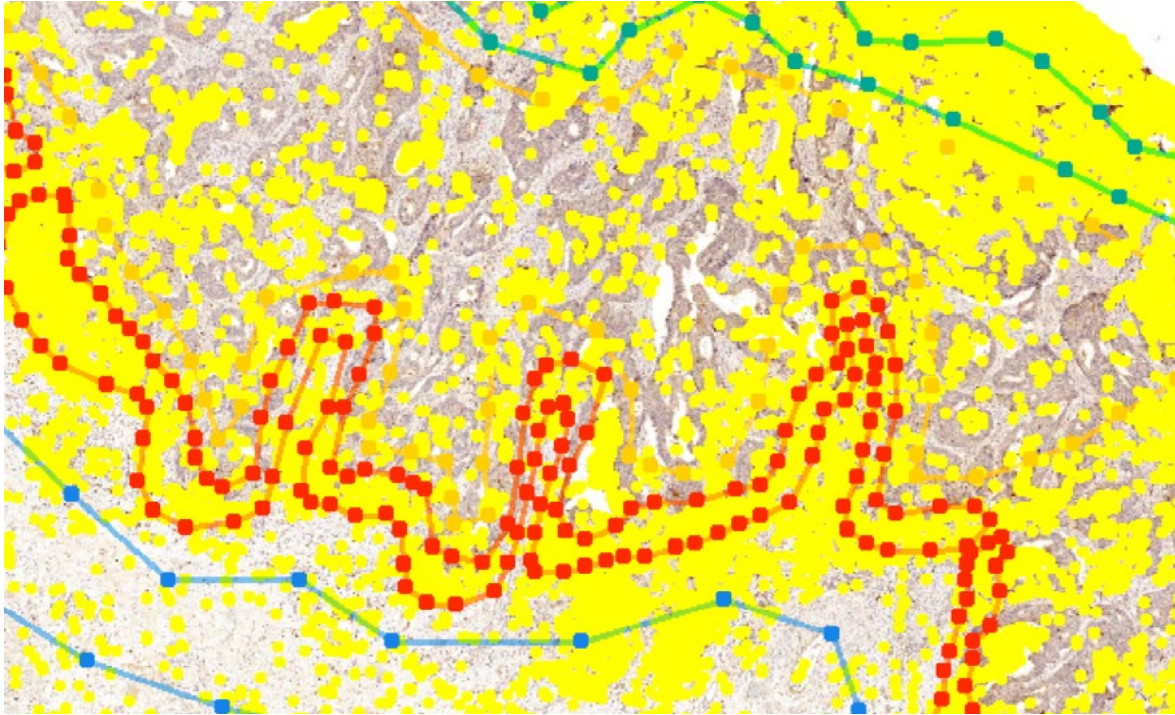


Abbildung 2.3: Großflächenschnitt eines KRK nach Durchführung der Definiens®-Bildanalyse (Anti-Myeloperoxidase-Immunfärbung; Originalvergrößerung 100-fach)

Daraufhin wurden die zuvor eingezeichneten Polygone hinsichtlich der Menge und der Dichte der anti-MPO-gefärbten TAN ausgezählt. Dabei wurden die X-Y-Koordinaten jedes erkannten TAN zur Lagebestimmung angegeben und konnten automatisiert dem jeweiligen Polygon und damit einem bestimmten Kompartiment innerhalb des Tumors bzw. innerhalb der Lymphknoten- oder Lebermetastase zugeordnet werden.

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS, Version 24 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Dimensionale Werte wurden als Mittel und mit Standardabweichung angegeben. Eine Evaluierung der Werte erfolgte durch einen χ^2 -Test oder einen zweiseitigen t-Test. p-Werte $< 0,05$ galten als signifikant und p-Werte $< 0,01$ als hochsignifikant. Zusammenhänge zwischen den Datensätzen wurden mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit dem exakten Test nach Fisher verifiziert. Die Abhängigkeit zwischen einem Parameter und dem Patientenüberleben wurde mit der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und mit dem Logrank-Test verglichen. Zur multivariaten Analyse der Überlebensdaten wurde eine Coxsche Regressionsanalyse durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Studienkohorte

Die klinisch-pathologischen Merkmale des Patientenkollektivs sind unter 2.1 (siehe oben) zusammengefasst. Maximal 214 Patienten erfüllten alle Studienkriterien. Die Fälle wurden in drei Gruppen unterteilt (siehe Abbildung 3.1), von denen die erste Gruppe (71 Fälle, entsprechend 33,2%) ein primäres, nicht metastasiertes KRK (UICC-Stadien I und IIa/b/c), die zweite Gruppe (43 Fälle, entsprechend 20,1%) ein KRK mit regionären Lymphknotenmetastasen (UICC-Stadien IIIa/b/c) und die dritte Gruppe (100 Fälle, entsprechend 46,7%) ein KRK mit Lymphknoten- und Lebermetastasen (UICC-Stadien IVa/b/c) aufwies. Diese Aufteilung ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

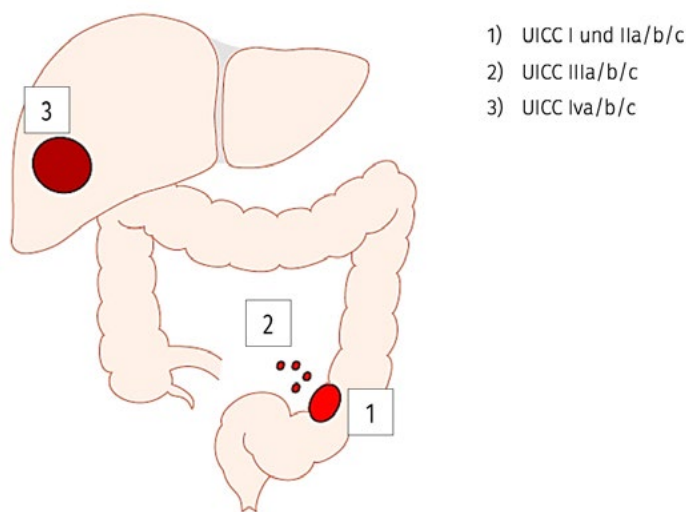


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der ausgewerteten Tumorkompartimente

In jedem KRK wurden zuvor definierte Tumor-Kompartimente hinsichtlich des TAN-Gehaltes zunächst in einer konventionellen, lichtmikroskopischen Analyse der HE-gefärbten Schnittpräparate untersucht. Granulozyten ließen sich an der Tumoroberfläche, im Tumorzentrum und im Bereich der Invasionsfront sowie im angrenzenden, tumorfreien Stroma (peritumoral) nachweisen. Zur genaueren Charakterisierung wurden zusätzlich im Tumorzentrum drei Subkompartimente getrennt bewertet (siehe Abbildung 3.2). Hier fanden sich TAN zwischen den Tumorzellen (intraepithelial), im Interstitium des Tumors (Stroma) und in den Lichtungen der Tumordrüsen (luminal) in unterschiedlichen Konzentrationen. Um ein möglichst genaues Bild über das Verteilungsmuster und Dichtegradienten zu erhalten und auch wenige, verteilt liegende TAN erfassen zu können, wurde eine anti-MPO-Immunfärbung durchgeführt, in der sich die TAN kräftig braun angefärbt darstellten. Die HE-morphologisch auffälligen inter- und intratumoralen Dichteunterschiede des tumorassoziierten Granulozyteninfiltrates konnten durch die anti-MPO-Färbung bestätigt und bekräftigt werden. Dichte granulozytäre Infiltrate im Bereich des Ulkusschorf an der Tumoroberfläche und sehr große,

weite Drüsenlumina mit abszedichten granulozytären Infiltraten im Tumorzentrum wurden nicht berücksichtigt, weil in der anti-MPO-Immunreaktion hier keine intakten Granulozyten abgegrenzt werden konnten und eine Untermischung mit Apoptosekörperchen der Tumorepithelien nicht auszuschließen war.

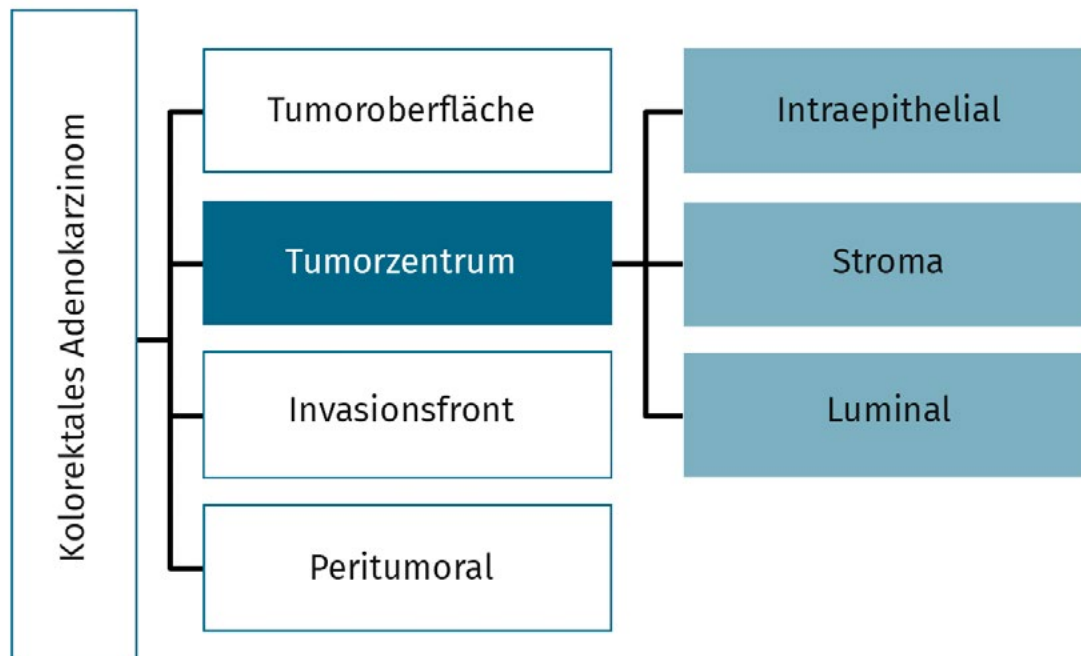


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der ausgewerteten Tumorkompartimente

Die oben genannten Tumorkompartimente wurden in einer dichotimierten Betrachtung (TAN fehlend vs. TAN vorhanden) bewertet.

Im Kompartiment Tumorzentrum korreliert der Nachweis intraepithelialer TAN signifikant mit verschiedenen Parametern des klinisch-pathologischen Tumorstadiums. Daraufhin wurden alle Fälle erneut mikroskopiert, die intraepithelialen Granulozyten ausgezählt und ein Toleranzwert von sieben TAN pro Gesichtsfeld (SFZ 20) festgelegt. Nur Fälle mit mehr als sieben intraepithelialen Granulozyten im Tumorzentrum pro Gesichtsfeld (siehe Abbildung 3.3) wurden für die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse als positiv gewertet.

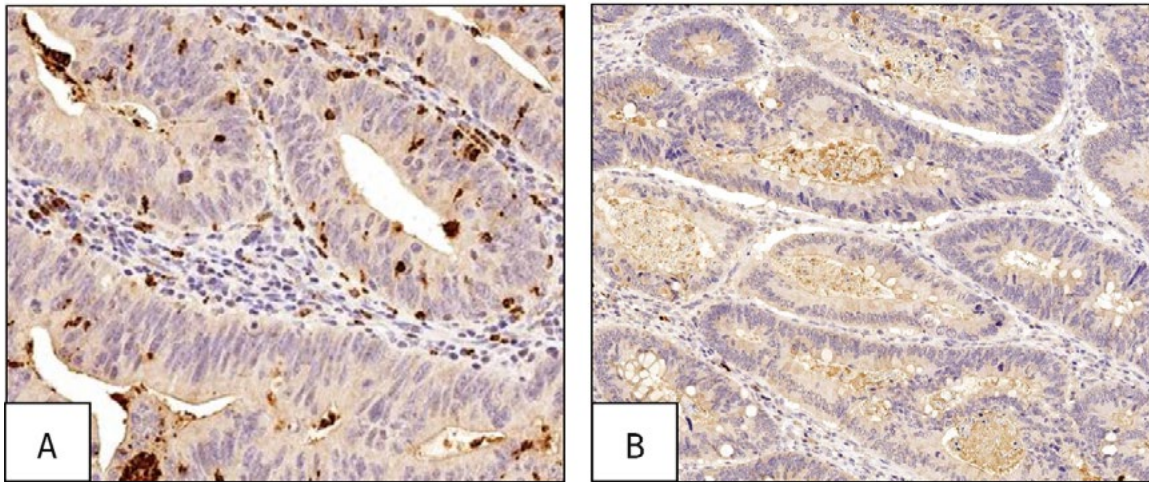


Abbildung 3.3: Tumorzentrum eines KRK (Anti-Myeloperoxidase-Immunfärbung; Originalvergrößerung 100-fach)

A Tumorzentrum eines KRK mit mehr als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld | B Tumorzentrum eines KRK mit weniger als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld

3.2 Qualitative Auswertung

3.2.1 Primärtumoren

Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Verteilungsmusters Myeloperoxidase-gefärbter Granulozyten im Primärtumor zusammen.

Klinische Parameter	Tumorzentrum											
	Intraepithelial				Stroma				Intraluminal			
	fehrend	vorhanden			fehrend	vorhanden			fehrend	vorhanden		
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
Gesamt	114	60,3	62	32,8	12	6,3	164	86,8	61	32,3	115	60,8
Geschlecht	n	(1)	0,342				0,389				0,634	
männlich	65	68,4	30	31,6	5	5,3	90	94,7	31	32,6	64	67,4
weiblich	49	60,5	32	39,5	7	8,6	74	91,4	30	37	51	63
Alter	n	(1)	0,272				0,564				0,429	
< 71 Jahre	54	60,7	35	39,3	5	5,6	84	94,4	28	31,5	61	68,5
>= 71 Jahre	60	69	27	31	7	8	80	92	33	37,9	54	62,1
Lokalisation	n	(1)	0,632				1				0,2	
Rektum - Sigma	65	66,3	33	33,7	7	7,1	91	92,9	38	38,8	60	61,2
C. desc. - Zökum	47	61,8	29	38,2	5	6,6	71	93,4	22	28,9	54	71,1
T	n	(1)/(2)	0,043 / 0,011				0,797 / 0,327				0,135 / 0,123	
T1	3	60	2	40	0	0	5	100	4	80	1	20
T2	23	79,3	6	20,7	1	3,4	28	96,6	12	41,4	17	58,6
T3	67	67,7	32	32,3	7	7,1	92	92,9	32	32,3	67	67,7
T4a/4b	21	48,8	22	51,2	4	9,3	39	90,7	13	30,2	30	69,8
N	n	(1)/(2)	0,002 / 0,001				0,252 / 0,100				0,865 / 0,606	
N0	47	77	14	23	2	3,3	59	96,7	22	36,1	39	63,9
N1a/1b/1c	37	71,2	15	28,8	3	5,8	49	94,2	19	36,5	33	63,5
N2a/2b	30	47,6	33	52,4	7	11,1	56	88,9	20	31,7	43	68,3
M	n	(1)	0,001				0,015				0,113	
M1	44	51,8	41	48,2	10	11,8	75	88,2	24	28,2	61	71,8
MX	70	76,9	21	23,1	2	2,2	89	97,8	37	40,7	54	59,3
Stadium	n	(1)/(2)	0,005 / < 0,001				0,095 / 0,035				0,016 / 0,078	
I	21	84	4	16	1	4	24	96	14	56	11	44
II a/b/c	25	73,5	9	26,5	1	2,9	33	97,1	8	23,5	26	76,5
III a/b/c	24	75	8	25	0	0	32	100	15	46,9	17	53,1
IV a/b/c	44	51,8	41	48,2	10	11,8	75	88,2	24	28,2	61	71,8
Grading	n	(1)/(2)	0,058 / 0,024				0,804 / 0,759				0,094 / 0,249	
G1	3	100	0	0	0	0	3	100	2	66,7	1	33,3
G2	77	67,5	37	32,5	8	7	106	93	30	26,3	84	73,7
G3	25	51	24	49	4	8,2	45	91,8	19	38,8	30	61,2
Lymphgefäßinvasion	n	(1)	0,039				0,128				0,752	
L0	72	71,3	29	28,7	4	4	97	96	34	33,7	67	66,3
L1	42	56	33	44	8	10,7	67	89,3	27	36	48	64
Blutgefäßinvasion	n	(1)	0,266				0,081				0,504	
V0	100	66,7	50	33,3	8	5,3	142	94,7	54	36	96	64
V1	14	53,8	12	46,2	4	15,4	22	84,6	7	26,9	19	73,1
Perineurale Invasion	n	(1)	0,03				1				0,545	
Pn0	78	70,3	33	29,7	8	7,2	103	92,8	34	30,6	77	69,4
Pn1	5	38,5	8	61,5	1	7,7	12	92,3	5	38,5	8	61,5
Residualtumor	n	(1)	1				0,515				162	
R0	101	66,4	51	33,6	10	6,6	142	93,4	53	34,9	99	65,1
R1/R2	7	70	3	30	1	10	9	90	4	40	6	60
Gesamtüberleben	n	(1)	0,004				0,294				172	
Gesamt / Ereignis / Zensiert	111 / 50 / 61		61 / 41 / 20		11 / 7 / 4		161 / 84 / 77		59 / 30 / 29		113 / 61 / 52	
Median [Monat]	73,7 ± 16,8		20,7 ± 3,4		20,7 ± 6,9		46,9 ± 15,4		73,7 ± 29,7		43,2 ± 14,1	
95% Konfidenzintervall	[40,8 - 106,6]		[14,1 - 27,4]		[7,2 - 34,1]		[16,7 - 77,0]		[15,4 - 131,9]		[15,5 - 71,0]	
5 Jahresüberlebensrate [%]	53,7 ± 5,7		32,8 ± 6,0		36,4 ± 14,5		47,1 ± 4,5		50,8 ± 6,5		44,3 ± 5,5	
Tumorspezifisches Überleben	n	(1)	0,001				0,401				166	
Gesamt / Ereignis / Zensiert	107 / 41 / 65		59 / 39 / 20		10 / 6 / 4		156 / 75 / 81		58 / 28 / 30		108 / 53 / 55	
Median [Monat]	nb		20,8 ± 2,4		20,7 ± 4,2		73,6		73,7 ± 30,9		nb	
95% Konfidenzintervall	nb		[16,1 - 25,4]		[12,4 - 29,0]		nb		[13,1 - 134,2]		nb	
5 Jahresüberlebensrate [%]	61,3 ± 4,8		33,9 ± 6,2		40,0 ± 15,5		52,2 ± 4,0		53,2 ± 6,6		50,6 ± 4,8	

