

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor : Prof. Dr. med. Horst Nizze

**Neoadjuvante Radiochemotherapie des  
Rektumkarzinoms –  
Tumorregression und Veränderungen an  
mesorektalen Lymphknoten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Michael Wöhlke, geb. am 11.09.1981 in Schwerin  
aus Rostock

Rostock, 11.07.2007

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

Referent: PD Dr. med. Friedrich Prall

1. Gutachter: PD Dr. med. Friedrich Prall  
OA am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer Fietkau  
Bis 2007 Direktor der Klinik für Strahlentherapie des  
Universitätsklinikums Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Frank Dombrowski  
Direktor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums  
Greifswald

Tag der  
Verteidigung: 02.04.2008

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b> .....	<b>1</b>
1.2	Eine neoadjuvante Radiochemotherapie senkt die Lokalrezidivrate. ....	2
1.3	Rektumkarzinome sprechen unterschiedlich auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie an.....	2
1.4	Regredientes Tumorgewebe wird durch eine Tumornarbe „ersetzt“.....	3
1.5	Fehlende Wirkung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf die Metastasierungsrate .....	4
1.6	Eine Tumorummunabwehr kann eine Metastasierung verhindern.....	4
<b>2</b>	<b><i>ZIELSETZUNGEN</i></b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b><i>MATERIAL UND METHODEN</i></b> .....	<b>8</b>
3.1	Patientenkollektive.....	8
3.2	Neoadjuvante Radiochemotherapie .....	10
3.3	Operation .....	11
3.4	Pathomorphologische Untersuchung des Operationspräparates.....	12
3.4.1	Ausmessen der Tumorkomplexe .....	12
3.4.2	Klassifikation der Tumorregression .....	13
3.4.3	Interobserverstudie .....	20
3.4.4	Tumornarbe und Rekonstruktion des Tumorstadiums vor der neoadjuvanten Radiochemotherapie.....	20
3.5	Aufarbeitung und Untersuchung der mesorektalen Lymphknoten.....	21
3.5.1	Größenbestimmung der Lymphknoten .....	21
3.5.2	Untersuchungen von immunhistochemisch angefärbten Immunzellen .....	21
3.6	Statistik .....	24
<b>4</b>	<b><i>ERGEBNISSE</i></b> .....	<b>27</b>
4.1	Tumorregressionsgrad.....	27
4.2	Ergebniskorrelation in der Interobserverstudie .....	28
4.3	Tumorantwort in Abhängigkeit vom therapeutischen Regime .....	28
4.4	Tumornarbe und Rekonstruktion des prätherapeutischen Tumorstadiums ....	29
4.5	Unterschiedliche Lymphknotenmorphologie und Dichten von Immunzellen ..	30
<b>5</b>	<b><i>DISKUSSION</i></b> .....	<b>36</b>
5.1	Der Tumorregressionsgrad beschreibt den Behandlungseffekt. ....	36

5.1.1	Der Tumorregressionsgrad bei verschiedenen neoadjuvanten Protokollen .....	36
5.1.2	Reproduzierbarkeit der GR-Klassifikation .....	37
5.1.3	Der Tumorregressionsgrad als prognostischer Parameter .....	38
5.1.4	Konsequenz für die Praxis .....	39
<b>5.2</b>	<b>Durch die Tumornarbe lässt sich das prätherapeutische Tumorstadium rekonstruieren. ....</b>	<b>40</b>
<b>5.3</b>	<b>Die neoadjuvante Radiochemotherapie bewirkt Veränderungen der mesorektalen Lymphknoten. ....</b>	<b>42</b>
5.3.1	Veränderung der Lymphknotenarchitektur .....	42
5.3.2	Veränderung der Immunzell-Zusammensetzung .....	43
5.3.3	Risikostratifizierung .....	49
5.3.4	Ausblick .....	51
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>THESEN .....</b>	<b>65</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CD	Cluster of differentiation
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
5-FU	5-Fluorouracil
GR	grade of regression
HTL	T-Helfer-Lymphozyten
MHC	Major histocompatibility complex
MPF	median power field, Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen

# **1 Einleitung**

Das kolorektale Karzinom ist der zweithäufigste maligne Tumor des Menschen in Mitteleuropa. Im Jahre 2002 erkrankten daran in Deutschland 70.000 Bürger, 28.000 verstarben tumorbedingt [1]. Über 60% der kolorektalen Karzinome sind *Rektumkarzinome*.

Die radikale Resektion des Tumors mit totaler Mesorektumexzision [2, 3] ist die Basistherapie für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom [4, 5]. Durch eine zusätzliche adjuvante Radiochemotherapie konnte die lokale Tumorkontrolle gegenüber der alleinigen chirurgischen Behandlung verbessert werden [6, 7]. Eine Operation mit nachfolgender, *adjuvanter* Radiochemotherapie galt in den 90er Jahren als Standardtherapie für Patienten mit Tumoren mit wandüberschreitender Ausbreitung und/oder regionärer Lymphknotenmetastasierung (UICC-Stadium II und III) [8]. Derzeit zeichnet sich ein Wandel ab: In der großen deutschen Studie der Arbeitsgruppe Rektumkarzinom konnte die Überlegenheit eines präoperativen, *neoadjuvanten* gegenüber eines adjuvanten Behandlungsregimes bezüglich der Lokalrezidiv- und Nebenwirkungsrate belegt werden [9]. Daher besteht heute bei Patienten im UICC-Stadium II bis III die Indikation zur neoadjuvanten Therapie mit anschließender Tumorresektion einschließlich totaler Mesorektumexzision [4, 5, 10]. Diese Therapie kann nach zwei unterschiedlichen Grundmustern ausgeführt werden:

1. Neoadjuvante Kurzzeitbestrahlung: Radiatio an 5 Tagen mit 5 Gy-Einzeldosen, Operation binnen weniger Tage nach der Bestrahlung.
2. Neoadjuvante intensivierte Radiochemotherapie: Radiatio über ca. fünf Wochen mit 1,8 Gy-Einzeldosen täglich und simultaner Chemotherapie, Operation 4 bis 6 Wochen nach Therapieende.

Die vorliegende Arbeit fokussiert hauptsächlich auf das intensivierte Regime.

## **1.2 Eine neoadjuvante Radiochemotherapie senkt die Lokalrezidivrate.**

Die neoadjuvante Therapie von Rektumkarzinompatienten hat gegenüber einer alleinigen Operation zwei wesentliche Vorteile: Zum einen konnte die *Lokalrezidivrate* gesenkt werden [9, 11-13]. Cammà et al. arbeiteten in einer Metaanalyse von 14 randomisierten Studien an insgesamt 6426 Patienten ebenfalls eine Senkung des Risikos für ein Lokalrezidiv nach neoadjuvanter Radiotherapie heraus (odds ratio 0,49;  $p < 0,001$ ) [14]. Zum anderen wird durch die Vorbehandlung in vielen Fällen eine *kontinenzerhaltende Operation* ermöglicht. Ohne neoadjuvante Therapie können insbesondere Rektumkarzinome des mittleren und distalen Drittels bei Einhaltung eines onkochirurgischen Sicherheitsabstandes oft nicht unter Schonung des Sphinkterapparates reseziert werden. Durch Tumor-Downstaging und -Downsizing kann in manchen Fällen nach Abschluss einer präoperativen Therapie eine sphinktererhaltende tiefe anteriore Rektumresektion trotzdem möglich werden [15-17].

## **1.3 Rektumkarzinome sprechen unterschiedlich auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie an.**

Die neoadjuvante Therapie bewirkt bei Rektumkarzinomen eine unterschiedlich starke Tumorregression. Das Ausmaß der Tumorantwort variiert von Fall zu Fall. Bei histopathologischer Untersuchung der Operationspräparate reicht das Spektrum von einer Totalremission bis zum weitgehenden Fehlen einer Therapiewirkung. Das pT-Stadium als Maß für die Infiltrationstiefe des Tumors nach der Vorbehandlung wird der Darstellung dieser Unterschiede nicht gerecht [18]. Darum sind in der Literatur verschiedene Klassifikationen beschrieben worden, die das unterschiedliche Ansprechverhalten zum Ausdruck bringen. Die älteste Einteilung wurde 1994 von Mandard et al. veröffentlicht: Diese Klassifikation beschreibt den therapeutischen Effekt einer neoadjuvanten Radiochemotherapie bei Ösophaguskarzinomen und unterscheidet fünf

Regressionsgrade [19]. Dworak et al. übernahmen diese Einteilungskriterien für die grade of regression-(GR)-Klassifikation für das Rektumkarzinom [20]. Die GR-Klassifikation ist vielfach aufgrund ungenauer Kriterien zur Gruppenzuordnung als subjektiv kritisiert worden. Die Schweizer Pathologin Hanifa Bouzourene schrieb, die Einteilung sei nicht sehr reliabel, es fehle die Standardisierung [21]. In der vorliegenden Arbeit wurde die GR-Einteilung bei 75 Fällen angewandt und die Zuordnungskriterien für die fünf Regressionsgrade präzisiert.

#### **1.4 Regredientes Tumorgewebe wird durch eine Tumornarbe „ersetzt“.**

In einem Zwischenbericht über die große deutsche Studie der Arbeitsgruppe Rektumkarzinom prägten Sauer und Fietkau den Begriff „*Overstaging error*“. Die Autoren bezeichneten damit eine falsche Indikationsstellung für eine neoadjuvante Radiochemotherapie bei 15 bis 20% der Patienten aufgrund einer Überschätzung des Tumorstadiums in der prätherapeutischen Bildgebung [22]. Für Patienten im UICC-Stadium I bestehe also ein „*Risiko der Übertherapie*“.

Durch Analyse einer sog. Tumornarbe sollte in der vorliegenden Arbeit die Indikation für eine neoadjuvante Radiochemotherapie im Nachhinein überprüft werden. Tumorgewebe, das durch die Vorbehandlung in Nekrose geht, wird durch Entzündungszellinfiltrate organisiert und resorbiert sowie durch lockeres Bindegewebe ersetzt [23]: Diese Tumornarbe ist Zeuge einer früheren Tumordinfiltration; ihr Vorhandensein oder Fehlen in den Wandschichten der Präparate geben einen Anhalt für die Tumorausdehnung vor der neoadjuvanten Therapie.



### **1.5 Fehlende Wirkung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf die Metastasierungsrate**

Der Nutzen einer neoadjuvanten Therapie für das Risiko einer *Fernmetastasierung* blieb hingegen bisher gering. In großen randomisierten Studien aus Schweden und den Niederlanden fanden sich keine Unterschiede zwischen neoadjuvant bestrahlten und nicht-bestrahlten Patienten [11, 13]. Gleiches Ergebnis lieferte eine Metaanalyse (odds ratio 0,93;  $p=0,54$ ) [14]. Im Gegensatz zur signifikanten Reduktion der Rate an Lokalrezidiven ist der Anteil der Patienten mit metastasierendem Verlauf nach neoadjuvanter Radiotherapie nicht verringert [24].

Die Erweiterung der neoadjuvanten Radiotherapie zur Radiochemotherapie – so die Erwartungen [25-27] – sollte diese „systemische Therapielücke“ schließen. Die klinische Erfahrung hatte aber gezeigt, dass einige Patienten, die mit einer aggressiven neoadjuvanten Radiochemotherapie behandelt worden waren, teilweise eine massive Metastasierung nach kurativer Operation erlitten [28]. Koda et al. berichteten sogar über eine höhere Metastasierungsrate nach der Vorbehandlung: 37% der Patienten entwickelten während der Nachbeobachtungszeit Fernmetastasen. In der Kontrollgruppe fanden sich im gleichen Zeitraum nur bei 16% der Patienten Fernmetastasen ( $p=0,02$ ) [29].

In einem aktuellen Übersichtsartikel von Fietkau und Klautke formulierten die Autoren eine ernüchternde Bilanz: *„Die Häufigkeit von Fernmetastasen blieb in allen Studien mit 30-40% in der gleichen Größenordnung; sie hat sich in den letzten 20 Jahren quasi nicht verändert.“* [30]. Die „systemische Therapielücke“ wurde also durch die Kombination der Radiotherapie mit Chemotherapeutika nicht verkleinert. Woran könnte das liegen?

### **1.6 Eine Tumorimmunabwehr kann eine Metastasierung verhindern.**

Bei soliden Tumoren gibt es systemische Tumorabsiedlungen schon lange als Mikrometastasen bevor sich Metastasen klinisch oder diagnostisch

nachweisen lassen [31]. Diese sog. dormant cells haben eine gleich starke Proliferationsrate wie neoplastische Zellen des Primärtumors, Angiogenese-Inhibitoren (produziert durch den Tumor [32, 33]) bewirken jedoch eine starke Apoptose. Es besteht ein Fließgleichgewicht (steady state) zwischen Proliferation und Zelltod, die Metastasen wachsen nicht. Durch eine operative Entfernung des Primärtumors entfällt der hemmende Einfluss von Anti-Angiogenese-Faktoren. Es kommt zur Disinhibition der ruhenden Mikrometastasen.

Neben Eigenschaften der Tumorzellen wirken auch wirtseigene Faktoren einer Metastasierung entgegen; insbesondere ein suffizientes Immunsystem ist wichtig [34, 35]. Verschiedene Immunzelltypen können diese Tumorabwehrmechanismen vermitteln:

**Dendritische Zellen** wandern als unreife Zellen aus dem Knochenmark in nicht-lymphoide Organe, unter anderem auch in die Mukosa von Kolon und Rektum und ins neoplastische Gewebe eines Rektumkarzinoms [36, 37]. Dort nehmen sie Tumorantigen auf und gelangen anschließend in die T-Zell-Regionen (Parakortex) des drainierenden Lymphknotens. Im Rahmen einer Zellreifung erscheint das aufgenommene Material MHC-gebunden an der Zelloberfläche und wird T-Lymphozyten präsentiert. Dendritische Zellen gelten als die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen [38]. Sie aktivieren T-Helferzellen (THL), zytotoxische T-Zellen (CTL) und NK-Zellen im tumordrainierenden Lymphknoten [39-41]. Dendritische Zellen übernehmen eine Starterrolle bei der Initiierung einer humoralen und zellulären Tumorimmunantwort [42]. Aktivierte Dendritische Zellen lassen sich durch Antikörper gegen CD83 selektiv immunhistochemisch anfärben [43].

**T-Helferzellen** (THL) exprimieren das Membranantigen CD4 und sind im Lymphknoten hauptsächlich im Parakortex lokalisiert. Diese Lymphozyten sind antigenspezifisch und vermitteln die Antikörperproduktion durch B-Zellen und den Kontakt zwischen Tumorantigen-tragenden Dendritischen Zellen und CTL [44]. THL-Subtypen übernehmen in der Tumorimmunabwehr Effektorfunktionen [45, 46].

**Natürliche Killer- (NK) Zellen** tragen das Membranantigen CD57 auf ihrer Zelloberfläche. Sie sind innerhalb des Lymphknotens in den Keimzentren der

Lymphfollikel lokalisiert [47]. NK-Zellen sind Bestandteil des unspezifischen Immunsystems gegen systemische Tumorzellabsiedlungen. Die Initiierung einer NK-Zellantwort gegen Tumorzellen kann über drei unterschiedliche Aktivierungspfade erfolgen: (1) MHC I-Moleküle auf Selbst-Körperzellen wirken hemmend auf NK-Zellen. Eine Veränderung, eine verminderte Expression oder das Fehlen dieser MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche – wie häufig bei Tumorzellen – bewirkt eine NK-Zellaktivierung [48] mit anschließender Elimination der Zielzelle. (2) Eine Zell-Zell-Interaktion mit Dendritischen Zellen führt ebenfalls zu einer NK-Antwort [49]. (3) Eine Markierung von Zielzellen mit Antikörpern initiiert ebenfalls eine NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Auch Tumorzellen können auf diesem Weg eliminiert werden [50]. NK-Zellen stellen somit ein Verbindungsglied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Arm einer Tumorabwehrreaktion dar.

CD8 ist das charakteristische Membranantigen von **zytotoxischen T-Lymphozyten** (CTL). CTL sind Bestandteil einer adaptiven Immunantwort gegen intra- und extrazelluläres MHC I-gebundenes Fremdanigen. Sie können bei Tumorzellen den apoptotischen Zelltod einleiten und besitzen lytische Enzyme wie Granzym B. Die immunologische Funktion von CTL liegt u.a. in der Abwehr einer beginnenden Fernmetastasierung durch zirkulierende Einzel-Tumorzellen [35, 51]. Ein Subtyp der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten hat keine Effektorfunktion, sondern wirkt als Regulatorzelle. Diese unterscheiden sich von CTL durch eine fehlende CD 28-Expression (CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>) [52].

Das komplexe Zusammenspiel der Immunzellen im regionalen Lymphknoten ermöglicht den Aufbau einer Immunantwort gegen Tumorantigene. Eine Beeinträchtigung dieser Immunmechanismen würde ein Auswachsen von (Mikro)metastasen begünstigen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Veränderungen der genannten Immunzellen nach neoadjuvanter Radiochemotherapie in nicht metastatisch befallenen perirektalen Lymphknoten.

## **2 Zielsetzungen**

1. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf Rektumkarzinome histomorphologisch zu beschreiben und die GR-Klassifikation nach Dworak [20] zu verwenden. Darüber hinaus sollten neu herausgearbeitete Zuordnungskriterien für die Gruppeneinteilung angewandt und die Objektivität in einer Interobserverstudie untersucht werden.
2. Es ist bekannt, dass Fälle, die mit verschiedenen Therapieregimen behandelt werden, unterschiedliche Ansprechraten zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Vorbehandlung mit Capecitabin einer Therapie auf 5-FU-Basis hinsichtlich der Tumorresponse überlegen ist.
3. Durch die Beurteilung der Tumornarbe sollte das Tumorstadium *vor* der neoadjuvanten Radiochemotherapie bei Downstaging-Fällen rekonstruiert werden. Ziel war es, das „Risiko einer Übertherapie“ (s. o.) post factum abzuschätzen.
4. Ferner sollte versucht werden, mögliche Auswirkungen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf das Immunsystem im Spiegel histomorphologischer Befunde einzuschätzen. Könnte eine Vorbehandlung als Nebenwirkung eine Immunsuppression bewirken und somit Wegbereiter für eine Metastasierung sein? Um Antworten auf diese Frage zu finden, wurden tumorfreie meso/perirektale Lymphknoten der Operationspräparate von vorbehandelten und Kontrollpatienten untersucht und Unterschiede hinsichtlich der Zelldichte von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen, CD83<sup>+</sup> aktivierten Dendritischen Zellen und CD57<sup>+</sup> Natürlichen Killer-Zellen sowie Unterschiede hinsichtlich der Lymphknotenmorphologie herausgearbeitet.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patientenkollektive**

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 133 Rektumkarzinomfälle des Universitätsklinikums Rostock ausgewählt. Je nach Therapie wurden zwei Kollektive definiert: Bei Fällen aus der *Studiengruppe* erfolgte vor der Operation eine neoadjuvante Radiochemotherapie, Patienten aus der *Kontrollgruppe* wurden nicht vorbehandelt.

Das Studienkollektiv umfasste 75 Patienten. Diese Fälle erfüllten folgende Kriterien:

- a) Kolo/rektoskopisch diagnostiziertes Rektumkarzinom,  $\leq 15$  cm proximal der Linea dentata,
- b) Biopsie und histologische Sicherung eines muzinösen oder tubulären Adenokarzinoms,
- c) Hinweis auf extramurale Tumorausbreitung ( $\geq T3$ ) und/oder Lymphknotenmetastasierung (N+) in der Computertomographie/Endosonographie
- d) neoadjuvante Radiochemotherapie in der Klinik für Strahlentherapie der Universität Rostock im Zeitraum zwischen 1997 bis 2004,
- e) Vollständige Beendigung der neoadjuvanten Therapie. Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen toxische Nebenwirkungen und Komplikationen zum Therapieabbruch führten.

Die Untersuchungsergebnisse des präoperativen Stagings wurden den entsprechenden Krankenakten der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universität Rostock entnommen.

58 Patienten mit Rektumkarzinom, die zwischen 1997 und 1999 behandelt wurden, bildeten ein Kontrollkollektiv. Hier erfolgte die operative Entfernung

des Tumors ohne vorangegangene neoadjuvante Therapie. Die Fälle wurden aus einer Datenbank, die alle kolorektalen Karzinomen am Institut für Pathologie der Universität Rostock seit 1994 erfasst, ausgewählt. Auswahlkriterium war eine strukturgleiche Verteilung der UICC-Stadien zwischen beiden Kollektiven. Alters- und –Geschlechterverteilung, Operationsverfahren und pTNM-Stadien sind für beide Gruppen in Tabelle 1 gegenübergestellt.

**Tabelle 1: Patientendaten.** Für die Radiochemotherapie- und die Kontrollgruppe sind die absoluten und relativen Häufigkeiten der Patientencharakteristika und Diagnosegruppen gegenübergestellt.

Parameter	Radiochemotherapie-Gruppe		Kontrollgruppe	
	Zahl	[%]	Zahl	[%]
Anzahl der Fälle	75		58	
Geschlecht				
männlich	55	73	31	53
weiblich	20	27	27	47
Alter zur Op-Zeit in Jahren				
Mittelwert	61,7		66,1	
Median	64		67	
Op-Verfahren				
tiefe anteriore Resektion	49	55	43	74,1
abdom.perin. Amputation	26	20	15	25,9
pT-Stadium				
0	11	14,6	-	-
1	1	1,3	1	1,7
2	18	24,0	15	25,9
3	40	53,3	30	51,7
4	5	6,7	12	20,7
pN-Stadium				
0	40	53,3	33	56,9
1	21	28,0	12	20,7
2	14	18,7	13	22,4
M-Stadium				
0	55	73,3	45	77,6
1	20	26,7	13	22,4
UICC-Stadium				
0*/I	21	28,0	11	19,0
II	15	20,0	20	34,5
III	19	25,3	14	24,1
IV	20	26,7	13	22,4

\*) UICC-Stadium 0 entspricht ypT0 N0 M0, also kein nachweisbarer Tumor nach neoadjuvanter Radiochemotherapie.

### 3.2 Neoadjuvante Radiochemotherapie

Die neoadjuvante Radiochemotherapie dauerte 38 bzw. 43 Tage. Dieses intensivisierte Langzeitregime (siehe Einleitung) wurde gemäß publizierten Protokollen [53, 54] durchgeführt.

Bei allen vorbehandelten Patienten erfolgte von Tag 1 bis 38 eine fraktionierte Bestrahlung in Mehrfeldertechnik durch einen Linearbeschleuniger mit einer Energie >6 MV. An fünf Tagen pro Woche wurden Einzeldosen von 1,8 Gy appliziert (Tag 1 bis 33). Es folgten drei zusätzliche Dosen à 1,8 Gy für ein kleineres Zielvolumen an den Tagen 36 bis 38. Die Gesamtdosis betrug 50,4 Gy.

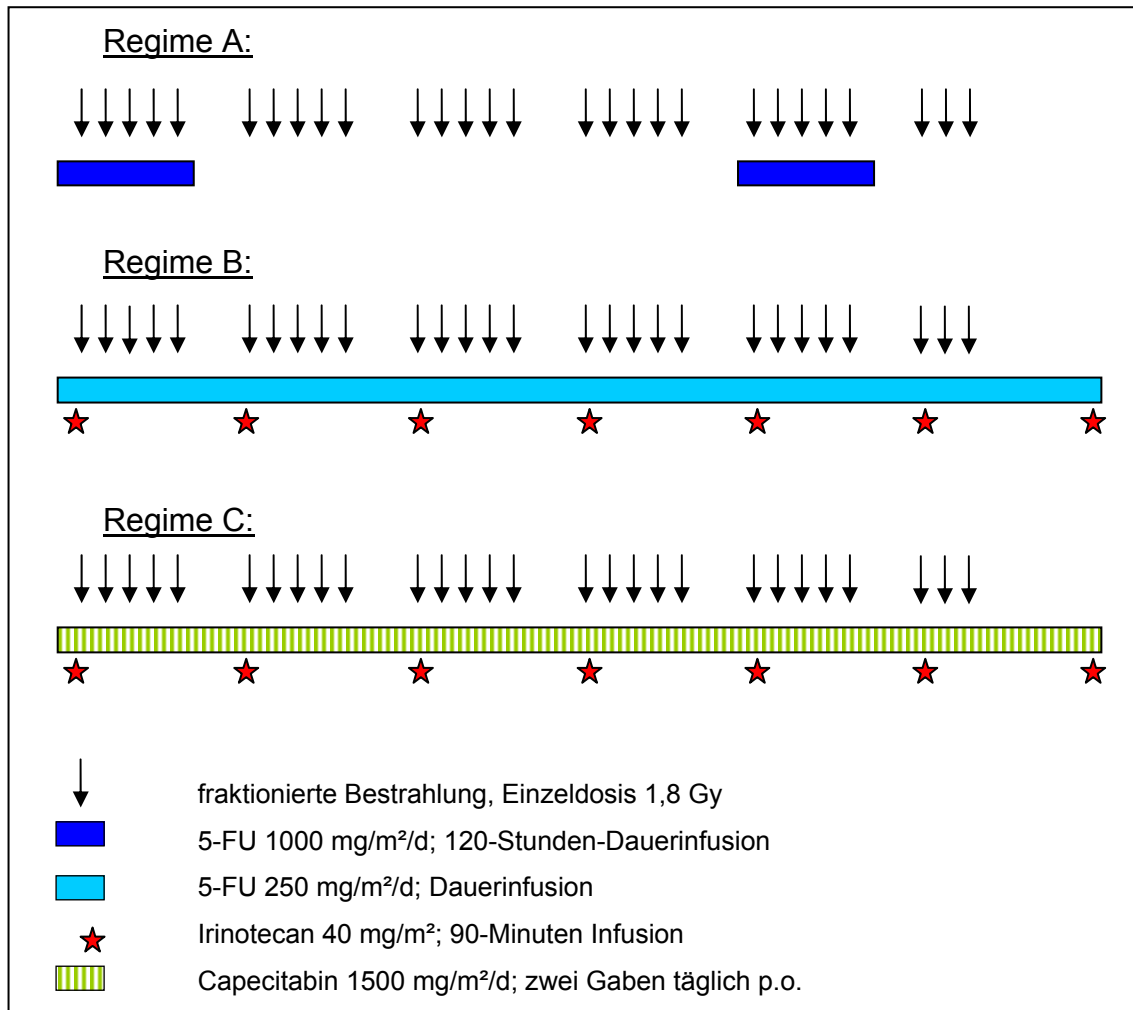
Es wurden drei alternative Chemotherapie-Regime angewandt (s. Abbildung 1 auf S.11):

16 Patienten wurden gemäß Regime A behandelt: Während der ersten und fünften Behandlungswoche wurden über eine 120-Stunden-Dauerinfusion 1000 mg/m<sup>2</sup>/d 5-FU verabreicht.

42 Patienten erhielten Regime B: Sie erhielten ebenfalls 5-FU, hier in einer Dosierung von 250 mg/m<sup>2</sup>/d als Dauerinfusion von Tag 1 bis 43. Zusätzlich wurde einmal pro Woche 40 mg/m<sup>2</sup> Irinotecan per 90-Minuten Infusion appliziert.

Bei 16 Patienten wurde Regime C angewandt: Anstelle von 5-FU wurde das orale Fluoropyrimidin Capecitabin (1500 mg/m<sup>2</sup>/d) verwendet. Die Dosierung des zusätzlich applizierten Irinotecan ist mit der Anwendung aus Regime B identisch.

Ein Patient wurde mit Tomudex 3 mg/m<sup>2</sup>/d behandelt. Ab dem 16. Tag wurde die Dosis auf die Hälfte reduziert.



**Abbildung 1: Drei alternative Behandlungsprotokolle der neoadjuvanten Radiochemotherapie.**

### 3.3 Operation

Bei allen 75 Radiochemotherapie-Patienten erfolgte die operative Entfernung des (Rest)tumors vier bis sechs Wochen nach Beendigung der Vorbehandlung: Bei 49 Patienten konnte das Karzinom unter Erhalt des Sphinkterapparats reseziert werden, in 26 Fällen erfolgte eine abdominoperineale Rektumamputation (s. Tabelle 1 auf S. 9). Im Kontrollkollektiv wurde in 43 Fällen eine tiefe anteriore Resektion und in 15 Fällen eine Amputation durchgeführt. Alle Operationen wurden von Viszeralchirurgen der Klinik für Chirurgie der Universität Rostock durchgeführt und beinhalteten eine totale Mesorektumexzision.



### **3.4 Pathomorphologische Untersuchung des Operationspräparates**

Die Aufarbeitung und histologische Befundung der Fälle aus beiden Gruppen erfolgte zum größten Teil (>80%) durch PD Dr. Friedrich Prall, Oberarzt am Institut für Pathologie der Universität Rostock, nach standardisiertem Ablauf: Die Operationspräparate wurden entlang ihrer vorderen Wand eröffnet und über Nacht in gepuffertem Formalin fixiert. Es wurden sechs bis zwölf ca. 5 mm dicke transversale Scheiben aus dem Tumor bzw. den Tumorresiduen angefertigt und mit Paraffin als Block konserviert. Im Falle einer makroskopischen kompletten Tumorregression wurde die ehemals tumortragende Region komplett aufgearbeitet. Nach sog. clearing in Aceton über Nacht wurden aus dem Mesorektum die regionalen Lymphknoten präpariert.

Alle Fälle wurden gemäß der TNM-Klassifikation befundet (s. Tabelle 1 auf S. 9). Abgesehen von Radiochemotherapie-Fällen mit ypT0 bzw. UICC 0 bestand zwischen beiden Kollektiven bezüglich der Tumorstadien Strukturgleichheit: Für die pT-Stadien 1 bis 4 ergaben sich im Chi-Quadrat Test keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kollektiven ( $p=0,231$ ). Gleiches gilt für die UICC-Stadien I bis IV ( $p=0,476$ ).

Für die folgenden histomorphologischen Untersuchungen wurde ein Lichtmikroskop der Firma Carl Zeiss, Deutschland, Typ Axioskop, mit einem Okularmikrometer verwendet.

#### **3.4.1 Ausmessen der Tumorkomplexe**

Ein einzelner *Tumorkomplex* stellt sich als glandulär konfigurierter Verband aus vitalen Tumorzellen dar. Es können ein oder mehrere Lumina umschlossen sein. Bindegewebe bzw. desmoplastisches Stroma trennt die einzelnen Tumordrüsen voneinander ab. Die Größe der Tumorkomplexe wurde für jeden Radiochemotherapie-Fall anhand aller vorhandenen HE-Schnitte, ggf. auch an zusätzlich angefertigten Stufenschnitten beurteilt und mit dem Okularmikrometer ausgemessen.

### 3.4.2 Klassifikation der Tumorregression

Das Ansprechen des Tumors auf die Vorbehandlung wurde für jeden Radiochemotherapie-Fall beurteilt und gemäß eines Tumorregressions-Gradings klassifiziert. Die Einteilung in fünf Gruppen orientiert sich an den Vorgaben von Dworak et al. (kursiv gedruckt) [20]. Zusätzlich wurden neu herausgearbeitete Kriterien zur objektiveren Gruppenzuordnung, ferner auch Kriterien zur Einordnung von muzinösen Adenokarzinomen angewandt.

#### **GR 4: Komplette Regression**

*„Bei Grad 4 finden sich keinerlei histologisch identifizierbare residualen Tumorzellen [20]“* (s. Abbildung 2).

#### **GR 3: Fast komplette Regression, nur mikroskopische Residuen**

*„Grad 3 ist charakterisiert durch die Anwesenheit vereinzelter residualer Tumorzellen, die in fibrotische Areale eingestreut sind [20].“*

#### **Nicht-muzinöse Adenokarzinome:**

Im ehemaligen Tumorbett finden sich Zeichen einer fast vollständigen Tumorregression: Nekrose, Kalzifizierungen, ggf. Schleim. In Abbildung 3 zeigen Bindegewebszüge und Tumornarbenfelder die Ausbreitung des Tumors vor der neoadjuvanten Therapie an.

In diesem Regressionsgebiet lässt sich vereinzelt vitales Tumorgewebe nachweisen:

- a) Der Residualtumor bleibt auf eine Ausdehnung von max. 10 mm begrenzt bzw. vitale Tumorverbände sind in höchstens drei verschiedenen Blockpräparaten nachweisbar.
- b) Einzelne Tumorkomplexe sind kleiner als 2 mm und
- c) die Ausbreitung beschränkt sich auf höchstens zwei der drei Wandzonen (Tunica mucosa, Tunica muscularis propria und perirektales Fettgewebe).

Muzinöse Adenokarzinome:

Schleimseen ohne Begrenzung aus vitalen Tumorzellen dominieren das histologische Präparat. Nur vereinzelt „schwimmen“ vitale Tumorzellen, teils einzeln, teils in kleinen Zellhaufen in diesen Schleimseen (s. Abbildung 4). Für muzinöse Karzinome gelten die o.g. Regeln a) bis c) nicht.

**GR 2: Mittelgradige Regression**

*„Bei Grad 2 findet sich eine größere Zahl an residualen Tumorzellen, dennoch überwiegt die Fibrose [20]“.*

Nicht-muzinöse Adenokarzinome:

Wie in der linken Bildhälfte von Abbildung 5 dargestellt, zeigt die Tumorregion deutliche Anzeichen einer Regression als Antwort auf die neoadjuvante Therapie. Die Tumordrüsen sind in mittlerer Dichte angeordnet und durch Fibrose, Tumornarbe, Nekrose oder Kalzifizierungen voneinander abgetrennt.

Die Überschreitung bereits eines Kriteriums a) bis c) aus GR 3 führt zur Einordnung als GR 2, d. h. der Tumor bei GR 2

- hat eine lokale Ausdehnung >10 mm bzw. ist in mehr als drei verschiedenen Blockpräparaten nachweisbar und/oder
- bildet Tumorkomplexe > 2 mm und/oder
- ist in allen drei Wandzonen ausgebreitet.

Muzinöse Adenokarzinome:

Die Schleimseen als Zeichen der Regression sind bildbestimmend. In den Schleimseen sind zu weniger als der Hälfte vitale Tumorzellen zu finden. S. Abbildung 5, rechte Bildhälfte.

**GR 1: Geringe Tumorregression**

*„Bei Grad 1 überwiegt der Residualtumor gegenüber der Fibrose [20]“.*

---

#### Nicht-muzinöse Adenokarzinome:

Tumordichte und –ausdehnung erscheinen nur gering bis mäßig durch die Vorbehandlung reduziert. Die Tumorkomplexe lagern dicht und sind in allen Wandzonen nachweisbar, wie in Abbildung 6 (links) verdeutlicht werden soll.

#### Muzinöse Adenokarzinome:

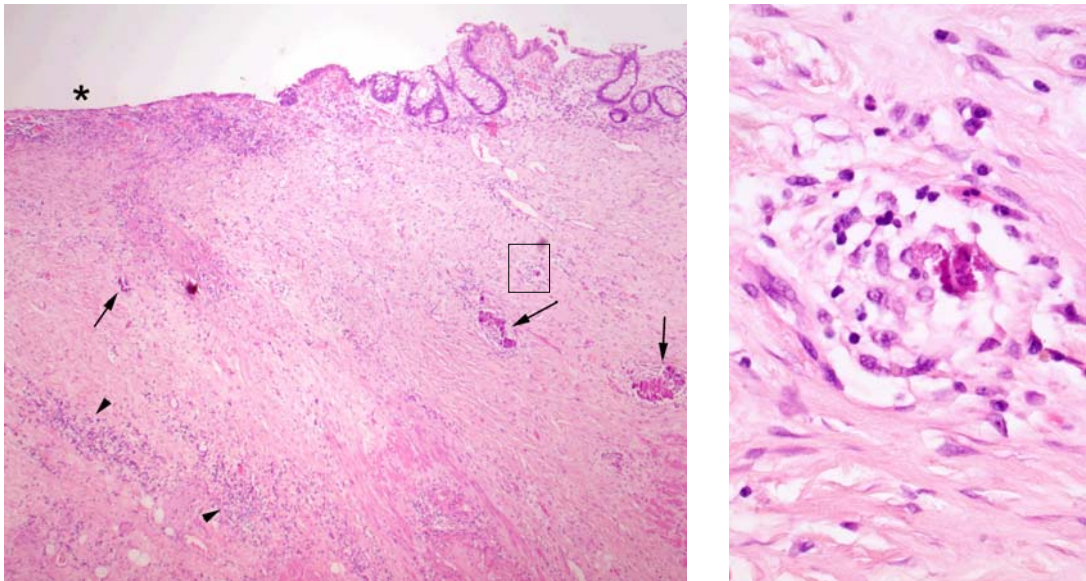
Schleimseen sind nachweisbar, es finden sich aber zu mehr als der Hälfte vitale Tumorzellen. S. Abbildung 6 (rechts).

#### **GR 0: Keine oder weitgehend fehlende Regression**

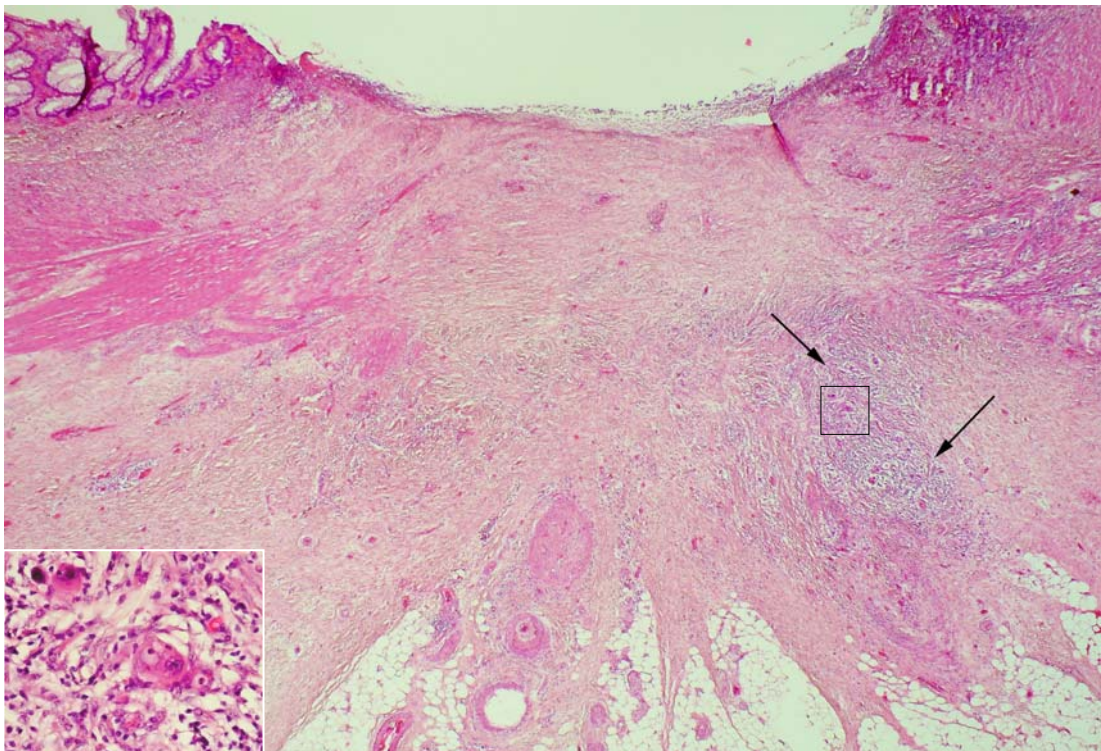
„*Grad 0 ist durch eine fehlende Regression charakterisiert [20]*“.

Histomorphologische Zeichen eines therapeutischen Effekts auf den Tumor (Nekrose, Kalzifizierung, Tumornarbe) sind gemessen am Anteil von vitalem Tumorgewebe gering. Der Tumor erscheint durch die Therapie kaum berührt: Die neoplastischen Drüsen lagern dicht, in allen Wandzonen ist eine große Tumormasse erkennbar. Abbildung 7 zeigt einen typischen GR 0-Fall.

Gemäß einer Einteilung nach Ryan et al. [55] wurde durch Zusammenlegung der GR-Gruppen eine 3-Teilung vorgenommen: Patienten aus GR 3 und 4 sprechen stark auf die neoadjuvante Radiochemotherapie an, GR 2-Fälle zeigen eine moderate, Patienten mit GR 0 und 1 eine geringe Therapieantwort.

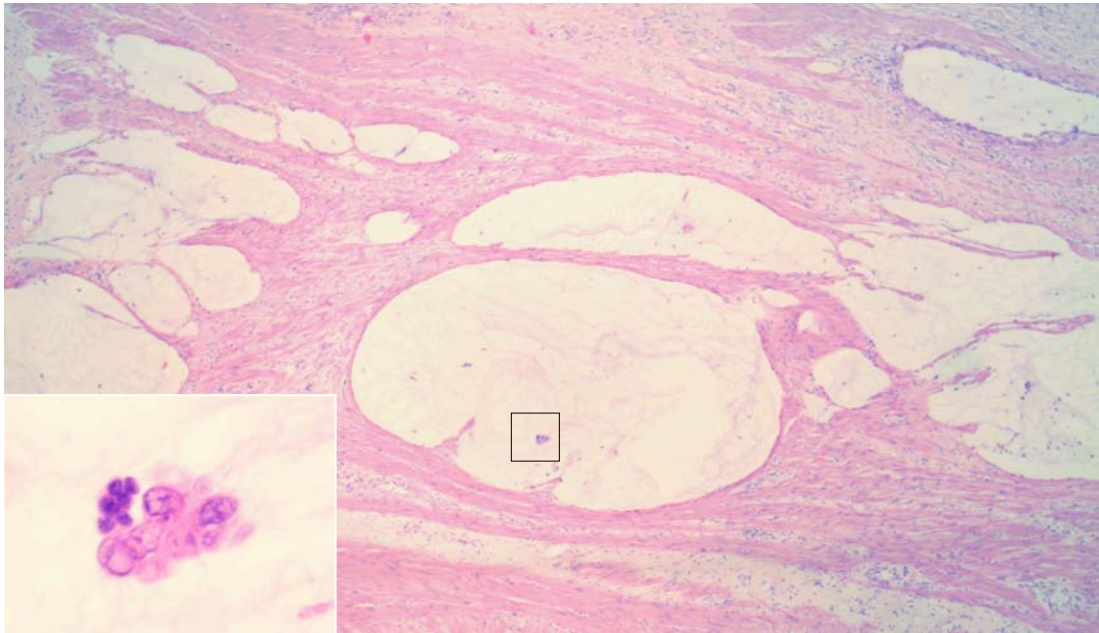


**Abbildung 2: Totalregression (GR 4).** Im ehemaligen Tumorbett finden sich ausgedehnte Bindegewebsareale. Verkalkungen (Pfeile) sind von Entzündungszellinfiltraten umgeben (Detailbild rechts). Eine Tumornarbe (Pfeilspitzen) deutet auf frühere Tumordinfiltration hin. Keine vitalen Tumorzellen im gesamten Präparat. Oberflächliches Ulkus (Stern). HE, x40, Detailbild x400.