(1) Fisher's exact test; (2) Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.1a Verteilungsmuster der TAN im Primärtumor

Klinische Parameter	Primärtumor													
	Tumoroberfläche				Invasionsfront				Peritumoral					
	fehlend n (%)		vorhanden n (%)		fehlend n (%)		vorhanden n (%)		fehlend n (%)		vorhanden n (%)			
Gesamt	37 19,6		137 72,5		64 33,9		110 58,2		132 69,8		42 22,2			
Geschlecht	n	(1)	174 0,459				174 1				174 0,213			
männlich	18	18,9	77	81,1	35	36,8	60	63,2	76	80	19	20		
weiblich	19	24,1	60	75,9	29	36,7	50	63,3	56	70,9	23	29,1		
Alter	n	(1)	174 0,46				174 0,274				174 0,378			
< 71 Jahre	21	23,9	67	76,1	36	40,9	52	59,1	64	72,7	24	27,3		
>= 71 Jahre	16	18,6	70	81,4	28	32,6	58	67,4	68	79,1	18	20,9		
Lokalisation	n	(1)	172 0,573				172 0,635				172 0,589			
Rektum - Sigma	18	18,8	78	81,3	34	35,4	62	64,6	75	78,1	21	21,9		
C. desc. Zökum	17	22,4	59	77,6	30	39,5	46	60,5	56	73,7	20	26,3		
T	n	(1)/(2)	174 0,591 / 0,649				174 0,323 / 0,193				174 0,082 / 0,296			
T1	2	40	3	60	2	40	3	60	2	40	3	60		
T2	7	24,1	22	75,9	10	34,5	19	65,5	25	86,2	4	13,8		
T3	19	19,2	80	80,8	32	32,3	67	67,7	77	77,8	22	22,2		
T4a/4b	9	22	32	78	20	48,8	21	51,2	28	68,3	13	31,7		
N	n	(1)/(2)	174 0,525 / 0,315				174 0,723 / 0,804				174 0,525 / 0,273			
N0	10	16,4	51	83,6	22	36,1	39	63,9	44	72,1	17	27,9		
N1a/1b/1c	12	23,5	39	76,5	21	41,2	30	58,8	38	74,5	13	25,5		
N2a/2b	15	24,2	47	75,8	21	33,9	41	66,1	50	80,6	12	19,4		
M	n	(1)	174 0,063				174 0,437				174 0,005			
M1	23	27,7	60	72,3	28	33,7	55	66,3	71	85,5	12	14,5		
MX	14	15,4	77	84,6	36	39,6	55	60,4	61	67	30	33		
Stadium	n	(1)/(2)	174 0,057 / 0,184				174 0,383 / 0,564				174 0,010 / 0,050			
I	7	28	18	72	11	44	14	56	19	76	6	24		
II a/b/c	3	8,8	31	91,2	10	29,4	24	70,6	24	70,6	10	29,4		
III a/b/c	4	12,5	28	87,5	15	46,9	17	53,1	18	56,3	14	43,8		
IV a/b/c	23	27,7	60	72,3	28	33,7	55	66,3	71	85,5	12	14,5		
Grading	n	(1)/(2)	164 0,346 / 0,375				164 0,074 / 0,032				164 0,041 / 0,012			
G1	1	33,3	2	66,7	1	33,3	2	66,7	3	100	0	0		
G2	22	19,5	91	80,5	31	27,4	82	72,6	91	80,5	22	19,5		
G3	13	27,1	35	72,9	22	45,8	26	54,2	30	62,5	18	37,5		
Lymphgefäßinvasion	n	(1)	174 1				174 1				174 0,858			
L0	22	21,8	79	78,2	37	37	63	63	75	75	25	25		
L1	15	20,5	58	79,5	27	36,5	47	63,5	57	77	17	23		
Blutgefäßinvasion	n	(1)	174 0,604				174 0,823				174 1			
V0	33	22,1	116	77,9	54	36,2	95	63,8	113	75,8	36	24,2		
V1	4	16	21	84	10	40	15	60	19	76	6	24		
Perineurale Invasion	n	(1)	122 1				122 0,746				122 0,726			
Pn0	25	22,7	85	77,3	41	36,9	70	63,1	81	73	30	27		
Pn1	3	25	9	75	5	45,5	6	54,5	9	81,8	2	18,2		
Residualtumor	n	(1)	160 0,433				160 1				160 0,69			
R0	34	22,5	117	77,5	53	35,3	97	64,7	117	78	33	22		
R1/R2	3	33,3	6	66,7	3	30	7	70	9	90	1	10		
Gesamtüberleben	n	(1)	170 0,182				170 0,668				170 0,975			
Gesamt / Ereignis / Zensiert	36 / 16 / 20		134 / 73 / 61		63 / 31 / 32		107 / 58 / 49		128 / 69 / 59		42 / 20 / 22			
Median [Monat]	73,7		37,2 ± 11,8		73,7 ± 40,4		37,2 ± 12,8		41,2 ± 14,5		nb			
95% Konfidenzintervall	nb		[14,1 - 60,3]		[0 - 152,8]		[12,1 - 62,4]		[12,8 - 69,6]		nb			
5 Jahresüberlebensrate [%]	58,3 ± 8,2		42,7 ± 5,7		54,0 ± 6,3		42,8 ± 5,8		45,7 ± 4,9		52,4 ± 7,7			
Tumorspezifisches Überleben	n	(1)	164 0,299				164 0,907				164 0,99			
Gesamt / Ereignis / Zensiert	36 / 15 / 21		128 / 64 / 64		62 / 29 / 33		102 / 50 / 52		124 / 61 / 63		40 / 18 / 22			
Median [Monat]	nb		46,9		73,7		nb		73,7		nb			
95% Konfidenzintervall	nb		nb		nb		nb		nb		nb			
5 Jahresüberlebensrate [%]	60,8 ± 8,2		49,7 ± 4,4		54,8 ± 6,3		50,5 ± 5,0		51,2 ± 4,5		55,0 ± 7,9			

(1) Fisher's exact test; (2) Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.1b Verteilungsmuster der TAN im Primärtumor

Es ergaben sich die folgenden signifikanten Zusammenhänge: Der Anteil der Fälle mit Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld bei 200facher Vergrößerung (SFZ 20) im Tumorzentrum steigt signifikant mit schlechterer Differenzierung des KRK, entsprechend einem höherem Grading ($p=0,024$), steigendem T-Stadium ($p=0,011$), dem Nachweis einer Perineuralscheideninfiltration ($p=0,03$), einer Lymphangiosis carcinomatosa ($p=0,039$), steigendem Nodalstadium ($p=0,001$), mit dem Nachweis von Lebermetastasen ($p=0,001$) und steigendem UICC-Stadium ($p<0,001$).

Der Anteil der Fälle mit Nachweis von TAN im Stroma des Tumorzentrums sinkt signifikant mit dem Nachweis von Lebermetastasen ($p=0,015$) und korreliert signifikant mit dem UICC-Stadium ($p=0,035$).

Der Anteil der Fälle mit Nachweis von TAN im Bereich der Invasionsfront korreliert signifikant mit dem Tumorgading ($p=0,032$). Der Anteil der Fälle mit Nachweis peritumorale TAN sinkt signifikant mit dem Nachweis von Lebermetastasen ($p=0,005$), einer schlechteren Differenzierung, entsprechend höherem Grading ($p=0,012$), korrelierend zu den Ergebnissen der intraepithelial nachgewiesenen TAN und korreliert signifikant mit dem UICC-Stadium ($p=0,05$).

3.2.2 Metastasen

3.2.2.1 Lymphknotenmetastasen

In 128 Fällen (67,7%) waren regionäre Lymphknotenmetastasen des KRK (Abbildung 3.4) nachweisbar. Auch hier wurden in unterschiedlichen Kompartimenten TAN nachgewiesen. Die zuvor definierten Tumorkompartimente wurden dem oben beschriebenen Vorgehen entsprechend individuell ausgewertet, wobei eine luminal gerichtete Tumoroberfläche bei einer Lymphknotenmetastase entfällt. Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Verteilungsmusters anti-MPO-gefärbter Granulozyten in den Lymphknotenmetastasen zusammen.

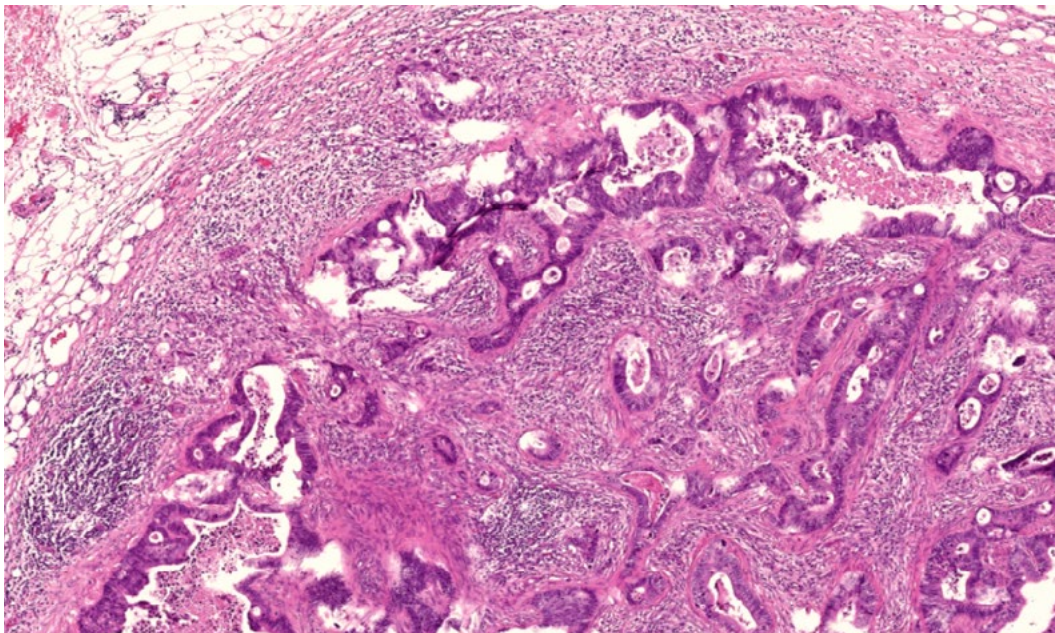


Abbildung 3.4 Lymphknotenmetastase eines KRK (Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Originalvergrößerung 100-fach)

Klinische Parameter	Lymphknotenmetastasen: Tumorzentrum													
	Intraepithelial				Stroma				Intraluminal					
	fehlend		vorhanden		TAN fehlend		TAN vorhanden		fehlend		vorhanden			
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
Gesamt	31	16,4	35	18,5	25	13,2	41	21,7	9	4,8	57	30,2		
Geschlecht	n	(1)	66		1		66		0,447		66		0,73	
männlich			16	47,1	18	52,9	11	32,4	23	67,6	4	11,8	30	88,2
weiblich			15	46,9	17	53,1	14	43,8	18	56,3	5	15,6	27	84,4
Alter	n	(1)	66		0,149		66		0,319		66		1	
< 71 Jahre			12	37,5	20	62,5	10	31,3	22	68,8	4	12,5	28	87,5
≥ 71 Jahre			19	55,9	15	44,1	15	44,1	19	55,9	5	14,7	29	85,3
Lokalisation	n	(1)	65		0,623		65		0,004		65		0,27	
Rektum - Sigma			15	50	15	50	17	56,7	13	43,3	2	6,7	28	93,3
C. desc. - Zökum			15	42,9	20	57,1	7	20	28	80	6	17,1	29	82,9
T	n	(1)/(2)	66		0,900 / 0,783		66		0,188 / 0,107		66		0,068 / 0,026	
T1			0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
T2			1	50	1	50	1	50	1	50	0	0	2	100
T3			18	48,6	19	51,4	17	45,9	20	54,1	2	5,4	35	94,6
T4a/4b			12	44,4	15	55,6	7	25,9	20	74,1	7	25,9	20	74,1
N	n	(1)/(2)	66		0,398 / 0,398		66		0,157 / 0,157		66		0,042 / 0,042	
N0			0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
N1a/1b/1c			6	35,3	11	64,7	9	52,9	8	47,1	5	29,4	12	70,6
N2a/2b			25	51	24	49	16	32,7	33	67,3	4	8,2	45	91,8
M	n	(1)	66		0,47		66		1		66		1	
M1			30	46,2	35	53,8	25	38,5	40	61,5	9	13,8	56	86,2
MX			1	100	0	0	0	0	1	100	0	0	1	100
Stadium	n	(1)/(2)	66		0,470 / 0,470		66		1 / 1		66		1 / 1	
I			0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
II a/b/c			0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
III a/b/c			1	100	0	0	0	0	1	100	0	0	1	100
IV a/b/c			30	46,2	35	53,8	25	38,5	40	61,5	9	13,8	56	86,2
Grading	n	(1)/(2)	66		0,535 / 0,398		66		0,875 / 0,801		66		1 / 1	
G1			1	100	0	0	0	0	1	100	0	0	1	100
G2			17	50	17	50	14	41,2	20	58,8	5	14,7	29	85,3
G3			13	41,9	18	58,1	11	35,5	20	64,5	4	12,9	27	87,1
Lymphgefäßinvasion	n	(1)	66		0,268		66		1		66		1	
L0			6	33,3	12	66,7	7	38,9	11	61,1	2	11,1	16	88,9
L1			25	52,1	23	47,9	18	37,5	30	62,5	7	14,6	41	85,4
Blutgefäßinvasion	n	(1)	66		0,431		66		0,096		66		0,437	
V0			20	43,5	26	56,5	14	30,4	32	69,6	5	10,9	41	89,1
V1			11	55	9	45	11	55	9	45	4	20	16	80
Perineurale Invasion	n	(1)	42		0,428		42		0,682		42		0,326	
Pn0			18	51,4	17	48,6	15	42,9	20	57,1	7	20	28	80
Pn1			5	71,4	2	28,6	4	57,1	3	42,9	0	0	7	100
Residualtumor	n	(1)	59		0,254		59		0,699		59		1	
R0			24	47,1	27	52,9	19	37,3	32	62,7	5	9,8	46	90,2
R1/R2			6	75	2	25	4	50	4	50	1	12,5	7	87,5
Gesamtüberleben	n	(1)	65		0,576		65		0,217		65		0,331	
Gesamt / Ereignis / Zensiert			31 / 28 / 3		34 / 26 / 8		25 / 18 / 7		40 / 36 / 4		9 / 9 / 0		56 / 45 / 11	
Median [Monat]			12,5 ± 4,5		11,6 ± 2,1		16,0 ± 8,9		11,0 ± 2,0		7,4 ± 7,3		12,3 ± 2,3	
95% Konfidenzintervall			[3,6 - 21,3]		[7,5 - 15,6]		[0 - 33,4]		[6,8 - 14,4]		[0 - 21,7]		[7,8 - 16,8]	
5 Jahresüberlebensrate [%]			9,7 ± 5,3		23,5 ± 7,3		28,0 ± 9,0		10,0 ± 4,7		0		19,6 ± 5,3	
Tumorspezifisches Überleben	n	(1)	62		0,775		62		0,195		62		0,275	
Gesamt / Ereignis / Zensiert			28 / 25 / 3		34 / 26 / 8		24 / 17 / 7		38 / 34 / 4		9 / 9 / 0		53 / 42 / 11	
Median [Monat]			15,0 ± 6,7		11,6 ± 2,1		16,0 ± 8,1		12,0 ± 1,6		7,4 ± 7,3		12,6 ± 2,8	
95% Konfidenzintervall			[2,0 - 28,1]		[7,5 - 15,6]		[0 - 32,0]		[8,3 - 14,8]		[0 - 21,7]		[7,1 - 18,0]	
5 Jahresüberlebensrate [%]			10,7 ± 5,8		23,5 ± 7,3		29,2 ± 9,3		10,5 ± 5,0		0		20,8 ± 5,6	