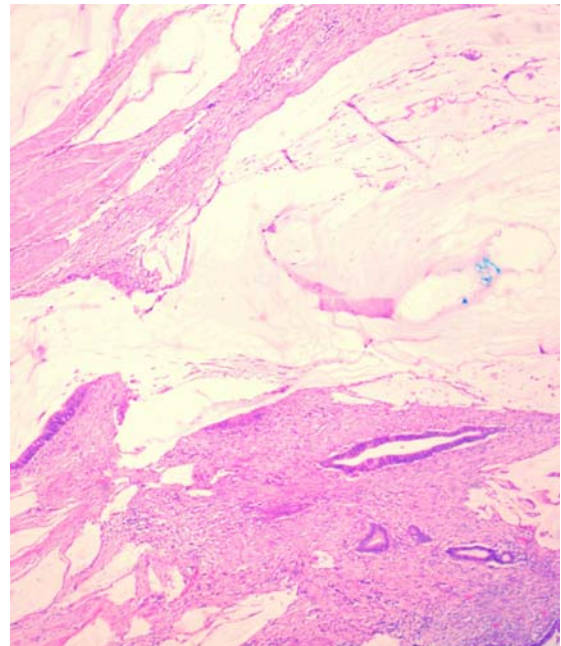
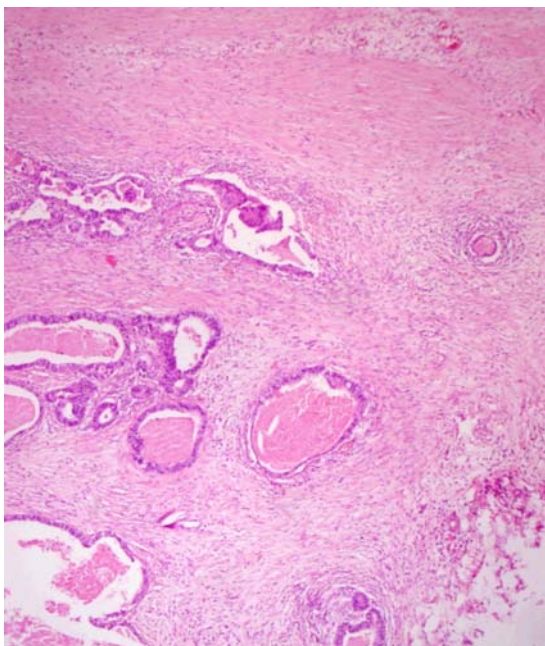


**Abbildung 3: Starke Tumorregression eines nicht-muzinösen Adenokarzinoms (GR 3).** Die normale Wandschichtung wurde durch frühere Tumordinfiltrate zerstört. Der Tumordurchbruch durch die Tunica muscularis propria lässt sich anhand von Tumorresiduen und umgebender Tumornarbe (Pfeile) mit Bindegewebszügen rekonstruieren. Zeichen der Tumorregression sind bildbestimmend. Vereinzelt und mikrofokal sind residuale Tumorzellen und –zellverbände nachweisbar (Detailbild). HE, x20, Detailbild x400.





**Abbildung 4: Starke Tumorregression eines muzinösen Adenokarzinoms (GR 3).** Das Tumorbett besteht aus regressiven Schleimseen. Nur vereinzelt sind darin vitale Tumorzellen zu finden (Detailbild). HE, x40, Detailbild x400.

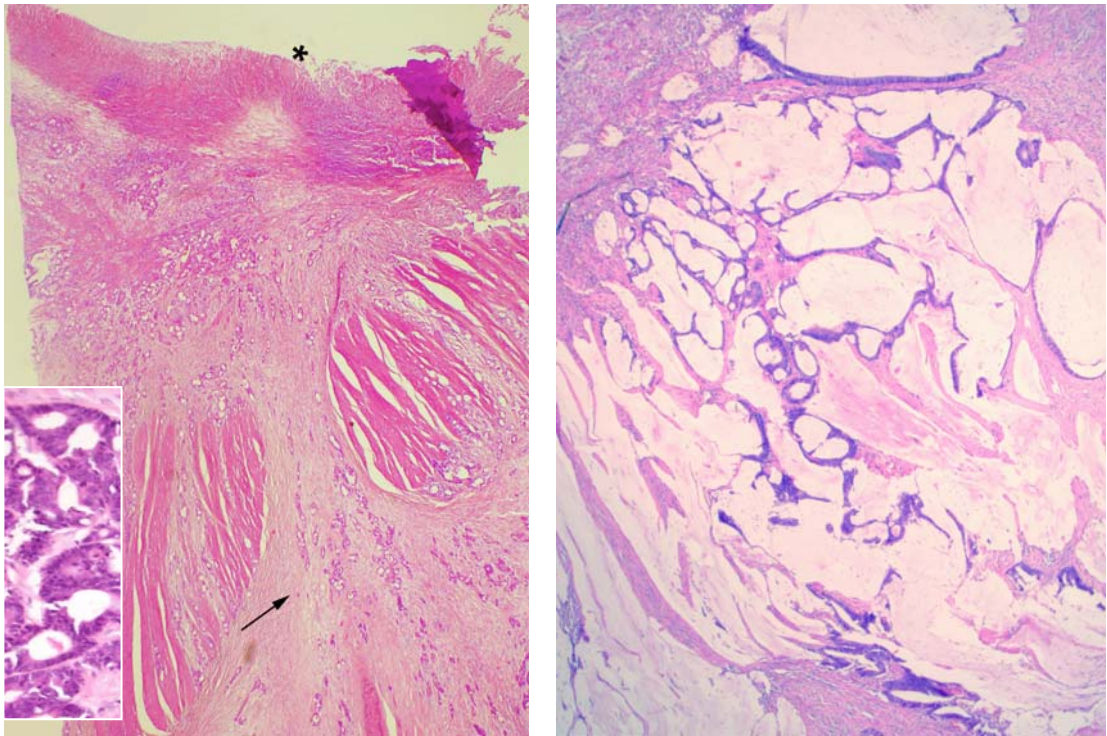


**Abbildung 5: Mittelgradige Tumorregression (GR 2).**

**Links: Nicht-muzinöses Adenokarzinom.** Regressiv veränderte Tumoranteile sind von nekrotischen Zellresten, Entzündungszellinfiltraten und Fibrose umgeben. Tumorzellnester im perirektalen Fettgewebe. HE, x40.

**Rechts: Muzinöses Adenokarzinom.** Die Schleimseen sind zum kleinen Teil von vitalen Tumorzellen begrenzt. HE, x40.

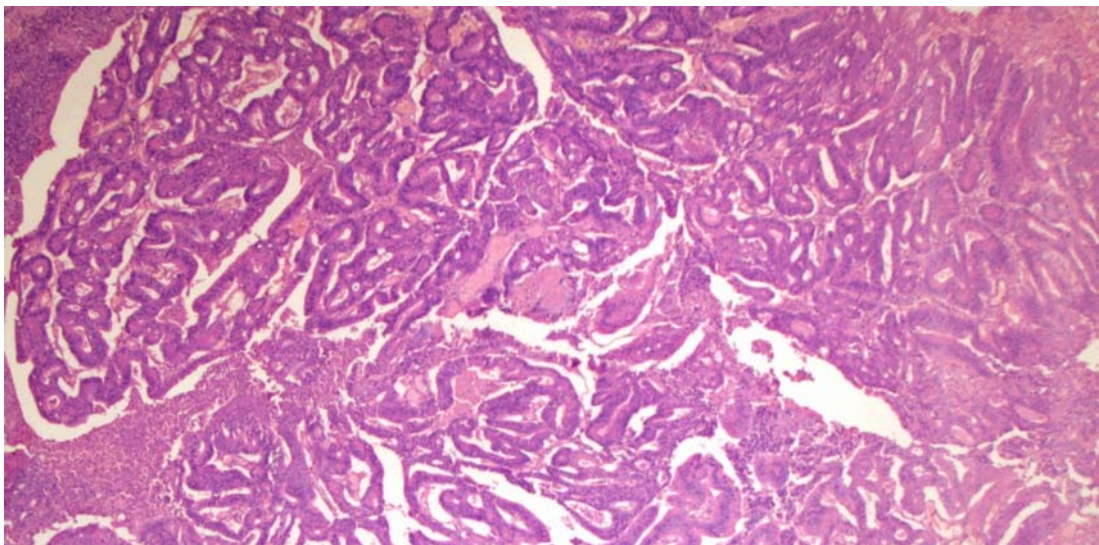




**Abbildung 6: Geringe Tumorregression (GR 1).**

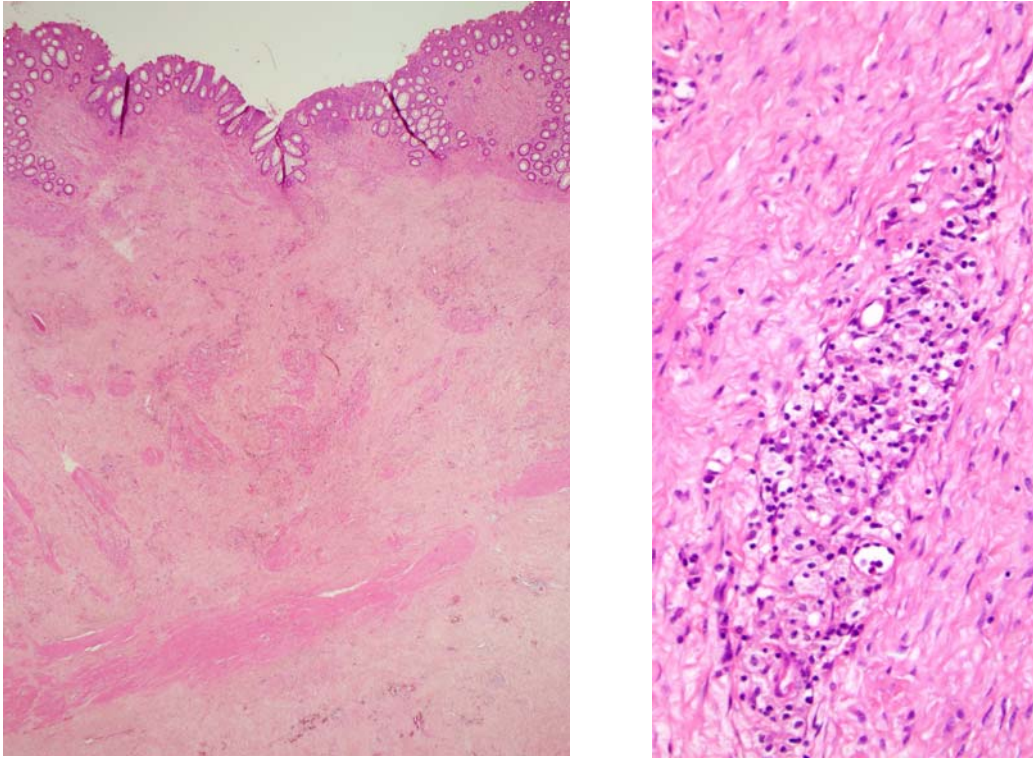
**Links: Nicht-muzinöses Adenokarzinom.** Tumorinfiltrate sind bildbestimmend. Dicht lagernde neoplastische Drüsen durchsetzen die Tunica muscularis propria und infiltrieren das perirektale Fettgewebe (Pfeil). Oberflächliche Ulzeration der Mukosa (Stern). HE, x20, Detailbild x200.

**Rechts: Muzinöses Adenokarzinom.** Um die Schleimseen sind zum großen Teil vitale Tumorzellen zu finden. HE, x40

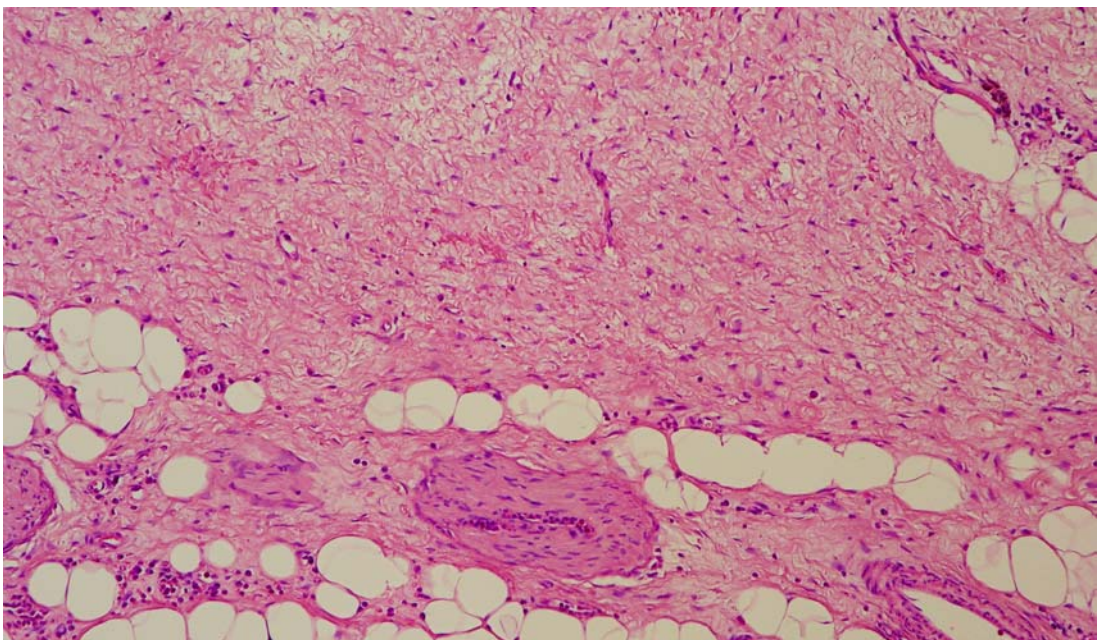


**Abbildung 7: Fehlende Tumorregression (GR 0).** Eng lagernde Tumordrüsen bilden eine große Tumormasse. HE, x40.





**Abbildung 8: Tumornarbe 1.** Inselartige Tumornarbenfelder im Bereich der ehemaligen Tunica muscularis propria, die durch frühere Tumordinfiltrationen größtenteils zerstört wurde (links, Übersichtsbild). Im ehemaligen Tumorbett haben zahlreiche Makrophagen regrediente Karzinomanteile resorbiert (rechts, Detailbild). HE, x40, Detailbild rechtsx200.



**Abbildung 9: Tumornarbe 2.** Aktivierte Fibroblasten produzieren in ehemaligen Tumorealen eine lockere kollagene Matrix als „Ersatzgewebe“. Spärliches Entzündungszellinfiltrat. HE, x40.



### 3.4.3 Interobserverstudie

In einer Interobserverstudie wurde die Auswertungsobjektivität der o.g. neuen Klassifikationskriterien überprüft: Dr. med. Gunther Wöhlke, Oberarzt am Institut für Pathologie der Helios Kliniken Schwerin, klassifizierte als zweiter Untersucher alle 75 Studienfälle anhand der HE-Schnittpräparate gemäß den in Abschnitt 3.4.2 genannten Kriterien. Die jeweiligen Zuordnungen der Fälle zu den GR-Untergruppen, die der erste Untersucher und Verfasser dieser Arbeit (Michael Wöhlke) getroffen hatte, waren dem zweiten Untersucher nicht bekannt (einfache Verblindung). Die Ergebnisse des zweiten Untersuchers wurden nur für die Ergebniskorrelation im Rahmen der Interobserverstudie verwendet ( $\kappa$ -Statistik). Für alle weiteren Berechnungen wurden die Ergebnisse des ersten Untersuchers benutzt.

### 3.4.4 Tumornarbe und Rekonstruktion des Tumorstadiums vor der neoadjuvanten Radiochemotherapie

Die Tumornarbe ist das histomorphologische Korrelat einer Tumorregression als Antwort auf die neoadjuvante Radiochemotherapie. Sie ist von anderen Gewebsveränderungen (z.B. radiogene Fibrose, desmoplastisches Stroma) abzugrenzen. Eine Tumornarbe zeigt typischerweise:

- eine aufgelockerte Matrix aus lockeren kollagenen Fasern mit proteoglykanreicher Grundsubstanz,
- resorptive Infiltrate: Histiozyten, Hämosiderophagen, evtl. Schaumzellen und Rundzellinfiltrate. Dargestellt in Abbildung 8 auf S.19.
- Aktivierte Fibroblasten. S. Abbildung 9 auf S. 19

Die Beurteilung der Tumornarbe erfolgte für alle Studienfälle an allen angefertigten HE-Schnitten.

Bei Fällen mit ypT0 bis 2 und ypN0 wurde versucht, durch das Vorhandensein einer Tumornarbe im perirektalen Fettgewebe und/oder Zeichen einer früheren Lymphknotenmetastasierung (nekrotische Lymphknotenmetastasen bzw. Tumorsatelliten ohne vitale Tumorzellen,

Tumornarbe im Lymphknoten) die primären T- und N-Stadien zu rekonstruieren.

### **3.5 Aufarbeitung und Untersuchung der mesorektalen Lymphknoten**

Für jeden Studien- und Kontrollfall wurden anhand der HE-Schnittpräparate die drei größten, nicht metastatisch befallenen, mesorektalen Lymphknoten identifiziert. Für weitere Untersuchungen wurde das Blockpräparat des jeweils größten tumorfreien Lymphknotens pro Fall verwendet.

#### **3.5.1 Größenbestimmung der Lymphknoten**

Für die drei größten Lymphknoten pro Fall wurden die jeweils größten Durchmesser mittels Okularlineal (s. Abschnitt 3.4.1) ermittelt. Diese drei Längenangaben pro Fall wurden addiert und bildeten den sog. Summendurchmesser. Dieses Maß und der Durchmesser für den jeweils größten Lymphknoten (nur *ein* Lymphknoten pro Fall) dienten zum Vergleich der Lymphknotengrößen zwischen den Fallgruppen.

#### **3.5.2 Untersuchungen von immunhistochemisch angefärbten Immunzellen**

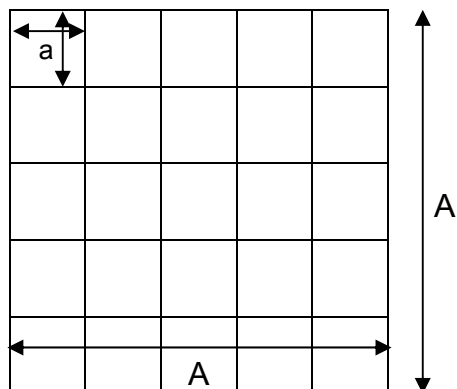
Für jeden Fall wurde der größte tumorfreie Lymphknoten ausgewählt. Es wurden jeweils vier immunhistochemische Färbungen gegen die Membranantigene CD4, CD8, CD83 und CD57 angefertigt.

Details der Färbemethodik sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Eigenschaften und Daten zu den immunhistochemischen Färbungen.**

Membran- antigen	Klon	Titer	Vorbehandlung	Anbieter, Firmensitz
CD4	1F6	1:10	Dampfdruck	Novocastra, Newcastle, UK
CD8	C8/144B	1:50	Mikrowelle	DAKO, Glostrup, Dänemark
CD83	1H4b	1:50	Mikrowelle	Novocastra, Newcastle, UK
CD57	NK-1	1:200	Protease	Novocastra, Newcastle, UK

Die Auszählung der angefärbten Zellen erfolgte lichtmikroskopisch (Mikroskop Typ Jenaval, Firma Zeiss, Jena, DDR) mit einem Okulargitter aus 5 mal 5 Kleinstquadraten (s. Abbildung 10).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Okulargitters.** Die absolute Länge der Seite eines Kleinstquadrates errechnete sich nach der Formel:  $a \text{ [mm]} = (\text{Vergrößerung des verwendeten Objektivs})^{-1}$ ;  $A = 5 \cdot a$ .

Die Größe eines *Zählfeldes* war durch die Anzahl der berücksichtigten Kleinstquadrate innerhalb des Okulargitters und das verwendete Objektiv festgelegt (z. B. 3 mal 3 Kleinstquadrate). Angefärbte Zellen, die nur teilweise innerhalb des Zählfeldes lagen, wurden folgendermaßen gezählt:

- Zellen, die auf der oberen oder linken Begrenzungslinie des Zählfeldes lagen, wurden als „innen liegend“ gewertet;
- Zellen, die die untere oder rechte äußere Linie berührten, wurden nicht mitgezählt („außerhalb liegend“).

### Zählung der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen

Die Auszählung dieser beiden Zellreihen erfolgte im Parakortex. Es wurden jene Lymphknotenbereiche ausgewertet, die beim Durchmustern die größte Dichte von angefärbten Zellen zeigten. 3 mal 3 Kleinstquadrate bildeten ein Zählfeld. Bei der verwendeten 320fachen Vergrößerung ergab sich eine Fläche von 0,0088 mm<sup>2</sup> pro Zählfeld.

Wie viele Zählfelder (n) sollten pro Lymphknoten ausgezählt werden? Zur Ermittlung des „n“ wurden vier Studien- und vier Kontrollfälle für einen Vorversuch ausgewählt und für n=1, n=2, n=4, n=8 und n=12 Zählfelder ausgezählt sowie für jedes n der Mittelwert der erhaltenen Zellzahlen gebildet. Für n>1 betrug der Abstand zwischen verschiedenen Zählfeldern mindestens ein MPF.

Die Festlegung auf n=4 Zählfelder für die Anwendung zur Auszählung *aller* Fälle ist aus folgenden Gründen gerechtfertigt:

1. graphisch: Für  $n \geq 4$  nähern sich die Verläufe der acht Kurven einer gedachten Geraden bzw. den „wahren“ Mittelwerten der Zellen pro Zählfeld an (s. Abbildung 11a und b auf S.25).
2. statistisch: Für  $n \geq 4$  ergab sich im Kruskal-Wallis-Test eine Signifikanz von  $p=0,69$  (CD4<sup>+</sup>) bzw.  $p=0,76$  (CD8<sup>+</sup>); das heißt, es bestanden zwischen den Mittelwerten der Zellen pro Zählfeld für  $n \geq 4$  innerhalb eines Falls keine signifikanten Unterschiede.
3. morphologisch: Die Auszählung von n=8 oder n=12 Zählfeldern im Abstand von mindestens einem MPF war für die acht Fälle aus den Vorversuchen möglich. Einige Lymphknoten aus dem gesamten Patientenkollektiv wären jedoch zu klein gewesen, um mehr als vier Zählfelder innerhalb eines Lymphknotens zu positionieren.

### Zählung der CD83<sup>+</sup> Zellen und CD57<sup>+</sup> Zellen

CD83<sup>+</sup> Zellen wurde im Parakortex bei 200 facher Vergrößerung gezählt. Die Außenlinien des Rasters (5 mal 5 Kleinstquadrate) begrenzten ein Zählfeld, dies entsprach einer Fläche von 0,0625 mm<sup>2</sup>.

Die Zählung der CD57<sup>+</sup> Zellen erfolgte innerhalb der Keimzentren [47] bei 320facher Vergrößerung. Die Fläche eines Zählfeldes betrug 3 mal 3 Kleinstquadrate, absolut 0,0088 mm<sup>2</sup>.