(1) Fisher's exact test; (2) Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.2a Verteilungsmuster der TAN in Lymphknotenmetastasen

Klinische Parameter	Lymphknotenmetastasen								
	Invasionsfront				Peritumoral				
	fehlend		vorhanden		fehlend		vorhanden		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Gesamt		35	18,5	31	16,4	52	27,5	14	7,4
Geschlecht	n	01		0,631		66		0,766	
männlich		17	50	17	50	26	76,5	8	23,5
weiblich		18	56,3	14	43,8	26	81,3	6	18,8
Alter	n	01		0,006		66		0,766	
< 71 Jahre		11	34,4	21	65,6	26	81,3	6	18,8
≥ 71 Jahre		24	70,6	10	29,4	26	76,5	8	23,5
Lokalisation	n	01		0,806		65		1	
Rektum Sigma		15	50	15	50	24	80	6	20
C. desc - Zökum		19	54,3	16	45,7	28	80	7	20
T	n	(10)		0,123 / 0,092		66		0,105 / 0,286	
T1		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
T2		1	50	1	50	1	50	1	50
T3		16	43,2	21	56,8	32	86,5	5	13,5
T4a/4b		18	66,7	9	33,3	19	70,4	8	29,6
N	n	(10)		0,587 / 0,587		66		0,744 / 1	
N0		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
N1a/1b/1c		8	47,1	9	52,9	13	76,5	4	23,5
N2a/2b		27	55,1	22	44,9	39	79,6	10	20,4
M	n	01		1		66		1	
M1		34	52,3	31	47,7	51	78,5	14	21,5
MX		1	100	0	0	1	100	0	0
Stadium	n	(10)		1 / 1		66		1 / 1	
I		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
II a/b/c		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
III a/b/c		1	100	0	0	1	100	0	0
IV a/b/c		34	52,3	31	47,7	51	78,5	14	21,5
Grading	n	(10)		0,176 / 0,323		66		0,817 / 0,954	
G1		0	0	1	100	1	100	0	0
G2		21	61,8	13	38,2	26	76,5	8	23,5
G3		14	45,2	17	54,8	25	80,6	6	19,4
Lymphgefäßinvasion	n	01		0,059		66		0,503	
L0		6	33,3	12	66,7	13	72,2	5	27,8
L1		29	60,4	19	39,6	39	81,3	9	18,8
Blutgefäßinvasion	n	01		0,107		66		0,745	
V0		21	45,7	25	54,3	37	80,4	9	19,6
V1		14	70	6	30	15	75	5	25
Perineurale Invasion	n	00		0,682		42		0,651	
Pn0		20	57,1	15	42,9	24	68,6	11	31,4
Pn1		3	42,9	4	57,1	6	85,7	1	14,3
Residualtumor	n	00		0,715		59		0,66	
R0		27	52,9	24	47,1	41	80,4	10	19,6
R1/R2		5	62,5	3	37,5	6	75	2	25
Gesamtüberleben	n	00		0,638		65		0,765	
Gesamt / Ereignis / Zensiert		35 / 30 / 5		30 / 24 / 6		51 / 42 / 9		14 / 12 / 2	
Median [Monat]		11,6 ± 4,2		12,3 ± 2,5		10,6 ± 2,6		12,5 ± 4,1	
95% Konfidenzintervall		[3,3 - 19,8]		[7,4 - 17,2]		[5,4 - 15,7]		[4,4 - 20,5]	
5 Jahresüberlebensrate [%]		14,3 ± 5,9		20,0 ± 7,3		17,6 ± 5,3		14,3 ± 9,4	
Tumorspezifisches Überleben	n	00		0,829		62		0,763	
Gesamt / Ereignis / Zensiert		32 / 27 / 5		30 / 24 / 6		49 / 40 / 9		13 / 11 / 2	
Median [Monat]		12,5 ± 5,8		12,3 ± 2,5		12,3 ± 3,0		16,0 ± 6,5	
95% Konfidenzintervall		[1,2 - 23,7]		[7,4 - 17,2]		[6,4 - 18,1]		[3,3 - 28,6]	
5 Jahresüberlebensrate [%]		15,6 ± 6,4		20,0 ± 7,3		18,4 ± 5,5		15,4 ± 10,0	

⁽¹⁾ Fisher's exact test; ⁽²⁾ Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.2b Verteilungsmuster der TAN in Lymphknotenmetastasen

Es ergaben sich die folgenden signifikanten Zusammenhänge:

Der Anteil der Fälle mit Nachweis von TAN im Stroma des Tumorzentrums einer Lymphknotenmetastase korreliert signifikant mit der Lokalisation des Primarius (p=0,004). Es ließen sich mehr Me-

tastasen mit TAN im Stroma des Tumorzentrums bei einer Lage des Primarius im oralen Kolonanteil (Caecum bis Colon descendens) als in den aboralen Kolonanteilen (Colon sigmoideum bis Rektum) nachweisen.

Der Anteil der Fälle mit Nachweis intraluminaler TAN sinkt signifikant mit steigendem Tumorstadium des Primarius ($p=0,026$) und steigt signifikant mit steigendem Nodalstadium ($p=0,042$).

Der Anteil der Fälle mit Nachweis TAN im Bereich der Invasionsfront der Lymphknotenmetastase korreliert signifikant mit einem jüngeren Patientenalter ($p=0,006$).

3.2.2.2 Lebermetastasen

In 98 Fällen (18,5%) waren histologisch gesicherte Lebermetastasen des KRK (Abbildung 3.5) nachweisbar. Auch hier wurden in unterschiedlichen Kompartimenten TAN nachgewiesen. Eine luminal gerichtete Tumoroberfläche entfällt bei einer intrapaenchymatösen Lebermetastase. Die übrigen Kompartimente wurden dem oben beschriebenen Vorgehen entsprechend individuell ausgewertet.

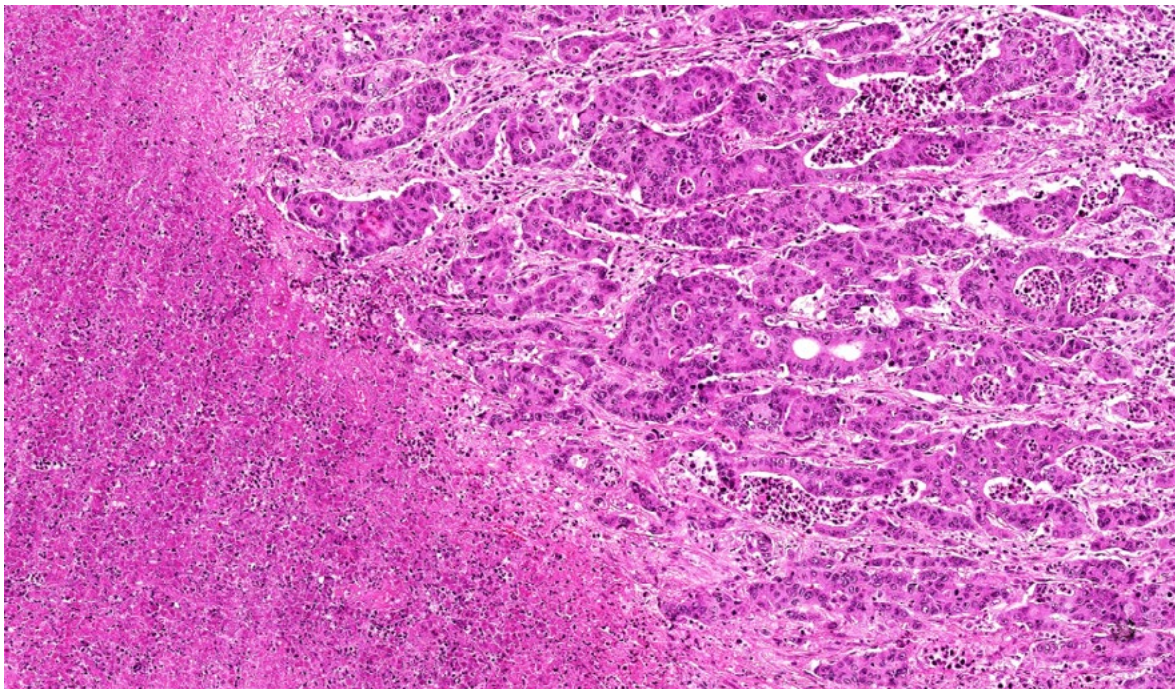


Abbildung 3.5 Lebermetastase eines KRK (Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Originalvergrößerung 100-fach)

In der statistischen Analyse ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge des TAN-Nachweises in Lebermetastasen mit Parametern des klinisch-pathologischen Tumorstadiums.

Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Verteilungsmusters Myeloperoxidase-gefärbter Granulozyten in den Lebermetastasen zusammen.

Klinische Parameter	p	Lebermetastasen: Tumorzentrum											
		Intraepithelial				Stroma				Intraluminal			
		fehlend n (%)		vorhanden n (%)		fehlend n (%)		vorhanden n (%)		fehlend n (%)		vorhanden n (%)	
Gesamt		23	12,2	3	1,6	7	3,7	19	10,1	2	1,1	24	12,7
Geschlecht	n (1)	26		1		26		0,665		26		1	
männlich		12	85,7	2	14,3	3	21,4	11	78,6	1	7,1	13	92,9
weiblich		11	91,7	1	8,3	4	33,3	8	66,7	1	8,3	11	91,7
Alter	n (1)	26		1		26		1		26		1	
< 71 Jahre		18	90	2	10	5	25	15	75	2	10	18	90
>= 71 Jahre		5	83,3	1	16,7	2	33,3	4	66,7	0	0	6	100
Lokalisation	n (1)	26		nb		26		nb		26		nb	
Rektum - Sigma		23	88,5	3	11,5	7	26,9	19	73,1	2	7,7	24	92,3
C. desc. Zökum		nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
T	n (1)/(2)	26		1 / 0,896		26		0,239 / 0,479		26		0,086 / 1	
T1		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
T2		5	100	0	0	0	0	5	100	1	20	4	80
T3		15	83,3	3	16,7	7	38,9	11	61,1	0	0	18	100
T4a/4b		3	100	0	0	0	0	3	100	1	33,3	2	66,7
N	n (1)/(2)	26		1 / 1		26		0,190 / 0,190		26		0,203 / 0,203	
N0		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
N1a/1b/1c		11	91,7	1	8,3	5	41,7	7	58,3	2	16,7	10	83,3
N2a/2b		12	85,7	2	14,3	2	14,3	12	85,7	0	0	14	100
M	n (1)	26		1		26		1		26		0,077	
M1		22	88	3	12	7	28	18	72	1	4	24	96
MX		1	100	0	0	0	0	1	100	1	100	0	0
Stadium	n (1)/(2)	26		1 / 1		26		1 / 1		26		0,077 / nb	
I		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
II a/b/c		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
III a/b/c		1	100	0	0	0	0	1	100	1	100	0	0
IV a/b/c		22	88	3	12	7	28	18	72	1	4	24	96
Grading	n (1)/(2)	22		0,470 / 0,435		22		0,487 / 0,620		22		1 / 1	
G1		1	100	0	0	1	100	0	0	0	0	1	100
G2		16	88,9	2	11,1	5	27,8	13	72,2	1	5,6	17	94,4
G3		2	66,7	1	33,3	1	33,3	2	66,7	0	0	3	100
Lymphgefäßinvasion	n (1)	26		0,556		26		1		26		0,492	
L0		14	93,3	1	6,7	4	26,7	11	73,3	2	13,3	13	86,7
L1		9	81,8	2	18,2	3	27,3	8	72,7	0	0	11	100
Blutgefäßinvasion	n (1)	26		0,54		26		1		26		0,474	
V0		16	84,2	3	15,8	5	26,3	14	73,7	1	5,3	18	94,7
V1		7	100	0	0	2	28,6	5	71,4	1	14,3	6	85,7
Perineurale Invasion	n (1)	17		1		17		1		17		nb	
Pn0		11	84,6	2	15,4	5	38,5	8	61,5	nb	nb	13	100
Pn1		3	75	1	25	1	25	3	75	nb	nb	4	100
Residualtumor	n (1)	26		1		26		0,474		26		1	
R0		21	87,5	3	12,5	6	25	18	75	2	8,3	22	91,7
R1/R2		2	100	0	0	1	50	1	50	0	0	2	100
Gesamtüberleben	n (1)	26		0,334		26		0,962		26		0,709	
Gesamt / Ereignis / Zensiert		23 / 18 / 5		3 / 1 / 2		7 / 5 / 2		19 / 14 / 5		2 / 1 / 1		24 / 18 / 6	
Median [Monat]		37,2 ± 7,3		nb		34,5 ± 7,1		41,0 ± 8,4		11		37,2 ± 7,1	
95% Konfidenzintervall		[23,0 - 52,0]		nb		[20,5 - 48,5]		[24,3 - 57,3]		nb		[23,3 - 51,1]	
5 Jahresüberlebensrate [%]		30,4 ± 9,6		66,7 ± 27,2		28,6 ± 17,1		30,7 ± 10,8		50,0 ± 3 5,4		32,8 ± 9,7	
Tumorspezifisches Überleben	n (1)	26		0,363		26		0,897		26		0,775	
Gesamt / Ereignis / Zensiert		23 / 17 / 6		3 / 1 / 2		7 / 5 / 2		19 / 13 / 6		2 / 1 / 1		24 / 17 / 7	
Median [Monat]		37,2 ± 7,3		nb		34,5 ± 7,1		41,0 ± 8,4		11		37,2 ± 7,1	
95% Konfidenzintervall		[23,0 - 52,0]		nb		[20,5 - 48,5]		[24,3 - 57,3]		nb		[23,3 - 51,1]	
5 Jahresüberlebensrate [%]		34,8 ± 9,9		66,7 ± 27,2		28,6 ± 17,1		36,8 ± 11,1		50,0 ± 35,4		37,5 ± 9,9	

(1) Fisher's exact test; (2) Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.3a Verteilungsmuster der TAN in Lebermetastasen

Klinische Parameter	p	Lebermetastasen							
		Invasionsfront				Peritumoral			
		fehlend		vorhanden		fehlend		vorhanden	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
Gesamt		3	1,6	23	12,2	19	10,1	7	3,7
Geschlecht	n (1)	26		1		26		1	
männlich		2	14,3	12	85,7	10	71,4	4	28,6
weiblich		1	8,3	11	91,7	9	75	3	25
Alter	n (1)	26		1		26		1	
< 71 Jahre		3	15	17	85	14	70	6	30
>= 71 Jahre		0	0	6	100	5	83,3	1	16,7
Lokalisation	n (1)	26		nb		26		nb	
Rektum - Sigma		3	11,5	23	88,5	19	73,1	7	26,9
C. desc. Zökum		nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb
T	n (1)/(2)	26		0,686 / 0,582		26		0,805 / 1	
T1		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
T2		1	20	4	80	4	80	1	20
T3		2	11,1	16	88,9	12	66,7	6	33,3
T4a/4b		0	0	3	100	3	100	0	0
N	n (1)/(2)	26		0,085 / 0,085		26		0,190 / 0,190	
N0		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
N1a/1b/1c		3	25	9	75	7	58,3	5	41,7
N2a/2b		0	0	14	100	12	85,7	2	14,3
M	n (1)	26		0,115		26		0,269	
M1		2	8	23	92	19	76	6	24
MX		1	100	0	0	0	0	1	100
Stadium	n (1)/(2)	26		0,115 / 0,115		26		0,269 / 0,269	
I		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
II a/b/c		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
III a/b/c		1	100	0	0	0	0	1	100
IV a/b/c		2	8	23	92	19	76	6	24
Grading	n (1)/(2)	22		1 / 0,965		22		0,407 / 0,656	
G1		0	0	1	100	0	0	1	100
G2		3	16,7	15	83,3	14	77,8	4	22,2
G3		0	0	3	100	2	66,7	1	33,3
Lymphgefäßinvasion	n (1)	26		0,238		26		0,658	
L0		3	20	12	80	10	66,7	5	33,3
L1		0	0	11	100	9	81,8	2	18,2
Blutgefäßinvasion	n (1)	26		0,54		26		0,629	
V0		3	15,8	16	84,2	13	68,4	6	31,6
V1		0	0	7	100	6	85,7	1	14,3
Perineurale Invasion	n (1)	17		1		17		0,219	
Pn0		1	7,7	12	92,3	11	84,6	2	15,4
Pn1		0	0	4	100	2	50	2	50
Residualtumor	n (1)	26		1		26		1	
R0		3	12,5	21	87,5	17	70,8	7	29,2
R1/R2		0	0	2	100	2	100	0	0
Gesamtüberleben	n (1)	26		0,169		26		0,523	
Gesamt / Ereignis / Zensiert		3 / 1 / 2		23 / 18 / 5		19 / 14 / 5		7 / 5 / 2	
Median [Monat]		nb		37,2 ± 8,8		37,2 ± 8,0		62,2 ± 40,0	
95% Konfidenzintervall		nb		[20,0 - 54,5]		[21,6 - 52,9]		[0 - 140,6]	
5 Jahresüberlebensrate [%]		66,7 ± 27,2		29,8 ± 9,7		25,3 ± 10,2		57,1 ± 18,7	
Tumorspezifisches Überleben	n (1)	26		0,2		26		0,666	
Gesamt / Ereignis / Zensiert		3 / 1 / 2		23 / 17 / 6		19 / 13 / 6		7 / 5 / 2	
Median [Monat]		nb		37,2 ± 8,8		37,2 ± 8,0		62,2 ± 40,0	
95% Konfidenzintervall		nb		[20,0 - 54,5]		[21,6 - 52,9]		[0 - 140,6]	
5 Jahresüberlebensrate [%]		66,7 ± 27,2		34,8 ± 9,9		31,6 ± 10,7		57,1 ± 18,7	

(1) Fisher's exact test; (2) Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.3b Verteilungsmuster der TAN in Lebermetastasen

3.2.3 Univariate Überlebensanalyse

Verschiedene klinisch-pathologische Parameter korrelierten mit dem tumorspezifischen und dem Gesamtüberleben der Patienten. Hierzu zählten Patientenalter, Lokalisation des KRK, UICC-Stadium, Lymphangiosis- und Hämangiosis carcinomatosa sowie Perineuralscheideninfiltration. Die KRK-Patienten des untersuchten Kollektivs mit Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld im Tumorzentrum zeigen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($p=0,004$) und ein signifikant kürzeres tumorspezifisches Überleben ($p=0,001$) als Patienten mit weniger als sieben oder fehlenden intraepithelialen TAN. Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier sind in der Abbildung 3.6 dargestellt.

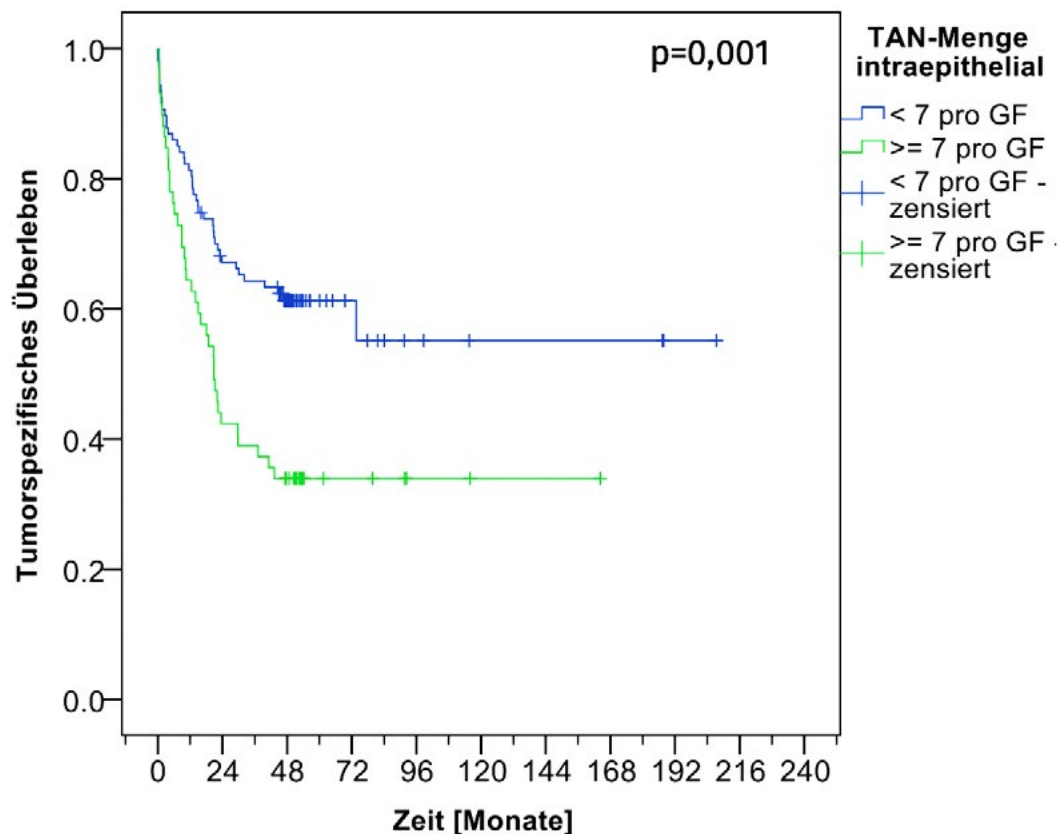


Abbildung 3.6 Korrelation des intraepithelialen TAN-Nachweises im Tumorzentrum mit dem tumorspezifischen Überleben. GF= Gesichtsfeld.

3.2.3 Univariate Überlebensanalyse

Verschiedene klinisch-pathologische Parameter korrelierten mit dem tumorspezifischen und dem Gesamtüberleben der Patienten. Hierzu zählten Patientenalter, Lokalisation des KRK, UICC-Stadium, Lymphangiosis- und Hämangiosis carcinomatosa sowie Perineuralscheideninfiltration. Die KRK-Patienten des untersuchten Kollektivs mit Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld im Tumorzentrum zeigen ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ($p=0,004$) und ein signifikant kürzeres tumorspezifisches Überleben ($p=0,001$) als Patienten mit weniger als sieben oder fehlenden intraepithelialen TAN. Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier sind in der Abbildung 3.6 dargestellt.

3.2.4 Multivariate Überlebensanalyse

Mit Hilfe des Cox-Modells lässt sich der Einfluss von metrischen oder kategorialen Variablen auf die Überlebenszeit untersuchen. Für die Auswertungen des qualitativen TAN-Nachweises wurde eine Cox-Regressionsanalyse zusammen mit klinisch-pathologischen Variablen durchgeführt. Eingeschlossen wurden hierbei alle Variablen, die in der univariaten Überlebensanalyse einen p-Wert $\leq 0,1$ (log-rank-Test) aufwiesen (s.o.). Hierbei ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge, so dass der Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld (SFZ 20) im Tumorzentrum kein unabhängiger Prognoseparameter ist.

3.3 Quantitative Auswertung

Zur Objektivierung der oben beschriebenen Ergebnisse wurden in einem nächsten Schritt die mit anti-MPO-immungefärbten Schnittpräparate digitalisiert und die TAN-Dichte (TAN/mm²) in vier Tumorbereichen (Tumoroberfläche, Tumorzentrum, Invasionsfront und peritumoral) durch eine Bildanalysesoftware bestimmt. Die Subkompartimente intraepithelial, Stroma und luminal wurden für diese Auswertung zusammengefasst als Kompartiment Tumorzentrum bewertet. Dichte granulozytäre Infiltrate im Bereich des Ulkusschorf an der Tumoroberfläche und Drüsenlumina mit abszedierten granulozytären Infiltraten im Tumorzentrum wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

3.3.1 Messwerte

Die bioinformatische Dichtemessung mittels des Bildanalyseprogramms Definiens® zeigte, dass der TAN-Gehalt sowohl zwischen den verschiedenen Primärtumoren als auch zwischen den verschiedenen Lokalisationen erhebliche Unterschiede aufwies. Die ermittelten Dichtewerte (TAN/mm²) zeigen, dass der Median um den Faktor 10 variiert (peritumoral vs. Oberfläche) und bezüglich der Einzelfallbetrachtung sogar um einen Faktor 5000 (Invasionsfront: 0 TAN/mm² vs. 5191,7 TAN/mm²). Die Unterschiede zwischen den Kompartimenten waren signifikant.

	Oberfläche	Tumorzentrum	Invasionsfront	Peritumoral
Median	711,5	186,7	431,4	78,7
Minimalwert	11,2	8,1	0	0
Maximalwert	4554,6	2827,0	5191,7	4216,3

Tabelle 3.4 Messwerte der TAN-Dichte (TAN/mm²) in den untersuchten Tumorarealen

Im nächsten Schritt wurde gezeigt, dass die TAN-Dichte in den verschiedenen Kompartimenten signifikante Zusammenhänge aufweist. Die jeweiligen Korrelationen sind in Tabelle 3.5 mit Angabe der p-Werte und der Korrelationskoeffizienten dargestellt.

Tumoroberfläche	Tumorzentrum	Invasionsfront	Peritumoral
Tumoroberfläche	p1<0,001 τ=0,285	p1=0,008 τ=0,134	p1=0,141 τ=0,075
Tumorzentrum		p1 <0,001 τ=0,409	p1 <0,001 τ=0,242
Tumorzentrum			p1 <0,001 τ=0,398
Invasionsfront			
Peritumoral			
1) Kendalls Tau τ) Korrelationskoeffizient [-1 ; +1]			

Tabelle 3.5 Korrelation der Parameter der quantitativen Auswertung

3.3.2 Korrelation mit dem T-Stadium

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob die TAN-Dichte (Anzahl/mm²) Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Parametern aufweist. Hier zeigt sich, dass die TAN-Dichte im Bereich der Invasionsfront in den verschiedenen Tumorstadien signifikant unterschiedlich sind (p=0,004) und dass die TAN-Dichte von Stadium T1 zu T2 zunächst deutlich ansteigt, von Stadium T2 bis T4 aber kontinuierlich abnimmt (Abbildung 3.7).

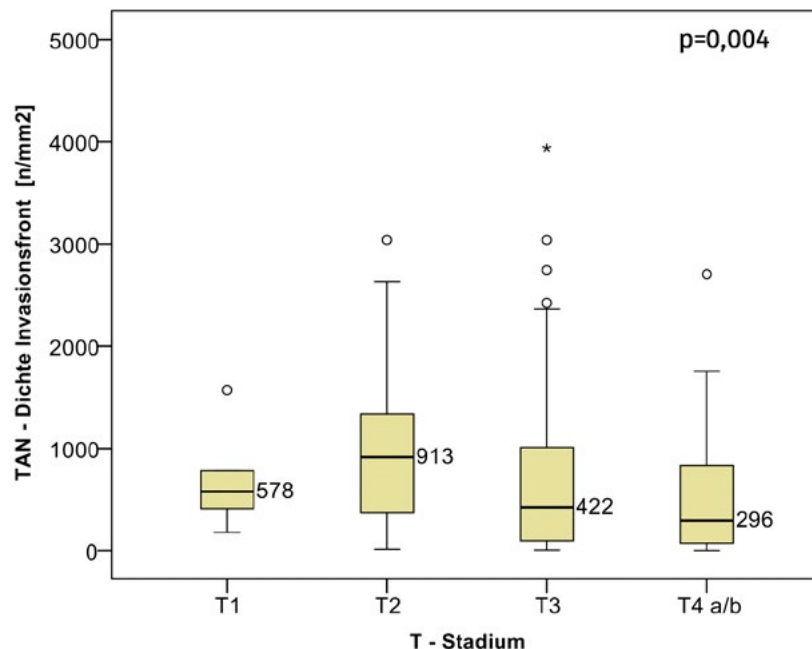


Abbildung 3.7: Boxplot-Darstellung der TAN-Dichte im Bereich der Invasionsfront

3.3.3 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

Die tumorbiologische Bedeutung der TAN wurde durch eine Korrelation der TAN-Dichte mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern überprüft. Für diese Analysen wurde der TAN-Gehalt am Median (431,4 TAN/mm²) dichotomiert in negative (TAN-Dichte kleiner als der Median) und positive (TAN-Dichte größer als der Median) Fälle. Beispiele für einen negativen und positiven TAN-Nachweis im Bereich der Invasionsfront sind in der folgenden Abbildung 3.8 dargestellt.

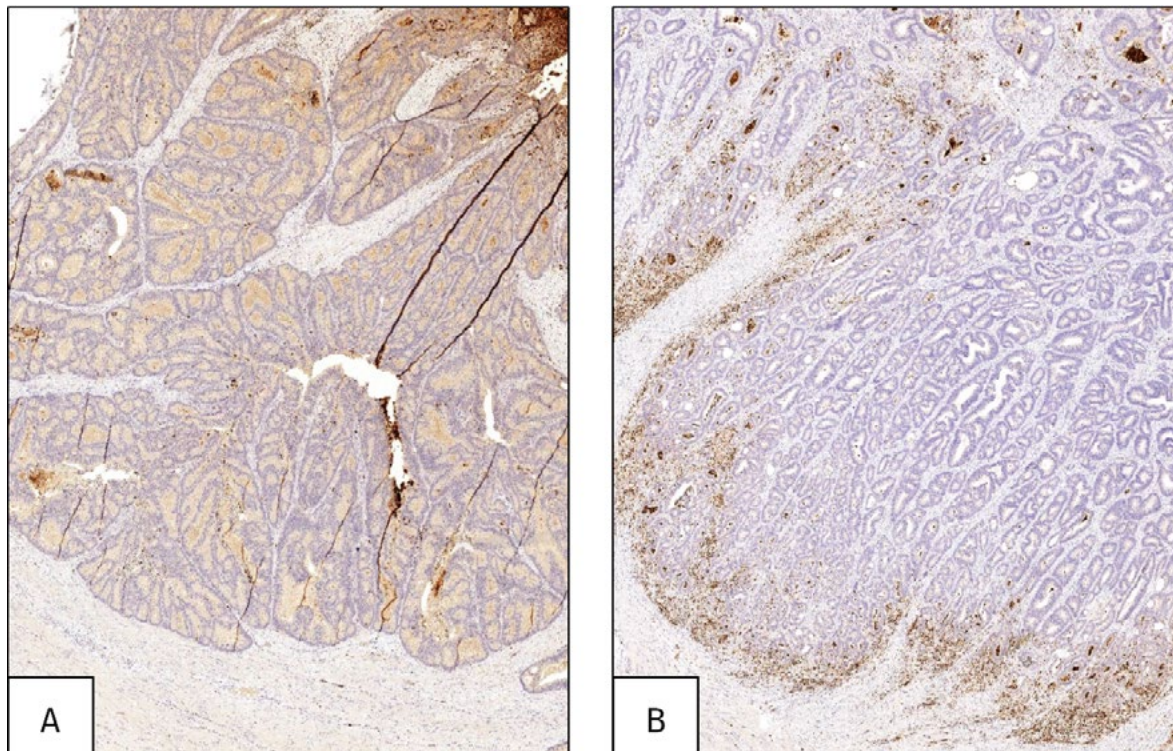


Abbildung 3.8: Dichteverteilung der TAN an der Invasionsfront eines KRK (Anti-Myeloperoxidase-Immunfärbung, Originalvergrößerung 40-fach)

A: KRK mit TAN-Dichte < Median im Bereich der Invasionsfront

B: KRK mit TAN-Dichte > Median im Bereich der Invasionsfront

3.3.3.1 Primärtumoren

Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Verteilungsmusters anti-MPO-immungefärbter Granulozyten im Primärtumor zusammen.