Der Abstand zwischen den Zählfeldern betrug mindestens ein MPF, zellreiche Areale wurden bevorzugt. Bei der Ermittlung der erforderlichen Anzahl von „n“ Zählfeldern wurde wie im Abschnitt „Zählung der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen“ vorgegangen. Mit den gleichen Argumenten wie dort konnten auch hier die Entscheidungen für n=4 Zählfelder begründet werden (Abbildung 11c und d auf S. 26). Auf dem Signifikanzniveau von p=0,95 (CD83<sup>+</sup>) bzw. p=0,92 (CD57<sup>+</sup>) im Kruskal-Wallis-Test waren für die Werte mit n≥4 keine signifikanten Mittelwertunterschiede anzunehmen.

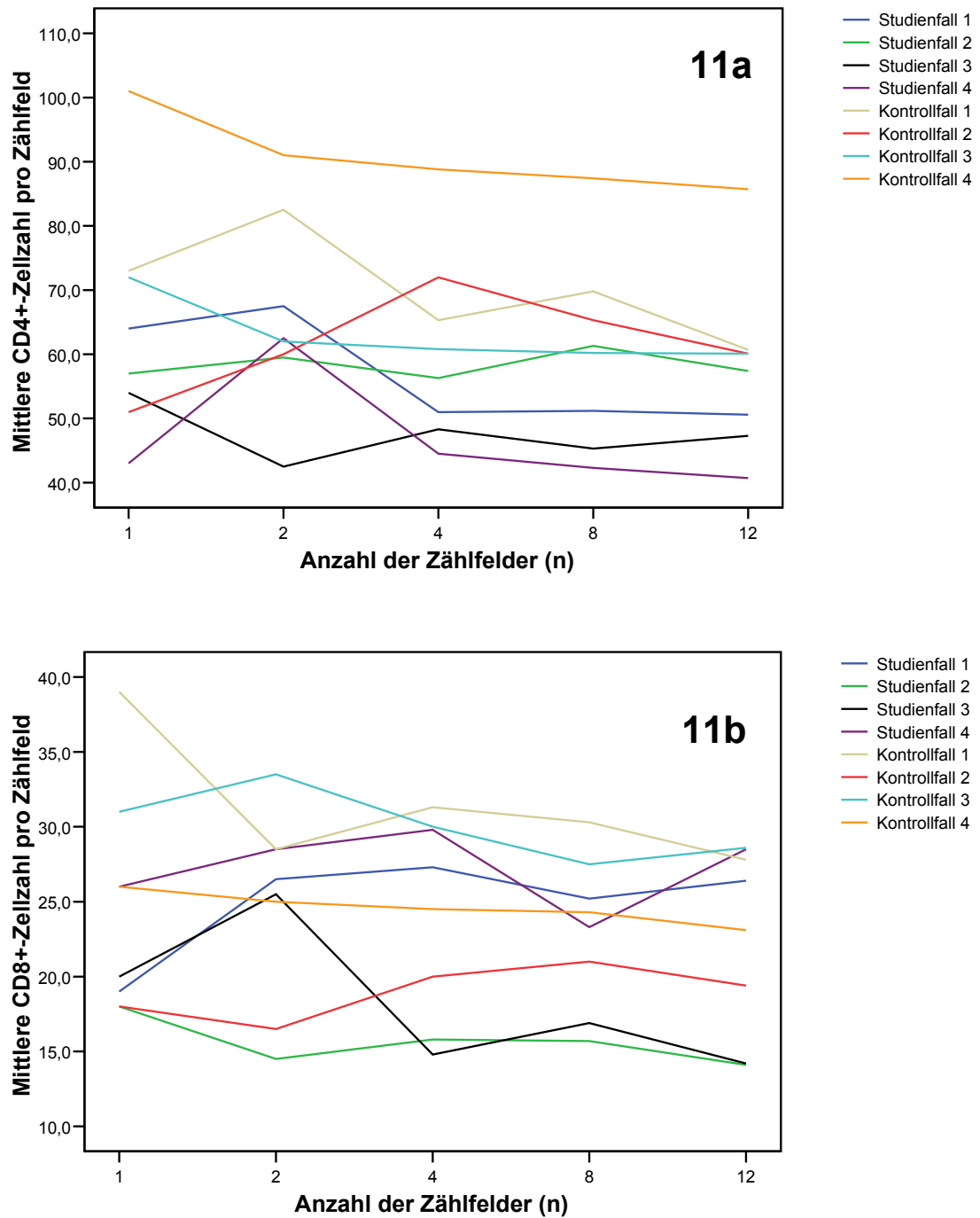
### **3.6 Statistik**

Für die statistische Auswertung wurde die Software SPSS (SPSS für Windows, Version 12.0.1, 2003, München, Deutschland) genutzt. Alle Daten wurden in eine SPSS-Datenbank aufgenommen. Qualitative Unterschiede in Klassen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests auf Signifikanz geprüft. Für Mittelwertunterschiede bei quantitativen Daten wurde der t-Test verwendet; vor jeder Anwendung wurde die Normalverteilung mittels Kolmogorow-Smirnow-Test geprüft.

Bei der Bestimmung der Anzahl der Zählfelder wurden Unterschiede durch den Kruskal-Wallis-Test beschrieben.

Das Maß der Übereinstimmung zwischen beiden Untersuchern im Interobserververgleich bei der GR-Klassifikation wurde durch den Konkordanzindex kappa ( $\kappa$ ) angegeben.

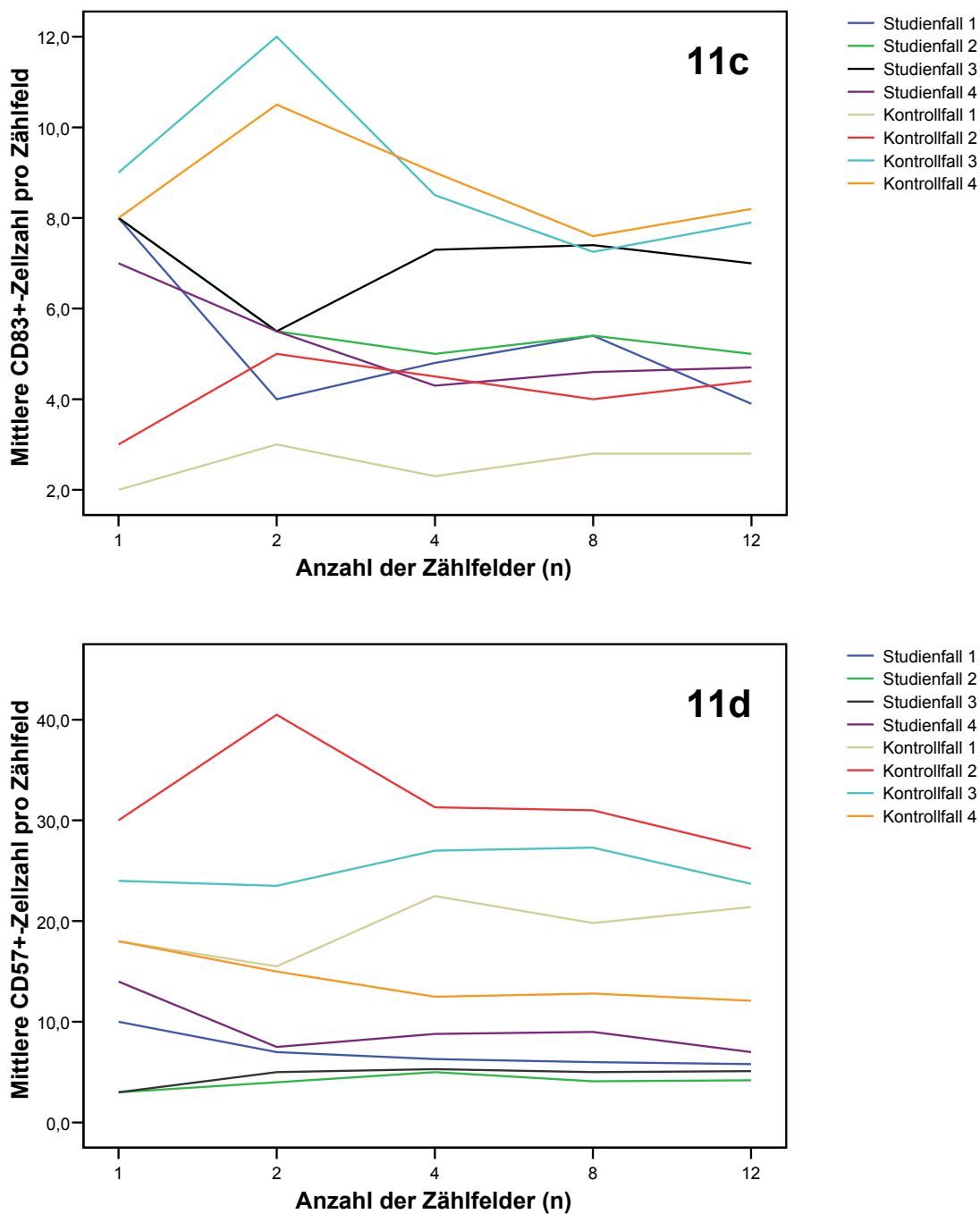
Bei allen verwendeten Tests wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  p=0,05 angesehen, für p<0,05 wurde ein signifikanter Unterschied angenommen.



**Abbildung 11 a bis d: Vorversuche zur Ermittlung der Anzahl der Zählfelder.** Für Vorversuche wurde für jeden ausgewählten Fall eine unterschiedliche Anzahl an Zählfeldern ausgezählt. Je mehr Zählfelder ausgezählt wurden, desto kleiner wurden die Mittelwertschwankungen der Zellzahlen pro Zählfeld. Die Kurvenverläufe nähern sich einer Geraden.

a) Vorversuch für die CD4<sup>+</sup> Zellen. Auszählung im Parakortex des Lymphknotens.

b) Vorversuch für die CD8<sup>+</sup> Zellen. Auszählung im Parakortex des Lymphknotens.



**Abbildung 11:** Vorversuche, siehe auch Bildunterschrift für Abbildung 10 a und b auf voriger Seite.

c) Vorversuch für die CD83<sup>+</sup> Zellen. Auszählung im Parakortex des Lymphknotens.

d) Vorversuch für die CD57<sup>+</sup> Zellen. Auszählung in den Keimzentren der Lymphfollikel.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Tumorregressionsgrad

75 Radiochemotherapie-Fälle wurden hinsichtlich ihrer Ansprechrate gemäß der GR-Klassifikation eingeteilt. Die absoluten und relativen Häufigkeiten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die anteilsmäßig größte Gruppe zeigte eine mittlere Therapieantwort (GR 2). In Richtung stärkere (GR 3+4) bzw. schwächere Response (GR 0+1) nahmen die Gruppenstärken ab. Eine Normalverteilung lag jedoch nicht vor. Die Ansprechraten von muzinösen und nicht-muzinösen Tumorformen waren nicht signifikant unterschiedlich.

Die Zusammenfassung der fünf GR-Gruppen in ein 3-Klassensystem zeigte eine gleichmäßige Häufigkeitsverteilung: 29 Patienten (38,7%) sprachen *stark* auf die neoadjuvante Radiochemotherapie an; 25 Fälle (33,3%) zeigten ein *moderates* und 21 Fälle (29,0%) ein *geringes* Ansprechen (Siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3: Verteilung der absoluten und relativen Häufigkeiten der GR-Klassen innerhalb des Studienkollektivs.** GR = Grade of regression.

GR	Tumorantwort	absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit [%]
4	stark	11	14,7
3		18	24,0
2	moderat	25	33,3
1	gering	17	22,7
0		4	5,3
Gesamt		75	100



## 4.2 Ergebniskorrelation in der Interobserverstudie

Die Ergebnisse einer Interobserverstudie sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Als Maß für die Übereinstimmung zwischen den beiden Untersuchern bezüglich der Alternativen hochgradige bzw. moderate (GR 2 bis 4) vs. geringgradige Tumorregression (GR 0 und 1) wurde ein Konkordanzindex von  $\kappa=0,94$  ermittelt.

**Tabelle 4: Ergebnisse der Interobserverstudie.** Für übereinstimmende bzw. differente Gruppenzuordnungen zwischen den beiden Untersuchern sind die absoluten und in Klammern die relativen Häufigkeiten angegeben.

	GR 4	GR 3	GR 2	GR 1	GR 0	
Übereinstimmende Zuordnung	11	17	24	7	0	59
	52			7		(78,7)
Unterschiedliche Zuordnung	0	1	1	10	4	16
	2			14		(21,3)

## 4.3 Tumorantwort in Abhängigkeit vom therapeutischen Regime

Die drei angewendeten Chemotherapieprotokolle A, B und C unterschieden sich hinsichtlich der Therapieantwort bei der Betrachtung von drei Ansprechgruppen. Tabelle 5 zeigt, dass mit dem intensivsten Regime C in 15 von 16 Fällen (93,8%) eine hohe bzw. moderate Ansprechrate erzielt wurde. Nur bei *einem* Patienten aus der Regime-Gruppe C wurde lediglich eine geringe Tumorantwort erreicht. Für die Signifikanz dieses Unterschieds zeigte sich ein statistischer Trend (Chi-Quadrat Test,  $p=0,073$ ).

**Tabelle 5: Ansprechraten bei unterschiedlichen Chemotherapieregimen.** Absolute Häufigkeitsverteilung in einer Darstellung als Kreuztabelle.

<b>Ansprechrate</b>	<b>Regime A</b>	<b>Regime B</b>	<b>Regime C</b>	<b>Gesamt</b>
hoch	3	19	7	29
moderat	7	10	8	25
gering	6	13	1	20
<b>Gesamt</b>	<b>16</b>	<b>42</b>	<b>16</b>	<b>74<sup>*)</sup></b>

Regime A: 5-FU; Regime B: 5-FU und Irinotecan; Regime C: Capecitabin und Irinotecan

<sup>\*)</sup> Ein Patient mit abweichendem Chemoregime (Tomudex) ist nicht aufgeführt.

#### **4.4 Tumornarbe und Rekonstruktion des prätherapeutischen Tumorstadiums**

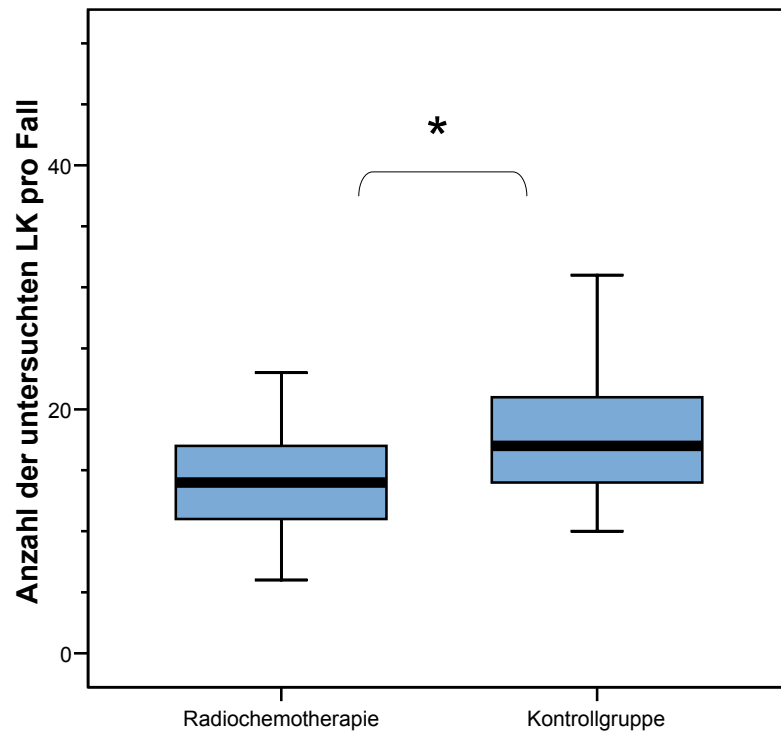
In 24 Fällen (32,0%) fanden sich bei der histopathologischen Untersuchung der Resektate keine kontinuierliche extramurale Tumorausbreitung ( $\leq$ ypT2) oder Lymphknotenmetastasen (ypN0). Nur 10 dieser 24 Fälle wiesen aber eine Tumornarbe im perirektalen Fettgewebe auf. In 2 von den verbleibenden 14 Fällen fanden sich allerdings nekrotische Lymphknotenmetastasen oder ehemalige Tumorsatelliten. Somit fehlten bei 12 Patienten (16,0% aller Radiochemotherapie-Fälle) Hinweise für eine prätherapeutische Tumordinfiltration ins perirektale Fettgewebe bzw. Lymphknotenmetastasierung (s. Tabelle 6). Für diesen Patientenanteil muss ein *prätherapeutisches UICC-Stadium I* ( $\leq$ T2 N0) angenommen werden.

**Tabelle 6: Tumornarbe bei ypT $\leq$ 2 ypN0- Patienten.** Für 24 Radiochemotherapie-Fälle mit ypT $\leq$ 2 ypN0 sind die absoluten Häufigkeiten bezüglich einer Tumornarbe im perirektalen Fett und bezüglich nekrotischer Lymphknoten bzw. Tumorsatelliten in Form einer Kreuztabelle dargestellt. Bei 12 Patienten fehlten diese Merkmale.

	<b>Nekrotische Lymphknotenmetastasen und/oder nekrotische Tumorsatelliten</b>		
<b>Tumornarbe im perirektalen Fett</b>	vorhanden	nicht vorhanden	<b>Gesamt</b>
vorhanden	2	8	
nicht vorhanden	2	<b>12</b>	
<b>Gesamt</b>	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>24</b>

#### 4.5 Unterschiedliche Lymphknotenmorphologie und Dichten von Immunzellen

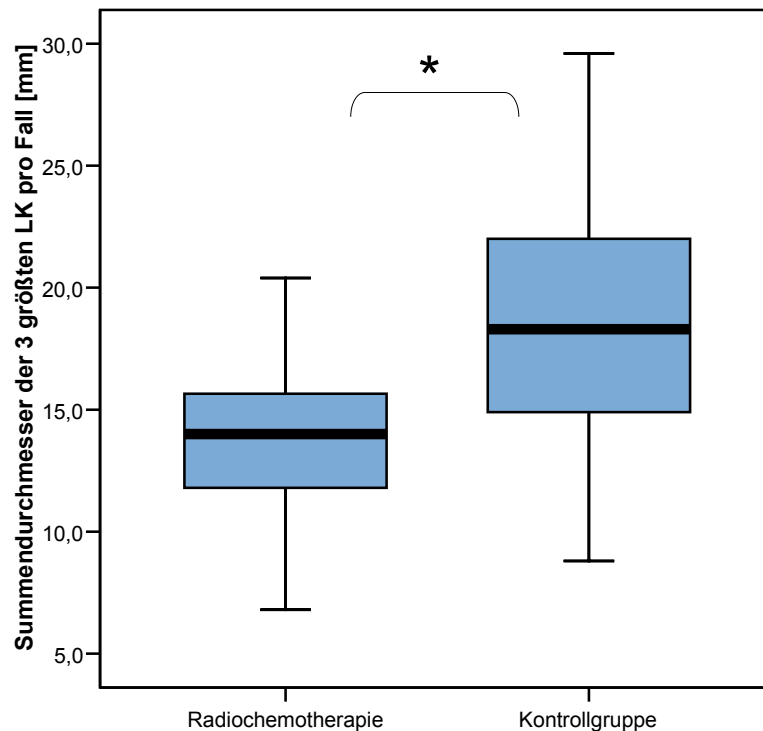
Die mittlere Gesamtzahl *aller* präparierten Lymphknoten pro Fall war für beide Kollektive nicht gleich. Bei Patienten ohne Vorbehandlung wurden im Mittel 18,7 (Median 17) Lymphknoten, bei Radiochemotherapie-Patienten 14,2 (Median 14) Lymphknoten präpariert. Eine Vorbehandlung ging folglich mit einer signifikant geringeren Ausbeute an Lymphknoten pro Fall einher ( $p < 0,001$ ). Siehe Abbildung 12.



**Abbildung 12: Anzahl der Lymphknoten (LK) pro Fall in Abhängigkeit von der Behandlung.** Bei vorbehandelten Patienten wurden signifikant weniger Lymphknoten präpariert (\*  $p < 0,001$ ).

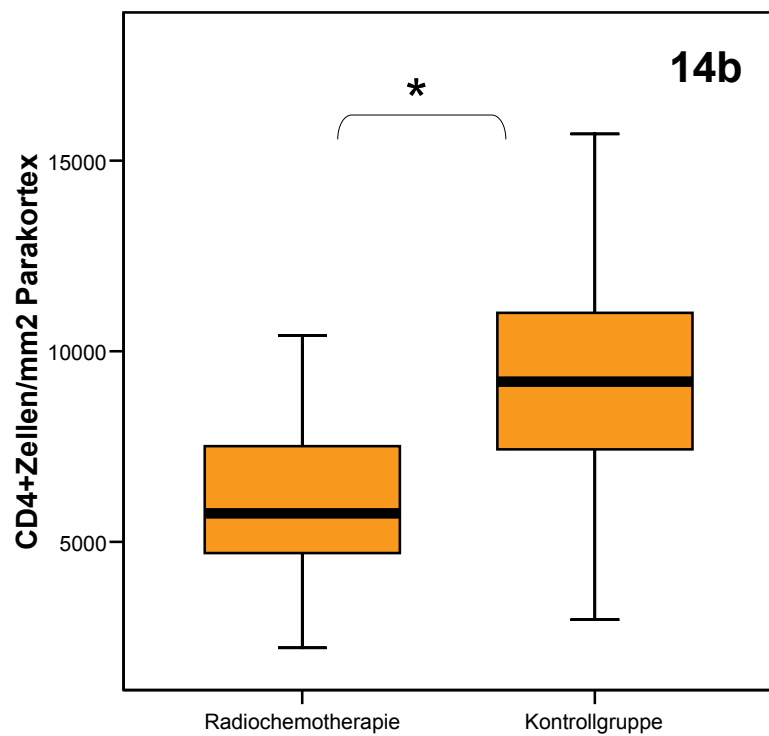
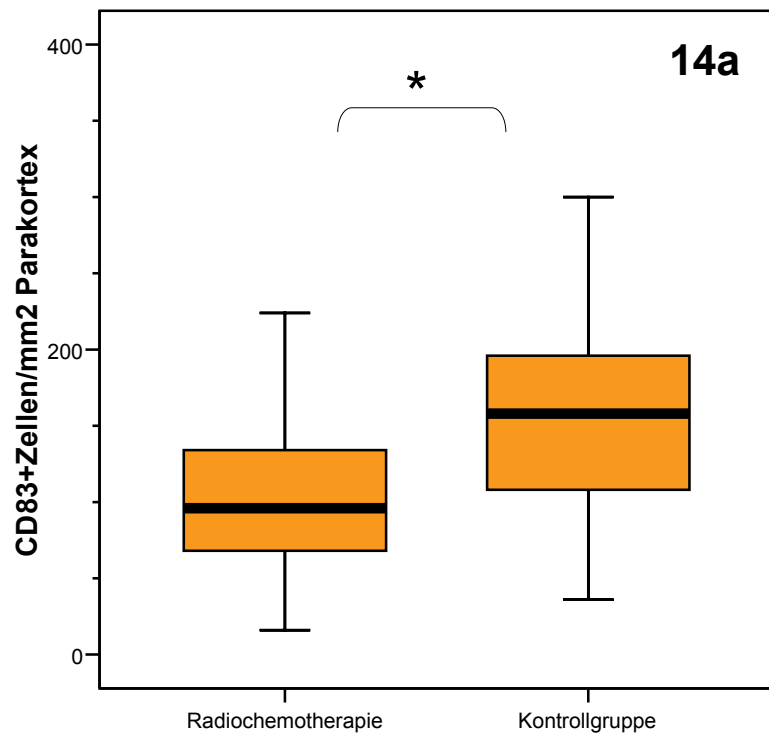
Die tumorfreien Lymphknoten von Patienten aus dem Radiochemotherapie-Kollektiv waren signifikant kleiner ( $p < 0,001$ ). Der größte tumorfreie Lymphknoten pro Fall maß in dieser Gruppe durchschnittlich 5,5 mm (Median 5,2), in der Kontrollgruppe 7,0 mm (Median 6,8). Auch im Vergleich der Summendurchmesser von den *drei* größten tumorfreien Lymphknoten pro

Fall zeigten sich im neoadjuvant vorbehandelten Patientenkollektiv signifikant kleinere Werte ( $p < 0,001$ ) (s. Abbildung 13). Ferner fiel bei vorbehandelten Fällen eine histomorphologisch veränderte Lymphknotenarchitektur auf: Die Kapsel erschien fibrös verdickt. Lymphfollikel und Parakortex zeigten eine deutliche Zelldepletion und Fibrosierung (s. Abbildung 15 auf S. 34).

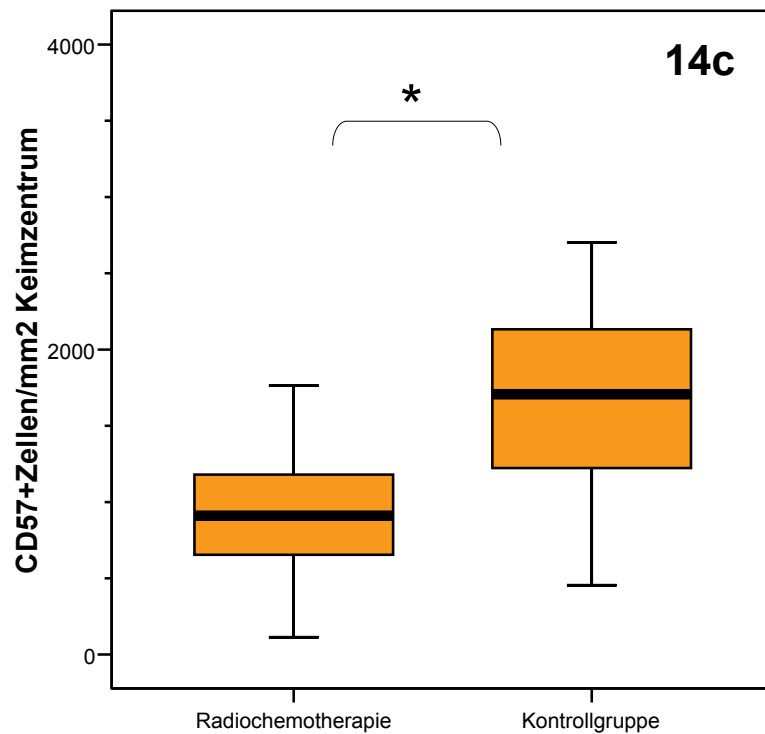


**Abbildung 13: Größe der tumorfreien Lymphknoten in Abhängigkeit von der Behandlung.** Radiochemotherapie-Patienten hatten signifikant kleinere Lymphknoten als Kontrollfälle (\*  $p < 0,001$ ).

Die Zelldichten von  $CD83^+$ ,  $CD4^+$  und  $CD57^+$  Zellen unterschieden sich zwischen beiden Patientenkollektiven jeweils signifikant ( $p < 0,001$ ). In den Lymphknoten von Radiochemotherapie-Patienten fand sich jeweils eine geringere Anzahl der entsprechenden Zelltypen pro  $mm^2$ . Die Diagramme in Abbildung 14a bis c (s. S. 32 und 33) und die Fotografien der Abbildung 16 bis Abbildung 18 (s. S. 34 und 35) verdeutlichen diese Unterschiede.

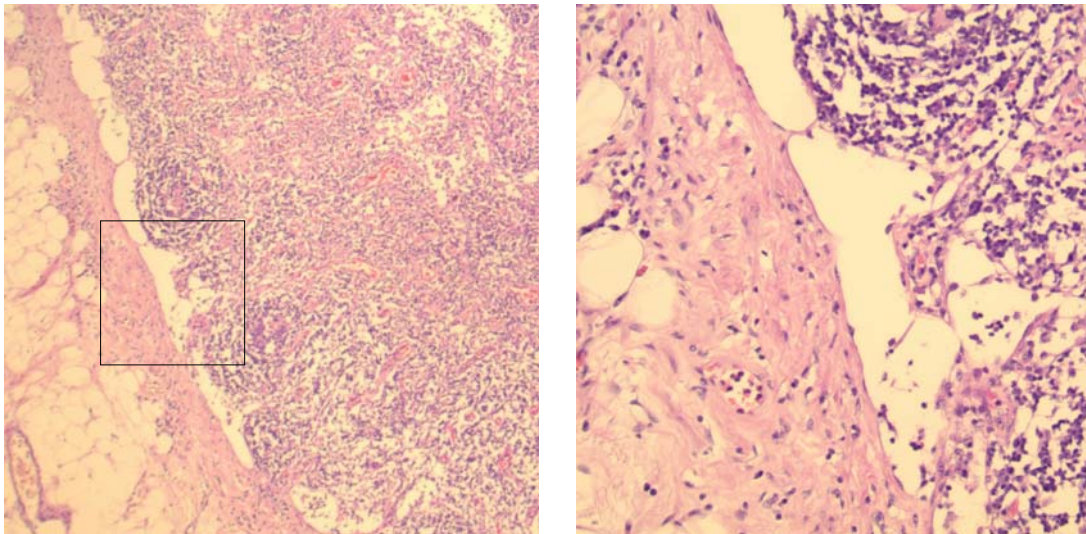


**Abbildung 14 a und b: CD83<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.** Die Boxplots beschreiben die signifikant unterschiedlichen Zelldichten für CD83<sup>+</sup> (a) und CD4<sup>+</sup> Zellen (b) von vorbehandelten und Kontrollfällen (\* p<0,001).

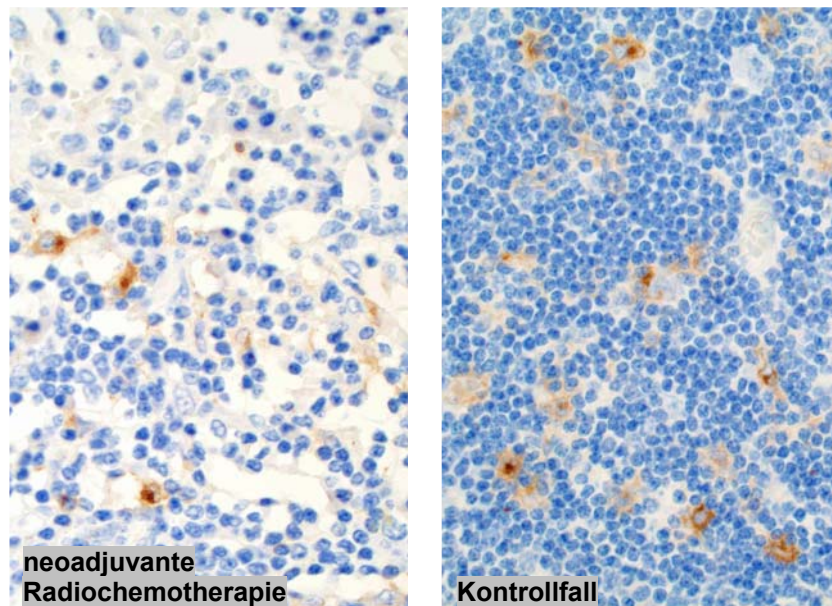


**Abbildung 14c: CD57<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.** Radiochemotherapie-Patienten hatten signifikant geringere Werte als nicht-vorbehandelte Kontrollfälle (\*  $p < 0,001$ ).

Der Unterschied in der Zelldichte von CD8<sup>+</sup> Zellen zwischen der Radiochemotherapie- und der Kontrollgruppe war nicht signifikant ( $p = 0,379$ ). Die Abbildung 19 auf Seite 35 zeigt zwei beispielhafte Fälle.

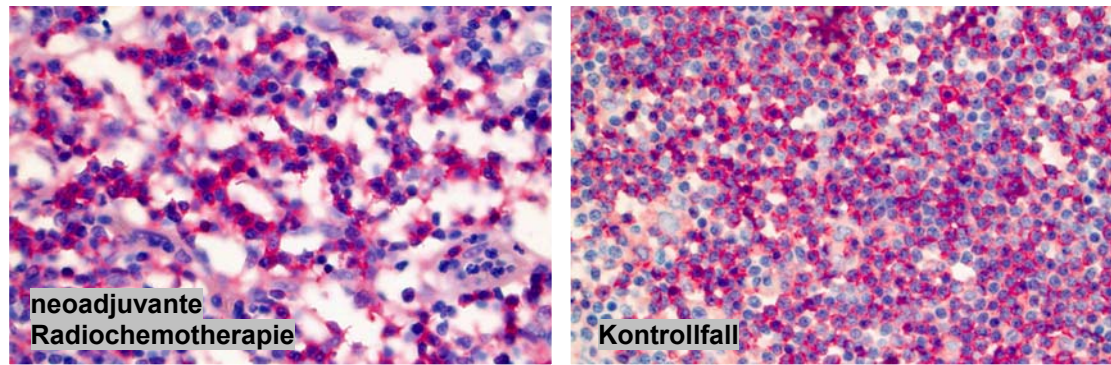


**Abbildung 15: Veränderte Lymphknotenarchitektur nach neoadjuvanter Radiochemotherapie.** In der Übersichtsaufnahme (links) sind eine verdickte Kapsel, lediglich gering stimulierte Lymphfollikel mit kleinen Keimzentren und eine generelle Zelldepletion zu erkennen. Das Detailbild (rechts) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem zellarmen Sinus. HE, x40, Detailbild x200.

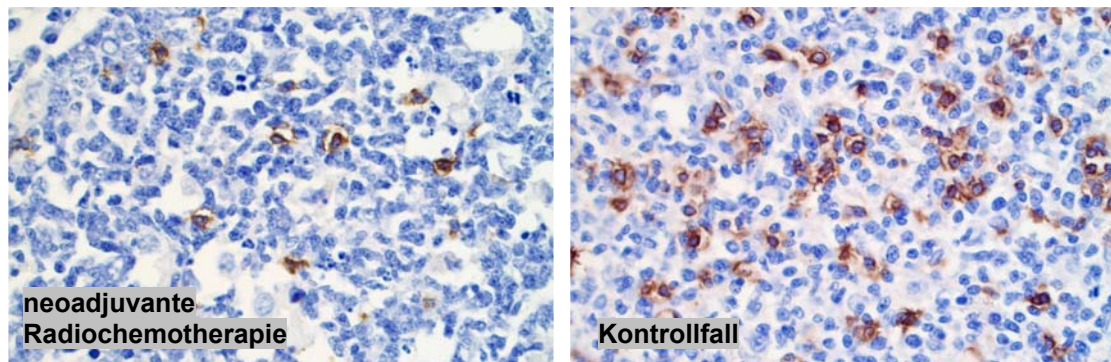


**Abbildung 16: CD83<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.** Immunhistochemische Färbung von tumorfreien Lymphknoten mit Antikörpern gegen das Membranantigen CD83, dadurch sind Dendritische Zellen im Parakortex braun markiert. Beim Radiochemotherapie-Fall fällt im Vergleich zum Kontrollfall eine deutlich geringere Dichte von Dendritischen Zellen auf. 400 fache Vergrößerungen.

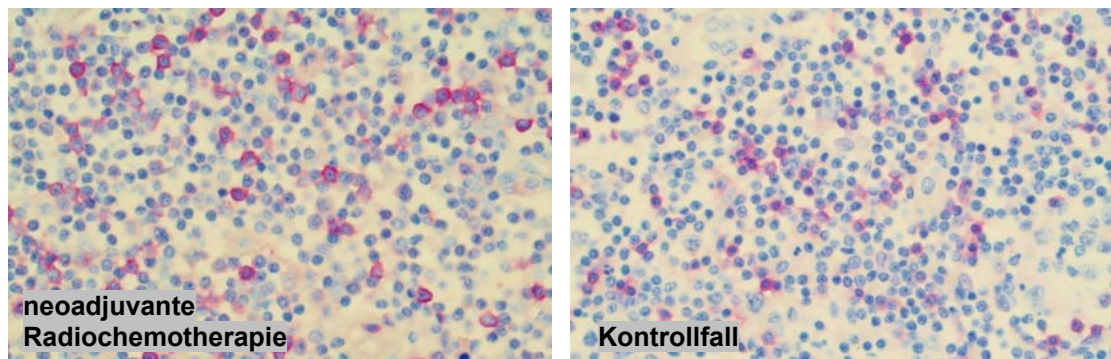




**Abbildung 17: CD4<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.** In diesen immunhistochemischen Färbungen von tumorfreien Lymphknoten sind CD4<sup>+</sup> Zellen rot markiert. Die Bildausschnitte zeigen jeweils zwei Parakortexareale in 400 facher Vergrößerungen. Die CD4<sup>+</sup>-Zelldichte ist nach Radiochemotherapie deutlich geringer.



**Abbildung 18: CD57<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.** Durch immunhistochemische Färbung von tumorfreien Lymphknoten wurden CD57<sup>+</sup> NK-Zellen braun hervorgehoben. Darstellung von zwei Ausschnitten aus Keimzentren der Lymphfollikel in 400 facher Vergrößerungen. Der Radiochemotherapie-Fall zeigt eine deutlich geringere Dichte von CD57<sup>+</sup> NK-Zellen.



**Abbildung 19: CD8<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung.** Bildausschnitte aus dem Parakortex. Für die Zelldichte der rot angefärbten CD8<sup>+</sup> Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen. 400 fache Vergrößerungen.



## **5 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf den Tumor und auf Immunzellen in mesorektalen Lymphknoten untersucht.

### **5.1 Der Tumorregressionsgrad beschreibt den Behandlungseffekt.**

Rektumkarzinome reagieren unterschiedlich auf eine neoadjuvante Radio- bzw. Radiochemotherapie. In dieser Arbeit wurden 75 Fälle histopathologisch untersucht und das Ansprechen auf die Vorbehandlung gemäß der GR-Klassifikation eingeteilt. Die größte Gruppe bildeten die Fälle mit mittlerer Ansprechrate: 33,3% der Fälle wurden als GR 2 klassifiziert. 28,7% der Patienten zeigten eine geringere (GR 0+1) und 38,7% eine stärkere (GR 3+4) Therapieantwort.

#### **5.1.1 Der Tumorregressionsgrad bei verschiedenen neoadjuvanten Protokollen**

Die Häufigkeitsverteilungen der GR-Untergruppen in publizierten Arbeiten streuen in Abhängigkeit von den Behandlungsprotokollen. Chang et al. untersuchten die Ansprechraten von 130 Patienten [56]. Die Bestrahlungsgesamtdosis betrug wie in der vorliegenden Arbeit 50,4 Gy. Alternativ zu einem Chemotherapieregime mit 5-FU in vergleichsweise niedrigerer Dosierung (400 mg/m<sup>2</sup>/d für zweimal fünf Tage) wurden einige Patienten mit Capecitabin vorbehandelt. Dieses Chemotherapeutikum wurde im Vergleich wiederum höher dosiert (1650 mg/m<sup>2</sup>/d für zweimal fünf Tage). Die Autoren erhielten ähnliche Ansprechraten: Die Häufigkeiten für die drei Ansprechgruppe entsprachen größenordnungsmäßig der Verteilung aus der vorliegenden Arbeit.

In zwei Studien betrug die Bestrahlungsgesamtdosis nur 45 Gy [57, 58]; im Gegensatz zum Protokoll aus der vorliegenden Arbeit erfolgte keine zusätzliche Bestrahlung (Boost) mit 5,4 Gy. Außerdem unterschieden sich die Chemotherapieregime. In den Studien erhielten alle Patienten 5-FU in niedrigeren Dosierungen (zwischen 350 und 1000 mg/m<sup>2</sup>/d für zweimal fünf Tage); andere Chemotherapeutika wurden nicht eingesetzt. Im Vergleich waren die Vorbehandlungen in diesen Arbeiten also weniger intensiv. Dieser Unterschied spiegelt sich in einer Verschiebung der Ansprechraten wider: Die Autoren berichteten, dass 45 bzw. 38 Prozent der Patienten ein geringes/fehlendes Tumoransprechen zeigten. In einer weiteren Studie mit ebenfalls niedrigerer 5-FU-Dosierung (625 mg/m<sup>2</sup>/d für zweimal fünf Tage) und einer Strahlendosis zwischen 45-50 Gy fand sich bei 52 Prozent der Patienten diese minimale Therapieantwort [55]. In der vorliegenden Arbeit betrug dieser Anteil – bedingt durch eine durchschnittlich höhere Dosierung von 5-FU, den Einsatz weiterer Chemotherapeutika und eine zusätzliche Boost-Bestrahlung [59] – lediglich 28 Prozent.

Seit einigen Jahren wurde das „Standardschema für eine neoadjuvante Radiochemotherapie“ mit 45 bis 50,4 Gy und 5-FU [59] durch den Einsatz anderer Substanzen erweitert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ansprechraten bei unterschiedlichen Chemotherapieregimen (bei gleichem Bestrahlungsprotokoll) verglichen. Durch Regime C (Capecitabin plus Irinotecan) wurden gegenüber den anderen Kombinationen mit 5-FU (Regime A und B) bessere Ansprechraten erreicht. Für diesen Unterschied zeigte sich ein statistischer Trend (p=0,073). Die Überlegenheit von Capecitabin bezüglich einer hohen Rate an Totalremissionen konnte bei Kim et al. [60] und in der Metaanalyse von Hartley et al. herausgestellt werden: Chemotherapieregime mit Capecitabin waren allen Protokollen auf 5-FU-Basis überlegen [59].

#### 5.1.2 Reproduzierbarkeit der GR-Klassifikation

In der vorliegenden Arbeit wurde die GR-Klassifikation nach Dworak ergänzt: Die Kriterien zur Gruppeneinteilung wurden für die Gruppen GR 2 und 3 durch objektive Parameter (Gesamtfläche des residualen Tumorbetts, Größe

der einzelnen Tumorkomplexe und Tiefe der Tumordinfiltration) erweitert. Zudem wurden Unterscheidungsmerkmale zur Einordnung von muzinösen Karzinomen hinzugefügt. Die neuen Kriterien wirkten sich auf die Reproduzierbarkeit der Gruppeneinteilung aus. In einer Interobserverstudie klassifizierte der erste Untersucher 54 Fällen mit GR 2-4. Der zweite Untersucher kam in 52 von diesen 54 Fällen zu einer übereinstimmenden Gruppenzuordnung. 14 von insgesamt 16 abweichenden Zuordnungen betrafen *die* GR-Gruppen, für die keine objektiven Kriterien galten (GR 0 und 1).

In zwei publizierten Interobserverstudien [55, 57] erfolgte die Zuordnung nach der ursprünglichen GR-Klassifikation. Die Objektivität der GR-Klassifikation ohne zusätzliche Kriterien war in diesen Studien hoch ( $\kappa=0,64$  und  $\kappa=0,88$ ). Bei Berücksichtigung der neuen Parameter konnten diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit noch verbessert werden. Die Interobserver-Korrelation bezüglich der Einteilung in GR 3 und 4 vs. GR 0 bis 2 war sehr stark ( $\kappa=0,94$ ). Nach einer Bewertung von Sachs entspricht dieses Ergebnis einer „nahezu vollständigen Übereinstimmung“ zwischen beiden Untersuchern [61].

### 5.1.3 Der Tumorregressionsgrad als prognostischer Parameter

Die Klärung, ob eine starke Tumorregression auch mit einem besseren klinischen Verlauf einhergeht, war nicht Gegenstand der Untersuchungen zu dieser Arbeit. Dennoch soll im Folgenden auf einen möglichen Zusammenhang eingegangen werden.

In einer großen randomisierten Studie wurden die neoadjuvante Langzeitbestrahlung und die neoadjuvante intensivierte Radiochemotherapie miteinander verglichen [62]. Die Patientengruppe mit der zweitgenannten Therapieform zeigte neben einer signifikant höheren Totalregressionsrate (3,6% vs. 11,4%) eine signifikant geringere Loklarezidivrate (8,1% vs. 16,5%). Möglicherweise könnte ein Zusammenhang zwischen Tumorregression und besserer lokaler Tumorkontrolle bestehen.

Offen bleibt aber, ob insbesondere *die* Patienten, bei denen durch die Vorbehandlung eine starke Tumorregression erreicht wurde, eine geringere Lokalrezidiv- bzw. eine höhere Überlebensrate haben. Nur wenige Autoren untersuchten explizit die Korrelation zwischen dem Tumorregressionsgrad und dem klinischen Verlauf. In Tabelle 7 sind die größten Studien zu diesem Sachverhalt zusammengefasst. Die Ergebnisse stützten in der Mehrzahl eine gemeinsame These: Je besser die Ansprechrates, desto besser die Rezidiv- und Überlebensraten.