Klinische Parameter	Primärtumor								
	Tumoroberfläche		Tumorzentrum		Invasionsfront		Peritumoral		
	< Median n (%)	> Median n (%)	< Median n (%)	> Median n (%)	< Median n (%)	> Median n (%)	< Median n (%)	> Median n (%)	
Gesamt	91 50,3	90 49,7	101 50,3	100 49,8	97 50	97 50	97	50	97 50
Geschlecht n (1)	181	0,767	201	1	194	0,774	194	0,566	
männlich	48 51,6	45 48,4	52 50	52 50	52 51,5	49 48,5	53 52,5	48 47,5	48 47,5
weiblich	43 48,9	45 51,1	49 50,5	48 49,5	45 48,4	48 51,6	44 47,3	49 52,7	49 52,7
Alter n (1)	178	0,23	198	0,394	191	0,312	191	0,773	
< 71 Jahre	38 44,7	47 55,3	46 46,9	52 53,1	43 45,7	51 54,3	48 51,1	46 48,9	46 48,9
>= 71 Jahre	51 54,8	42 45,2	54 54	46 46	52 53,6	45 46,4	47 48,5	50 51,5	50 51,5
Lokalisation (gruppiert) n (1)	179	0,765	198	0,158	191	0,311	191	0,386	
Rektum - Sigma	49 51	47 49	57 54,3	48 45,7	54 53,5	47 46,5	54 53,5	47 46,5	47 46,5
C. desc. - Zökum	40 48,2	43 51,8	41 44,1	52 55,9	41 45,6	49 54,4	42 46,7	48 53,3	48 53,3
T n (1)/(2)	181	0,796 / 0,889	201	0,589 / 0,838	194	0,032 / 0,008	194	0,111	
T1	3 50	3 50	2 33,3	4 66,7	3 50	3 50	2 33,3	4 66,7	4 66,7
T2	17 54,8	14 45,2	16 48,5	17 51,5	9 29	22 71	10 32,3	21 67,7	21 67,7
T3	48 47,1	54 52,9	60 54,1	51 45,9	55 50,5	54 49,5	57 52,3	52 47,7	52 47,7
T4a/4b	23 54,8	19 45,2	23 45,1	28 54,9	30 62,5	18 37,5	28 58,3	20 41,7	20 41,7
N n (1)/(2)	181	0,246 / 0,210	201	0,170 / 0,279	194	0,004 / 0,001	194	0,710 / 0,807	
N0	41 57,7	30 42,3	36 48,6	38 51,4	26 35,6	47 64,4	36 49,3	37 50,7	37 50,7
N1a/1b/1c	21 42,9	28 57,1	23 41,8	32 58,2	28 52,8	25 47,2	29 54,7	24 45,3	24 45,3
N2a/2b	29 47,5	32 52,5	42 58,3	30 41,7	43 63,2	25 36,8	32 47,1	36 52,9	36 52,9
M n (1)	181	0,291	201	0,256	194	0,009	194	0,56	
M1	33 45,2	40 54,8	48 55,2	39 44,8	50 61,7	31 38,3	43 53,1	38 46,9	38 46,9
MX	58 53,7	50 46,3	53 46,5	61 53,5	47 41,6	66 58,4	54 47,8	59 52,2	59 52,2
Stadium n (1)/(2)	181	0,478 / 0,198	201	0,557 / 0,281	194	0,014 / 0,001	194	0,428 / 0,391	
I	15 53,6	13 46,4	13 43,3	17 56,7	9 31	20 69	11 37,9	18 62,1	18 62,1
II a/b/c	24 60	16 40	21 51,2	20 48,8	16 39	25 61	23 56,1	18 43,9	18 43,9
III a/b/c	19 47,5	21 52,5	19 44,2	24 55,8	22 51,2	21 48,8	20 46,5	23 53,5	23 53,5
IV a/b/c	33 45,2	40 54,8	48 55,2	39 44,8	50 61,7	31 38,3	43 53,1	38 46,9	38 46,9
Grading n (1)/(2)	172	1 / 1	192	0,874 / 0,874	187	0,052 / 0,052	187	0,871 / 0,871	
low grade (G1 / G2)	65 50,8	63 49,2	67 48,6	71 51,4	59 44	75 56	66 49,3	68 50,7	68 50,7
high grade (G3)	22 50	22 50	27 50	27 50	32 60,4	21 39,6	25 47,2	28 52,8	28 52,8
Lymphgefäßinvasion n (1)	181	0,357	201	0,02	194	0,005	194	0,658	
L0	61 53	54 47	54 43,5	70 56,5	50 41,7	70 58,3	58 48,3	62 51,7	62 51,7
L1	30 45,5	36 54,5	47 61	30 39	47 63,5	27 36,5	39 52,7	35 47,3	35 47,3
Blutgefäßinvasion n (1)	181	0,255	201	1	194	0,074	194	0,658	
V0	83 51,9	77 48,1	87 50	87 50	81 47,4	90 52,6	84 49,1	87 50,9	87 50,9
V1	8 38,1	13 61,9	14 51,9	13 48,1	16 69,6	7 30,4	13 56,5	10 43,5	10 43,5
Perineurale Invasion n (1)	128	0,522	141	1	134	0,012	134	0,071	
Pn0	56 47,5	62 52,5	62 48,4	66 51,6	51 41,8	71 58,2	56 45,9	66 54,1	66 54,1
Pn1	6 60	4 40	6 46,2	7 53,8	10 83,3	2 16,7	9 75	3 25	3 25
Residualtumor n (1)	164	0,28	183	0,02	176	0,327	176	0,745	
R0	79 50,6	77 49,4	87 50,3	86 49,7	81 48,5	86 51,5	85 50,9	82 49,1	82 49,1
R1/R2	6 75	2 25	9 90	1 10	6 66,7	3 33,3	4 44,4	5 55,6	5 55,6
Gesamtüberleben n (1)	177	0,419	197	0,632	190	0,078	190	0,309	
Gesamt / Ereignis / Zensiert	88 / 39 / 49	89 / 46 / 43	99 / 51 / 48	98 / 48 / 50	95 / 52 / 43	55	94 / 49 / 45	96 / 43 / 53	
Median [Monat]	nb	56,5 ± 18,2	73,7 ± 31,3	nb	29,8 ± 17,3	nb	39,7 ± 13,7	nb	
95% Konfidenzintervall	nb	[20,9 - 92,2]	[12,4 - 134,9]	nb	[0,0 - 63,7]	nb	[12,8 - 66,6]	nb	
5 Jahresüberlebensrate [%]	56,8 ± 5,3	44,6 ± 7,1	50,5 ± 5,0	45,2 ± 7,5	46,3 ± 5,1	57,4 ± 5,1	48,8 ± 5,2	54,8 ± 5,1	
Tumorspezifisches Überleben n (1)	170	0,39	190	0,624	184	0,107	184	0,426	
Gesamt / Ereignis / Zensiert	84 / 34 / 50	86 / 41 / 45	96 / 46 / 50	94 / 43 / 51	91 / 47 / 44	56	90 / 44 / 46	94 / 40 / 54	
Median [Monat]	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	
95% Konfidenzintervall	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	
5 Jahresüberlebensrate [%]	60,5 ± 5,4	51,9 ± 5,5	52,9 ± 5,1	53,8 ± 5,2	48,4 ± 5,2	59,4 ± 5,2	51,0 ± 5,3	56,8 ± 5,2	

⁽¹⁾ Fisher's exact test; ⁽²⁾ Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.6 Verteilungsmuster der TAN im Primärtumor

Es ergaben sich die folgenden signifikanten Korrelationen: Der Anteil der Fälle mit Nachweis von mehr als 431 TAN/mm² (>Median) im Bereich der Invasionsfront sinkt mit steigendem T-Stadium (p=0,008), mit steigendem Nodalstadium (p=0,001) und mit dem Nachweis einer Lymphangiomas carcinomatosa (p=0,005), dem Nachweis von Lebermetastasen (p=0,009) und dem Anstieg des UICC-Stadiums (p=0,001).

3.3.3.2 Metastasen

3.3.3.2.1 Lymphknotenmetastasen

In 140 Fällen (65,4%) wurden Lymphknotenmetastasen untersucht. Auch hier wurden in unterschiedlichen Kompartimenten TAN nachgewiesen. Eine luminal gerichtete Tumoroberfläche entfällt bei einer Lymphknotenmetastase. Die übrigen Kompartimente wurden dem oben beschriebenen Vorgehen entsprechend individuell ausgewertet. Es ergaben sich die folgenden Messwerte:

	Tumorzentrum	Invasionsfront	Peritumoral
Median	84,5	131,6	43,4
Minimalwert	2,0	1,7	0
Maximalwert	1656,8	2285,1	989,4

Tabelle 3.7 Messwerte der TAN-Dichte (TAN/mm²) in den untersuchten Tumorarealen der Lymphknotenmetastasen

Für die weiteren Analysen wurde der TAN-Gehalt am Median dichotomiert in negative (TAN-Dichte kleiner als der Median) und positive (TAN-Dichte größer als der Median) Fälle. Tabelle 3.8 fasst die Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Verteilungsmusters anti-MPO-immungefärbter Granulozyten in den Lymphknotenmetastasen zusammen. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Parametern oder dem Überleben.

Klinische Parameter	Lymphknotenmetastasen												
	Tumorzentrum				Invasionsfront				Peritumoral				
	< Median		> Median		< Median		> Median		< Median		> Median		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Gesamt		31	50	31	50	31	50	31	50	31	50	31	50
Geschlecht	n ⁽¹⁾	62			0,8	62			0,446	62			0,446
männlich		17	53,1	15	46,9	18	56,3	14	43,8	18	56,3	14	43,8
weiblich		14	46,7	16	53,3	13	43,3	17	56,7	13	43,3	17	56,7
Alter	n ⁽¹⁾	62			0,31	62			0,31	62			0,01
< 71 Jahre		18	58,1	13	41,9	18	58,1	13	41,9	21	67,7	10	32,3
>= 71 Jahre		13	41,9	18	58,1	13	41,9	18	58,1	10	32,3	21	67,7
Lokalisation (gruppiert)	n ⁽¹⁾	61			0,202	61			0,444	61			0,609
Rektum - Sigma		16	59,3	11	40,7	15	55,6	12	44,4	15	55,6	12	44,4
C. desc. - Zökum		14	41,2	20	58,8	15	44,1	19	55,9	16	47,1	18	52,9
T	n ^{(1)/(2)}	62			1 / 1	62			0,394 / 0,896	62			0,180 / 0,537
T1		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
T2		1	50	1	50	0	0	2	100	0	0	2	100
T3		17	50	17	50	19	55,9	15	44,1	20	58,8	14	41,2
T4a/4b		13	50	13	50	12	46,2	14	53,8	11	42,3	15	57,7
N	n ^{(1)/(2)}	62			0,500 / 1	62			0,277 / 0,554	62			0,500 / 1
N0		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
N1a/1b/1c		8	53,3	7	46,7	9	60	6	40	8	53,3	7	46,7
N2a/2b		23	48,9	24	51,1	22	46,8	25	53,2	23	48,9	24	51,1
M	n ⁽¹⁾	62			1	62			1	62			1
M1		30	49,2	31	50,8	30	49,2	31	50,8	31	50,8	30	49,2
MX		1	100	0	0	1	100	0	0	0	0	1	100
Stadium	n ^{(1)/(2)}	62			1 / 1	62			1 / 1	62			1 / 1
I		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
II a/b/c		0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb	0	nb
III a/b/c		1	100	0	0	1	100	0	0	0	0	1	100
IV a/b/c		30	49,2	31	50,8	30	49,2	31	50,8	31	50,8	30	49,2
Grading	n ^{(1)/(2)}	62			0,074 / 0,074	61			0,021 / 0,021	61			0,021 / 0,021
low grade (G1 / G2)		19	61,3	12	38,7	20	64,5	11	35,5	20	64,5	11	35,5
high grade (G3)		11	36,7	19	63,3	10	33,3	20	66,7	10	33,3	20	66,7
Lymphgefäßinvasion	n ⁽¹⁾	62			0,582	62			1	62			1
L0		8	42,1	11	57,9	9	47,4	10	52,6	9	47,4	10	52,6
L1		23	53,5	20	46,5	22	51,2	21	48,8	22	51,2	21	48,8
Blutgefäßinvasion	n ⁽¹⁾	62			1	62			1	62			1
V0		22	50	22	50	22	50	22	50	22	50	22	50
V1		9	50	9	50	9	50	9	50	9	50	9	50
Perineurale Invasion	n ⁽¹⁾	38			0,344	38			0,355	38			0,374
Pn0		16	48,5	17	51,5	17	51,5	16	48,5	18	54,5	15	45,5
Pn1		4	80	1	20	4	80	1	20	4	80	1	20
Residualtumor	n ⁽¹⁾	53			0,694	53			0,704	53			0,436
R0		21	45,7	25	54,3	24	52,2	22	47,8	24	52,2	22	47,8
R1/R2		4	57,1	3	42,9	3	42,9	4	57,1	5	71,4	2	28,6
Gesamtüberleben	n ⁽¹⁾	61			0,275	61			0,015	61			0,01
Gesamt / Ereignis / Zensiert		31 / 23 / 8			30 / 26 / 4	31 / 23 / 8			30 / 26 / 4	30 / 22 / 8			31 / 27 / 4
Median [Monat]		12,6	4,5	9,8	± 1,2	18,0	± 4,0	5,4	± 3,0	20,7	± 5,5	5,4	± 2,3
95% Konfidenzintervall		[3,7 - 21,4]			[7,5 - 12,2]	[10,1 - 26,0]			[0,0 - 11,4]	[9,9 - 31,4]			[0,9 - 9,9]
5 Jahresüberlebensrate [%]		25,8 ± 7,9			13,3 ± 6,2	25,8 ± 7,9			13,3 ± 6,2	26,7 ± 8,1			12,9 ± 6,0
Tumorspezifisches Überleben	n ⁽¹⁾	58			0,279	58			0,015	58			0,012
Gesamt / Ereignis / Zensiert		30 / 22 / 8			28 / 24 / 4	30 / 22 / 8			28 / 24 / 4	29 / 21 / 8			29 / 25 / 4
Median [Monat]		12,6 ± 3,7			10,3 ± 3,4	18,0 ± 4,3			5,4 ± 3,0	21,2 ± 4,5			5,4 ± 1,2
95% Konfidenzintervall		[5,2 - 19,9]			[3,6 - 17,0]	[9,5 - 26,5]			[0,0 - 11,3]	[12,4 - 30,0]			[3,1 - 7,8]
5 Jahresüberlebensrate [%]		26,7 ± 8,1			14,3 ± 6,6	26,7 ± 8,1			14,3 ± 6,6	27,6 ± 8,3			13,8 ± 6,4

(1) Fisher's exact test; (2) Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.8 Verteilungsmuster der TAN in Lymphknotenmetastasen

3.3.3.2 Lebermetastasen

In 100 Fällen (46,7%) wurden Lebermetastasen untersucht. Auch hier wurden in unterschiedlichen Kompartimenten TAN nachgewiesen. Eine luminal gerichtete Tumoroberfläche entfällt bei einer Lebermetastase. Die übrigen Kompartimente wurden dem oben beschriebenen Vorgehen entsprechend individuell ausgewertet. Es ergaben sich die folgenden Messwerte:

	Tumorzentrum	Invasionsfront	Peritumoral
Median	323,3	955,1	391,3
Mininmalwert	87,1	184,9	127,9
Maximalwert	3312,8	5618,7	1737,9

Tabelle 3.9 Messwerte der TAN-Dichte (TAN/mm²) in den untersuchten Tumorarealen der Lebermetastasen

Für die weiteren Analysen wurde der TAN-Gehalt am Median dichotomiert in negative (TAN-Dichte kleiner als der Median) und positive (TAN-Dichte größer als der Median) Fälle. Tabelle 3.9 fasst die Ergebnisse der qualitativen Auswertung des Verteilungsmusters Myeloperoxidase-gefärbter Granulozyten in den Lebermetastasen zusammen. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit klinisch-pathologischen Parametern oder dem Überleben.