**Tabelle 7: Prognostische Relevanz der GR-Klassifikation.** In den aufgeführten Studien wurden der Zusammenhang zwischen der Tumorregression nach neoadjuvanter Therapie und dem klinischen Verlauf untersucht.

Autor	Regime Gesamtdosis und Chemotherapeutika	n	Vergleich zw. GR- Gruppen	Lokalrezidiv- rate [%]	Krebsfreies Überleben [%]	Gesamt- überleben [%]
Losi et al. 2006 [63]	50 Gy 5-FU	106	4 vs. 3 vs. 2 vs. 1 vs. 0	k. A.	100 vs. 85 vs. 82 vs. 66 vs. 33 )	k. A.
Jakob et al. 2006 [64]	50,4 Gy 5-FU	40	4-2 vs. 1+0	31,2 vs. 12,5 °)	k. A.	k. A.
Rödel et al. 2005 [65]	50,4 Gy 5-FU	344	4 vs. 3+2 vs. 1+0	0 vs. 4 vs. 6 °)	86 vs. 75 vs. 63 )	k. A.
Vecchio et al. 2005 [66]	37,8-50,4 Gy 5-FU u.a.	144	4+3 vs. 2-0	2 vs. 17 *)	91 vs. 58 **)	89 vs. 68 **)
Guillem et al. 2005 [67]	50,4 Gy 5-FU/Irinotecan	297	4+3 vs. 2-0	k. A.	92,1 vs. 66,1 **)	94,5 vs. 67,3 **)
Gavioli et al. 2005 [68]	50 Gy 5-FU	139	4 vs. 3 vs. 2-0	0 vs. 0 vs. 14 *)	k. A.	k. A.

\*)  $p < 0,05$ ; \*\*)  $p < 0,01$ ; \*\*\*)  $p < 0,001$ ; °) nicht signifikant; k. A. = keine Angaben

#### 5.1.4 Konsequenz für die Praxis

Die Indikation zu einer zusätzlichen adjuvanten Therapie leitet sich derzeit aus dem ypTNM-Stadium ab. Ergänzend dazu könnten „Risikopatienten“ nach neoadjuvanter Langzeittherapie anhand der GR-Klassifikation erkannt bzw. die Gefährdung für ein Tumorrezidiv abgeschätzt werden. Bei Fällen mit GR 0 bis 2 müssten demnach zusätzliche Therapien eingesetzt werden, um ein erhöhtes Risiko für ein Lokal- und/oder Fernrezidiv aufzufangen. Bei Fällen mit hoher Tumorregression wären keine weiteren Therapien indiziert.

Deshalb sollte die histopathologische Befundung eines Rektumkarzinoms nach neoadjuvanter Radiochemotherapie neben einem Staging gemäß der pTNM-Klassifikation zusätzlich ein Grading der Tumorregression beinhalten. Eine dreistufige Einteilung wäre aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und prognostischen Relevanz gut geeignet:

- (1) Komplette Regression/mikroskopische Residuen
- (2) mittelgradige Regression
- (3) Geringe Regression

## **5.2 Durch die Tumornarbe lässt sich das prätherapeutische Tumorstadium rekonstruieren.**

Eine Tumornarbe kann vermutlich als eine Phase innerhalb eines Regressionsprozesses aufgefasst werden. Sie ist Reaktion auf einen Tumorzelluntergang nach neoadjuvanter Therapie und organisiert als kontrollierter Entzündungsprozess die Tumornekrosen. Gleichzeitig entstehen Proliferationsreize; aktivierte Fibroblasten produzieren Kollagen und sind Wegbereiter einer Defektdeckung. Es bleiben Fragen offen: Wie schnell kommt es zur Bildung einer Tumornarbe? Wie lange bleibt sie bestehen? Stellt sie nur ein Übergangsstadium für eine vollständige Defektheilung dar? Kann der Regressionsprozess auch ohne die Entstehung einer Tumornarbe ablaufen? Möglicherweise könnten Studien, die systematisch die Tumorantwort nach unterschiedlicher neoadjuvanter Therapiedauer und unterschiedlichen Zeitabständen zur anschließenden Tumorresektion untersuchen, Antworten auf diese Fragen liefern.

In der großen multizentrischen Studie der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft Onkologie/Arbeitsgemeinschaft der Radioonkologen (CAO/ARO) wurden über 800 Patienten bezüglich einer adjuvanten vs. einer neoadjuvanten Radiochemotherapie randomisiert [9]. Die prätherapeutische Stadieneinteilung erfolgte bei allen Patienten mittels Endosonographie; es wurden nur Fälle im klinischen UICC-Stadium II und III (uT3/4 und/oder uN+) eingeschlossen. Bei Patienten aus dem adjuvanten Studienarm konnten

diese uT- und uN-Stadien unmittelbar histologisch am Operationspräparat überprüft werden. Bei 18% wurde hierbei jedoch weder eine wandüberschreitende Tumorinfiltration noch eine Lymphknotenmetastasierung nachgewiesen. Diese Patienten hatten also einen Tumor im UICC-Stadium I ( $pT \leq 2$  pN0). Der gleiche Patientenanteil musste auch für das neoadjuvant therapierte Kollektiv angenommen werden. Für 18% der vorbehandelten Patienten (UICC I) wäre somit eine *neoadjuvante Radiochemotherapie nicht indiziert* gewesen.

Die vorliegende Arbeit lieferte nach histologischer Auswertung der Tumornarbe ein Ergebnis in gleicher Größenordnung: bei 16% der Patienten musste ein UICC I-Stadium *vor* der Behandlung vermutet werden. Rückblickend bestand hier keine Indikation für eine neoadjuvante Radiochemotherapie (s. Einleitung S. 1), die Patienten wurden wahrscheinlich übertherapiert.

Dieses Ergebnis sollte auch bei der Interpretation von publizierten Studien berücksichtigt werden: Patienten mit Tumor-Downstaging nach neoadjuvanter Radiochemotherapie sind nur zu einem Teil „echte“ Therapieresponder. Der andere Teil umfasst die „Pseudo“-responder - also Fälle, die schon *vor* der Therapie ein Tumorstadium UICC I hatten und bei denen nur aufgrund eines *Overstagings* in der prätherapeutischen Bildgebung die Indikation zur neoadjuvanten Therapie gestellt wurde.

Bei der Stadieneinteilung mittels Endosonographie und CT sind Fehleinschätzungen nicht ausgeschlossen. In zwei Übersichtsarbeiten wurde der Anteil für ein unkorrektes T-Stadium mittels Endosonographie zwischen 10 und 33% angegeben, der N-Status wurde in 15 bis 38% fehlinterpretiert; die CT-Diagnostik ist noch unsicherer [69, 70]. Die Gefahr liege im *Overstaging*: In einer Studie wurde das präoperative Staging (keine neoadjuvante Therapie) mit dem histopathologischen Befund verglichen: bei 28% aller Patienten, die als uT3 eingeschätzt worden waren, fand sich histologisch nur ein pT2-Stadium [71]. Durch Verbesserungen in der prätherapeutischen Bildgebung könnte das Risiko für Overstaging und Übertherapie gesenkt werden. Durch den Einsatz des MRT ließe sich eine wandüberschreitende Tumorinfiltration ( $\geq T3$ ) besser darstellen [72, 73].

### 5.3 Die neoadjuvante Radiochemotherapie bewirkt Veränderungen der mesorektalen Lymphknoten.

Zur Beschreibung der Therapiewirkung auf das Immunsystem wurden tumorfreie mesorektale Lymphknoten untersucht. Die Befunde wurden bei vorbehandelten und Kontrollfällen erhoben und miteinander verglichen.

#### 5.3.1 Veränderung der Lymphknotenarchitektur

Es fiel auf, dass bei Studienpatienten signifikant *weniger* Lymphknoten präpariert werden konnten. Eine Untersuchung von Wijesuriya et al. untermauert dieses Ergebnis [58]. Allerdings berichteten die Autoren von geringeren Absolutwerten: Bei neoadjuvant vorbehandelten Patienten konnten durchschnittlich nur vier, bei Kontrollpatienten durchschnittlich nur neun Lymphknoten untersucht werden. Bei den Fällen aus der vorliegenden Arbeit war die Anzahl der präparierten Lymphknoten – wohl bedingt durch die Operationstechnik und/oder die akkurate Aufarbeitung des Präparates – höher: In der Radiochemotherapie-Gruppe durchschnittlich 14, in der Kontrollgruppe im Mittel 19 Lymphknoten pro Fall.

Die tumorfreien mesorektalen Lymphknoten von vorbehandelten Patienten waren signifikant *kleiner*. Eine Schrumpfung von Lymphknoten durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie ist auch in anderen Arbeiten beschrieben worden [55, 74]. Bei Wijesuriya et al. zeigte sich für das Studienkollektiv ein mittlerer Lymphknotendurchmesser von 5 mm und für die Kontrollgruppe von 9 mm - ein signifikanter Unterschied [58]. Allerdings wurde in dieser Studie nicht angegeben, ob für diese Messungen nur die größten *tumorfreien* Lymphknoten berücksichtigt worden sind. Möglicherweise ist durch eine abweichende Methodik der absolute Größenunterschied zwischen beiden Patientengruppen größer als in der vorliegenden Arbeit (hier 5,5 mm vs. 7,0 mm).

Lymphknoten aus der Kontrollgruppe zeigten häufiger eine deutliche Immunstimulation, sichtbar an Parakortex- und Keimzentrumshyperplasie, Follikelhyperplasie und Sinushistiozytose. Wahrscheinlich ist dies ein

morphologisches Abbild der lokalen Tumorimmunantwort bei Rektumkarzinompatienten ohne Vorbehandlung [36, 75]. Die Lymphknoten von Patienten nach neoadjuvanter Radiochemotherapie sahen verglichen mit Kontrollfällen deutlich anders aus: neben einer Fibrosierung mit veränderter Lymphknotenarchitektur waren eine deutliche Zelldepletion sowie eine geringere Follikel- und Keimzentrumsgröße erkennbar. In einer großen Studie an 1226 Rektumkarzinompatienten aus dem Jahr 1983 hatte dieser Unterschied in der Lymphknoten-Morphologie prognostische Relevanz: Zeichen einer geringeren Immunstimulation gingen mit einem schlechteren 5- und 10-Jahresüberleben einher [75].

### 5.3.2 Veränderung der Immunzell-Zusammensetzung

Durch die immunhistochemische Anfärbung und Zählung von Lymphozytensubtypen in den Lymphknoten wurde versucht, das Ausmaß der Wirkung der Radiochemotherapie auf das lokoregionale Immunsystem zu quantifizieren.

Mit Antikörpern gegen das Membranantigen CD83 wurden selektiv aktivierte Dendritische Zellen angefärbt. Die Dichte dieser Zellen im perirektalen Lymphknoten war bei vorbehandelten Patienten signifikant geringer als bei nicht vorbehandelten Patienten.

Die klinischen Folgen einer geringeren Dichte der Dendritischen Zellen in tumordrainierenden Lymphknoten wurden für Patienten mit Rektumkarzinom bislang nicht untersucht. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom zeigte sich für Fälle mit geringerer Zelldichte im Lymphknoten ein statistischer Trend für ein kürzeres tumorfreies Überleben [76].

Andere Studien untersuchten die klinische Prognose bei unterschiedlich starker Infiltration von Dendritischen Zellen ins *Tumorbett* von Adenokarzinomen des Rektums oder des Magens und hatten eine ähnliche Aussage: Eine geringere Dichte von Dendritischen Zellen war mit einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert [36, 37, 77]. Eine Korrelation zwischen den Zelldichten in Tumorbett und Lymphknoten ist anzunehmen [36].

Als weitere Zellarten wurden CD4<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen untersucht.



Die Vergleiche zwischen beiden Kollektiven bezüglich der Zelldichten von CD4<sup>+</sup> und CD57<sup>+</sup> Zellen im perirektalen Lymphknoten zeigten jeweils signifikant geringere Werte bei Patienten mit neoadjuvanter Radiochemotherapie. Für CD8<sup>+</sup> Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied.

Die Wirkung einer neoadjuvanten Therapie auf diese drei Zelltypen im tumordrainierenden Lymphknoten wurde bisher nur in zwei weiteren Studien beschrieben. Adachi et al. untersuchten eine kleine Patientengruppe: 12 Patienten mit Rektumkarzinom im Stadium I bis III erhielten zweimal täglich in der präoperativen Woche 100 mg 5-FU als Suppositorium. Die Kontrollgruppe bestand aus 11 Patienten ohne Vorbehandlung. Die Ergebnisse sind spiegelbildlich zu den Werten aus der vorliegenden Arbeit: Bei Adachi et al. fand sich kein Unterschied in der Zelldichte für TH- und NK-Zellen, die Zahl für CTL war in der 5-FU-Gruppe dagegen signifikant niedriger [78]. Durch die geringe Fallzahl ist die Aussagekraft eines Vergleichs mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit jedoch eingeschränkt. Ferner unterlagen die Lymphknoten aus der Studie einem anderen neoadjuvanten Therapieregime: 5-FU wurde nicht intravenös appliziert, die Therapiedauer betrug nur eine Woche, die Operation erfolgte gleich im Anschluss an die Chemotherapie. Darüber hinaus unterlagen die Immunzellen nicht dem zytotoxischen Einfluss einer Bestrahlung. Des Weiteren wurden anstelle von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen die entsprechenden Subtypen selektiv angefärbt und ausgewertet: Leu4<sup>+</sup> 3a<sup>+</sup> 8<sup>-</sup> wurde für TH verwendet, Leu4<sup>+</sup> 3a<sup>+</sup> 8<sup>+</sup> für Suppressorzellen, Leu4<sup>+</sup> 2a<sup>+</sup> 15<sup>-</sup> für CTL, Leu4<sup>+</sup> 2a<sup>+</sup> 15<sup>+</sup> für Suppressor-T-Zellen. So wurde nur für die CTL, nicht aber für die Suppressor-T-Zellen ein signifikanter Unterschied herausgearbeitet; wären beide Subtypen zusammen als CD8<sup>+</sup> Zellen gezählt worden, hätte der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen geringer sein können.

Die zweite Studie von Fattarossi et al. verglich auch zwei kleine Patientengruppen: 19 Patientinnen mit Zervixkarzinom wurden mit einer Gesamtstrahlendosis von 39,6 Gy neoadjuvant behandelt. An zweimal vier Tagen wurden 1000 mg/m<sup>2</sup>/d 5-FU und 20 mg/m<sup>2</sup>/d Cisplatin appliziert. Die Operation des Tumors erfolgte vier Wochen nach Therapieende. Der Vergleich zu 15 Kontrollpatientinnen zeigte ebenfalls ein differentes Ergebnis

zur vorliegenden Arbeit:  $CD8^+$  und  $CD56^+$  NK-Zellen waren bei vorbehandelten Patientinnen signifikant erhöht, für  $CD4^+$  Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied [79]. Allerdings sind erneut die geringen Fallzahlen dieser Studie anzumerken. Ferner ist die Zählmethode mit der Vorgehensweise aus der vorliegenden Arbeit nicht identisch: Fattarossi et al. stellten aus mehreren tumorfreien Lymphknoten pro Fall eine Zellsuspension her, um anschließend die Zellzählung per Durchflusszytometrie durchzuführen. Dabei erhielten die Autoren die Zellzahl einer bestimmten Zellart für den *gesamten* Lymphknoten, während in der vorliegenden Arbeit nur die jeweils charakteristische *Zone* eines Lymphknotens ausgezählt wurde.

Sechs Studien untersuchten die quantitativen Veränderungen von  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und NK-Zellen nach neoadjuvanter Therapie im *peripheren Blut* bei Patienten mit Rektumkarzinom [80-82] oder mit verschiedenen anderen Tumorentitäten [83-85]. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Zellzahlen *im Lymphknoten* ist möglich: Fattarossi et al. stellten eine mäßige Parallelität fest [79]. In jeweils vier der sechs Studien deckte sich das Ergebnis aus der vorliegenden Arbeit: Abfall der  $CD4^+$  und NK-Zellen, gleich bleibende Zahl der  $CD8^+$  Zellen nach der Vorbehandlung. Differente Ergebnisse könnten ebenfalls auf geringe Patientenzahlen (zwischen 8 und 30 Patienten) sowie auf unterschiedliche neoadjuvante Behandlungsprotokolle zurückzuführen sein.

Welche tumorbiologischen bzw. tumorimmunologischen Implikationen ergeben sich aus den Befunden einer Suppression von Dendritischen,  $CD4^+$  und NK-Zellen im tumordrainierenden Lymphknoten im Gegensatz zu stabilen Werten für  $CD8^+$  Zellen?

1. Die Aktivierungskaskaden des Immunsystems werden durch Zytokine und Zell-Zell-Interaktionen gesteuert. Es ist anzunehmen, dass diese Abläufe durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie erheblich beeinflusst

werden. Aufgrund absoluter und relativer Verschiebungen innerhalb der Immunzellsubpopulationen im Lymphknoten könnte das biochemische *Mikromilieu verändert* und der Aufbau einer Tumorimmunantwort gestört sein:

Dendritische Zellen benötigen für ihre Reifung die Hilfe von antigenspezifischen  $CD4^+$  THL [86]. Diese Zell-Zell-Interaktion bewirkt die Aktivierung und sichert das Überleben der Dendritischen Zellen [87]. Wenn diese sog. inflammatorischen Stimuli fehlen, bleiben Dendritische Zellen nach Aufnahme von Tumorantigen inaktiv [88, 89]; folglich wird der Aktivierungspfad für tumorantigenspezifische CTL aufgrund fehlender Stimulierung von Dendritischen Zellen unterbrochen. Eine Reduktion der  $CD4^+$  THL nach neoadjuvanter Radiochemotherapie könnte also eine funktionelle Schwächung der Dendritischen Zellen (und in der Folge auch der CTL) nach sich ziehen. Die quantitativen Veränderungen nach einer neoadjuvanten Therapie könnten sich somit auch qualitativ auswirken und die „Feinabstimmung“ zwischen Dendritischen Zellen und  $CD4^+$  THL beeinflussen. Dieses gestörte Zusammenspiel hätte eine Schwächung der *lokalen* Tumorimmunantwort und eine Immuntoleranz gegenüber Tumorantigen zur Folge [90].

2. Dendritische Zellen können eine NK-Zell-vermittelte Tumorimmunabwehr initiieren. Der Aktivierungspfad beginnt mit der Aufnahme von Tumorantigen durch Dendritische Zellen und anschließender Präsentation für  $CD4^+$  THL. Die darauf folgende IL-2 Sekretion durch  $CD4^+$  THL bewirkt eine NK-Zellaktivierung. Nach (experimenteller)  $CD4^+$  THL-depletion bleibt die NK-Zellantwort aus [91]. Daraus lässt sich schließen, dass eine NK-Zell-vermittelte Tumorimmunabwehr nach neoadjuvanter Radiochemotherapie nicht nur direkt aufgrund einer NK-Zelldepletion, sondern auch *indirekt* durch eine Reduzierung der Dendritischen Zellen und  $CD4^+$  THL geschwächt wird.
3. NK-Zellzahl und -Toxizität korrelierten bei Balch et al. eng miteinander: Der Autor beschrieb einen „exzellenten positiven Zusammenhang“

zwischen dem NK-Zell-Titer und der NK-Zell-Aktivität gegen Testzielzellen [92]. Demnach ließe sich aus der Reduzierung der NK-Zellen nach neoadjuvanter Radiochemotherapie eine Verminderung der Zellfunktion ableiten. Die Therapie hätte somit eine quantitative *und qualitative* Alteration der NK-Zellen [93, 94] bewirkt.

Für T-Zellen wurde ein Funktionsverlust durch neoadjuvante Radiochemotherapie explizit nachgewiesen [95].

4. Die Verringerung der jeweiligen Zelltypen bleibt wahrscheinlich nicht auf die Verhältnisse im lokoregionalen Lymphknoten beschränkt. Vielmehr ist wegen der systemischen Wirkung der Chemotherapeutika eine Reduzierung der jeweiligen Zell-Pools im *Gesamtorganismus* zu erwarten. Ferner ist, wie bereits oben erwähnt, die Übertragung der Ergebnisse einer Zellverminderung nach neoadjuvanter Radiochemotherapie in den Lymphknoten auf die Situation im peripheren Blut plausibel [79].

Eine systemische Reduktion der  $CD4^+$  und NK-Zellen bliebe nicht ohne Folgen für die Tumormunantwort, denn diese Zellen vermitteln eine Abwehr von Tumormetastasen [35 ,96]. Dies könnte eine Erklärung für die fehlende Wirkung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf die Metastasierungsrate sein und eine mögliche Begründung für die „systemische Therapielücke“ (s. Einleitung S. 4) bieten.

5. Die  $CD8^+$  Zellen wurden durch die neoadjuvante Radiochemotherapie nicht signifikant reduziert. Demnach hat der *relative* Anteil dieser Lymphozyten gemessen am Gesamtgehalt aller Immunzellen im Lymphknoten unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie zugenommen. Dies ist allerdings nicht gleichbedeutend mit einer Prognoseverbesserung bei höheren  $CD8^+$ -Zellzahlen: dieser Nutzen ist nur für absolute Unterschiede in der Zellzahl belegt [97-100].

6. Die Initiierung einer Immunantwort durch  $CD8^+$  CTL wird durch Zell-Zell-Interaktionen gesteuert und ist von der Zusammensetzung der umgebenden Zellpopulation abhängig. Eine Aktivierung setzt die Bildung eines sog. ternären Clusters zwischen antigenpräsentierender Dendritischer,  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zelle voraus [101]. Durch die verschobenen Relationen nach neoadjuvanter Radiochemotherapie verkleinert sich das Verhältnis Dendritischer zu  $CD8^+$  Zellen. Für die Aktivierung von  $CD8^+$  Zellen stehen absolut *und* relativ weniger Dendritische Zellen zur Verfügung. In dieser Situation entsteht eine „Konkurrenz“ um die verbliebenen Dendritischen Zellen [102]: Die  $CD8^+$  Zellen behindern sich gegenseitig am Zugang zu der antigenpräsentierenden Zelle. Die Limitierung von Zytokinen im Rahmen der Zell-Zell-Interaktion verstärken diese Hemmmechanismen [103]. D.h., es resultiert eine Schwächung der CTL-Immunantwort aufgrund einer Reduzierung der Dendritischen Zellen.

Eine alternative CTL-Aktivierung ist NK-Zell-vermittelt und  $CD4^+$ -Zell-unabhängig. Bei diesem Weg werden NK-Zellen durch Dendritische Zellen zur Sekretion von  $INF-\gamma$  stimuliert; dies bewirkt eine IL-12-Sekretion durch die Dendritischen Zellen, was abschließend eine CTL-Effektorantwort gegen Tumorantigene auslöst. Diese Aktivierungskaskade wurde von Adam et al. experimentell untersucht: Nach NK-Zelldepletion war dieser Aktivierungspfad vollständig unterbrochen [104].

Die Reduzierung der Dendritischen und NK-Zellen nach neoadjuvanter Radiochemotherapie beeinflusst somit auch die CTL-Funktion. Dies führt zu der Annahme, dass durch die Vorbehandlung die Aktivierungswege für CTL unterbrochen und die lokoregionale Tumorummunantwort beeinträchtigt werden.

7. Das relative Überwiegen der  $CD8^+$  Zellen könnte einen relativen Anstieg einer  $CD8^+$ -Subpopulation mit sich bringen: *Suppressorzellen* ( $CD8^+ CD28^-$ ). Diese Zellen stammen von  $CD8^+ CD28^+$  CTL ab; unter dem Einfluss von Zytokinen verlieren sie die  $CD28$ -Expression und ihre zytotoxischen Eigenschaften [105-107].  $CD8^+ CD28^-$  Suppressorzellen

sind antigenspezifisch [108] und wirken indirekt immunsuppressiv: Sie verändern Dendritische Zellen in der Weise, dass THL und CTL nach Antigenpräsentation nicht mehr aktiviert werden [109, 110]. CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> Suppressorzellen bewirken also via Dendritische Zellen eine antigenspezifische Immuntoleranz. Im Rahmen einer Immunantwort gegen Tumorantigen könnte ein relatives Überwiegen dieser Zellen - wie bei Zustand nach neoadjuvanter Radiochemotherapie - die Balance zwischen Aktivierung und Suppression der Tumorimmunabwehr verschieben und eine immunologische Tumortoleranz induzieren. Die Entstehung von Tumormetastasen könnte begünstigt werden [111].

Eine hohe CD8<sup>+</sup> Zelldichte *per se* scheint aber nicht mit einem höheren Metastasierungsrisiko assoziiert zu sein. Im Gegenteil: Prall et al., die diesen Zusammenhang bei 152 Stadium III-Patienten (ohne Vorbehandlung) untersuchten, zeigten, dass eine hohe *intratumorale* CD8<sup>+</sup>-Infiltration mit einer signifikant geringeren Metastasierungsrate und besserem Gesamtüberleben einherging [100].

8. Bei der Interpretation einer gleich bleibenden CD8<sup>+</sup>-Zellzahl bei gleichzeitig abfallenden Werten für Dendritische, CD4<sup>+</sup> und NK-Zellen nach der neoadjuvanten Radiochemotherapie muss auch ein *β-Fehler* bei der Bestimmung der CD8<sup>+</sup>-Zellzahl diskutiert werden. Konnte ein Unterschied zwischen beiden Fallgruppen nur aufgrund eines zu geringen Stichprobenumfangs nicht statistisch abgesichert werden? In einer großen Studie mit 1304 Patienten (nahezu zehnfacher Stichprobenumfang im Vergleich zu dieser Arbeit) konnte eine Reduzierung von tumorinfiltrierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> sowie NK-Zellen nach neoadjuvanter Kurzzeitbestrahlung nachgewiesen werden [112].

### 5.3.3 Risikostratifizierung

Durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie bei Patienten mit Rektumkarzinom wird nicht nur der Tumor, sondern auch das Immunsystem geschädigt. Die Immunsuppression betrifft *vier* Ebenen: Über eine *direkte*

Zellschädigung (i) kommt es zu einer absoluten und relativen Verminderung von regulatorischen und Effektorzellen sowie antigenpräsentierenden Zellen. Diese Zellen unterliegen auch einer *indirekten* Immunsuppression (ii); aufgrund funktioneller Abhängigkeit sind die Aktivierungskaskaden der Immunzellen gestört. Ein relatives Überwiegen von Suppressorzellen könnte diese indirekte Immunsuppression verstärken. Die Arbeit untersuchte die Auswirkungen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf Immunzellen in perirektalen Lymphknoten, also Elementen des *lokoregionalen* Immunsystems (iii). Aufgrund der zirkulierenden Eigenschaften der Zellen und der systemischen Wirkung der Chemotherapeutika lassen sich die Ergebnisse auf die Immunlage des *Gesamtorganismus* (iv) übertragen. Die Folge ist eine Schwächung der systemischen Tumorkontrolle mit Gefahr einer Fernmetastasierung nach kurativer Operation.

Dennoch, die Erfolge, die in den letzten Jahren durch neue Therapieverfahren bei der Behandlung des Rektumkarzinoms erzielt wurden, sind sehr ermutigend. Es bleibt unbestritten, dass durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie die Lokalrezidivrate – trotz Immunsuppression durch Reduktion von Immunzellen – gegenüber der alleinigen Tumorsektion gesenkt wurde.

Möglicherweise gibt es Patienten, die mehr als andere von einer neoadjuvanten Radiochemotherapie profitieren bzw. bei denen durch die Vorbehandlung eine Prognoseverbesserung erzielt werden kann. Bei dieser Patientengruppe müsste der Nutzen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie die unerwünschten Therapiewirkungen überwiegen. Dies wäre bei Patienten der Fall, die primär eine schwache oder fehlende Tumorimmunabwehr besitzen. In diesen Fällen würde eine neoadjuvante Radiochemotherapie die ohnehin insuffiziente Tumorimmunabwehr kaum weiter verschlechtern. Die Fernmetastasierungsrate wäre sowohl mit als auch ohne neoadjuvanter Radiochemotherapie hoch. Diese Patienten profitierten aber dennoch von einer Tumorregression und damit verbundener Senkung der Lokalrezidivrate durch die Vorbehandlung.

Patienten mit einer primär starken Tumorimmunabwehr haben hingegen einen körpereigenen (relativen) Schutz vor Fernmetastasen. Dieser

„natürliche“ Prognosevorteil wäre nach Zerstörung der Immunabwehr durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie aufgebraucht. Obwohl bei diesen Patienten gleichermaßen eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle durch die Vorbehandlung erzielt werden würde, ist der Netto-Effekt aufgrund einer relativen Verschlechterung der Fernmetastasierungsrate u. U. gering.

Es wäre also sinnvoll, die individuelle Güte der Tumورimmunabwehr bei der Indikationsstellung für eine neoadjuvante Radiochemotherapie zu berücksichtigen. Bei Patienten mit starker Immunlage gegen Tumorzellen sollten Risiko und Nutzen einer Vorbehandlung besonders sorgfältig gegeneinander abgewogen werden. In Studien müssten geeignete „Indikatoren“ gefunden werden, die die Einschätzung der Stärke einer Tumорimmunabwehr erlauben. Als Orientierung könnte die quantitative Bestimmung von  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , Dendritischen und NK-Zellen im peripheren Blut, z.B. per Durchflusszytometrie, dienen. Weiterführende qualitative Tests müssten die Antigenspezifität gegen Tumorzellen klären.

#### 5.3.4 Ausblick

Nach neoadjuvanter Radiochemotherapie ist als mittelfristiger Behandlungserfolg eine gute lokale Tumorkontrolle erzielt worden; die Prognose für das Gesamtüberleben bleibt jedoch aufgrund einer hohen Metastasierungsrate eingeschränkt [30, 113]. Eine Verkleinerung dieser „systemischen Therapielücke“ könnte über zwei Wege erreicht werden: Zum einen könnte durch eine Intensivierung der neoadjuvanten Therapie ein größerer Anteil der Mikrometastasen abgetötet werden. Ob dies moderne Chemotherapeutika wie Oxaliplatin [114, 115], Cetuximab [116, 117] und Bevacizumab [118, 119] leisten können, wird in multizentrischen Phase III-Studien erforscht. Zum anderen könnte durch eine Stimulation der Tumорimmunabwehr einer Metastasierung entgegen gewirkt werden. Innovative Immuntherapien mit GM-CSF [120] oder Vakzinierungen mit CEA-assoziierten Proteinen [121] oder den spezifischen Antikörpern 105AD7 [122] und Ep-CAM [123] sowie Immunmodulatoren [124] versuchen, das spezifische und unspezifische Immunsystem zu aktivieren und sollen den Aufbau einer Tumорimmunabwehr unterstützen.



## **6 Zusammenfassung**

Bei Patienten mit Rektumkarzinom im Stadium II und III ist eine neoadjuvante Radiochemotherapie indiziert. Dadurch konnte die Lokalrezidiv- – nicht aber die Metastasierungsrate – gegenüber der alleinigen Tumorresektion gesenkt werden.

Nach neoadjuvanter Radiochemotherapie (50,4 Gy mit drei alternativen Chemotherapieprotokollen auf 5-FU- oder Capecitabin-Basis) wurde bei 75 Fällen die Therapiewirkung auf den Tumor anhand der HE-Schnittpräparate histopathologisch untersucht und gemäß der GR-Klassifikation in fünf Gruppen eingeteilt. GR 4 entsprach einer Totalremission. Bei GR 3 waren lediglich mikrofokale vitale Tumorverbände nachweisbar. Bei GR 2 überwog der regressive Anteil über residualem Tumorgewebe. Für GR 1 galt: mehr Tumor als Regression. Bei GR 0 waren histologisch kaum Zeichen einer Tumorregression erkennbar. Die Einteilungskriterien wurden ergänzt und die Auswirkungen auf die Objektivität in einer Interobserverstudie überprüft. Gewebsareale mit lockerer kollagener Matrix, resorptiven Zellinfiltraten und aktivierten Fibroblasten wurden als sog. Tumornarbe definiert. Sie kennzeichnete jene Areale, die vor der neoadjuvanten Therapie tumorinfiltriert waren. Tumorfremie Lymphknoten von 75 Studien- und 58 Kontrollfällen wurden hinsichtlich folgender Parameter verglichen: (1) Größe und (2) Dichte von CD83<sup>+</sup> Dendritischen Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD57<sup>+</sup> NK-Zellen.

33% der Studienpatienten zeigten eine mittlere Therapieantwort (GR 2). In Richtung stärkere (GR 3 und 4) bzw. schwächere Response (GR 0 und 1) nahmen die Gruppenstärken ab. In einer Interobserverstudie ergab sich eine hohe Übereinstimmung zwischen beiden Untersuchern ( $\kappa=0,94$ ). Patienten, die mit Capecitabin behandelt worden waren, zeigten eine höhere Ansprechrate als Patienten, die 5-FU erhalten hatten (Trend,  $p=0,073$ ). Bei 16% der neoadjuvant behandelten Patienten ließ sich ein primäres UICC-Stadium I rekonstruieren.

Im Vergleich fanden sich bei vorbehandelten Patienten signifikant kleinere Lymphknoten ( $p < 0,001$ ) sowie eine signifikant geringere Dichte von  $CD83^+$ ,  $CD4^+$  und  $CD57^+$  Zellen (jeweils  $p < 0,001$ ). Der Unterschied in der Zelldichte von  $CD8^+$  Zellen war nicht signifikant ( $p = 0,379$ ).

Rektumkarzinome sprechen gut auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie an. Durch die GR-Klassifikation ließ sich das Tumorsprechen nach fünfwöchiger Vorbehandlung reproduzierbar beschreiben. Die Ansprechraten lagen in der Größenordnung publizierter Studien, die Ergebnisse von anderen Autoren variieren jedoch je nach Aggressivität der Therapieregime. Durch Ergänzung der GR-Klassifikation um eindeutige Parameter konnte die Objektivität dieser Einteilung verbessert werden. Die Beurteilung der Tumornarbe erwies sich als unkompliziert anwendbare Methode zur Rekonstruktion des primären UICC-Stadiums. 16% der Studienpatienten wurden vermutlich übertherapiert.

Die Therapie bewirkte eine Depletion von Immunzellen der Tumorummunabwehr. Eine mehrdimensionale Schädigung der Tumorummunabwehr könnte einen Erklärungsansatz für die unzureichende Wirkung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie auf die Metastasierungsrate bieten. Es wird angenommen, dass bei einigen Patienten mit primär guter Tumorummunabwehr, dieser natürliche (relative) Schutz vor einer Metastasierung durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie aufgebraucht und dadurch der Netto-Nutzen der Vorbehandlung geschmälert wird.

Neue Therapieansätze bei der Behandlung des Rektumkarzinoms sollten eine Senkung der Metastasierungsrate zum Ziel haben. Dies könnte durch weniger immunsuppressive Therapieregime erreicht werden. Eine Risikostratifizierung bei der Indikationsstellung zur neoadjuvanten Radiochemotherapie und eine Individualisierung der Behandlungsprotokolle könnten den Gesamtnutzen dieser Behandlung erhöhen.

## **7 Literaturverzeichnis**

- 1 Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken 2006.
- 2 Heald RJ: Rectal cancer: the surgical options. Eur J Cancer. 1995;31:1189-92.
- 3 Heald RJ, Husband EM, Ryall RD: The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? Br J Surg. 1982;69(10):613-6.
- 4 Balch GC, de Meo A, Guillem JG: Modern management of rectal cancer: A 2006 update. World J Gastroenterol 2006;12(20):3186-95.
- 5 Schmiegel W, Pox C, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Fröhnmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Kühlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Sauer R, Sauerbruch T, Schmoll HJ, Zeitz M, Selbmann HK: S3-Leitlinien-Konferenz "Kolorektales Karzinom" 2004. Deutsch Med Wochenschr 2005;130:S5-S53.
- 6 Tveit KM, Guldvog I, Hagen S, Trondsen E, Harbitz T, Nygaard K, Nilsen JB, Wist E, Hannisdal E: Randomized controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time-scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. Norwegian Adjuvant Rectal Cancer Project Group. Br J Surg. 1997;84(8):1130-5.
- 7 Gastrointestinal Tumor Study Group [No authors listed]: Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. N Engl J Med. 1985;312(23):1465-72.
- 8 NIH consensus conference: Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 1990;264:1444-50.
- 9 Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R; German Rectal Cancer Study Group: Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. N Engl J Med. 2004;351(17):1731-40.
- 10 Zimmermann F, Molls M: Indikation zur neoadjuvanten Therapie beim Rektumkarzinom. Chirurg 2003;74:887-96.
- 11 Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ; Dutch Colorectal Cancer Group: Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. N Engl J Med. 2001;345(9):638-46.
- 12 Colorectal Cancer Collaborative Group: Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. Lancet. 2001;358(9290):1291-304.

- 
- 13 Swedish Rectal Cancer Trial [No authors listed]: Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med.* 1997;336(14):980-7.
  - 14 Camma C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxi A, Cottone M: Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA.* 2000;284(8):1008-15.
  - 15 Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Pudelko M, Kryj M, Oledzki J, Szmaja J, Sluszniaik J, Serkies K, Kladny J, Pamucka M, Kukulowicz P: Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy vs. conventionally fractionated radiochemotherapy. *Radiother Oncol.* 2004;72(1):15-24.
  - 16 Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, Pazdur R, Dubrow R, Cleary KR, Allen PK, Lynch PM, Guber G, Wolff R, Rich TA, Skibber J: Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999;44(5):1027-38.
  - 17 Valentini V, Coco C, Cellini N, Picciocchi A, Genovesi D, Mantini G, Barbaro B, Cogliandolo S, Mattana C, Ambesi-Impimbato F, Tedesco M, Cosimelli M: Preoperative chemoradiation for extraperitoneal T3 rectal cancer: acute toxicity, tumor response, and sphincter preservation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;40(5):1067-75.
  - 18 Calvo FA, Gomez-Espi M, Diaz-Gonzalez JA, Cantalapiedra R, Marcos P, Alvarado A, Garcia Alfonso P, Herranz R, Alvarez E: Pathologic downstaging of T3-4Nx rectal cancer after chemoradiation: 5-fluorouracil vs. Tegafur. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51(5):1264-70.
  - 19 Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G, et al.: Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer.* 1994;73(11):2680-6.
  - 20 Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A: Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis.* 1997;12(1):19-23.
  - 21 Bouzourene H, Bosman FT, Seelentag W, Matter M, Coucke P: Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy. *Cancer.* 2002;94(4):1121-30.
  - 22 Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Martus P, Rödel C, Hohenberger W, Jatzko G, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H, Hess C, Raab R: Adjuvant versus neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. *Strahlenther Onkol* 2001;4:173-181.
  - 23 Shia J, Guillem JG, Moore HG, Tickoo SK, Qin J, Ruo L, Suriawinata A, Paty PB, Minsky BD, Weiser MR, Temple LK, Wong WD, Klimstra DS: Patterns of morphologic alteration in residual rectal carcinoma following preoperative chemoradiation and their association with long-term outcome. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(2):215-23.

- 
- 24 Pahlman L, Hohenberger W, Gunther K, Fietkau R, Metzger U: Is radiochemotherapy necessary in the treatment of rectal cancer? *Eur J Cancer*. 1998;34(4):438-48.
  - 25 Glynne-Jones R, Grainger J, Harrison M, Ostler P, Makris A: Neoadjuvant chemotherapy prior to preoperative chemoradiation or radiation in rectal cancer: should we be more cautious? *Br J Cancer*. 2006;94(3):363-71.
  - 26 Ulrich A, Hartel M, Weitz J, Friess H, Büchler M: Der Stellenwert der (neo-)adjuvanten Therapie beim Rektumkarzinom. *Deutsch Med Wochenschr* 2004;129:957-962.
  - 27 Vauthey JN, Marsh RW, Zlotecki RA, Abdalla EK, Solorzano CC, Bray EJ, Freeman ME, Lauwers GY, Kubilis PS, Mendenhall WM, Copeland EM 3rd: Recent advances in the treatment and outcome of locally advanced rectal cancer. *Ann Surg*. 1999;229(5):745-54.
  - 28 Koda K, Saito N, Takiguchi N, Oda K, Nunomura M, Nakajima N: Preoperative natural killer cell activity: correlation with distant metastases in curatively resected colorectal carcinomas. *Int Surg*. 1997;82(2):190-3.
  - 29 Koda K, Saito N, Oda K, Seike K, Kondo E, Ishizuka M, Takiguchi N, Miyazaki M: Natural killer cell activity and distant metastasis in rectal cancers treated surgically with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Am Coll Surg*. 2003;197(2):254-60.
  - 30 Fietkau R, Klautke G: Möglichkeiten und Entwicklungen der neoadjuvanten und adjuvanten Therapie des Rektumkarzinoms. *Chir Gastroenterol* 2005;21:119-129.
  - 31 Ryan P, McCarthy S, Kelly J, Collins JK, Dunne C, Grogan L, Breathnach O, Shanahan F, Carey PD, Walsh TN, O'Sullivan GC: Prevalence of bone marrow micrometastases in esophagogastric cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Surg Res*. 2004;117(1):121-6.
  - 32 Bodar E, Buter J, de Gruijl TD, van der Wall EW, Pinedo HM: Immunologic and biologic properties of the primary tumor during prolonged neoadjuvant chemoimmunotherapy. *Oncology (Williston Park)* 2002;16:32-9.
  - 33 Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J: Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*. 1995;1(2):149-53.
  - 34 Lundy J, Lovett EJ 3rd, Wolinsky SM, Conran P: Immune impairment and metastatic tumor growth: the need for an immunorestorative drug as an adjunct to surgery. *Cancer*. 1979;43(3):945-51.
  - 35 Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenburg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ, van Krieken JH: Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 2001;1:7-17.
  - 36 Ambe K, Mori M, Enjoji M: S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer* 1989;63(3):496-503.

- 
- 37 Schwaab T, Weiss JE, Schned AR, Barth RJ Jr: Dendritic cell infiltration in colon cancer. *J Immunother.* 2001;24(2):130-7.
  - 38 Shurin MR: Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;43(3):158-64.
  - 39 Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Fromentin A, Solary E, Martin M, Martin F: Role of tumor cell apoptosis in tumor antigen migration to the draining lymph nodes. *J Immunol* 2000;164(4):1995-2000.
  - 40 Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L: Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med.* 1999;5(4):405-11.
  - 41 Kimura H, Dobrenkov K, Iida T, Suzuki M, Ando S, Yamamoto N: Tumor-draining lymph nodes of primary lung cancer patients: a potent source of tumor-specific killer cells and dendritic cells. *Anticancer Res.* 2005;25:85-94.
  - 42 Porgador A, Snyder D, Gilboa E: Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol.* 1996;156(8):2918-26.
  - 43 Zhou LJ, Tedder TF: Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154(8):3821-35.
  - 44 Porgador A, Gilboa E: Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995;182(1):255-60.
  - 45 Abrams SI: Regulation of tumor progression by anti-neoplastic T cell responses. *Cancer Biol Ther* 2004;3(2):140-6.
  - 46 Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ: CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med.* 1999;189(5):753-6.
  - 47 Adachi W, Usuda N, Sugeno A, Iida F: Immune-competent cells of regional lymph nodes in colorectal cancer patients: II. Immunohistochemical analysis of Leu-7+ cells. *J Surg Oncol* 1990;45(4):234-41.
  - 48 Rolstad B, Seaman WE: Natural killer cells and recognition of MHC class I molecules: new perspectives and challenges in immunology. *Scand J Immunol.* 1998;47(5):412-25.
  - 49 Kim A, Noh YW, Kim KW, Jang YS, Choe YK, Lim JS: Activated natural killer cell-mediated immunity is required for the inhibition of tumor metastasis by dendritic cell vaccination. *Exp Mol Med* 2004;36:428-443.
  - 50 Abdullah N, Greenman J, Pimenidou A, Topping KP, Monson JRT: The role of monocytes and natural killer cells in mediating antibody-dependent lysis of colorectal tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:517-524.