Klinische Parameter	Lebermetastasen					
	Tumorzentrum		Invasionsfront		Peritumoral	
	< Median n (%)	> Median n (%)	< Median n (%)	> Median n (%)	< Median n (%)	> Median n (%)
Gesamt	12 50	12 50	12 50	12 50	11 45,8	13 54,2
Geschlecht n (1)	25	0,688	25	1	25	0,111
männlich	7 46,7	8 53,3	8 53,3	7 46,7	10 66,7	5 33,3
weiblich	6 60	4 40	5 50	5 50	3 30	7 70
Alter n (1)	25	0,645	25	1	25	0,16
< 71 Jahre	11 55	9 45	10 50	10 50	12 60	8 40
>= 71 Jahre	2 40	3 60	3 60	2 40	1 20	4 80
Lokalisation (gruppiert) n (1)	25	1	25	1	25	0,48
Rektum - Sigma	12 50	12 50	12 50	12 50	13 54,2	11 45,8
C. desc. - Zökum	1 100	0 0	1 100	0 0	0 0	1 100
T n (1)/(2)	25	0,068 / 0,300	25	0,832 / 0,732	25	1 / 1
T1	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb
T2	0 0	4 100	2 50	2 50	2 50	2 50
T3	11 64,7	6 35,3	8 47,1	9 52,9	9 52,9	8 47,1
T4a/4b	2 50	2 50	3 75	1 25	2 50	2 50
N n (1)/(2)	25	0,695 / 0,695	25	1 / 1	25	0,659 / 0,659
N0	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb
N1a/1b/1c	5 45,5	6 54,5	6 54,5	5 45,5	5 45,5	6 54,5
N2a/2b	8 57,1	6 42,9	7 50	7 50	8 57,1	6 42,9
M n (1)	25	1	25	1	25	0,48
M1	12 50	12 50	12 50	12 50	13 54,2	11 45,8
MX	1 100	0 0	1 100	0 0	0 0	1 100
Stadium n (1)/(2)	25	1 / 1	25	1 / 1	25	0,480 / 0,480
I	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb
II a/b/c	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb	0 nb
III a/b/c	1 100	0 0	1 100	0 0	0 0	1 100
IV a/b/c	12 50	12 50	12 50	12 50	13 54,2	11 45,8
Grading n (1)/(2)	21	0,476 / 0,476	21	0,214 / 0,214	21	1 / 1
low grade (G1 / G2)	9 47,4	10 52,6	8 42,1	11 57,9	8 42,1	11 57,9
high grade (G3)	2 100	0 0	2 100	0 0	1 50	1 50
Lymphgefäßinvasion n (1)	25	0,238	25	0,695	25	1
L0	5 38,5	8 61,5	6 46,2	7 53,8	7 53,8	6 46,2
L1	8 66,7	4 33,3	7 58,3	5 41,7	6 50	6 50
Blutgefäßinvasion n (1)	25	1	25	1	25	0,673
V0	9 50	9 50	9 50	9 50	10 55,6	8 44,4
V1	4 57,1	3 42,9	4 57,1	3 42,9	3 42,9	4 57,1
Perineurale Invasion n (1)	17	0,537	17	1	17	1
Pn0	5 35,7	9 64,3	7 50	7 50	7 50	7 50
Pn1	2 66,7	1 33,3	1 33,3	2 66,7	1 33,3	2 66,7
Residualtumor n (1)	25	1	25	0,48	25	1
R0	12 52,2	11 47,8	11 47,8	12 52,2	12 52,2	11 47,8
R1/R2	1 50	1 50	2 100	0 0	1 50	1 50
Gesamtüberleben n (1)	25	0,688	25	0,554	25	0,196
Gesamt / Ereignis / Zensiert	13 / 10 / 3	12 / 9 / 3	13 / 9 / 4	12 / 10 / 2	13 / 9 / 4	12 / 10 / 2
Median [Monat]	34,5 ± 4,9	43,2 ± 3,5	43,2 ± 9,6	31,6 ± 10,1	50,6 ± 11,0	21,2 ± 9,4
95% Konfidenzintervall	[25,0 - 44,1]	[36,3 - 50,2]	[24,4 - 62,1]	[11,8 - 51,5]	[29,0 - 72,2]	[2,7 - 39,7]
5 Jahresüberlebensrate [%]	30,8 ± 12,8	31,3 ± 14,0	38,5 ± 13,5	22,2 ± 12,8	46,2 ± 13,8	16,7 ± 10,8
Tumorspezifisches Überleben n (1)	25	0,516	25	0,757	25	0,305
Gesamt / Ereignis / Zensiert	13 / 10 / 3	12 / 8 / 4	13 / 9 / 4	12 / 9 / 3	13 / 9 / 4	12 / 9 / 3
Median [Monat]	34,5 ± 4,9	43,2 ± 3,5	43,2 ± 9,6	31,6 ± 10,1	50,6 ± 11,0	21,2 ± 9,4
95% Konfidenzintervall	[25,0 - 44,1]	[36,3 - 50,2]	[24,4 - 62,1]	[11,8 - 51,5]	[29,0 - 72,2]	[2,7 - 39,7]
5 Jahresüberlebensrate [%]	30,8 ± 12,8	41,7 ± 14,2	38,5 ± 13,5	33,3 ± 13,6	46,2 ± 13,8	25,0 ± 12,5

(1) Fisher's exact test; (2) Kendall's tau; nb = nicht berechenbar

Tabelle 3.9 Verteilungsmuster der TAN in Lebermetastasen

3.3.4 Überlebensanalyse

Bezüglich des TAN-Nachweises ergab die Überlebensanalyse, dass die KRK-Patienten des untersuchten Kollektivs mit einer hohen TAN-Dichte im Bereich der Invasionsfront des Primärtumors ein statistisch längeres tumorspezifisches Überleben als Patienten mit geringer TAN-Dichte zeigen. Dieser Zusammenhang war nicht signifikant ($p=0,107$). Die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier sind in der Abbildung 3.9 dargestellt.

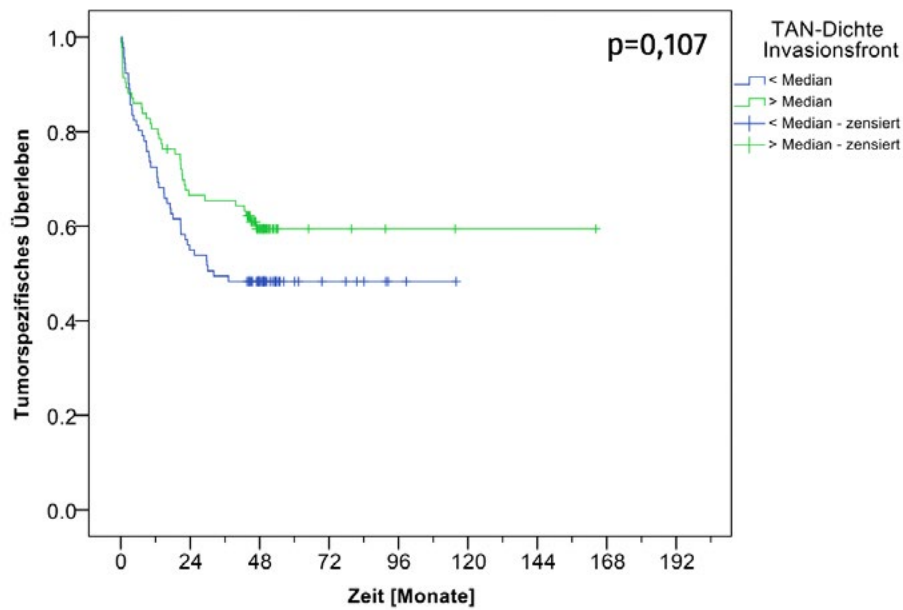


Abbildung 3.9: Korrelation der TAN-Dichte im Bereich der Invasionsfront mit dem tumorspezifischen Überleben

4. Diskussion

Die prognostisch relevanten Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen sind weithin anerkannt (Reiman et al., 2007). Bisher wurde die Rolle der TAN hierbei jedoch unterschätzt. Vor diesem Hintergrund beschreibt meine Dissertation eine zuverlässige Methode zur Quantifizierung der TAN-Infiltration im KRK und belegt, dass TAN im KRK eine entscheidende prognostische Rolle einnehmen. Meine Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die veränderliche, tumorbiologische Funktion der TAN von ihrer räumlichen Verteilung im Tumor abhängt.

4.1 Synopsis der qualitativen und quantitativen Auswertung

4.1.1 TAN reichern sich spezifisch in Kompartimenten eines KRK an

Das Auftreten und die Mengenverteilung der TAN wurde in den Primärtumoren, den Lymphknoten- und Lebermetastasen jeweils in definierten Tumorkompartimenten zunächst qualitativ durch eine lichtmikroskopische Auswertung und in einem zweiten Schritt quantitativ durch ein Bildanalyse-system untersucht. Die Kompartimente wurden als Tumoroberfläche, Tumorzentrum (in der qualitativen Auswertung unterteilt in Tumorepithel, Drüsenlumina und Tumorstroma), Invasionsfront und peritumorales Stroma bezeichnet. Zunächst zeigten sich in beiden Auswertungen übereinstimmend im Bereich der Tumoroberfläche, unterhalb des Ulkusschorf viele TAN, während im Tumorzentrum, im Bereich der Invasionsfront und besonders peritumoral signifikant geringere TAN-Mengen nachgewiesen wurden. Bei zunehmender TAN-Menge an der Tumoroberfläche wurden auch intratumoral und im Bereich der Invasionsfront signifikant vermehrt TAN nachgewiesen. Außerdem korrelierte der Nachweis vermehrter intratumoraler TAN signifikant mit einem vermehrten Nachweis von TAN im Bereich der Invasionsfront und peritumoral. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Nachweis von TAN im KRK kein zufälliges Begleitinfiltrat bei gestörter Barrierefunktion der Schleimhaut bzw. der ulzerierten Tumoroberfläche ist, sondern eine spezifische Anreicherung in bestimmten Tumorkompartimenten darstellt. Hier übernehmen die TAN je nach Lokalisation vermutlich eine unterschiedliche, tumorbiologisch und prognostisch relevante Funktion.

4.1.2 TAN-Dichte korreliert mit dem Tumorstadium

Die TAN-Menge wird durch den vom Tumor freigesetzten Granulozytenkolonie-stimulierenden Faktor (GCSF) beeinflusst, der spezifisch auf granulozytäre Vorläuferzellen im Knochenmark wirkt (Lord et al., 1989) und gemäß vorheriger Studien in Adenokarzinomen signifikant gesteigert nachweisbar ist (Gabitass et al., 2011). In der Korrelation der quantitativen Daten mit den T-Stadien fiel auf, dass die TAN-Dichte im Bereich der Invasionsfront der Primärtumoren zunächst von T1 bis T2 ansteigt, aber von T2 bis T4 wieder abnimmt. Diese Befunde stimmen mit früheren Ergebnissen überein, die auf Tissue-Microarray-Daten basieren und zeigten, dass in KRK der UICC-Stadien I-III überwiegend recht dichte Granulozyteinfiltate nachzuweisen sind (Bindea et al., 2013), während sich eine signifikante Reduktion im Stadium IV zeigte. Dieses Phänomen deutet auf eine Veränderung des Immun-

zellmilieus während der Tumorprogression hin und zeigt, dass Tumor und Immunsystem in einem sehr dynamischen wechselseitigen Verhältnis stehen.

4.2 Tumorbiologische Funktion der TAN ist lokalisationsabhängig

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass TAN durch direkte oder antikörpervermittelte Zytotoxizität eine antitumorale Rolle übernehmen können. In diesen Studien wurde angenommen, dass die antitumorale Wirkung dieser sogenannten TAN-N1 vor allem durch die Interaktion mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Ogino et al., 2009, Waldner et al., 2006) vermittelt wird, unter anderem weil eine Lymphopenie in Zusammenhang mit einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium steht (Nind et al., 1973, Calman et al., 1975) und eine erhöhte Zahl tumorinfiltrierender Lymphozyten als Prädiktor für eine gute Prognose gilt (Ropponen et al., 1997). Andere Studien konnten jedoch spezifische tumorvermittelte Signale identifizieren, die einen protumoralen Effekt der sogenannten TAN-N2 erzeugen (Gregory et al., 2011). Die Tumorzellen können beispielsweise TAN stimulieren, Onkostatin M zu produzieren (Queen et al., 2005) und so über die Sekretion des potenten Angiogenese-Zytokins VEGF das Tumorstadium beschleunigen (Jablonska et al., 2010, Hofman 2010). Auch eine immunsuppressive und dadurch indirekt protumorale Wirkung der TAN-N2 konnte gezeigt werden (Dolcetti et al., 2010), da TAN in der Lage sind, die Aktivierung von T-Lymphozyten zu hemmen und zur Suppression einer antitumoralen Immunantwort beitragen (Schmielau et al., 2001, Pekarek et al. 1995). Diese teilweise widersprüchliche Datenlage kann durch meine im Folgenden dargestellten Ergebnisse weiter aufgeklärt werden.

4.2.1 Primärtumoren

Eine hohe TAN-Dichte im Bereich der Invasionsfront der Primärtumoren korrelierte mit einem niedrigeren UICC-Stadium und damit einem niedrigen Tumorstadium, einem niedrigen Nodalstadium und fehlenden Lebermetastasen. Als zusätzliches Zeichen einer geringeren Malignität dieser KRK fanden sich ebenfalls weniger Tumoren mit einer Lymphangiosis carcinomatosa. Diese Befunde stimmen mit früheren Daten überein, die gezeigt haben, dass höhere TAN-Dichten signifikant mit besseren klinischen Verläufen bei KRK-Patienten assoziiert sind (Galdiero et al., 2016). Einige vergleichbare Studien zeigten übereinstimmend einen prognostisch günstigeren Verlauf von Tumoren mit hohen TAN-Dichten (Berry et al. 2017). Diese Studien bewerteten jedoch die TAN-Dichte im gesamten Tumorgewebe, unabhängig von der jeweiligen Lokalisation der TAN und konnten daher keine Aussagen über die lokalisationsabhängige tumorbiologische Funktion der TAN treffen. Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Phänotypisierung von TAN liegt nahe, dass durch meine Daten die antitumoral wirksamen TAN-N1 im Bereich der Invasionsfront nachgewiesen wurden. Der für diese Korrelation verantwortliche Mechanismus bleibt jedoch schwer fassbar. Es wurde gezeigt, dass das entzündliche Begleitinfiltrat eines Tumors die Polarisierung von angeborenen Immunzellen beeinflussen kann (Di Caro et al., 2016). So wurde beispielsweise eine Aktivierung von Caspase-1 in myeloiden Suppressorzellen (MDSC) gezeigt, was zu einer Inflammasom-Aktivierung und IL-1 β -

Sekretion führt (Bruchard et al., 2013) und eine antitumorale Immunantwort mittels CD8-positiver T-Zellen auslöst (Ghiringhelli et al., 2009). Daten, die diese Effekte auch für TAN klar belegen stehen jedoch noch aus.

Auch in der statistischen Korrelation der intratumoralen TAN-Verteilung mit den klinisch-pathologischen Charakteristika ergaben sich signifikante Zusammenhänge, allerdings invers zu den oben beschriebenen Ergebnissen. Hier korrelierte der Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld im Tumorzentrum mit einem höheren Tumorstadium, einem höheren Nodalstadium und dem vermehrten Nachweis von Lebermetastasen und damit einem höheren UICC-Stadium sowie anderen Merkmalen eines aggressiven Karzinoms wie einer Lymphangiosis carcinomatosa, einer Infiltration von Perineuralscheiden und einer schlechteren Differenzierung. Außerdem korrelierte der Nachweis vermehrter TAN in weiteren Kompartimenten des Tumorzentrums (Stroma und luminal) ebenfalls mit einem höheren UICC-Stadium. Einziger Widerspruch ist der Befund, dass sich bei vermehrtem Nachweis von TAN im Stroma des Tumorzentrums und peritumoral weniger Fälle mit Lebermetastasen nachweisen ließen. Dies legt nahe, dass im Tumorzentrum (intraepithelial) die protumoral wirkenden TAN-N2 nachgewiesen wurden.

Die signifikanten Zusammenhänge des vermehrten intraepithelialen TAN-Nachweises im Tumorzentrum sowie den Kompartimenten Invasionsfront und peritumorales Stroma mit einer besseren Tumordifferenzierung (low grade) sind nicht ganz schlüssig und möglicherweise wiederum als Invasionsstrategie des Tumors zu werten, da in besser differenzierten KRK viele Fälle, in Tumoren mit höheren Grading (high-grade) wenige Fälle mit TAN gefunden wurden. Somit wird von den aggressiveren Tumoren anscheinend auch die Immunantwort stärker supprimiert.

Die kompartmentbezogene Auswertung des TAN-Gehalts (qualitativ und quantitativ) im Primärtumor unterstreicht die Bedeutung der räumlichen Verteilung der TAN im Hinblick auf ihre tumorbiologische Wirkung.

4.2.2 Metastasen

4.2.2.1 Lymphknotenmetastasen

Aus der signifikanten Korrelation vermehrter intraluminaler TAN im Zentrum von Lymphknotenmetastasen mit dem Tumor- und Nodalstadium ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die TAN in Lymphknotenmetastasen das tumorbiologische Verhalten der TAN im Primärtumor teilweise widerspiegeln. Dies deutet darauf hin, dass neutrophile Granulozyten auch in einer metastatischen Nische wirken können, wie vorangegangene Studien in einem Mausmodell zeigten (Granot et al., 2011, Wu et al., 2015). Dass sich bei jüngeren Patienten (< 71 Jahre) mehr Tumoren mit TAN im Bereich der Invasionsfront einer Lymphknotenmetastase finden ließen, ist möglicherweise Ausdruck des kompetenteren Immunsystems mit stärker antitumoral gerichteter Immunantwort dieser Patientengruppe. Mehr Tumoren mit TAN im Stroma des Tumorzentrums einer Lymphknotenmetastase fanden sich in den proximal (Zökum bis Colon descendens) gelegenen KRK, was sich durch ein

unterschiedliches Keimspektrum der Darmabschnitte mit dementsprechend unterschiedlichem Tumormikromilieu und durch die Ergebnisse einer Studie von Patel et al. erklären lässt, die zeigten, dass ein KRK des proximalen Kolons durchgängig mit einer verstärkten systemischen Entzündungsreaktion verbunden war (Patel et al., 2018), was sich hier in einer verstärkten granulozytären Infiltration der Lymphknotenmetastasen zeigt. Ein Rückschluss auf die tumorbiologische Wirkung dieser Granulozyten ist hier jedoch nicht möglich.

4.2.2.2 Lebermetastasen

Für die statistische Analyse der Korrelation von TAN in Lebermetastasen mit den klinisch-pathologischen Parametern ergaben sich weder in der qualitativen noch in der quantitativen Analyse signifikante Zusammenhänge, was wahrscheinlich in der niedrigen Fallzahl (n=100) begründet liegt.

4.3 TAN als prognostischer Parameter

Bereits in der Frühphase der Entstehung eines KRK kommt es typischerweise zu einem Anstieg einer bakteriellen Migration aus dem Darmlumen (Abreu et al., 2014), was eine Immunreaktion hervorruft und das Chemokinmilieu des Tumors beeinflusst. Unter anderem deshalb hat sich die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms als entscheidender Faktor für die Wirksamkeit einer Chemo- oder Immuntherapie erwiesen (Zitvogel et al., 2016). In Anbetracht der Schlüsselrolle von neutrophilen Granulozyten bei der Abwehr von Bakterien ist es hochwahrscheinlich, dass die Mikrobiomzusammensetzung die Fähigkeit der TAN beeinflusst, eine antitumorale Immunantwort auszuführen (Yatsunencko et al., 2012). Der Einfluss dieses, auch vom ethnischen Hintergrund abhängigen Mikrobioms könnte auch die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse einzelner Studien bezüglich der prognostischen Relevanz der TAN bei asiatischen Patienten erklären (Rao et al., 2012).