- 
- 51 Lee SH, Bar-Haim E, Machlenkin A, Goldberger O, Volovitz I, Vadai E, Tzehoval E, Eisenbach L: In vivo rejection of tumor cells dependent on CD8 cells that kill independently of perforin and FasL. *Cancer Gene Ther.* 2004;11(3):237-48.
- 52 Filaci G, Fravega M, Negrini S, Procopio F, Fenoglio D, Rizzi M, Brenci S, Contini P, Olive D, Ghio M, Setti M, Accolla RS, Puppo F, Indiveri F: Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol.* 2004;65(2):142-56.
- 53 Fietkau R, Barten M, Klautke G, Klar E, Ludwig K, Thomas H, Brinckmann W, Friedrich A, Prall F, Hartung G, Küchenmeister U, Kunth G: Postoperative chemotherapy may be not necessary for patients with ypN0-category after neoadjuvant chemoradiotherapy of rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2006;49(9):1284-92.
- 54 Klautke G, Feyerherd P, Ludwig K, Prall F, Foitzik T, Fietkau R: Intensified concurrent chemoradiotherapy with 5-fluorouracil and irinotecan as neoadjuvant treatment in patients with locally advanced rectal cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(7):1215-20.
- 55 Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Moriarty M, Fennelly D, Sheahan K: Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology.* 2005;47(2):141-6.
- 56 Chang HJ, Jung KH, Kim DY, Jeong SY, Choi HS, Kim YH, Sohn DK, Yoo BC, Lim SB, Kim DH, Ahn JB, Kim IJ, Kim JM, Yoon WH, Park JG: Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2005;36(4):364-71.
- 57 Morgan MJ, Koorey DJ, Painter D, Findlay M, Trans M, Stevens G, Solomon MJ: Histological tumor response to pre-operative combined modalità therapy in locally advanced rectal cancer. *Colorectal Disease* 2002;4:177-83.
- 58 Wijesuriya RE, Deen KI, Hewavisenthi J, Balawardana J, Perera M: Neoadjuvant therapy for rectal cancer down-stages the tumor but reduces lymph node harvest significantly. *Surg Today.* 2005;35(6):442-5.
- 59 Hartley A, Ho KF, McConkey C, Geh JI: Pathological complete response following pre-operative chemoradiation in rectal cancer: analysis of phase II/III trial. *Br J Cancer* 2005;78:934-938.
- 60 Kim JS, Kim JS, Cho MJ, Yoon WH, Song KS: Comparison of the efficacy of oral capecitabine versus bolus 5-FU in preoperative radiotherapy of locally advanced rectal cancer. *J Korean Med Sci.* 2006;21(1):52-7.
- 61 Sachs L (2002): *Angewandte Statistik.* Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 473.
- 62 Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, Boche O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, Untereiner M, Leduc B, Francois E, Maurel J, Seitz JF, Buecher B, Mackiewicz R, Ducreux M, Bedenne L: Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: Results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 2006;24(28):4620-25.

- 
- 63 Losi L, Luppi G, Gavioli M, Iachetta F, Bertolini F, D'Amico R, Jovic G, Bertoni F, Falchi AM, Conte PF: Prognostic value of Dworak grade of regression (GR) in patients with rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. In *J Colorectal Dis* 2006;21:645-51.
- 64 Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Häusler P, Kulle B, Becker H, Aust DE: Prognostic value of histologic tumor regression, thymidate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer UICC stage II/III after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 2006;30(9):1169-74.
- 65 Rodel C, Martus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C: Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(34):8688-96.
- 66 Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD, Padula GD, Venkatraman ES, Balducci M, Micciche F, Ricci R, Morganti AG, Gambacorta MA, Maurizi F, Coco C: The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;62(3):752-60.
- 67 Guillem JG, Chessin DB, Cohen AM, Shia J, Mazumdar M, Enker W, Paty PB, Weiser MR, Klimstra D, Saltz L, Minsky BD, Wong WD: Long-term oncologic outcome following preoperative combined modality therapy and total mesorectal excision of locally advanced rectal cancer. *An Surg* 2005; 241(5):829-836.
- 68 Gavioli M, Luppi G, Losi L, Bertolini F, Santantonio M, Falchi AM, D'Amico R, Conte PF, Natalini G: Incidence and clinical impact of sterilized disease and minimal residual disease after preoperative radiochemotherapy for rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(10):1851-7.
- 69 Hohenberger P, Hünnerbein M, Gebauer B, Stroszczyński C: Bildgebende Diagnostik im präoperativen Staging beim Rektumkarzinom. *Chirurg* 2004;75:3-12.
- 70 Pijl ME, Chaoui AS, Wahl RL, van Oostayen JA: Radiology of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38(7):887-98.
- 71 Garcia-Aguilar J, Pollack J, Lee SH, Hernandez de Anda E, Mellgren A, Wong WD, Finne CO, Rothenberger DA, Madoff RD: Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. *Dis Colon Rectum.* 2002;45(1):10-5.
- 72 Burton S, Brown G, Daniels I, Norman A, Swift I, Abulafi M, Wotherspoon A, Tait D: MRI identified prognostic features of tumors in distal sigmoid, rectosigmoid, and upper rectum: treatment with radiotherapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Jun 1;65(2):445-51.
- 73 Hermanek P, Heald RJ: Pre-operative radiotherapy for rectal carcinoma? Has the case really been made for short course pre-operative radiotherapy if surgical standards for rectal carcinoma are optimal? *Colorectal Dis.* 2004;6(1):10-4.
- 74 Barth C, Rau B, Hünnerbein M, Schlag PM: Vergleichende Diagnostik des lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinoms nach präoperativer Therapie. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998;115:1404-7.



- 
- 75 Zhou XG, Yu BM, Shen YX: Surgical treatment and late results in 1226 cases of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1983;26(4):250-6.
- 76 Pinedo HM, Buter J, Luykx-de-Bakker SA, Pohlmann PR, Hensbergen Y van, Heideman DAM, Diest PJ van, Gruijl TD de, Wall E van der: Extended neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer combined with GM-CSF: effect on tumour-draining lymph node dendritic cells. *Eur J Cancer* 2003;39:1061-1067.
- 77 Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N: Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer*. 1998;78(12):1573-7.
- 78 Adachi W, Sugeno A, Horigome N, Takahashi C, Iida F, Nakayama J: The antitumor activity and immunosuppressive effects of 5-fluorouracil suppositories in rectal cancer patients. *Surg Today* 1992;22(3):221-5.
- 79 Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina G, Coronetta F, Legge F, Salutati V, Scambia G: Neoadjuvant therapy changes the lymphocyte composition of tumor-draining lymph nodes in cervical carcinoma. *Cancer*. 2004;100(7):1418-28.
- 80 Melichar B, Tuskova M, Vesely P: Effect of irinotecan on the phenotype of peripheral blood leukocyte populations in patients with metastatic colorectal cancer. *Hepatology*. 2002;49(46):967-70.
- 81 Rafique M, Adachi W, Koike S, Kajikawa S, Yazawa K, Sugeno A, Amano J: Adverse effects of intraportal chemotherapy on natural killer cell activity in colorectal cancer patients. *J Surg Oncol*. 1997;64(4):324-30.
- 82 Wichmann MW, Meyer G, Adam M, Hochtlen-Vollmar W, Angele MK, Schalhorn A, Wilkowski R, Muller C, Schildberg FW: Detrimental immunologic effects of preoperative chemoradiotherapy in advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(7):875-87.
- 83 Louagie H, Van Eijkeren M, Philippe J, Thierens H, de Ridder L: Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 1999;75(6):767-71.
- 84 Murta EF, de Andrade JM, Falcao RP, Bighetti S: Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori*. 2000;86(5):403-7.
- 85 Sewell HF, Halbert CF, Robins RA, Galvin A, Chan S, Blamey RW: Chemotherapy-induced differential changes in lymphocyte subsets and natural-killer-cell function in patients with advanced breast cancer. *Int J Cancer*. 1993;55(5):735-8.
- 86 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*. 1996;184(2):747-52.
- 87 Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 1994;180(4):1263-72.

- 
- 88 Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N: Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2000;191(3):423-34.
- 89 Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-52.
- 90 Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K: The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med*. 2000;191(3):411-6.
- 91 Broeke L van de, Daschbach E, Thomas EK, Andringa G, Berzofsky JA: Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J Immunol* 2003; 171:5842-52.
- 92 Balch CM, Tilden AB, Dougherty PA, Cloud GA: Depressed levels of granular lymphocytes with natural killer (NK) cell function in 247 cancer patients. *Ann Surg* 1983;198(2):192-9.
- 93 Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Roman J, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP: Effects of concurrent cisplatin administration during radiotherapy vs. radiotherapy alone on the immune function of patients with cancer of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48(4):997-1006.
- 94 Yamazaki H, Yoshioka Y, Inoue T, Tanaka E, Nishikubo M, Sato T, Ishida T, Nakamura H, Inoue T: Changes in natural killer cell activity by external radiotherapy and/or brachytherapy. *Oncol Rep*. 2002;9(2):359-63.
- 95 Heidecke CD, Weighardt H, Feith M, Fink U, Zimmermann F, Stein HJ, Siewert JR, Holzmann B: Neoadjuvant treatment of esophageal cancer: Immunosuppression following combined radiochemotherapy. *Surgery*. 2002;132(3):495-501.
- 96 Wiltout RH, Herberman RB, Zhang SR, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green KM Jr, Talmadge JE: Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol*. 1985;134(6):4267-75.
- 97 Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, Ohuchi A, Ohuchi K, Shiiba K, Kurokawa Y, Satomi S: Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer*. 2004;91(9):1711-7.
- 98 Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H: CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(16):3491-4.
- 99 Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J: Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2654-66.
- 100 Prall F, Duhrkop T, Weirich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H, Barten M: Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol*. 2004;35(7):808-16.

- 
- 101 Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN: Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*. 2006;440(7086):890-5.
- 102 Kedi RM, Rees WA, Hildeman DA, Schaefer B, Mitchell T, Kaapler J, Marrack P: T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med* 2000;192(8):1105-1113.
- 103 Gattinoni L, Powell DJ, Rosenberg SA, Restifo NP: Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature Rev Immunol* 2006;6:383-393.
- 104 Adam C, King S, Allgeier T, Braumüller H, Lüking C, Mysliwietz J, Kriegeskorte A, Busch DH, Röcken M, Mocikat R: DC-NK-cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* 2005;106(1):338-44.
- 105 Borthwick NJ, Lowdell M, Salmon M, Akbar AN: Loss of CD28 expression on CD8(+) T cells is induced by IL-2 receptor gamma chain signalling cytokines and type I IFN, and increases susceptibility to activation-induced apoptosis. *Int Immunol*. 2000;12(7):1005-13.
- 106 Labalette M, Leteurtre E, Thumerelle C, Grutzmacher C, Tourvieille B, Dessaint JP: Peripheral human CD8(+)CD28(+)T lymphocytes give rise to CD28(-)progeny, but IL-4 prevents loss of CD28 expression. *Int Immunol*. 1999;11(8):1327-36.
- 107 Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, Rossi P, Manavalan JS, Kim-Schulze S, Fang J, Favera RD, Cortesini R, Suci-Foca N: Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. *Hum Immunol*. 2004;65(11):1297-306.
- 108 Cortesini R, LeMaout J, Ciubotariu R, Cortesini NS: CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev*. 2001;182:201-6.
- 109 Kuwana M: Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol*. 2002;63(12):1156-63.
- 110 Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N: Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol*. 1998;10(6):775-83.
- 111 Effros RB: Replicative senescence of CD8 T cells: potential effects on cancer immune surveillance and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53(10):925-33.
- 112 Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenburg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ, van Krieken JH; Pathology Review Committee: Short-term preoperative radiotherapy interferes with the determination of pathological parameters in rectal cancer. *J Pathol*. 2002;197(1):20-7.
- 113 Pasetto LM, Pucciarelli S, Agostini M, Rossi E, Monfardini S: Neoadjuvant treatment for locally advanced rectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;52(1):61-71.

- 
- 114 Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filippelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C; Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale: Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):4866-75.
- 115 Kemeny N, Garay CA, Gurtler J, Hochster H, Kennedy P, Benson A, Brandt DS, Polikoff J, Wertheim M, Shumaker G, Hallman D, Burger B, Gupta S: Randomized multicenter phase II trial of bolus plus infusional fluorouracil/leucovorin compared with fluorouracil/leucovorin plus oxaliplatin as third-line treatment of patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(23):4753-61.
- 116 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(4):337-45.
- 117 Vincenzi B, Santini D, Rabitti C, Coppola R, Beomonte Zobel B, Trodella L, Tonini G: Cetuximab and irinotecan as third-line therapy in advanced colorectal cancer patients: a single centre phase II trial. *Br J Cancer.* 2006;94(6):792-7.
- 118 Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, Hambleton J, Novotny WF, Kabbinavar F: Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3502-8.
- 119 Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF: Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol.* 2005;23(16):3697-705.
- 120 Mels AK, Statius Muller MG, van Leeuwen PA, von Blomberg BM, Scheper RJ, Cuesta MA, Beelen RH, Meijer S: Immune-stimulating effects of low-dose perioperative recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients operated on for primary colorectal carcinoma. *Br J Surg.* 2001;88(4):539-44.
- 121 Weihrach MR, Ansen S, Jurkiewicz E, Geisen C, Xia Z, Anderson KS, Gracien E, Schmidt M, Wittig B, Diehl V, Wolf J, Bohlen H, Nadler LM: Phase I/II combined chemioimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5993-6001.
- 122 Durrant LG, Maxwell-Armstrong C, Buckley D, Amin S, Robins RA, Carmichael J, Scholefield JH: A neoadjuvant clinical trial in colorectal cancer patients of the human anti-idiotypic antibody 105AD7, which mimics CD55. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):422-30.
- 123 Mosolits S, Markovic K, Frodin JE, Virving L, Magnusson CG, Steinitz M, Fagerberg J, Mellstedt H: Vaccination with Ep-CAM protein or anti-idiotypic antibody induces Th1-biased response against MHC class I- and II-restricted Ep-CAM epitopes in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5391-402.

- 
- 124 Holcombe RF, Jacobson J, Dakhil SR, Stewart RM, Betzing KS, Kannan K, Macdonald JS: Association of immune parameters with clinical outcome in stage III colon cancer: results of Southwest Oncology Group Protocol 9009. *Cancer Immunol Immunother.* 1999;48(9):533-9.

**Eigene Publikation:**

Prall F, Wöhlke M, Klautke G, Schiffmann L, Fietkau R, Barten M: Tumour regression and mesorectal lymph node changes after intensified neoadjuvant chemoradiation for carcinoma of the rectum. *APMIS* 2006;114(3):201-10.

## 8 Thesen

1. Bei Patienten mit Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III ist eine neoadjuvante Radiochemotherapie indiziert. Bei 75 Fällen wurde das Tumorsprechen auf diese Vorbehandlung (50,4 Gy mit drei alternativen Chemotherapieprotokollen auf 5-FU- oder Capecitabin-Basis) nach histopathologischen Kriterien gemäß der Grade of regression (GR)-Klassifikation eingeteilt. Das Spektrum reichte von GR 4 – hier war kein vitales Tumorgewebe mehr nachweisbar – bis GR 0 – hier fehlten Anzeichen einer Tumorregression.
2. Ein Drittel der untersuchten Fälle zeigte ein mittleres Ansprechen (GR 2). In Richtung stärkere (GR 3 und 4) bzw. schwächere Responseraten (GR 0 und 1) nahmen die Häufigkeiten ab.
3. Patienten, die mit Capecitabin therapiert wurden, zeigten stärkere Ansprechraten als Patienten, die 5-FU erhalten hatten (Trend,  $p=0,073$ ). Der Vergleich mit publizierten Ergebnissen zeigte ebenfalls, dass die Ansprechraten je nach Intensität des Behandlungsregimes variieren können.
4. Durch die Anwendung neuer, eindeutiger Zuordnungskriterien, die für die Gruppen GR 2 und 3 herausgearbeitet wurden, konnte die Reproduzierbarkeit der GR-Klassifikation verbessert werden.
5. Studien haben einen positiven Zusammenhang zwischen der Ansprechraten nach neoadjuvanter intensivierter Radiochemotherapie und der Prognose herausgearbeitet. Die Bestimmung des Regressionsgrades könnte helfen, Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Tumorredivisio-Risiko haben. Damit könnte eine differenzierte Entscheidung für eine zusätzliche adjuvante Therapie getroffen werden.
6. Die Beurteilung der Ausdehnung einer sog. Tumornarbe war ein geeignetes Mittel, um das prätherapeutische Tumorstadium zu rekonstruieren und die Indikation zur neoadjuvanten Radiochemotherapie im Nachhinein zu prüfen: bei 16% der Patienten war demnach eine Vorbehandlung nicht indiziert gewesen (primär UICC-Stadium I).

- 
7. Dieses Ergebnis sollte bei der Interpretation von Studienergebnissen berücksichtigt werden: Das Downstaging nach neoadjuvanter Therapie wäre demnach in ca. 16% der Fälle ein falsch-positives Ergebnis und wurde wahrscheinlich durch ein Overstaging in der prätherapeutischen Bildgebung hervorgerufen. Durch Verbesserung in der präoperativen Bildgebung ließe sich die Indikation für eine neoadjuvante Therapie genauer stellen.
  8. Die tumorfreien mesorektalen Lymphknoten von 75 Studien- und 58 Kontrollpatienten (*ohne* Vorbehandlung) unterschieden sich signifikant: Bei Radiochemotherapie-Fällen waren sie wesentlich kleiner ( $p < 0,001$ ) und wiesen eine deutliche Verringerung von  $CD4^+$  T-Zellen ( $p < 0,001$ ),  $CD83^+$  Dendritischen Zellen ( $p < 0,001$ ) und  $CD57^+$  NK-Zellen ( $p < 0,001$ ) auf. Diese Zelltypen vermitteln regulatorische und Effektorfunktionen bei einer Tumorimmunantwort. Eine Verringerung könnte die Abwehr gegen disseminierte Tumorzellen schwächen: Vermutlich wird eine Metastasierung durch die Immunsuppression nach neoadjuvanter Radiochemotherapie begünstigt.
  9. Für die Zelldichte von  $CD8^+$  Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,379$ ). Das mögliche relative Überwiegen eines  $CD8^+$ -Subzelltyps mit Suppressorfunktion könnte die Immunsuppression nach neoadjuvanter Radiochemotherapie weiter verstärken und die Gefahr für eine Metastasierung indirekt erhöhen.
  10. Durch relative und absolute Verschiebungen der Immunzelltypen ist anzunehmen, dass durch die Vorbehandlung die Aktivierungspfade im immunologischen Netzwerk der Tumorimmunabwehr beeinträchtigt werden.
  11. Die Qualität einer patienteneigenen Tumorimmunabwehr sollte eventuell bei der Indikationsstellung für eine neoadjuvante Radiochemotherapie berücksichtigt werden. Bei primär starker Immunlage würde eine Vorbehandlung den immunologischen (relativen) Schutz vor einer Fernmetastasierung möglicherweise schwächen. Damit wäre trotz einer verbesserten lokalen Tumorkontrolle durch die neoadjuvante Therapie der Netto-Effekt U. u. geringer als bei Patienten mit primär ohnehin schwacher Immunlage.
  12. Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte muss die Senkung der Metastasierungsrate zum Ziel haben. Neue Chemotherapeutika müssen höhere Wirkung gegenüber disseminierten Tumorzellen aufweisen. Durch Immunmodulatoren kann versucht werden, die Tumorimmunabwehr zu stimulieren.

# LEBENS LAUF

## Angaben zur Person

Name, Vorname	Wöhlke, Michael
Geburtsdatum und -ort	11.09.1981, Schwerin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	BRD

## Ausbildung

03.09.1988 - 10.07.1992	Grundschule Leen-Kullman, Schwerin
22.08.1992 - 14.07.2000	Musikgymnasium J.W.v. Goethe, Schwerin, Allgemeine Hochschulreife
seit 01.10.2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
20.08.2003 und 15.09.2003	Ärztliche Vorprüfung
26.08.2004	Erstes Staatsexamen
16./17.10.2007 und 12./13.12.2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.08.2006 – 15.07.2007	Praktisches Jahr in der Klinik für Chirurgie und Klinik für Innere Medizin der Helios Kliniken Schwerin und der Klinik für Urologie im Kantonsspital St. Gallen (Schweiz).
Seit 01.01.2008	AIW am Institut für Pathologie der Helios Kliniken Schwerin

## Sonstiges

01.08.2000 - 30.06.2001	Zivildienst bei der Caritas-Sozialstation, Schwerin
-------------------------	--

Rostock, 28.04.2008

Michael Wöhlke



## SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich diese eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 11.07.2007

Michael Wöhlke

## DANKSAGUNG

*Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Friedrich Prall, OA am Institut für Pathologie der Universität Rostock, danke ich sehr für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Bei Problemlösungen und Fragen zur Morphologie, Methodik und Statistik bis hin zur Begleitung bei der Fertigstellung der Promotionsschrift stand mir Herr PD Dr. med. Friedrich Prall als kompetenter Wissenschaftler zur Seite. Ich danke ihm für sein persönliches Engagement und für die angenehme Zusammenarbeit.*

*Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Horst Nizze, Direktor des Instituts für Pathologie der Universität Rostock, der mir diese Arbeit an seinem Hause ermöglichte. Ich danke ihm für seine interessierte Begleitung und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Institut.*

*Ich danke den Mitarbeiterinnen der Histologischen und Immunhistologischen Labore am Institut für Pathologie für die Erstellung von Färbungen der Schnittpräparate.*

*Frau PD Dr. Helga Krentz vom Institut für Biomathematik und Statistik danke ich für das Beratungsgespräch zu Fragen der statistischen Auswertung.*

*Ich danke meinem Vater, Dr. med. Gunther Wöhlke, OA am Institut für Pathologie der Helios Kliniken Schwerin, für die Durchführung einer Interobserverstudie und für die Hilfe bei Erstellung ausgewählter Histologie-Fotos.*

*Ein Dankeschön an Dr. med. Leif Schiffmann, Klinik für Chirurgie, für die Möglichkeit, die Patientenakten der Klinik einzusehen.*

*Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder Johannes und meiner Freundin Agnes, die mich in den vergangenen Jahren unermüdlich mit Rat und praktischer Hilfe begleitet und unterstützt haben.*

*Michael Wöhlke*