Die Vorhersage der Prognose von KRK-Patienten ist zudem aufgrund der Komplexität der molekularen Merkmale, der intra- und intertumoralen Heterogenität der Tumoren und der individuellen Einflussfaktoren wie beispielsweise der Zusammensetzung des Tumorbegleitinfiltrates schwierig. Das aktuell verwendete System wird daher zunehmend in Frage gestellt, da alternative prognostische und prädiktive Marker für die Auswahl der am besten geeigneten Therapie unberücksichtigt bleiben (Galon J et al., 2006).

Meinen bisher beschriebenen Ergebnissen entsprechend ergaben sich auch in den Überlebensanalysen Zusammenhänge mit dem Nachweis von TAN. Eine hohe TAN-Dichte im Bereich der Invasionsfront des Primarius korrelierte (nicht-signifikant) mit einem besseren tumorspezifischen Überleben, während der Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN im Tumorzentrum hochsignifikant mit einem schlechteren tumorspezifischen Überleben korrelierte. Die Cox-Regressionsanalyse ergab zwar, dass der alleinige Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN pro Gesichtsfeld im Tumorzentrum kein unabhängiger Prognoseparameter ist. Trotzdem unterstreicht die Beobachtung

die potentielle tumorbiologische Relevanz der TAN. Der Nachweis und die Menge an TAN korrelieren mit klinisch-pathologischen Parametern, dürfen aber nicht als isolierter Faktor bewertet werden. Dies liegt vermutlich an den komplexen Interaktionen der TAN mit den Tumorzellen und den anderen Zellen des Tumorbegleitinfiltrates.

4.4 Einschränkungen und Ausblick

Die verwendete anti-MPO-Immunfärbung ist nicht uneingeschränkt zur Darstellung der Granulozyten geeignet, weil MPO in geringerem Maße auch im Zytoplasma von Monozyten und gewebständigen Makrophagen nachgewiesen werden kann (Klebanoff, 2005). Daher musste eine Fehlinterpretation minimiert werden, indem anhand der Zytomorphologie eines segmentkernigen Granulozyten nur klar als TAN erkennbare Zellen gewertet wurden.

Die untersuchte Fallzahl ist mit 214 untersuchten Tumoren möglicherweise zu gering, um eine belastbare Aussage für die Gesamtbevölkerung zu treffen. Durch die Auswahl von Fällen, deren klinisch-pathologischen Parameter möglichst genau der epidemiologischen Wirklichkeit entsprechen, sind die Ergebnisse dennoch als repräsentativ zu werten.

Außerhalb von experimentellen Studien konnten zudem keine klaren Unterscheidungskriterien der beiden TAN-Phänotypen bestimmt werden. In Forschungsarbeiten über TAN als Ziele für die Krebstherapie wurde die Frage aufgeworfen, ob die Unterschiede zwischen TAN-N1 und TAN-N2 aufgrund getrennter Transkriptionen entstehen oder änderbaren Aktivierungszuständen der TAN entsprechen, was Gegenstand aktueller Forschung ist (Gregory et al., 2011, Fridlender et al., 2009). Auch die möglicherweise prognosebestimmenden Interaktionen der TAN mit anderen Zellen des inflammatorischen Tumorbegleitinfiltrates und den Tumorzellen sind aktuell nicht genau charakterisiert (Governa et al., 2017).

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Adenokarzinom (KRK) ist der zweithäufigste maligne Tumor bei Männern und Frauen, bei dem gelegentlich ein auffällig dichtes, inter- und intratumoral ungleich verteiltes Infiltrat neutrophiler Granulozyten nachweisbar ist. Frühere Studien fanden Hinweise, dass tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TAN) tumorbiologisch relevant sind. In dieser Dissertation sollte die Hypothese geprüft werden, dass die Häufigkeit und das Verteilungsmuster von TAN mit klinisch-pathologischen Eigenschaften des KRK korreliert. Hierzu wurden Großflächenschnitte von 214 kolorektalen Adenokarzinomen, 140 korrespondierenden Lymphknoten- und 100 korrespondierenden Lebermetastasen mittels Myeloperoxidase-Immunfärbung zunächst qualitativ hinsichtlich der Menge und des Verteilungsmusters von TAN untersucht. Unterschieden wurden die Kompartimente Tumoroberfläche, Tumorzentrum (intraepithelial, Stroma und luminal), Invasionsfront und peritumoral. Der Nachweis von mindestens sieben TAN pro Gesichtsfeld im Tumorzentrum bei 200-facher Vergrößerung (Sehfeldzahl 20) wurde als positiv gewertet. Für eine nachfolgende quantitative Auswertung wurden die Großflächenschnitte hochauflösend digitalisiert. In jedem KRK wurden mittels farbiger Polygone die Kompartimente Tumoroberfläche, Tumorzentrum, Invasionsfront und peritumorales Gewebe definiert, sodass mittels der Bildanalysesoftware Definiens® die TAN-Dichte (TAN/mm²) objektiv bestimmt werden konnte. In den statistischen Auswertungen ließen sich zunächst signifikant unterschiedliche TAN-Mengen in den untersuchten Kompartimenten nachweisen, was für eine spezifische Anreicherung dieser Zellpopulation in bestimmten Teilen des KRK und gegen ein zufälliges Begleitinfiltrat spricht. Der TAN-Nachweis und die TAN-Dichte in den einzelnen Kompartimenten wurden dann mit dem Tumorstadium, verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern und dem Überleben korreliert. Der qualitative Nachweis von mehr als sieben intraepithelialen TAN im Tumorzentrum korrelierte signifikant mit einer höheren T-, einer höheren N-Kategorie, dem Nachweis von Lebermetastasen, einem höheren UICC-Stadium und einem kürzeren Gesamt- sowie tumorspezifischen Überleben. Der quantitative Nachweis von mehr als 431 TAN/mm² (> Median) im Bereich der Invasionsfront korrelierte dagegen signifikant mit einer niedrigeren T-, einer niedrigeren N-Kategorie, dem Fehlen von Lebermetastasen und einem niedrigeren UICC-Stadium sowie nicht-signifikant mit einem längeren Gesamt- sowie tumorspezifischen Überleben.

Meine Ergebnisse belegen die tumorbiologische Relevanz von TAN im KRK und zeigen, dass ihre prognostische Funktion lokalisationsabhängig variiert. Während die intraepithelialen TAN im Tumorzentrum einen protumoralen Effekt haben, wirken die TAN im Bereich der Invasionsfront antitumoral. In weiterführenden Studien sollte geklärt werden, durch welche komplexen Interaktionen TAN Einfluss auf die Tumorbiologie nehmen und in welcher Form TAN bei einer personalisierten Immuntherapie nützlich sein können.

6. Literaturverzeichnis

Abreu MT, Peek RM Jr. (2014): Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology*, 146, 1534–46

Ahnen D. J., Feigl, P., Quan G., Fenoglio-Preiser C., Lovato L. C., J., Bunn P. A., Stemmerman G., Wells J. D., Macdonald J. S., Meyskens F. L. J. (1998): K-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behaviour of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res*, 58, 1149-1158

Almendingen K., Hofstad B., Vatn M. H. (2003): Does a family history of cancer increase the risk of occurrence, growth, and recurrence of colorectal adenomas? *Gut*, 52, 747-751

Andzinski L., Wu C.-F., Lienenklaus S., Kröger A., Weiss S., Jablonska J. (2015): Delayed apoptosis of tumor associated neutrophils in the absence of endogenous IFN- β , *International Journal of Cancer*, 136, 572–583

Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, et al. (2014): Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin Cancer Res*, 20, 1891–9

Antonio N., Bonnelykke-Behrndtz M. L., Ward L. C. et al. (2015): The wound inflammatory response exacerbates growth of pre-neoplastic cells and progression to cancer. *The EMBO Journal*, 34, 2219–2236

Arnhold J, Flemmig J. (2010): Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch Biochem Biophys*, 500, 92-106

Arnold J., De Boer E. C., O'Donnell M. A., Böhle A., Brandau S. (2004): Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon- γ . *Journal of Immunotherapy*, 27,116–123

Arteaga C. L. (2002): Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist*, 7, supplement 4, 31–39

Askling J., Dickman P. W., Karlen P., Brostrom O., Lapidus A., Lofberg R., Ekblom A. (2001): Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Lancet*, 357, 262-266

Atreya I., Neurath M.F. (2008): Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies, *Expert Rev Anticancer Ther*, 8, 561-572

Bainton D.F., Ulyot J.L., Farquhar M.G (1971): The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med*, 134, 907-934

Barcellos-Hoff M. H., Dix T. A. (1996): Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- β 1, *Molecular Endocrinology*, 10, 1077-1083

Bell D. A., Stephens D. A., Castranio T., Umbach D. M., Watson M., Deakin M., Elder J., Handrickse C., Duncan H. und Strange R.C. (1995): Polyadenylation polymorphism in the acetyltransferase 1 gene (NAT1) increases risk of colorectal cancer. *Cancer Res*, 55, 3537-3542

Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H (2010): Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*, 53, 57-64

Berry RS, Xiong MJ, Greenbaum A, Mortaji P, Nofchissey RA, et al. (2017): High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. *PLOS ONE* 12(12)

Bertz J., Hentschel S., Hundsdörfer G., Kaatsch P., Katalinic A., Lehnert M., Schön D., Stegmaier C., Ziegler H. (2004): Krebs in Deutschland. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland

Bierie B., Moses H. L. (2010): Transforming growth factor beta (TGF- β) and inflammation in cancer, *Cytokine and Growth Factor. Reviews*, 21, 49-59

Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. (2013): Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*, 39, 782-95

Boland C., Thibodeau S., Hamilton S., Sidransky D., Eshleman J., Burt R., Meltzer S., Bigas-Rodriguez M., Fodde R., Ranzani G., Srivastava S. (1998): A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58, 5248-5257

Borresen A. L., Lothe R. A., Meling G. I., Lystad S., Morrison P., Lipford J., Kane M. F., Rognum T. O., Kolodner, R. D. (1995): Somatic mutations in the hMSH2 gene in microsatellite unstable colorectal carcinomas. *Hum Mol Genet*, 4, 2065-2072

Bos A., Wever R., Roos D. (1978): Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. *Biochim Biophys Acta*, 525, 37-44

Bos, J. L. (1998): ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689

Bouzourene H., Gervaz, P., Cerottini, J. P., Benhattar, J., Chaubert, P., Saraga, E., Pampallona, S., Bosman, F. T., Givel, J. C. (2000): p53 and K-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 36, 1008-1015

Brinkmann V., Zychlinsky, A (2007): Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*, 5, 577-582

Bronner C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M. F., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., Tannergard, P., Bollag, R. J., Godwin, A. R., Ward, D. C., Nordenskjold, M., Fishel, R., Kolodner, R. D. and Liskay, R. M. (1994): Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368, 258-261

Bruchard M, Mignot G, Derangere V, et al. (2013): Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med*, 19, 57-64

Bubb V. J., Curtis, L. J., Cunningham, C, Dunlop, M. G., Carothers, A. D., Morris, R. G., White, S., Bird, C. C. and Wylie, A. H. (1996): Mikrosatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene*, 12, 2641-2649

Bubenik J., Perlmann P, Helmstein K, Moberger G. (1970): Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas. *International Journal of Cancer*, 5, 310-319

Cahill D., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G., Willson, J., Markowitz, S. , Kinzler, K. and Vogelstein, B. (1998): Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, 392, 300-303

Calman KC. (1975): Tumour immunology and the gut. *Gut*, 16, 490-9

Carethers J. M., Hawn, M. T., Greenson, J. K., Hitchcock, C. L. and Boland, C. R. (1998): Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology*, 114, 1188-1195

Cassatella M. A. (1999): Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound, *Advances in Immunology*, 73, 369-509

Cavallo F., Giovarelli M., Gulino A. et al. (1992): Role of neutrophils and CD4+ T lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene, *The Journal of Immunology*, 149, 3627-3635

- Cerottini** J. P., Caplin, S., Sagara, E., Givel, J. C. and Benhattar, J. (1998): The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg*, 175, 198-202
- Chang** G.J., et al. (2007): Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst*, 99 (6), 433-41
- Christoffersson** G., Vågesjö E., Vandooren J. et al. (2012): VEGF-A recruits a proangiogenic MMP9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue, *Blood*, 120, 4653–4662
- Citarda** F., Tomaselli, G., Capocaccia, R., Barcherini, S. and Crespi, M. (2001): Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut*, 48, 812-815
- Grivicich** I., Mans D.R.A., Peters G.J., Schwartzmann G. (2001): Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(9), 1087-1103
- Davies** H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 949-54
- Di Caro** G, Cortese N, Castino GF et al (2016): Dual prognostic significance of tumour-associated macrophages in human pancreatic adenocarcinoma treated or untreated with chemotherapy. *Gut*, 65, 1710-1720
- Di Nicolantonio** F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S (2008): Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, 5705-12
- Dissemond** J., Weimann T. K., Schneider L. A. et al. (2003): Activated neutrophils exert antitumor activity against human melanoma cells: reactive oxygen species-induced mechanisms and their modulation by granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. *Journal of Investigative Dermatology*, 121, 936–938
- Dolcetti** L. et al. (2010): Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur.J. Immunol.*, 40, 22–35
- Droeser** RA, Hirt C, Eppenberger-Castori S, et al. (2013): High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS One*, 8, 64814

Dvorak HF (1986): Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315, 1650–1659

Eckardt V.F., Bernhard G. (1997): Nachsorge beim kolorektalen Karzinom. Eine Analyse von Effektivität und Kosten. *Deutsches Ärzteblatt*, 94, A456-62

Eiserich Jason P., Baldus Stephan, Brennan Marie-Luise, Wenxin Ma, Chunxiang Zhang, Tousson Albert, Castro Laura, Lusic Aldons J., Nauseef William M., White C. Roger, Freeman Bruce A. (2002): Myeloperoxidase, a Leukocyte-Derived Vascular NO Oxidase. *Science*, 28, 2391-2394

Ekbom A., Helmick C., Zack M., Adami, H. O. (1990a): Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet*, 336, 357-359

Ekbom A., Helmick C., Zack, M., Adami, H. O. (1990b): Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*, 323, 1228-1233

Faivre J., Dancourt V., Lejeune C., Tazi M. A., Lamour J., Gerard D., Dassonville F., Bonithon-Kopp C. (2004): Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology*, 126, 1674-1680

Fearon E. R., Vogelstein B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767

Florey O., Haskard D. O. (2009): Sphingosine 1-phosphate enhances Fcγ receptor-mediated neutrophil activation and recruitment under flow conditions. *The Journal of Immunology*, 183, 2330–2336

Forslund A., Lonnroth C., Andersson M., Brevinge H., Lundholm, K. (2001): Mutations and allelic loss of p53 in primary tumor DNA from potentially cured patients with colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*, 19, 2829-2836

Fridlender Z. G., Sun J., Kim S. et al. (2009): Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-β: 'N1' versus 'N2' TAN. *Cancer Cell*, 16, 183–194

Fuchs C. S., Giovannucci E. L., Colditz G. A., Hunter D. J., Speizer F. E., Willett W. C. (1994): A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 331, 1669-1674

Gabitass R.F., Annels N.E., Stocken D.D. et al. (2011): *Cancer Immunol Immunother*, 60: 1419

Galdiero M. R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A. et al. (2013): Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer, *Immunobiology*, 218, 1402-1410

Galdiero M. R., Bianchi P., Grizzi F., Di Caro G., Basso G., Ponzetta A., Bonavita E., Barbagallo M., Tartari S., Polentarutti N., Malesci A., Marone G., Roncalli M., Laghi L., Garlanda C., Mantovani A., Jaillon S. (2016): Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 139, 446-456

Ganz T. (1999): Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(5), 390-395

Ghadirian P., Lacroix A., Maisonneuve P., Perret C., Potvin C., Gravel D., Bernard D., Boyle P. (1997): Nutritional factors and colon carcinoma: a case-control study involving French Canadians in Montreal, Quebec, Canada. *Cancer*, 80, 858-864

Ghiringhelli F., Apetoh L., Tesniere A et al. (2009): Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*, 15, 1170-8

Giovannucci E. (2003): Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health*, 12, 173-182

Glimelius B., Hoffmann R. N., Graf W. (1994): Quality of life during chemotherapy in patients with symptomatic advanced colorectal cancer. *Cancer*, 73, 556-562

Goel A., Arnold C. N., Niedzwiecki D., Chang D. K., Ricciardiello L., Carethers J. M., Dowell J. M., Wasserman L., Compton C., Mayer R. J., Bertagnolli M. M., Boland C. R. (2003): Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res*, 63, 1608-1614

Governa V., Trella E., Spagnoli G. C. et al. (2017): The Interplay Between Neutrophils and CD8+T-Cells Improves Survival in Human Colorectal Cancer, *Clin Cancer Res*. 2017, 23: 3847-3858

Grady W. M. (2004): Genomic instability and colon cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23, 11-27

Graeven U., Schmiegel W. (2000): Das Kolonkarzinom. *Internist*, 41, 876-885

Grady W. M. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23, 11-27

Granot Z., Henke E, Comen EA et al. (2011): Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the pre-metastatic lung. *Cancer Cell*, 20, 300-14

Granot Z., Jablonska J. (2015): Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators of Inflammation*, vol. 2015, Article ID 701067

Gregory A.D. et al. (2011): Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, 71, 2411–2416

Grenier A., Dehoux M., Boutten A. et al. (1999): Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*, 93, 1413–1421

Grotendorst G. R., Smale G., Pencev D. (1989): Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils, *Journal of Cellular Physiology*, 140, 396–402

Grunewald M., Avraham I., Dor Y. et al. (2006): VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 124, 175–189

Gu F.-M., Li, Q. Q.-L. et al. (2011): IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma, *Molecular Cancer*, 10, 150

Halazun K. J., Hardy M. A., Rana A. A. et al. (2009): Negative impact of neutrophil-lymphocyte ratio on outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgery*, 250, 141–151

Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn, C. C. (1998): Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *Blood*, 92(9), 3007–3017

Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646–674

Harris E.S., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A. (2000): The leukocyte integrins. *J Biol Chem*, 275, 23409–23412

Herman J. G., Umar A., Polyak K., Graff J. R., Ahuja N., Issa J. P., Markowitz S., Willson J. K., Hamilton S. R., Kinzler K. W., Kane M. F., Kolodner R. D., Vogelstein B., Kunkel T. A., Baylin, S. B. (1998): Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 6870–6875

Hofman PM. (2010): Pathobiology of the neutrophil intestinal epithelial cell interaction: role in carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 16, 5790–800

Iliopoulos D., Ernst C., Steplewski Z., et al. (1989): Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides: *Journal of the National Cancer Institute*, 81, 440–444

Jablonska J., Leschner S, Westphal K, et al. (2010): Neutrophils responsive to endogenous IFN beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Investig*, 120, 1151–64

- Jensen** H. K., Donskov F., Marcussen N., Nordmark M., Lundbeck F., H. von der Maase (2009): Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 27, 4709–4717
- Jing** Y., Ma N., Fan T. et al. (2011): Tumor necrosis factor-alpha promotes tumor growth by inducing vascular endothelial growth factor. *Cancer Investigation*, 29, 485–493
- Kane** M. F., Loda M., Gaida G. M., Lipman J., Mishra R., Goldman H., Jessup J. M., Kolodner, R. (1997): Methylation of the hMLH1 promoter corellates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*, 57, 808-811
- Kerfoot** S. M., Raharjo E., Ho M. et al. (2001): Exclusive neutrophil recruitment with oncostatin M in a human system. *The American Journal of Pathology*, 159, 1531–1539
- Kim** H., Jen J., Vogelstein, B., Hamilton, S. R. (1994): Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*, 145, 148-156
- Klebanoff** S. J. (1999): Myeloperoxidase. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111, 383-389
- Klebanoff** S. J. (2005): Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77, 598-625
- Knudson** A. G. J., Meadows A. T., Nichols W. W., Hill, R. (1976): Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N Engl J Med*, 295, 1120-1123
- Kruger** P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, et al. (2015) Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLOS Pathogens* 11(3), e1004651
- Kushner** B. H., Cheung N.-K. V. (1992): Absolute requirement of CD11/CD18 adhesion molecules, FcRII and the phosphatidylinositol-linked FcRIII for monoclonal antibody-mediated neutrophil antihuman tumor cytotoxicity, *Blood*, 79, 1484–1490
- Leitlinienprogramm** Onkologie: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Version 2.0, 2017
- Lord** BI, Bronchud MH, Owens S, et al. (1989): The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony stimulating factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 9499–503
- Luo** J.-L., Maeda S., Hsu L.-C., Yagita H., Karin M. (2004): Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*, 6, 297–305

- Lynch** H. T., Smyrk T. C., Watson P., Lanspa S. J., Lynch J. F., Lynch P. M., Cavalieri R. J., Boland C. R. (1993): Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*, 104, 1535-1549
- Markowitz** S., Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan R. S., Zborowska E., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1995): Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268, 1336-1338
- McCourt** M., Wang J. H., Sookhai S., Redmond H. P. (2001): Activated human neutrophils release hepatocyte growth factor/scatter factor, *European Journal of Surgical Oncology*, 27, 396-403
- McMahon** G. (2000): VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis, *Oncologist*, 5, 3-10
- Patel** M., Stephen T McSorley, James H Park, Campbell S D Roxburgh, Joann Edwards, Paul G Horgan and Donald C McMillan (2018): The relationship between right-sided tumour location, tumour microenvironment, systemic inflammation, adjuvant therapy and survival in patients undergoing surgery for colon and rectal cancer. *British Journal of Cancer*, 118, 705-712
- Moore** R. J., Owens D. M., Stamp G. et al. (1999): Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nature Medicine*, 5, 828-831
- Nauseef** WM, Borregaard N. (2014): Neutrophils at work. *Nat Immunol.*, 15, 602-611
- Nemunaitis** J., Cox J., Meyer W., Courtney A., Mues, G. (1997): Irinotecan hydrochloride (CPT-11) resistance identified by K-ras mutation in patients with progressive colon cancer after treatment with 5-fluorouracil (5-FU). *Am J Klin Oncol*, 20, 527-529
- Nind** AP, Nairn RC, Rolland JM, et al. (1973): Lymphocyte anergy in patients with carcinoma. *Br J Cancer*, 28, 108-17
- Norat** T., Lukanova, A., Ferrari, P. and Riboli, E. (2002): Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*, 98, 241-256
- Normanno** N., De Luca A., Bianco C. et al. (2006): Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366, 2-16
- Nowell**, P. C. (1976): The clonal evolution of tumour cell populations. *Science*, 194, 23-73
- Ogino** S, Nosho K, Irahara N, et al. (2009): Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*, 15, 6412-20

Parsons R., Myeroff L. L., Liu B., Willson J. K., Markowitz S. D., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1995): Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*, 55, 5548-5550

Pattison DI, Davies MJ, Hawkins CL (2012): Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. *Free Radic Research*, 46:8, 975-995

Pekarek L.A. et al. (1995): Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.*, 181, 435-440

Peltomaki P. (2003): Role of DNA Mismatch Repair Defects in the Pathogenesis of Human Cancer. *J Clin Oncol*, 21, 1174-1179

Pfannschmidt J, Muley T, Hoffmann H, Dienemann H. (2003): Prognostic factors and survival after complete resection of pulmonary metastases from colorectal carcinoma: Experiences in 167 patients, *J Thorac Cardiovasc*, 126(3), 732-9

Pinnix I.B., Guzman G.S., Bonkovsky H.L., Zaki S.R., Kinkade J.M. (1994): The Post-translational Processing of Myeloperoxidase Is Regulated by the Availability of Heme, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 447-458

Pricolo V. E., Finkelstein S. D., Wu T.-T., Keller G., Bakker A., Swalsky P. A., Bland K. I. (1996): Prognostic value of TP53 and K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am J Surg*, 171, 41-46

Queen M. M., Ryan R. E., Holzer R. G., Keller-Peck C. R., Jorcyk C. L. (2005): Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Research*, 65, 8896-8904

Rao HL, Chen JW, Li M, et al (2012): Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One*, 7, 30806

Reid M. E., Marshall J. R., Roe D., Lebowitz M., Alberts D., Battacharyya A. K., Martinez M. E. (2003): Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 1006-1011

Reid MD, Basturk O, Thirabanjasak D, et al. (2011): Tumor-infiltrating neutrophils in pancreatic neoplasia. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, 24(12), 1612-1619

Reiman J.M. et al. (2007): Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.*, 17, 275–287

Roncucci L, Mora E, Mariani F, et al (2008): Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 2291–7

Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, et al. (1997): Prognostic value of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *J Pathol*, 182, 318–24

Roth A.D. et al. (2010): Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*, 28(3), 466-74

Rüschoff J., Bocker T., Schlegel J., Stumm G., Hofstaedter F. (1995): Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. *Virchows Arch*, 426, 215-222

Sainson R. C. A., Johnston D. A., Chu H. C. et al. (2008): TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood*, 111, 4997–5007

Salim H., Hamid HKS, Mekki SO, Suleiman SH, Ibrahim SZ (2010): Colorectal carcinoma associated with schistosomiasis: a possible causal relationship. *World Journal of Surgical Oncology*, 8-68, 1477-7819

Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. (1995): Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 19, 183–232

Salovaara R., Loukola A., Kristo P., Kaariainen H., Ahtola H., Eskelinen M., Harkonen N., Julkunen R., Kangas, E., Ojala, S., Tulikoura, J., Valkamo, E., Jarvinen, H., Mecklin, J. P., Aaltonen, L. A. and de la Chapelle, A. (2000): Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18, 2193-2200

Schmiegel W., Pox C., Adler G., Fleig W., Fölsch U. R., Frühmorgen P., Graeven U., Hohenberger W., Holstege A., Junginger T., Kühlbacher T., Porschen R., Propping P., Riemann J. F., Sauer R., Sauerbruch T., Schmoll H. J., Zeitz M., Selbmann H.-K. (2004): Results of an Evidence-Based Consensus Conference. *Gastroenterol* 42, 1129-1177

Schmielau J. et al. (2001): Activated granulocytes and granulocyte derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.*, 61, 4756–4760

- Schneider R.** (2012): Das Lynch-Syndrom-Epidemiologie, Klinik, Genetik, Screening, Therapie. Zeitschrift für Gastroenterologie, 50, 217–225
- Scholmerich J.** (1996): Sense and nonsense in after-care of colorectal carcinoma. Med Klin (Munich), 91(6), 420-427
- Secco G.B. et al.** (2002): Efficacy and cost of risk-adapted follow-up in patients after colorectal cancer surgery: a prospective, randomized and controlled trial. Eur J Surg Oncol, 28(4), 418-23
- Segal A.W., Geisow M., Garcia R., Harper A., Miller R** (1981): The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. Nature, 290, 406-409
- Senger D. R.** (2010): Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. Molecular Biology of the Cell, 21, 377–379
- Sionov R. V., Fridlender Z. G., Granot Z.** (2015): The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. Cancer Microenvironment, 8, 125-158
- Smith J. A.** (1994): Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. J Leukoc Biol, 56(6), 672–686
- Soussi T.** (2000). p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: A Review. Cancer Res, 60 (7), 1777-1788
- Stoppacciaro A., Melani C., Parenza M. et al.** (1993): Regression of an established tumor genetically modified to release granulocyte colony-stimulating factor requires granulocyte-T cell cooperation and T cell-produced interferon γ . Journal of Experimental Medicine, 178, 151-161
- Tecchio C., Scapini P., Pizzolo G., Cassatella M. A.** (2013): On the cytokines produced by human neutrophils in tumors, Seminars in Cancer Biology, 23, 159–170
- Terry P., Giovannucci E., Michels K. B., Bergkvist L., Hansen H., Holmberg L., Wolk A.** (2001): Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. J Natl Cancer Inst, 93, 525-533
- Thibodeau S. N., Bren G., Schaid D.** (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science, 260, 816-819
- Towler B, Irwig L, Glasziou P, Kewenter J, Weller D, Silagy C** (1998): A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemocult. British Medical Journal, 317, 559-565

- Trellakis S.**, Bruderek K., Dumitru C. A. et al. (2011): Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *International Journal of Cancer*, 129, 2183–2193
- Treska V.**, Topolcan O, Stanislav K, Liska V, Holubec L (2009): Preoperative tumor markers as prognostic factors of colorectal liver metastases. *Hepatogastroenterology*, 56, 317–320
- Tzeng H.-E.**, Tsai C.-H., Chang Z.-L. et al. (2013): Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma, *Biochemical Pharmacology*, 85, 531–540
- Uhrbom L.**, Hesselager G., Nistér M., Westermarck B. (1998): Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus, *Cancer Research*, 58, 5275–5279
- Valerius T.**, Repp R., M. de Wit T. P. et al. (1993): Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Blood*, 82, 931–939
- Vogelstein B.**, Fearon E. R., Hamilton S. R., Kern S. E., Preisinger A. C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A. M., Bos J. L. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319, 525–532
- Waldner M.**, Schimanski CC, Neurath MF (2006): Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World J Gastroenterol*, 12, 7233–8
- Wan PT,** Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D (2004): Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116, 855–67
- Wang L,** Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN (2003): BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res*, 63, 5209–12
- Wei E. K.**, Giovannucci E., Wu K., Rosner B., Fuchs C. S., Willett W. C., Colditz G. A. (2004): Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer*, 108, 433–442
- Wenger R. H.** (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal*, 16, 1151–1162
- Whalen G. F.** (1990): Solid tumours and wounds: transformed cells misunderstood as injured tissue? *The Lancet*, 336, 1489–1492

Winawer S. J., Fletcher R. H., Rex D., Bond J., Burt R., Ferrucci J., Ganiats T., Levin T., Woolf S., Johnson D., Kirk L., Litin S., Simmang, C. (2003): Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*, 124, 544-560

Winawer S. J., Zauber A. G., Gerdes H., O'Brien M. J., Gottlieb L. S., Sternberg S. S., Bond J. H., Waye J. D., Schapiro M., Panish J. F. (1996): Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Work Group. *N Engl J Med*, 334, 82-87

Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ (2000): Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*, 7, 53-8

Wittekind C., Wagner C. (2017): TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 8. Aufl.

Wojtowicz-Praga S. (2003): Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- β inhibitors. *Investigational New Drugs*, 21, 21-32

Wright C. M., Dent O. F., Newland R. C., Barker M., Chapuis P. H., Bokey E. L., Young J. P., Leggett B. A., Jass J. R., Macdonald G. A. (2005): Low level microsatellite instability may be associated with reduced cancer specific survival in sporadic stage Colorectal carcinoma. *Gut*, 54, 103-108

Wu C.-F., Andzinski L., Kasnitz N. et al. (2015): The lack of type I interferon induces neutrophil-mediated pre-metastatic niche formation in the mouse lung. *International Journal of Cancer*, 137, 837-847

Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. (2012): Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222-7

Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B, Kroemer G. (2016): Microbiome and anticancer immunosurveillance. *Cell*, 165, 276-87

Zivkovic M., Poljak-Blazi M., Egger G., Sunjic S. B., Schaur R. J., Zarkovic N. (2005): Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. *BioFactors*, 24, 305-312

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. C. Röcken, Leiter des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel herzlich für die

Möglichkeit, dieses spannende Projekt durchführen zu können. Auf seine persönliche Betreuung und professionelle Unterstützung in allen praktischen und theoretischen Fragen konnte ich jederzeit zählen.

Für die Hilfe bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs und der Durchführung der immunpathologischen Färbungen bedanke ich mich bei den medizinisch-technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, besonders bei Sandra Krüger.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper, Leiter der Sektion Hämatopathologie am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel und der Kinder-Krebs-Initiative Buchholz/Holm-Seppensen (KKI) für die Möglichkeit das Bildanalyse-System Definiens® nutzen zu können.

Mein Dank gilt in besonderer Weise auch Herrn Dr. rer. medic. H. M. Behrens für seine geduldige und professionelle Hilfe bei der Durchführung der Bildauswertungen und der statistischen Analyse der ermittelten Daten.

Das Layout dieser Dissertation wurde mit professioneller und herzlicher Unterstützung von Tanja Schweitzer entwickelt. Dafür bin ich ihr sehr dankbar. Bernadette Heinrich danke ich für Ihre humorvolle und zuvorkommende Hilfe bei der Erstellung einer zeichnerischen Darstellung eines Granulozyten.

Abschließend danke ich meinen Eltern für die fortwährende Hilfe während meiner gesamten Ausbildung und weit darüber hinaus. Ganz besonders danke ich meiner Frau Joana Vondung für die verständnisvolle Entlastung und ihre liebevolle Unterstützung in jeder Phase der Dissertation.

Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwaneerweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. med. Christoph Röcken
UKSH Kiel
Institut für Pathologie
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 12
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 0431 / 500-14191
Telefax 0431 / 500-14195
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 16. Mai 2017

AZ: D 468/17 (bitte stets angeben)
Studienplan: Bedeutung neutrophiler Granulozyten bei kolorektalen und gastralen Karzinomen
Anschreiben und Projektbeschreibung v. 01.05.17; Basisformular für einen Ethikantrag v. 01.05.17

Antragsteller und Studienleiter: Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie, UKSH, Campus Kiel
Antrag vom: 01. Mai 2017 (Eingang: 03. Mai 2017)

Sehr geehrter Herr Kollege Röcken,

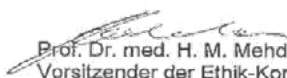
wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.
3. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission