

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. HANS J. SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE IMMUNARCHITEKTUR KOLOREKTALER LUNGENMETASTASEN  
UND DEREN AUSWIRKUNG AUF DAS ÜBERLEBEN VON PATIENTEN**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Ulrich Hahn

2018



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. HANS J. SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE IMMUNARCHITEKTUR KOLOREKTALER LUNGENMETASTASEN  
UND DEREN AUSWIRKUNG AUF DAS ÜBERLEBEN VON PATIENTEN**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Ulrich Hahn

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Stefan Brunner
2. Berichterstatter:	PD Dr. Michael Ried
Tag der mündlichen Prüfung:	16. Oktober 2018

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Lungenmetastasen des kolorektalen Karzinoms</b> .....	<b>6</b>
1.1.1 Epidemiologie.....	6
1.1.2 Therapeutische Ansätze.....	9
1.1.2.1 Die chirurgische Therapie.....	10
1.1.2.2 Die Chemotherapie .....	13
1.1.2.3 Weitere Therapieansätze .....	16
1.1.3 Risikofaktoren zur Abschätzung der Effektivität der Metastasektomie.....	17
<b>1.2 Immunhistochemie als prognostisches Hilfsmittel</b> .....	<b>18</b>
<b>2 Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>26</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Patientenkollektiv und Gewebeprobe</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Patientendaten und Herkunft der Proben.....	27
3.1.2 Aufbereitung der Proben.....	29
<b>3.2 Färbemethoden</b> .....	<b>30</b>
3.2.1 HE-Färbung.....	30
3.2.2 Immunhistochemische Färbungen.....	31
3.2.2.1 CD20 .....	31
3.2.2.2 CD4.....	33
3.2.2.3 CD8.....	33
3.2.2.4 CD68 KP1.....	33
3.2.2.5 CD45 RO.....	34
<b>3.3 Digitalisierung der Proben</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4 Verwendete Materialien</b> .....	<b>35</b>
3.4.1 Geräte .....	35
3.4.2 Software .....	36
3.4.3 Chemikalien und Reagenzien.....	36
3.4.4 Gebrauchsgegenstände.....	37
3.4.5 Antikörper.....	37
<b>3.5 Statistische Analysen</b> .....	<b>37</b>
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 Unterschiede der Immunzellinfiltration bei kolorektalen Lungen- und Lebermetastasen</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 Überlebenszeitanalyse</b> .....	<b>45</b>
4.2.1 Einfluss der Immunzellinfiltration auf das Patientenüberleben .....	45
4.2.2 Einfluss von Chemotherapie auf das Patientenüberleben .....	53
4.2.3 Einfluss weiterer klinischer Faktoren auf das Patientenüberleben .....	55
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>59</b>
<b>5.1 Ergebnisse der Untersuchungen</b> .....	<b>59</b>
5.1.1 Unterschiede der Immunzellinfiltration bei kolorektalen Lungen- und Lebermetastasen.....	60
5.1.2 Einfluss des Immunzellinfiltrats auf das Überleben .....	61
5.1.3 Einfluss klinischer Faktoren auf das Überleben.....	62
<b>5.2 Kritische Anmerkungen</b> .....	<b>64</b>
<b>5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick</b> .....	<b>66</b>
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	<b>68</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>70</b>
<b>8 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>72</b>

<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>79</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

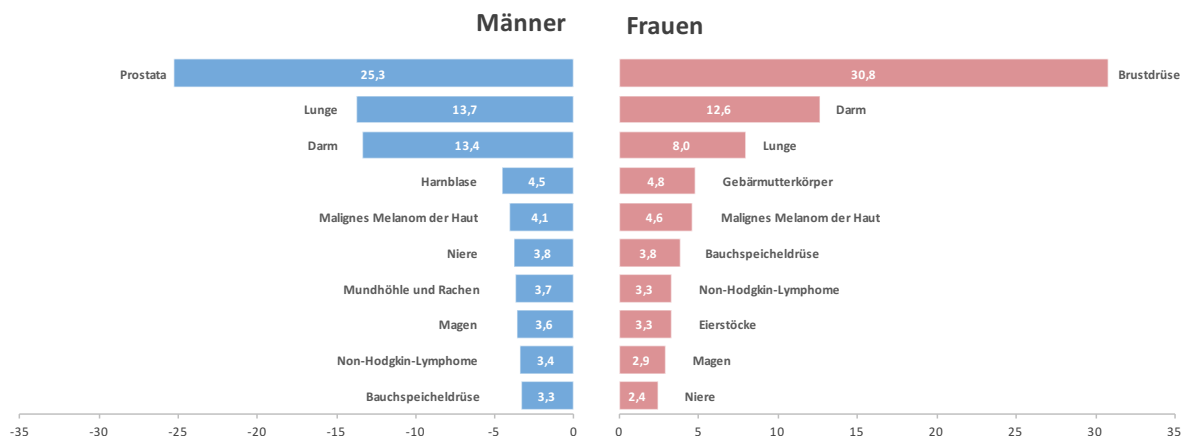
Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation (immunphänotypisches Oberflächenmerkmal)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CT	Computertomographie
DC-LAMP	dendritic cell lysosome-associated membrane glycoprotein
DFI	Disease-free Intervall [dt. krankheitsfreies Intervall]
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESMO	European Society for Medical Oncology
et al.	et alii [dt. und andere]
FDG-PET	Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FEV <sup>1</sup>	expiratorische Einsekundenkapazität
FOLFIRI	Chemotherapie bestehend aus Irinotecan und 5-FU/Folinsäure
FOLFOX	Chemotherapie bestehend aus Oxaliplatin und 5-FU/Folinsäure
FOLFOXIRI	Chemotherapie bestehend aus Oxaliplatin, Irinotecan und 5-FU/Folinsäure
FoxP3	Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3
FUS	Fokussierter Ultraschall
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor
GOLFIG	Chemotherapie bestehend aus Gemcitabin, Oxaliplatin, 5-FU/Folinsäure und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
OS	Overall Survival [dt. Gesamtüberleben]
RAS-wt-Karzinom	RAS-Wild-Typ-Karzinom
RFA	Radiofrequenzablation
Tab.	Tabelle
TACE	transarterielle Chemoembolisation
T <sub>H</sub> 1-Zellen	Subgruppe der T-Helfer-Zellen
T <sub>H</sub> 2-Zellen	Subgruppe der T-Helfer-Zellen
UICC	Union internationale contre le cancer
VATS	Video-assistierte thorakoskopische Chirurgie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
5-FU	5-Fluoruracil

# 1 Einleitung

## 1.1 Lungenmetastasen des kolorektalen Karzinoms

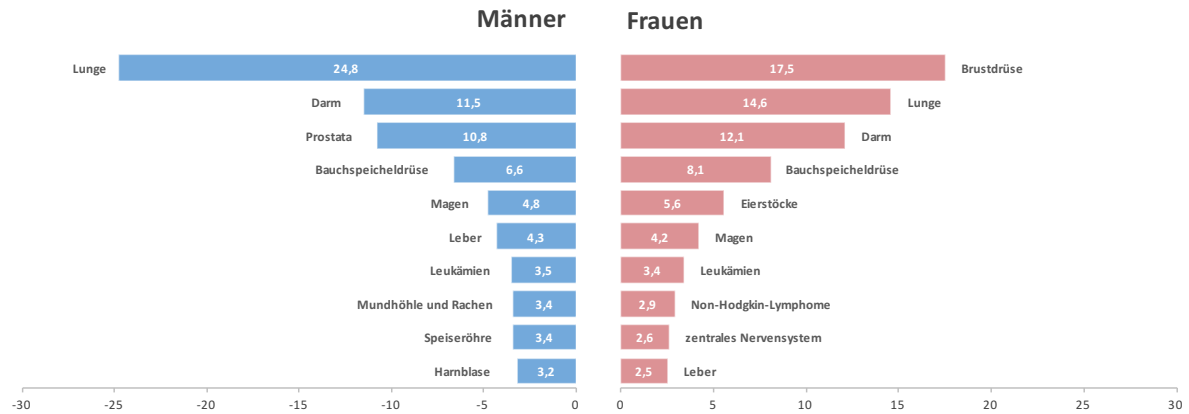
### 1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2012 traten Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert-Koch-Institutes zufolge in Deutschland rund 478.000 Krebsneuerkrankungen auf. Davon waren ca. 252.100 Männer und 225.900 Frauen betroffen. Bei Männern stellte das Prostatakarzinom mit 25,3 % aller Neuerkrankungen die häufigste Tumorlokalisation vor dem Lungenkarzinom (13,7 %) und dem Darmkrebs (13,4 %) dar. Die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen war mit 30,8 % das Mammakarzinom, gefolgt von Tumoren des Darms (12,6 %) und der Lunge (8,0 %) (1). Nachfolgend stellt Abbildung 1 den prozentualen Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2012 dar.



**Abbildung 1** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Krebs in Deutschland 2015 (1).

Den höchsten prozentualen Anteil an allen Krebssterbefällen wies bei Männern das Lungenkarzinom (24,8 %) und bei Frauen das Mammakarzinom (17,5 %) auf. Darmtumore befanden sich in dieser Statistik bei Männern mit 11,5 % an zweiter und bei Frauen mit 12,1 % an dritter Stelle (Abb. 2) (1).



**Abbildung 2** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2012. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Krebs in Deutschland 2015 (1).

Im Jahr 2012 erkrankten in Deutschland 33.740 Männer und 28.490 Frauen an Darmkrebs. Davon betrafen fast zwei Drittel der Erkrankungen das Kolon, etwa 30 % traten im Rektum auf und die übrigen Erkrankungen fanden sich im Übergang von Dick- zu Enddarm (Rektosigmoid) bzw. im Analkanal (1, 2).

Das mittlere Erkrankungsalter betrug dabei 72 bzw. 75 Jahre, wobei das Erkrankungsrisiko bis ins hohe Alter stetig anstieg. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für beide Geschlechter lagen bei 63 % (1). Generell ist das Risiko an einem Rektumkarzinom zu erkranken für Männer etwa 1,5-mal höher als für Frauen, wohingegen das Risiko eines Kolonkarzinoms für beide Geschlechter etwa gleich hoch ist (3).

Bereits bei 20 - 30 % der Patienten liegen zum Diagnosezeitpunkt des Primarius Fernmetastasen vor (3-5). Dies entspricht dem UICC Stadium IV (Tab. 4). Die häufigste Lokalisation kolorektaler Metastasen stellt die Leber dar. In 10 - 25 % der Fälle finden sich synchrone Lebermetastasen und bei 40 - 70 % aller Patienten mit Dissemination treten Metastasen in der Leber auf (2, 3, 6, 7). Eine Erklärung hierfür liefert vor allem die hämatogene Metastasierung des Kolonkarzinoms über den portalvenösen Kreislauf in die Leber.

Lungenmetastasen stellen den häufigsten extraperitonealen Metastasierungsort dar und werden bei 10 - 20 % aller Patienten diagnostiziert (2, 3). Mit ihrem dicht verzweigten Kapillarplexus stellt die Lunge ein empfängliches Organ für zirkulierende Tumorzellen dar. Die Inzidenz von isolierten Lungenmetastasen nach radikaler Resektion eines Rektumkarzinoms ist etwa doppelt so hoch wie nach Resektion eines

Kolonkarzinoms. Diese Ergebnisse werden der Tatsache zugeschrieben, dass die hämatogene Streuung bei Rektumkarzinomen, vor allem bei tiefsitzenden, über die Drainage in die inferioren und mittleren Rektalvenen direkt in den systemischen Kreislauf unter Umgehung des portalvenösen Kreislaufes erfolgt (4, 8, 9).

Als weiterer möglicher Metastasierungsweg gilt neben der hämatogenen Streuung die Ausbreitung über die Lymphbahnen (4).

Laut einer prospektiven, multizentrischen Beobachtungsstudie aus Deutschland konnten synchrone Lungenmetastasen bei 1,5 % der Patienten mit Kolonkarzinom bzw. 1,9 % der Patienten mit Rektumkarzinom gefunden werden (10). Metachrone Lungenmetastasen traten in einer Studie von Watanabe et. al bei 4,7 % der Patienten mit Kolonkarzinom und in einer von Ding et. al veröffentlichten Studie bei 10 % aller Patienten mit Rektumkarzinom auf (9, 11). Eine großangelegte multizentrische Studie aus Japan, die 5230 Patienten umschloss, fand metachrone Lungenmetastasen bei 3,5 % der Patienten mit Kolonkarzinom und bei 7,5 % der Patienten mit Rektumkarzinom (12). Eine von Nozawa et al. durchgeführte Studie beschrieb das Auftreten von synchronen Lungenmetastasen bei 2,8 % aller Patienten mit kolorektalem Karzinom und von metachronen Lungenherden bei 10,2 % des Kollektivs (13). Einen zusammenfassenden Überblick bietet Tabelle 1.

**Tabelle 1** Auswahl von Studien zur prozentualen Häufigkeit von Lungenmetastasen basierend auf der Lokalisation des Primärtumors.

	synchron		metachron	
	Kolon	Rektum	Kolon	Rektum
<b>Mantke et al. (10)</b>	1,5 %	1,9 %	-	-
<b>Watanabe et. al (11)</b>	-	-	4,7 %	-
<b>Ding et. al (9)</b>	-	-	-	10 %
<b>Kobayashi et al. (12)</b>	-	-	3,5 %	7,5 %
<b>Nozawa et al. (13)</b>	2,8 %		10,2 %	

Patienten, die im Krankheitsverlauf Fernmetastasen (UICC Stadium IV) entwickeln, weisen eine sehr schlechte Prognose mit einem medianen Überleben von lediglich acht Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5 % auf (4, 14). Durch den Einsatz hocheffektiver Chemotherapeutika und die stetige Weiterentwicklung der chi-

rurgischen Therapie kann bei diesen Patienten eine erhebliche Verbesserung der Prognose bewirkt werden. Die chemotherapeutische Behandlung allein konnte in verschiedenen Studien bei Patienten einen Anstieg des medianen Überlebens auf 24 Monate erreichen (15). Mit 5-Jahres-Überlebensraten von 32 - 68 % zeigten Patienten nach erfolgreicher chirurgischer Resektion kolorektaler Lungenmetastasen ein noch besseres Outcome (4). Eine Zusammenschau verschiedener aktueller Studien zum Überleben nach pulmonaler Metastasenresektion zeigt Tabelle 2.

**Tabelle 2** Ausgewählte Studien seit 2000, Patientenzahl > 100. Tabelle nach Limmer 2014 (4).

<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>	<b>Patienten</b>	<b>Med. Überleben (Monate)</b>	<b>5-Jahres-überleben</b>
<b>Saito et al.</b>	2002	165	-	40 %
<b>Pfannschmidt et al.</b>	2004	167	40	32 %
<b>Kanemitsu et al.</b>	2004	313	38	38 %
<b>Inoue et al.</b>	2004	128	49	45 %
<b>Yedibela et al.</b>	2006	153	43	37 %
<b>Welter et al.</b>	2007	169	47	39 %
<b>Onaitis et al.</b>	2009	378	-	56 %
<b>Riquet et al.</b>	2010	127	45	41 %
<b>Watanabe et al.</b>	2009	113	-	68 %
<b>Hwang et al.</b>	2010	125	37	48 %

### **1.1.2 Therapeutische Ansätze**

Die S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ (Langversion 1.1, August 2014) empfiehlt sowohl für synchrone als auch für metachrone Leber- und/oder Lungenmetastasen die operative Entfernung unter der Voraussetzung, dass eine R0-Resektion möglich erscheint. Patienten, für die primär nicht die Möglichkeit einer operativen Intervention gegeben ist, sollten einer systemischen Chemotherapie zugeführt werden. Individuelle Therapieregime werden dabei in einer interdisziplinären Tumorkonferenz diskutiert (16).

### 1.1.2.1 Die chirurgische Therapie

Die Entscheidung über das therapeutische Verfahren bei Nachweis einer pulmonalen Metastasierung erfordert zunächst die Beurteilung der Resektabilität. Dabei etablierten sich in Deutschland die folgenden modifizierten Thomford-Kriterien, die Patienten für die Indikationsstellung zur Lungenmetastasen Chirurgie erfüllen sollten (4, 17, 18):

- Technische Resektabilität
- Tolerables allgemeines und funktionelles Operationsrisiko
- Kontrolliertes Primärtumorgeschehen
- Ausschluss extrathorakaler Metastasen (mit Ausnahme lokal therapierbarer Lebermetastasen)
- Fehlen therapeutischer Alternativen
- Interdisziplinäre Indikationsstellung zur Resektion

Besonders die zu erwartenden Einschränkungen der postoperativen Lungenfunktion müssen vor dem Eingriff sorgfältig abgeklärt werden. Mit Hilfe der Computertomographie (CT) lässt sich der voraussichtliche Parenchymverlust abschätzen, wodurch Aussagen zum Operationsrisiko getroffen werden können (4). Allein eine Standardthorakotomie hat eine vorübergehende Abnahme der Vitalkapazität und der expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV<sup>1</sup>) um 30 - 40 % zur Folge. Patienten, deren postoperative FEV<sup>1</sup> voraussichtlich < 1l (bzw. 30 - 35 % des Solls) beträgt, kann daher im Allgemeinen kein operativer Eingriff zugemutet werden (3).

Das Vorliegen extrathorakaler, solitärer Organ- oder Lymphknotenmetastasen stellt nach heutigem Wissensstand keine absolute Kontraindikation zum operativen Eingriff dar, sofern eine R0-Resektion mit vertretbarem Aufwand und Risiko erreicht werden kann (3).

Vor der Durchführung einer chirurgischen Metastasenresektion kommen eine Reihe diagnostischer Verfahren zum Einsatz. Neben der zuvor bereits erwähnten CT, die sich im klinischen Alltag als Maßnahme zum primären Staging des kolorektalen Karzinoms etablierte, ist die flexible Tracheobronchoskopie fester Bestandteil der präoperativen Diagnostik und dient besonders der Beurteilung endobronchialer Pro-

zesse (3). In Verbindung mit der endobronchialen Sonographie kann zusätzlich eine Aussage über die Dignität peribronchialer und mediastinaler Lymphknoten getroffen werden. Darüber hinaus kann auch der Einsatz der FDG-PET (Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie) zum Ausschluss von Metastasen und Rezidivmanifestationen des Primärtumors dienen (17). Zur Überprüfung der funktionellen Operabilität des Patienten kommen zudem die Lungenfunktionsdiagnostik, die Belastungs-Blutgasanalyse, die Echokardiographie, die Ergometrie und gegebenenfalls eine Lungenperfusionsszintigraphie oder eine CO<sup>2</sup>-Diffusionskapazität zum Einsatz (19).

Die Indikation zur Lungenmetastasen Chirurgie wird wie zuvor bereits erwähnt im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboards getroffen. Neben Resektionen in kurativer Intention konnte eine Studie von Park et al. auch für palliative Resektionen kolorektaler Metastasen einen Überlebensvorteil aufzeigen (20). Außerdem können Patienten mit primär inoperablen Lungenmetastasen durch Kombination mit einer systemischen Therapie einer Metastasenresektion zugänglich gemacht werden (4, 16).

Als operativer Zugangsweg wird vor allem die laterale Thorakotomie verwendet. Durch die seitliche Eröffnung des Brustkorbes auf Höhe des 4. bzw. 5. Interkostalraumes wird ein optimaler Zugang zu den Strukturen im Hemithorax geschaffen. Besonders bei multiplen Metastasen in der präoperativen CT können durch die intraoperative Palpation bei etwa 30 % der Patienten weitere Herde entdeckt werden. Nachteile dieser Technik sind die Schmerzprovokation durch Spreizung der kostovertebralen Gelenke und das zweizeitige Vorgehen bei bilateraler Metastasierung.

Bei solitären, möglichst peripher gelegenen Herden besteht hingegen die Möglichkeit einer thorakoskopischen Entfernung, die sogenannte Video-assistierte thorakoskopische Chirurgie (VATS). Eine generelle Empfehlung für minimalinvasive Verfahren bei der pulmonalen Metastasektomie besteht trotz der geringen Traumatisierung durch den operativen Zugang nicht. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Palpation der Lunge und wegen der eingeschränkten Durchführbarkeit der systematischen Lymphadenektomie sind thorakoskopische Verfahren der offenen Thorakotomie unterlegen (3, 21).

Das chirurgische Standardverfahren stellt die atypische, parenchymschonende Keilresektion dar. Dabei wird die Metastase ohne Berücksichtigung der segmentalen Strukturen reseziert. Der empfohlene Sicherheitsabstand für Metastasen bis 2 cm Durchmesser beträgt 3 mm, bei größeren Metastasen 1 cm. Abhängig von der Größe und Lage der Metastasen kann eine anatomische Resektion in Form einer Segmentresektion, Lobektomie oder sogar Pneumonektomie notwendig sein (21).

In Hinsicht auf das technische Vorgehen bei der Resektion wird zwischen resezierenden Verfahren und den sogenannten Diathermieverfahren unterschieden. Der Goldstandard bei der chirurgischen Entfernung peripherer Herde ist die atypische Keilresektion mittels Stapler. Der mechanische Stapler, ein Klammernahtgerät, erlaubt Resektionen ohne Respektierung der anatomischen Grenzen. Bei Patienten mit multiplen Metastasen stellt die Resektion mittels Laser eine Alternative dar, die ein extrem parenchymsparendes Vorgehen durch die unmittelbar an den Tumorrand herangeführte Koagulationslinie erlaubt.

Die Verfahren der Diathermie führen zu einer lokalen Nekrose, die durch die Wärmeentwicklung des Hochfrequenzstroms erzeugt wird. Ein beliebtes Verfahren, das mit hoher Verfügbarkeit und niedrigen Kosten verbunden ist, ist der Elektrokauter. Dieser ermöglicht die Behandlung multipler und vor allem tiefer gelegener Herde, indem eine Koagulationsnekrose des umliegenden Lungengewebes ausgelöst wird (4).

Die Resektion der Lungenmetastasen erfolgt in der Regel nach präoperativem Abschluss von intrathorakalen Lymphknotenmetastasen. Trotzdem wird bei einem Großteil der Eingriffe zusätzlich eine systematische Lymphadenektomie durchgeführt. Dabei kann in bis zu 25 % der Fälle eine Lymphknotenmetastasierung nachgewiesen werden, die mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergeht (21, 22). Die therapeutische Effektivität der Lymphadenektomie bei pulmonaler Metastasierung ist weiterhin unbekannt. Prospektive Studien in Hinsicht auf Überlebensunterschiede fehlen (23, 24).

Die Bedeutung der pulmonalen Metastasen Chirurgie wird anhand folgender Beispiele deutlich: Sponholz et al. berichten von 5-Jahres-Überlebensraten von 54 % bei Patienten nach Metastasektomie mit einem medianen Überleben von 64 Monaten, wohingegen Patienten ohne einen operativen Eingriff mit alleiniger Chemotherapie bei

Regression ein medianes Überleben von 27 Monaten, bei „stable disease“ eines von 16 Monaten und bei Krankheitsprogress eines von acht Monaten aufweisen (19). In einer retrospektiv durchgeführten Studie von Tampellini et al. bestehend aus 409 Patienten mit kolorektalen Lungenmetastasen konnte ebenfalls ein längeres Gesamtüberleben bei resezierten Patienten (72,4 gegenüber 31,5 Monate;  $p < 0,0001$ ) festgestellt werden (25). Eine von McCormack et al. veröffentlichte Studie zeigte eine 5-Jahres-Überlebensrate von 44 % bei Patienten mit Resektion von Lungenmetastasen, wohingegen keiner der Patienten mit alleiniger Chemotherapie länger als 24 Monate überlebte. Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Patienten mit einer R0-Resektion ein signifikant besseres Überleben als Patienten mit unvollständiger Resektion aufweisen (26).

Die chirurgische Therapie sollte nach Empfehlung der konsensbasierten Leitlinie der ESMO (European Society for Medical Oncology) für sechs Monate mit einer postoperativen Chemotherapie oder für jeweils drei Monate mit einer prä- und postoperativen Chemotherapie kombiniert werden (27).

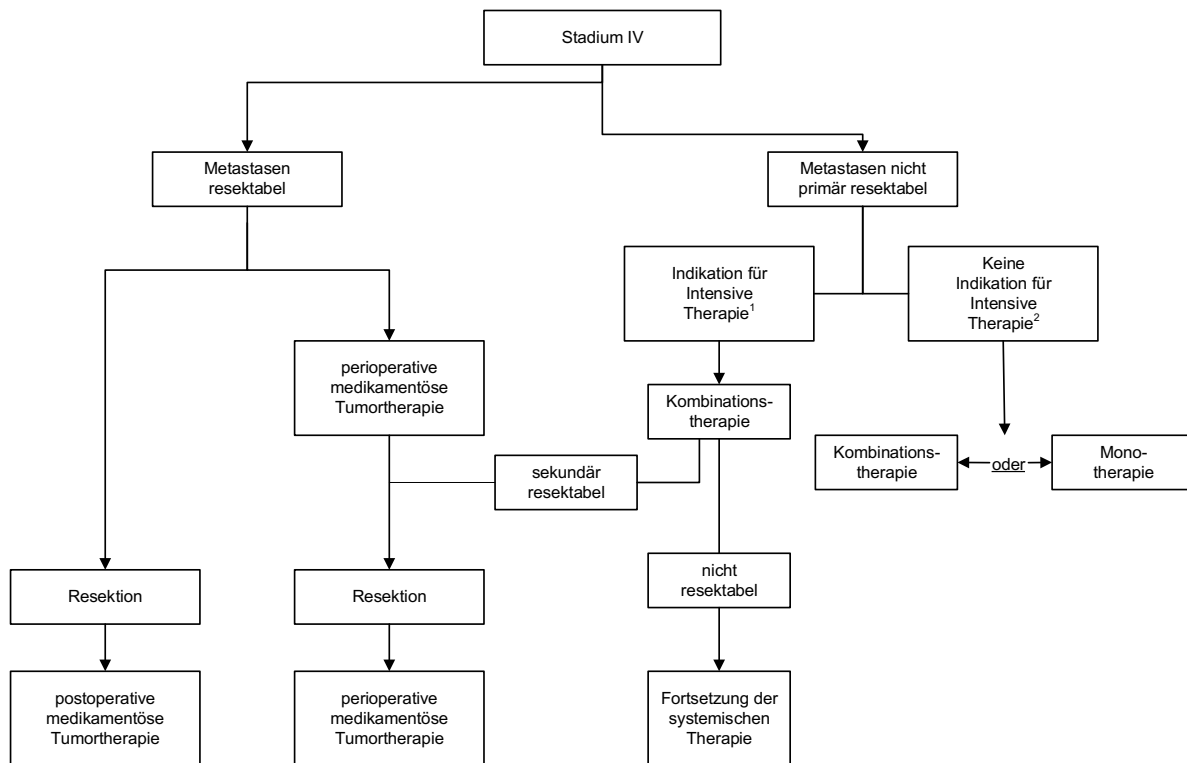
### **1.1.2.2 Die Chemotherapie**

Eine Hilfestellung zur Auswahl des geeigneten therapeutischen Vorgehens für Patienten im UICC Stadium IV mit kolorektalem Karzinom soll laut der aktuellen S3-Leitlinie die Unterteilung in drei Subgruppen erbringen:

- Patienten mit primär resektablen Lungen-/Lebermetastasen
- Patienten mit einer Indikation für eine intensivierete Therapie:
  - Patienten mit potentiell resektablen Lungen-/Lebermetastasen nach Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie
  - Patienten mit tumorbedingten Symptomen, Organkomplikationen oder raschem Progress
- Patienten mit der Möglichkeit für eine weniger intensive Therapie

Die erste Gruppe wurde bereits in Kapitel 1.1.2.1 behandelt. Patienten mit potentiell resektablen Metastasen oder mit einem schwierigen Verlauf sollten einer intensivierten Kombinationschemotherapie zugeführt werden. Bei Patienten der dritten Sub-

gruppe steht weniger die Remissionsinduktion als vielmehr eine Verlängerung des Überlebens bei gleichzeitig guter Lebensqualität im Vordergrund (16). Einen Überblick über die therapeutische Entscheidungsfindung im UICC Stadium IV liefert Abbildung 3.



**Abbildung 3** Therapiealgorithmus des kolorektalen Karzinoms im UICC Stadium 4. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Hofheinz et al. 2016 (28).

<sup>1</sup> Patienten mit potenziell resektablen Leber- und / oder Lungenmetastasen nach Ansprechen auf neoadjuvante Therapie; Patienten mit tumorbedingte Symptome, Organkomplikationen oder raschem Progress.

<sup>2</sup> Patienten mit multiplen Metastasen ohne Aussicht auf eine Resektion nach Metastasenrückbildung; Patienten ohne tumorbezogene Symptome oder Organkomplikationen und / oder mit schwerer Komorbidität.

Der Nutzen der Systemtherapien verbesserte sich in den letzten Jahren durch die Einführung neuer Substanzen und Chemotherapieprotokolle deutlich. Das Zytostatikum 5-Fluoruracil (5-FU) wurde schon in den 50er Jahren als Standardtherapeutikum bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt. In Kombination mit dem Biomodulator Folinsäure konnten Remissionsraten von 20 % dokumentiert werden. Für die orale Vorstufe Capecitabin, die besonders in Tumorzellen enzymatisch in 5-FU metabolisiert wird, konnte in verschiedenen Studien eine bessere Ansprechrate als für das Bolus-5-FU-Protokoll erreicht werden. Die Einführung neuerer Chemotherapeutika wie Oxaliplatin und Irinotecan verbesserte in Kombination mit 5-FU/Folinsäure die Ansprechraten und das progressionsfreie Überleben. Die Kom-

bination aus Oxaliplatin und 5-FU/Folinsäure (FOLFOX) ist aufgrund des günstigeren Wirkungs-/Nebenwirkungsverhältnisses der Kombination aus Irinotecan und 5-FU/Folinsäure (FOLFIRI) überlegen (16).

Die Einführung der molekularen Therapien mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab und dem anti-EGFR-Antikörper Cetuximab führte bei bestimmten Patienten zu einer weiteren Verbesserung der Prognose. Die Kombinationschemotherapie von 5-FU mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab bewirkte einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil von vier bzw. zwei Monaten (29, 30). Die Therapie mit dem anti-EGFR-Antikörper Cetuximab setzt vor Therapiebeginn die Bestimmung des RAS-Status voraus. Ein signifikanter Überlebensvorteil konnte für die Kombinationschemotherapie mit einem anti-EGFR-Antikörper gegenüber der Kombinationschemotherapie mit einem anti-VEGF-Antikörper bei Patienten mit RAS-Wild-Typ(wt)-Karzinomen festgestellt werden (31).

Einen kurzen Überblick über die zahlreichen Optionen bei der systemischen Therapie soll im Folgenden anhand der zuvor definierten Subgruppen gegeben werden. Patienten mit primär resektablen Metastasen sollten im Rahmen der operativen Versorgung eine Chemotherapie nach dem FOLFOX-Schema erhalten. Diese kann entweder über sechs Monate nach der Operation oder über jeweils drei Monate prä- und postoperativ erfolgen.

Patienten mit primär irresektablen, aber nach neoadjuvanter Chemotherapie potentiell R0-resektablen Metastasen sollten einer intensivierten Kombinationschemotherapie zugeführt werden. Nach aktuellem Stand sollte entweder eine Kombinationschemotherapie nach dem FOLFOXIRI (Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan) oder bei RAS-wt-Karzinomen eine Kombination des FOLFIRI-, FOLFOX- oder FOLFOXIRI-Protokolls mit einem anti-EGFR-Antikörper (Cetuximab/ Panitumumab) verabreicht werden.

Patienten, die eine hohe Tumorlast oder ein aggressives Wachstum aufweisen, sollten gleich zu Beginn eine intensivierte Kombinationschemotherapie erhalten. Bei RAS-wt-Tumoren sollte die Chemotherapie mit einem anti-EGFR-Antikörper kombiniert werden, während bei RAS-mutierten Tumoren eine bevacizumabbasierte Chemotherapie günstig erscheint.

Unklarer ist die Datenlage für die Therapie von Patienten mit niedriger Tumormass oder keinen Tumorsymptomen. Den Ergebnissen der FIRE3-Studie zufolge sollte bei Patienten mit RAS-wt-Tumoren eine EGFR-basierte Kombinationstherapie bevorzugt werden. Bei einer Vielzahl von Patienten mit mutiertem RAS-Status kann zu Beginn eine 5-FU-Monotherapie in Kombination mit Bevacizumab erfolgen. Bei Tumorprogression ist es möglich, dass die Therapie auf FOLFOX oder FOLFIRI plus Bevacizumab erweitert wird (32).

Die Fülle der Chemotherapieprotokolle verdeutlicht einmal mehr die Notwendigkeit der Therapieplanung in einer interdisziplinären Tumorkonferenz. Generell sollte eine systemische Therapie nur unter Abwägung der Toxizität und Nebenwirkungen erfolgen.

### **1.1.2.3 Weitere Therapieansätze**

Neben den klassischen Therapieformen wie der chirurgischen Resektion oder der systemischen Chemotherapie gewannen in den letzten Jahren auch die interventionellen Verfahren an Bedeutung. Die angewandten Verfahren umfassen zum einen die endovaskulären Interventionen, bei denen es zu einer mechanischen oder Chemoembolisation der pulmonalen Herde kommt, und zum anderen die lokalen Thermoablationsverfahren. Letztere machen den weitaus größeren Anteil an den interventionellen Therapieansätzen aus.

Die CT-gesteuerte perkutane Radiofrequenzablation (RFA), bei der hochfrequenter Strom an der Elektrodenspitze zu einer thermischen Nekrose führt, ist das am häufigsten durchgeführte thermische Verfahren. Auch wenn in Studien von einer 3-Jahres-Überlebensrate von 48 - 57 % berichtet wird, darf die relativ hohe periinterventionelle Komplikationsrate von 30 % sowie eine 30-Tages-Letalität von 3,9 % nicht vernachlässigt werden. Im Vergleich dazu lag die perioperative Letalität in Studien zur VATS-Metastasektomie bei deutlich unter 1 %. Die RFA sollte daher nur bei Patienten diskutiert werden, die eine chirurgische Resektion ablehnen oder für eine chirurgische Therapie nicht in Frage kommen.

Zu den endovaskulären Verfahren zählt die transarterielle Chemoembolisation (TACE), die auch als transpulmonale Chemoembolisation bezeichnet wird. Dabei wird im Rahmen eines angiographischen Eingriffes die Verabreichung eines Chemotherapeutikums mit einer gezielten Embolisation von tumorversorgenden Gefäßen durch kleine Partikel kombiniert. Während die TACE bei Tumoren und Metastasen in der Leber bereits klinisch etabliert ist, stellt sie zur Behandlung von Lungenmetastasen bis jetzt ein auf wenige Zentren und Individualentscheidungen begrenztes palliatives Verfahren dar.

Weitere interventionelle Verfahren zur Behandlung kolorektaler Lungenmetastasen wie die Kryoablation oder der Fokussierte Ultraschall (FUS) befinden sich derzeit noch in der Studienphase (4, 33).

### **1.1.3 Risikofaktoren zur Abschätzung der Effektivität der Metastasektomie**

Die Anzahl der durchgeführten pulmonalen Metastasektomien nahm über die letzten Jahre stetig zu, da das Verfahren für Patienten im metastasierten Krankheitsverlauf einen potenziell kurativen Ansatz darstellt. Welche Patienten am meisten von einer chirurgischen Therapie profitieren, war die zentrale Forschungsfrage zahlreicher Studien. Denn auch wenn die Resektion mit einer niedrigen Morbidität und Mortalität einhergeht, wird nur bei einer Minderheit eine kurative Situation geschaffen. Um ein geeignetes Patientenkollektiv für die operative Behandlung rekrutieren zu können, wurde der Einfluss klinischer Risikofaktoren, wie zum Beispiel die Anzahl der Metastasen oder der hiliäre/mediastinale Lymphknotenstatus, auf das Überleben nach Metastasenresektion untersucht (4).

In einer von Gonzalez et al. durchgeführten Metaanalyse mit 2925 Patienten aus 25 Studien konnten vier unabhängige Faktoren identifiziert werden, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren: ein kurzes krankheitsfreies Intervall (DFI) zwischen der Operation des Primärtumors und der Erstdiagnose der Lungenmetastasen (Hazard Ratio 1,59; 95 % KI 1,27-1,98), multiple Lungenmetastasen (Hazard Ratio 2,04; 95 % KI 1,72-2,41), positive hiliäre und/oder mediastinale Lymphknoten

(Hazard Ratio 1,65; 95 % KI 1,35-2,02) und ein erhöhtes Carcinoembryonales Antigen (CEA) vor dem Eingriff (Hazard Ratio 1,91; 95 % KI 1,57-2,32) (22).

Die multivariate Analyse einer 927 Patienten umfassenden Arbeit von Salah et al. konnte ebenfalls ein erhöhtes CEA  $\geq 5$  ng/ml, ein DFI  $< 36$  Monate und mehr als eine Lungenmetastase als prognostisch ungünstige Faktoren bestimmen (34). In einem systematischen Review von Pfannschmidt et al. konnte nur ein erhöhter Serum-CEA Wert ( $>5$  ng/ml oder  $>10$  ng/ml) als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden, wohingegen kein Überlebensvorteil für ein langes DFI oder die Anzahl der Metastasen gezeigt werden konnte. Der thorakale Lymphknotenstatus wurde nur in Studien, in denen bei allen Patienten eine systematische Lymphadenektomie durchgeführt worden war, als prognostischer Faktor beschrieben (35).

Diese Ergebnisse zeigen, für welche Patienten eine operative Versorgung einen größeren Benefit darstellen würde und die Indikation zur Resektion eher gegeben wäre. Allerdings sollte Patienten mit hohen CEA-Werten oder multiplen Lungenmetastasen nicht generell von einer Operation abgeraten werden, da trotz der negativen prognostischen Faktoren durch die Resektion ein immer noch besseres Überleben zu erwarten ist als ohne einen chirurgischen Eingriff (4).

## **1.2 Immunhistochemie als prognostisches Hilfsmittel**

Die Entscheidung für eine geeignete Therapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom wird, wie bereits erwähnt, in einem interdisziplinären Tumorboard getroffen. Eine Einschätzung der klinischen Situation liefert das Staging nach der AJCC/UICC TNM-Klassifikation. Dabei werden Gewebeschnitte, die während der Operation des Primärtumors gewonnen werden konnten, bezüglich histopathologischer Eigenschaften wie der Tumorgröße, der Eindringtiefe in umliegendes Gewebe und der Zellmorphologie untersucht. Außerdem erfolgt eine histologische oder radiologische Beurteilung von Lymphknoten im Abflussbereich des Tumors und von entfernt liegenden Organen, um Hinweise für eine mögliche Metastasierung zu finden. Die Einteilung in verschiedene Tumorstadien ermöglicht durch den Vergleich von Überlebensdaten von Patienten mit dem gleichen Krankheitsprogress eine Einschätzung des weiteren Verlaufs (Tab. 3 und 4).

**Tabelle 3** TNM-Klassifikation. Eigene Darstellung nach Sobin et al. 2010 (36).

<b>TNM</b>	<b>Ausdehnung</b>
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Infiltration der Submukosa
<b>T2</b>	Infiltration der Muscularis propria
<b>T3</b>	Infiltration der Subserosa, Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes
<b>T4</b>	Infiltration des viszeralen Peritoneums (T4a) oder anderer Organe/Strukturen (T4b)
<b>N1</b>	1-3 regionäre Lymphknoten
<b>N2a</b>	4-6 regionäre Lymphknoten
<b>N2b</b>	≥7 regionäre Lymphknoten
<b>M1a</b>	Fernmetastasen: Nur ein Organ betroffen
<b>M1b</b>	Fernmetastasen: Mehr als ein Organ betroffen oder Peritonealkarzinose

**Tabelle 4** AJCC/UICC-Stadien. Vereinfachte Darstellung nach Sobin et al. 2010 (36).

<b>UICC-Stadium</b>	<b>TNM</b>
<b>0</b>	Tis
<b>I</b>	Bis <b>T2</b> , N0, M0
<b>II</b>	Bis <b>T4</b> , N0, M0
<b>III</b>	Jedes T, <b>N1/N2</b> , M0
<b>IV</b>	Jedes T, jedes N, <b>M1</b>

Die Erkenntnisse, die aus der TNM-Klassifikation entnommen werden können, besitzen allerdings nur eine eingeschränkte Wertigkeit in Hinblick auf die Prognose des Patienten. So können die Überlebensraten von Patienten innerhalb desselben Stadiums deutliche Unterschiede aufweisen. Es wird von Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung, aber über Jahre stabilen Verlauf berichtet, wohingegen es Fälle gibt, in denen Patienten nach vollständiger Resektion eines Tumors im Frühstadium ohne Nachweis einer Metastasierung einen raschen Progress bis hin zum Tod zeigten.

Ein Grund für die fehlende Genauigkeit des traditionellen Staging-Systems könnte in der Annahme begründet liegen, dass der Progress einer Tumorerkrankung einen Prozess darstellt, der hauptsächlich von den Tumorzellen beeinflusst wird, ohne dabei den Einfluss des körpereigenen Immunsystems zu berücksichtigen (37).

In zahlreichen Studien konnten allerdings ein tumorspezifisches Infiltrat aus Immunzellen unterschiedlicher Dichte im Tumorzentrum, im Tumordinfiltrationsrand und in dem den Tumor umgebenden, peripheren Stroma nachgewiesen werden. Dies stärkt die Hypothese, dass die Tumorentwicklung und -ausbreitung durch die Anwesenheit von Immunzellen beeinflusst wird (38). Galon et al. fordern, dass systemische und lokale immunologische Biomarker bezüglich ihres Einflusses und ihrer Aussagekraft auf die Prognose und das Überleben der Patienten validiert werden und in den klinischen Staging- und Therapieprozess aufgenommen werden (37, 39).

Dabei wird insbesondere der An- oder Abwesenheit verschiedener Subgruppen der T-Lymphozyten bei der Analyse des Tumormilieus auf Zellebene eine zentrale Bedeutung zugeschrieben (40, 41). Immunhistochemische Färbungen ermöglichen durch die Reaktion eines spezifischen Antikörpers gegen bestimmte Antigene oder Proteine die Auszählung und Beurteilung der Verteilung von Zellen in untersuchten Präparaten. Einen häufigen Angriffspunkt stellen dabei die Cluster of Differentiation (CD) Antigene dar, eine Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale, durch die eine Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen erfolgt.

In Studien zum kolorektalen Karzinom wurden dabei Färbungen gegen das CD4-Antigen, das auf das Vorliegen von T<sub>H</sub>1+2-Helferzellen hinweist, gegen das CD8-Antigen, das von zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert wird, gegen das CD45RO-Antigen, eine von T-Gedächtniszellen exprimierte Isoform des Leukozytenspezifischen CD45-Antigens, und gegen das CD3-Antigen, ein auf allen T-Lymphozyten exprimierter Proteinkomplex, der mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist, durchgeführt (42, 43). Außerdem konnten regulatorische T-Zellen, denen ebenfalls eine Rolle bei der Immunreaktion in menschlichen Tumoren zugeschrieben wird, durch die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) identifiziert werden (44, 45).

So konnte die Arbeitsgruppe um Galon, Pages und Mlecnik bei Untersuchungen zur Immunarchitektur von kolorektalen Karzinomen eine starke Korrelation zwischen einer ausgeprägten lokalen Immunreaktion, hervorgerufen durch verschiedene Subpopulationen von T-Lymphozyten, und einer günstigen Prognose feststellen. Zudem korrelierte die Anwesenheit von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Lymphozyten, CD8<sup>+</sup> Zytotoxischen- und

CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen mit einer niedrigen Inzidenz von Tumorrezidiven (38). Ein rasch progredientes Wachstum des Primärtumors und das Auftreten einer Fernmetastasierung waren mit einer erniedrigten intratumoralen T-Zell-Dichte assoziiert. Bei Patienten, die kein Tumorrezidiv entwickelten, zeigte die Dichte an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten einen entgegengesetzten Zusammenhang zum dazugehörigen Tumorstadium. So wiesen 60 % der Patienten mit einer hohen Dichte an CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen ein Tumorstadium Tis/T1 auf, wohingegen sich kein Patient mit einer niedrigen Dichte an Immunzellen mit einem frühen TNM-Stadium präsentierte. Patienten, die ein Rezidiv des Tumors erlitten, wiesen allesamt niedrige CD8<sup>+</sup> T-Zell-Zahlen auf, unabhängig vom Tumorstadium (39).

Salama et al. wiederum zeigten, dass eine Infiltration FOXP3<sup>+</sup> regulatorischer T-Lymphozyten sowohl im Tumorzentrum als auch im umliegenden Gewebe einen größeren Einfluss auf die Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom hat als sie dies für Infiltrate aus CD8<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen zeigen konnten. Interessanterweise zeigte eine hohe Infiltration FOXP3<sup>+</sup> regulatorischer T-Lymphozyten in tumorfreiem Gewebe eine signifikant schlechtere Prognose ( $p = 0,019$ ), wohingegen eine hohe Dichte FOXP3<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorzentrum mit einem verbesserten Überleben ( $p = 0,001$ ) einherging (46). Diese Ergebnisse verdeutlichen die tumorspezifische Ausprägung des Immuninfiltrats, da bei verschiedenen anderen, soliden Tumoren, wie dem Ovarialkarzinom, dem Pankreaskarzinom oder dem hepatozellulären Karzinom, eine hohe Zelldichte aus FOXP3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Tumorzentrum mit einer schlechten Prognose assoziiert war (47-49).

Eine bessere Aussagekraft hinsichtlich der Prognose und des Überlebens konnte in ausgewählten Studien durch die Verwendung von Ratios, dem Quotienten zweier Zahlenwerte, im Gegensatz zu der alleinigen Verwendung absoluter Zellzahlen erreicht werden. So untersuchten Diederichsen et al., ob das Überwiegen einer T-Zell-Subpopulation Auswirkungen auf die Prognose oder das Überleben hat. Dabei konnte für Patienten mit einer niedrigen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Ratio eine signifikant bessere 5-Jahres-Überlebensrate ( $p = 0,046$ ) unabhängig vom Patientenalter und dem jeweiligen Tumorstadium festgestellt werden (50). Diese Daten konnten in einer prospektiv angelegten Studie, bestehend aus 35 Patienten mit kolorektalem Karzinom im AJCC/UICC TNM-Stadium I-III, bestätigt werden. Ein signifikant besseres krankheits-

freies Intervall konnte bei Patienten mit einer niedrigen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Ratio ( $p = 0,0082$ ) gefunden werden. Patienten mit einer hohen Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Tumor zeigten einen nicht-signifikanten Trend zu einem längeren DFI (51).

Des Weiteren konnte mit Hilfe einfacher Immunscores, die die Verteilung und Dichte von Immunzellen im Tumor quantifizieren, ein prognostisches Hilfsmittel erstellt werden, das in der statistischen Analyse dem klassischen TNM-System signifikant überlegen war (52). Der von Pages et al. erstellte Immunscore lässt sich in fünf Gruppen (I0-I4) unterteilen, die die Zellzahlen zweier T-Zell-Populationen in zwei ausgewählten Bereichen, dem Tumorzentrum und dem Tumordinfiltrationsrand, widerspiegeln. Ein Immunscore von 0 repräsentiert eine niedrige Zelldichte beider Zelltypen (CD8<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup>) in den beiden Bereichen, ein Immunscore von 4 zeigt in beiden Bereichen eine hohe Dichte der Zellpopulationen an. Dabei konnten hochsignifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in Bezug auf das krankheitsfreie Intervall und Gesamtüberleben ( $p < 0,0001$ ) gezeigt werden. So entwickelten fünf Jahre nach der Diagnose des Primärtumors nur 4,8 % der Patienten mit einer hohen Zelldichte von CD8<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Zellen in beiden Bereichen ein Rezidiv und 86,2 % davon waren noch am Leben. Dagegen erlitten 75 % der Patienten mit einem Immunscore von 0 innerhalb von fünf Jahren ein Rezidiv und nur 27,5 % überlebten diesen Zeitraum (53). Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit geringer Tumordinvasion, aber niedrigem Immunscore ein Rezidiv mit erhöhter Wahrscheinlichkeit auftritt und diese Patienten möglicherweise von einer adjuvanten Chemotherapie im Gegensatz zu einer alleinigen operativen Resektion, die in diesem Fall nur noch fraglich als kurativer Ansatz anzusehen ist, profitieren könnten (52).

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in der Folge auch auf Metastasen des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms ausgedehnt. Der Fokus lag dabei vor allem auf der häufigsten kolorektalen Metastasenlokalisation: der Leber.

In einer ersten Veröffentlichung konnten Katz et al. bei Patienten mit einer Überlebenszeit größer zehn Jahren nach Lebermetastasenresektion eine Assoziation mit einer hohen Gesamt-T-Lymphozyten-Anzahl (CD3<sup>+</sup> T-Zellen), spezieller einer hohen Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen, nachweisen. Paradoxerweise wurden nur bei 22 % dieser Patienten hohe CD4<sup>+</sup> Zellzahlen gefunden, obwohl für eine wirksame und dauerhafte

Immunantwort CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Lymphozyten die Hilfe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigt wird. Als mögliche Erklärung geben die Autoren die Einschlusskriterien ihrer Patienten in der vorliegenden Studie an, die, ausgewählt nach der Überlebenszeit ( $\leq 2$  Jahre und  $\geq 10$  Jahren), Extremfälle des Krankheitsverlaufes darstellen (54, 55). In einer aktuellen Studie mit 188 Patienten konnte die Forschungsgruppe um Katz et al. für die Anzahl CD4<sup>+</sup> Zellen eine positive Korrelation mit dem Gesamtüberleben und der rezidivfreien Zeit feststellen. Eine hohe Anzahl CD8<sup>+</sup> Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzahl an T-Lymphozyten (CD8/CD3 Ratio) konnte ebenfalls ein verlängertes Überleben voraussagen. Die Analyse der regulatorischen T-Lymphozyten zeigte, dass hohe FoxP3:CD4 und FoxP3:CD8 Ratios unabhängige Prädiktoren für ein kürzeres Gesamtüberleben waren (56).

Eine an unserem Institut von Brunner et al. durchgeführte Studie, die das Immuninfiltrat kolorektaler Lebermetastasen untersuchte, ergab in der multivariaten Analyse ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit einer hohen CD45RO<sup>+</sup> T-Zell Ratio beim Vergleich von Tumordinfiltrationsrand und tumorfreiem Lebergewebe. Die Ausbildung einer fibrotischen Kapsel zeigte ebenfalls eine signifikante Korrelation mit einem verlängerten Überleben, sodass mit Hilfe dieser beiden Werte ein Immunscore zur Risikostratifikation erstellt werden konnte (57).

Die Gruppe um Halama et al. beschrieb zudem eine starke Assoziation zwischen der Immunzellendichte im Tumordinfiltrationsrand kolorektaler Lebermetastasen und der Ansprache auf eine Chemotherapie. Patienten, die als Responder auf eine Chemotherapie identifiziert wurden und gleichzeitig eine hohe Dichte an Immunzellen im Tumordinfiltrationsrand aufwiesen, zeigten ein signifikant längeres Gesamt- und progressionsfreies Überleben (58).

Bei 10 - 20 % der Patienten mit kolorektalem Karzinom treten im Krankheitsverlauf Metastasen in der Lunge auf (2). Remark et al. fertigten immunhistochemische Färbungen von Patienten mit Lungenmetastasen von kolorektalen Karzinomen und Nierenzellkarzinomen an und verglichen anschließend die Immuninfiltrate der Metastasen mit denen der Primärtumoren. Dabei korrelierte eine hohe Dichte von CD8<sup>+</sup>-Zellen mit einem längeren Gesamtüberleben ( $p = 0,039$ ), was sich mit den Ergebnissen aus Studien zum Primärtumor deckt. Die Kombination von CD8<sup>+</sup>-Zellen mit Zell-

zahlen reifer dendritischer Zellen ( $CD8^{\text{high}}/DC\text{-LAMP}^{\text{high}}$ ;  $p = 0,008$ ) ergab zudem in der multivariaten Analyse den stärksten unabhängigen Prädiktor für das Überleben. Außerdem konnte beim Vergleich der Dichte der Immunzellen zwischen dem Primärtumor und den Lungenmetastasen eine positive Korrelation für alle untersuchten Zellreihen ( $CD8^+$  T-Lymphozyten, dendritische Zellen und NK-Zellen) gefunden werden. Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist noch nicht geklärt. Sie könnten aber entweder eine Art „Imprinting“ des Immuninfiltrates durch die Tumorzellen oder ein durch Immunzellen im Rahmen des Kontakts mit dem Primärtumor erlerntes Gedächtnis widerspiegeln (59). Weitere Studien, die das Immuninfiltrat kolorektaler Lungenmetastasen erforschen und auf seine prognostische Aussagekraft hin untersuchen, fehlen bisher.

Eine bedeutende Rolle könnte die Integration von Immunmarkern neben seiner prognostischen Aussagekraft zudem für die Etablierung einer Immuntherapie beim kolorektalen Karzinom spielen. Verschiedene Ansätze wurden bereits in klinischen Studien getestet oder befinden sich gerade in der Erprobung. Einer dieser Ansätze stellt eine Kombination aus nicht-spezifischer Immun- und Chemotherapie dar. Dafür wurde im Rahmen einer Phase-III-Studie die Zusammensetzung aus dem Zytostatikum Gemcitabin, dem FOLFOX-Schema und dem Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) mit dem klassischen Chemotherapieschema FOLFOX verglichen. Eine zwischenzeitliche Analyse konnte bereits eine signifikante Überlegenheit des sogenannten GOLFIG-Schemas über das alleinige FOLFOX-Schema in Bezug auf die Ansprechrate (59,3 % gegenüber 34,4 %;  $p = 0,0001$ ) und das progressionsfreie Überleben (12,4 Monate gegenüber 7,9 Monate;  $p = 0,0105$ ) zeigen. Als unabhängiger, voraussagender Faktor konnte eine Tumordinfiltration durch regulatorische T-Lymphozyten und zentrale Gedächtnis-T-Zellen identifiziert werden.

Ein weiterer Ansatz verfolgt die Beimpfung des Patienten mit tumorspezifischen Antigenen, zum Beispiel durch den Einsatz von Vektoren wie bestrahlten autologen Tumorzellen oder autologen dendritischen Zellen, die eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunreaktion bewirken sollen (60). Es ist zu erwarten, dass die Immuntherapie durch die intensive Forschung und das zunehmende Wissen auf diesem Gebiet in den nächsten Jahren zunehmend an Bedeutung bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms gewinnen wird.

Der Einfluss von Immunzellen im Tumormilieu konnte in zahlreichen Studien auch für andere Tumorentitäten (Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom, Nierenzellkarzinom, etc.) und für verschiedene histologische Typen (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, etc.) beschrieben werden (61). Begründet auf der universalen Rolle der Immunreaktion in Tumoren wurde in Fachkreisen die Forderung laut, Hilfsmittel wie den Immunscore als prognostischen Faktor und Komponente der Tumorklassifikation aufzunehmen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass ein Instrument wie der Immunscore als stärkster Parameter für das DFI und Gesamtüberleben dem traditionellen TNM-System überlegen ist. Zum anderen können die Ergebnisse immunhistochemischer Färbungen ein mögliches Hilfsmittel für neue therapeutische Ansatzpunkte darstellen. Die Auswertung von Gewebeschnitten nach immunhistochemischer Färbung kann von Standardlaboren, die mit der Routinediagnostik und Begutachtung von Tumoren vertraut sind, durchgeführt werden. Um einen Vergleich der Messwerte zu ermöglichen, erfordert es allerdings die Standardisierung der Versuchsprotokolle. Hierfür wurde eigens eine internationale Task Force mit Spezialisten aus 23 verschiedenen Zentren ins Leben gerufen, die mit der Validation und Integration der aus den Immuninfiltraten gewonnenen Informationen beauftragt wurde. Ziel ist die Entwicklung einer vorläufigen Leitlinie für Organisationen und Institutionen, die sich mit der Krebsimmuntherapie und anderen Aspekten der Tumorbilogie auseinandersetzen, und die Aufnahme des Immunscores als neue Komponente für die Klassifikation von Tumoren (37, 62).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Analyse des Infiltrationsmusters von Immunzellen bei soliden Tumoren lieferte wertvolle Informationen in Bezug auf die Prognose und das Überleben der Patienten. Zahlreiche Studien konzentrierten sich dabei auf die Erforschung des Immuninfiltrates des kolorektalen Karzinoms. Auch die Rolle der Immunzellen bei kolorektalen Lebermetastasen wurde in den letzten Jahren zunehmend untersucht, wohingegen das Immuninfiltrat kolorektaler Lungenmetastasen bisher kaum erforscht wurde.

Ziel der vorliegenden retrospektiv durchgeführten Studie war es, einen Zusammenhang zwischen dem Immuninfiltrat kolorektaler Lungenmetastasen und der Prognose und dem Überleben der Patienten zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser Studie sollen langfristig dazu beitragen, eine bessere Abschätzung der Prognose bei Patienten mit metastasiertem Tumorstadium zu ermöglichen und Informationen über mögliche Angriffspunkte neuer immuntherapeutischer Ansätze bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms zu liefern.

Zudem wurden die Immuninfiltrate kolorektaler Lungen- und Lebermetastasen miteinander verglichen. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob die immunologische Reaktion bei Metastasen desselben Primärtumors aber unterschiedlicher Lokalisation einem gemeinsamen Muster folgt.

Neben den immunhistochemischen Auswertungen wurde zusätzlich der Einfluss klinischer Faktoren, wie des Lymphknotenstatus bei der Metastasenresektion oder der Anzahl an Metastasen, auf das Überleben der Patienten untersucht.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben**

##### **3.1.1 Patientendaten und Herkunft der Proben**

Die vorliegende retrospektive Studie wurde an der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Nr. 12-101-0009). Die Stichprobe umfasste 69 Patienten mit in die Lunge metastasiertem kolorektalem Karzinom, die zwischen den Jahren 2005 und 2012 in der thoraxchirurgischen Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder Regensburg operativ versorgt worden waren.

Die Auswahlkriterien für die Indikationsstellung zur pulmonalen Metastasektomie beinhalteten die technische Möglichkeit zur Resektion der Lungenherde, die funktionelle Operabilität der Patienten, den Ausschluss eines Lokalrezidivs des Primärtumors sowie den Ausschluss extrapulmonaler Metastasen, ausgenommen Lebermetastasen (17, 63). Als operatives Verfahren wurde hauptsächlich die parenchymschonende Keilresektion (n = 29) verwendet. Bei 18 der Patienten wurde die Resektion der Lungenherde mittels Laser durchgeführt. In Einzelfällen musste aufgrund der Lage oder Ausbreitung der Metastasen eine Segmentresektion (n = 6), Lobektomie (n = 12) oder Pneumonektomie (n = 2) durchgeführt werden. Bei zwei Patienten kam die VATS zum Einsatz.

Mit Hilfe klinischer Daten aus dem Computer-System des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder und pathologischer Berichte konnte eine umfassende Datenbank für die statistische Auswertung erstellt werden. Die Tabellen 5 und 6 zeigen klinisch-pathologische Aspekte der 69 Patienten, darunter 45 Männer (65 %) und 24 Frauen (35 %), mit einem medianen Alter von 65 Jahren zum Zeitpunkt der Metastasenoperation. Die Lokalisation des Primärtumors befand sich bei 23 Patienten im Kolon und bei 46 Patienten im Rektum. Bei der Mehrzahl der Patienten (n = 39) wurde zum Diagnosezeitpunkt das TNM-Stadium T3 diagnostiziert, gefolgt von Stadium T2 (n = 16), Stadium T4 (n = 9), Stadium T1 (n = 2) sowie 3 nicht näher klassifizierte Stadien. Lymphknotenmetastasen konnten bei 36 Patienten (Stadien N1 und N2) beim Staging des Primärtumors gefunden werden.

**Tabelle 5** Histopathologische Aspekte des Primärtumors.

	n = 69 (100 %)
<b>Primärtumor</b>	
Kolon	23 (33 %)
Rektum	46 (66 %)
<b>TNM-Stadium</b>	
T1	2 (3 %)
T2	16 (23 %)
T3	39 (57 %)
T4	9 (13 %)
Tx	3 (4 %)
<b>Grading</b>	
G2	48 (70 %)
G3	12 (17 %)
Gx	9 (13 %)
<b>Lymphknotenmetastasen</b>	
N0	33 (48 %)
N1	17 (25 %)
N2	19 (28 %)
<b>Resektionsstatus Primärtumor</b>	
R0	54 (78 %)
R1	2 (3 %)
R2	3 (4 %)
Rx	10 (14 %)

Die Metastasen in der Lunge traten in unserem Kollektiv bei sechs (8,7 %) der Teilnehmer synchron zum Primärtumor auf, bei 63 (91,3 %) wurden Lungenmetastasen erst metachron entdeckt. Drei der Patienten entwickelten zudem synchron Lebermetastasen, bei 15 wurden Lebermetastasen metachron diagnostiziert. Zwölf der Patienten erhielten vor der Metastasen Chirurgie eine neoadjuvante Chemotherapie, 18 erhielten nach der Metastasektomie eine adjuvante Chemotherapie. Das mediane Überleben nach der Lungenoperation lag bei 33 Monaten mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von 44 % und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 37 %.

**Tabelle 6** Klinisch-pathologische Aspekte des Patientenkollektivs.

	Ja (%)	Nein (%)
Geschlecht (männlich)	45 (65,2 %)	24 (34,8 %)
Raucher	13 (18,8 %)	56 (81,2 %)
Pulmonale Vorerkrankung	9 (13,0 %)	60 (87,0 %)
Synchrone Lungenmetastasen	6 (8,7 %)	63 (91,3 %)
Singuläre Lungenmetastase	43 (62,3 %)	26 (37,7 %)
R0 Resektion d. Lungenmetastasen	67 (97,1 %)	2 (2,9 %)
pulmonale Lymphadenektomie	48 (69,6 %)	21 (30,4 %)
Positiver pulmonaler Lymphknotenstatus	8 (16,7 %)	40 (83,3 %)
Neoadjuvante Chemotherapie	12 (17,4 %)	57 (82,6 %)
Adjuvante Chemotherapie	18 (26,1 %)	51 (73,9 %)

Überlebensdaten des Kollektivs konnten mit Hilfe des Tumorzentrums Regensburg (Tumorzentrum für Ostbayern) erhoben werden. Die für die immunhistochemischen Untersuchungen benötigten Tumor- und Lymphknotengewebeblöcke aus Paraffin wurden von der pathologischen Gemeinschaftspraxis Dr. med. Wiesinger bereitgestellt.

Hinsichtlich der Verteilung von Immunzellen in den drei Bereichen wurde unser Patientenkollektiv mit Patienten aus einer Studie verglichen, die das Immuninfiltrat bei kolorektalen Lebermetastasen erforscht hatte. Die von Brunner et al. an unserem Institut durchgeführte Studie umfasste 222 Patienten (118 männlich, 59 %; 83 weiblich, 41 %) mit einem medianen Altersdurchschnitt von 62 Jahren, denen im Zeitraum von 2004 bis 2010 am Universitätsklinikum Regensburg Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms reseziert worden waren. Die Datenbanken zu den Zellzahlen wurden von Stefan Brunner bereitgestellt (57).

### **3.1.2 Aufbereitung der Proben**

Die Paraffinblöcke mit den Gewebeproben wurden zur Herstellung von Gewebeschnitten zunächst auf einer Kühlplatte bei -15 °C gekühlt. Die Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm wurden am Rotationsmikrotom SLEE CUT 6062 hergestellt.

Für jede Gewebeprobe wurden mehrere Schnitte angefertigt. Die fertigen Schnitte wurden dann zur Streckung in ein Wasserbad gegeben und anschließend auf Objektträger der Größe 75 x 25 mm fixiert.

## **3.2 Färbemethoden**

### **3.2.1 HE-Färbung**

Zur morphologischen Beurteilung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt basophile Strukturen, wie die DNS im Zellkern oder die Ribosomen, blau. Azidophile (Eosinophile) Zellbestandteile, wie zum Beispiel ein Großteil der Proteine im Zytoplasma, werden durch Eosin rot angefärbt. Die Färbung erfolgte nach dem folgenden Färbeprotokoll:

Die Schnitte wurden zunächst zur Entparaffinierung für 2 x 10 min in das organische Lösungsmittel Roti-Histol (Carl Roth) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 99 % - 2 x 96 % - 70 % Ethanol) für jeweils 2 Minuten rehydratisiert und unter destilliertem Wasser gewaschen. Die Färbung der basophilen Zellbestandteile erfolgte durch Einbringen der Schnitte in eine Hämalaun-Lösung für 3 - 5 min. Daraufhin wurden die Schnitte erneut mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 10 min unter Leitungswasser gebläut. Erst durch den höheren pH-Wert im Leitungswasser kommt es zum Farbumschlag der angefärbten, basophilen Strukturen ins Blaue. Die Gegenfärbung erfolgte für weitere 2 min mit Eosin. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte zur Dehydrierung in eine aufsteigende Alkoholreihe (1 min in 70 % Ethanol, je 2 x 2 min in 96 % und 99 % Ethanol) gegeben. Abschließend wurden die Präparate erneut in die Roti-Histol-Lösung getaucht und mit dem Deckmittel Roti HistoKitt (Carl Roth) und einem Deckglas luftdicht eingedeckt. Die Schnitte wurden zum Abdampfen unter den Abzug gelegt und später bei Zimmertemperatur gelagert.

### 3.2.2 Immunhistochemische Färbungen

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte in die Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg gebracht. Pro Patient wurden fünf Färbungen angefertigt. Die Schnitte wurden dabei auf das Vorhandensein von Immunzellen in drei unterschiedlichen Bereichen der Präparate (Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie) untersucht. Verwendet wurden Antikörper, die jeweils gegen das Antigen von CD4<sup>+</sup> Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen sowie CD45RO<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen gerichtet waren, da diese Marker bei Untersuchungen zum Primärtumor sowie bei Metastasierung in die Leber einen Zusammenhang zwischen der Immunzellverteilung im Tumormilieu und dem Patientenüberleben ergeben hatten (38, 39, 53, 56, 57).

Zusätzlich wurde das Vorliegen des B-Zell-Oberflächenantigens CD20 sowie des CD68 Antigens, das sich hauptsächlich bei Gewebsmakrophagen und Monozyten intrazellulär befindet, untersucht (Tab. 7).

**Tabelle 7** Antikörper der Immunhistochemischen Färbungen.

<b>Herstellerbezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>
Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Clone L26	1:500
CONFIRM Anti-CD4 (SP35) Rabbit Mono	1:1
CONFIRM anti-CD8 (SP57) Rabbit	1:2
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 Clone KP1	1:600
Monoclonal Mouse Anti-Human CD45-RO Clone UCHL1	1:150

Die Färbungen wurden am BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module mit vorgefertigten Protokollen durchgeführt. Das Fassungsvermögen pro Färbevorgang betrug 30 Objektträger.

#### 3.2.2.1 CD20

Die Färbung gegen das CD20 Antigen erfolgte mit dem Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy-Antikörper (Clone L27) in einer Verdünnung von 1:500.

Im ersten Schritt (Backen) wurden die Objektträger auf 75 °C erwärmt und für 4 Minuten inkubiert. Schritt 2 bestand aus der Entparaffinierung der Objektträger. Dafür wurden die Objektträger-Temperatur auf 72 °C gebracht und die Proben mit der Ventana EZ-Prep Lösung inkubiert. Die Hitzevorbehandlung im Schritt 3 erfolgte mit dem Ventana ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) Reagenz für 20 min bei einer Temperatur von 95 °C. Im vierten Schritt wurde ein Tropfen eines von der Pathologie der Universitätsklinik Regensburg selbst hergestellten Reagenzes, bestehend aus 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in absolutiertem Methanol (OPTION 2), zusammen mit der Ventana LCS-Lösung, die der Austrocknung der Proben entgegenwirken soll, auf den Objektträger aufgetragen und für weitere 8 Minuten inkubiert.

In Schritt 5 wurde schließlich der Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy-Antikörper (PREP KIT 2) in einer Verdünnung von 1:500 zusammen mit der Ventana LCS-Lösung hinzugegeben und für 16 Minuten inkubiert. Im Schritt 6 wurden die Objektträger im ultraWash-Programm gespült. Im siebten Schritt wurde zur Gegenfärbung ein Tropfen Hämatoxylin mit der Ventana LCS-Lösung für 8 Minuten inkubiert und im darauffolgenden Schritt (8) das Ventana Bluing-Reagent zusammen mit der Ventana LCS-Lösung für weitere 8 Minuten hinzugegeben, um die Blau-Färbung zu verstärken.

Das Präzipitat aus Antigen und Primärantikörper konnte mit Hilfe des ultraView Universal DAB Detection Kit nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um eine indirekte Methode, die dem Nachweis von Maus-IgG, Maus-IgM und Kaninchen-Primärantikörpern dient. Ferner kommen ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper und ein Enzym mit dazugehörigem Substrat-Chromogen-System zum Einsatz. Der durch die Reaktion von dem Enzym-Substrat-Gemisch nachgewiesene Antigen-Antikörper-Komplex erscheint als braunes Präzipitat. Diese Methode wurde bei allen Färbungen im Benchmark ULTRA verwendet.

Die fertig gefärbten Schnitte wurden dann mit einem Tropfen Spülmittel unter Leitungswasser abgespült und anschließend in eine aufsteigende Alkohol-Reihe gegeben. Diese setzt sich aus den folgenden Konzentrationen zusammen: 1 x 70 % Ethanol, 2 x 96 % Ethanol, 2 x 100 % Isopropanol und 2 x 100 % Xylol.

Im Anschluss daran wurden die Objektträger mit Entellan<sup>®</sup> der Firma Merck eingedeckt. Dieses Verfahren wurde nach allen Färbevorgänge durchgeführt.

### **3.2.2.2 CD4**

Die Färbung gegen das CD4 Antigen erfolgte mit dem CONFIRM anti-CD4 (SP35) Rabbit Monoclonal Primary Antibody der Firma Ventana.

Die Schritte 1 und 2 des Färbeporgangs waren identisch mit dem Färbeprotokoll von CD20. Im Schritt 3 wurde die Hitzevorbehandlung mit dem Ventana ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1) Reagenz bei 95 °C für 52 Minuten durchgeführt.

Die Inkubation mit einem Tropfen des unverdünnten anti-CD4 Antikörpers zusammen mit der Ventana LCS-Lösung für 32 Minuten erfolgte in Schritt 4. In den Schritten 5 bis 7 wurden die vorher bereits beschriebene Spülung mit der ultraWash-Option und die Gegenfärbung für je 8 Minuten mit Hämatoxylin und anschließend dem Bluing-Reagent durchgeführt.

### **3.2.2.3 CD8**

Bei der CD8 Färbung wurde der CONFIRM anti-CD8 (SP57) Rabbit Monoclonal Primary Antibody der Firma Ventana in einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt, der im Färbeprotokoll als PREP KIT 56 bezeichnet wird.

Die ersten beiden Schritte des Färbeprotokolls stimmten mit dem Färbeporgang von CD20 überein.

Die Hitzevorbehandlung mit dem Ventana ULTRA CC1 Reagenz bei 95 °C im Schritt 3 wurde bei der CD8 Färbung für 36 Minuten durchgeführt. Im vierten Schritt wurde ein Tropfen des 1:2 verdünnten Antikörpergemisch gegen CD8 zusammen mit dem LCS-Reagenz zu den Proben gegeben und für 28 Minuten inkubiert. Anschließend folgten der Spülvorgang und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und dem Bluing-Reagent nach oben beschriebenem Schema.

### **3.2.2.4 CD68 KP1**

Das Färbeprotokoll der CD68 KP1 Färbung stimmte in den ersten drei Schritten mit dem Protokoll von CD8 überein. Nach der 36-minütigen Hitzevorbehandlung wurden die Proben in Schritt 4 mit der als OPTION 2 bezeichneten Lösung zusammen mit dem LCS-Reagenz für 8 Minuten inkubiert. Dann wurde der Monoclonal Mouse Anti-Human CD68-Antikörper (Clone KP1) in einer Verdünnung von 1:600 ebenfalls mit

der LCS-Lösung für weitere 24 Minuten hinzugegeben. Anschließend wurde im ultraBlock-Programm ein Tropfen des Ventana Antibody Diluent (OPTION 1) - ein Antikörper-Verdünnungsreagenz, um den für die optimale immunhistochemische Färbung erforderlichen Antikörper-Titer zu erhalten - zusammen mit dem LCS-Reagenz für 16 Minuten mit den Proben inkubiert. Die Schnitte wurden dann direkt mit Hämatoxylin und dem Bluing-Reagent gegengefärbt.

### **3.2.2.5 CD45 RO**

Die Färbung gegen das CD45 RO Antigen erfolgte mit dem 1:150 verdünnten Monoclonal Mouse Anti-Human CD45 RO-Antikörper (Clone UCHL1).

Die Schritte 1 und 2 erfolgten analog zu den anderen Protokollen. Die Hitzevorbehandlung mit dem ULTRA CC1 Reagenz bei 95° C wurde im dritten Schritt für 52 Minuten durchgeführt. Darauf wurde in Schritt 4 ein Tropfen von OPTION2 mit dem LCS-Reagenz aufgetragen und für 8 Minuten inkubiert. In Schritt 5 wurden dann 100 µl des CD45 RO Primär Antikörper mittels Pipette per Hand zu den Proben titriert und für 24 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und dem Bluing-Reagent nach bekanntem Schema.

### **3.3 Digitalisierung der Proben**

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden am Axio Observer Z1 Mikroskop mit Hilfe der AxioVision 40x64 Rel.4.9.1.0 Software für Windows digitalisiert. Dabei wurde von jedem der Gewebeschnitte zunächst eine Übersichtsaufnahme in 5-facher Vergrößerung und anschließend je drei Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung aus zufällig ausgewählten Abschnitten (Größe eines Gesichtsfeldes) der Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie angefertigt. Die einzelnen Bereiche in den Präparaten wurden wie folgt ausgewählt:

- Tumorzentrum (Tu): Bereich, der die Tumormetastase ohne den Infiltrationsrand erfasst
- Tumordinfiltrationsrand (Im): Bereich, der innerhalb eines Gesichtsfeldes an die Tumormetastase angrenzt
- Lungenperipherie (Sd): peripheres, tumorfreies Lungenparenchym

Da der Resektionsrand einzelner Präparate so nahe an die Tumormetastase heranreichte, dass auf den Gewebeschnitten keine Lungenperipherie miterfasst war, und einige Schnitte eine unzureichende Qualität aufwiesen, konnten bei vier der Patienten nicht alle drei Bereiche in die Auswertung mit aufgenommen werden.

Die Aufnahmen im .tif-Format wurden in das JPEG-Format exportiert. Mit Hilfe der ImageJ-Software Version 1.47 konnten die bei der immunhistochemischen Färbung positiv gefärbten Zellen in den drei zufällig ausgewählten Abschnitten ausgezählt und hieraus Mittelwerte für die einzelnen Bereiche eines jeden Schnittes errechnet werden.

Abhängig von der Anzahl der CD20<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Bereichen wurden die Patienten für die Überlebensanalysen in zwei Gruppen unterteilt. Dafür wurde zunächst für jeden Bereich innerhalb einer Färbung ein Gesamtmittelwert, der sich aus den Mittelwerten der einzelnen Schnitte zusammensetzt, gebildet. Daraus erfolgte die Einteilung in Bereiche mit hohem und niedrigem Anteil an Immunzellen.

### **3.4 Verwendete Materialien**

#### **3.4.1 Geräte**

Computer	MacBook Pro, Apple,Cupertino, USA
Färbeautomat	BenchMark ULTRA, Ventana, Tucson, USA
Kühlplatte	COP30, Medite GmbH, Burgdorf
Mikroskop	Axio Observer Z1, Zeiss, Oberkochen
Mikroskop-Computer	Dell, Round Rock, USA
Mikrotom	CUT 6062, SLEE medical GmbH, Mainz
Wasserbad	MWB, SLEE medical GmbH, Mainz

### 3.4.2 Software

AxioVision 40x64 Rel.4.9.1.0 (Windows)	Zeiss, Oberkochen
Endnote X5 (Windows) & X7 (Mac)	Thomson Reuters, New York City, USA
GraphPadPrism v.6.01 (Windows)	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
SPSS Statistics Version 23 (Mac)	IBM, Armonk, USA
ImageJ 1.47 (Mac)	NIH, Bethesda, USA
Microsoft Office 2013 (Word,Excel) (Windows)	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office 2016 (Word,Excel) (Mac)	Microsoft, Redmond, USA

### 3.4.3 Chemikalien und Reagenzien

Entellan <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin I	Ventana, Tucson, USA
Hämalaun	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung 3%ig (Teil von OPTION2)	Merck, Darmstadt
Isopropanol 100 %	(Haus Intern)
Methanol (Teil von OPTION2)	Merck, Darmstadt
Roti <sup>®</sup> -Histokitt	Carl Roth, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Histol	Carl Roth, Karlsruhe
Ventana <sup>®</sup> Antibody Diluent (OPTION 1)	Ventana, Tucson, USA
Ventana <sup>®</sup> Bluing-Reagent	Ventana, Tucson, USA
Ventana <sup>®</sup> EZ-Prep Lösung	Ventana, Tucson, USA
Ventana <sup>®</sup> LCS-Lösung	Ventana, Tucson, USA
Ventana <sup>®</sup> ULTRA Cell Conditioning (ULTRA CC1)	Ventana, Tucson, USA
Ventana <sup>®</sup> ultraView Universal DAB Detection Kit	Ventana, Tucson, USA
Xylol 100 %	VWR, Radnor, USA

### 3.4.4 Gebrauchsgegenstände

Deckgläser	VWR, Radnor, USA
Objektträger SuperFrost™ Plus 75 x 25 mm	Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.4.5 Antikörper

CONFIRM Anti-CD4 (SP35) Rabbit Mono	Ventana, Tucson, USA
CONFIRM anti-CD8 (SP57) Rabbit	Ventana, Tucson, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy Clone L26	Dako, Glostrup, Dänemark
Monoclonal Mouse Anti-Human CD45-RO Clone UCHL1	Dako, Glostrup, Dänemark
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 Clone KP1	Dako, Glostrup Dänemark

### 3.5 Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen in der vorliegenden Studie wurden mit der Software SPSS Statistics Version 23 und GraphPadPrism Version 6.0.1 durchgeführt. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde überprüft, ob sich die Mittelwerte der Zellzahlen für die einzelnen Bereiche unseres Kollektivs von den Mittelwerten der Patienten aus der Studie mit Lebermetastasen signifikant unterscheiden. Analog dazu wurden die Mittelwerte der drei Bereiche der Lungenmetastasen untereinander unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests untersucht. Die Überlebensraten in zwei oder mehreren unverbundenen Gruppen wurden mit Hilfe des Log-Rank Tests miteinander verglichen. Kreuztabellen wurden zum Vergleich zweier Gruppen hinsichtlich verschiedener klinischer und histologischer Kriterien erstellt. Das Signifikanz-Level für sämtliche statistische Tests wurde auf  $p < 0,050$  festgelegt.

Für die Überlebenszeitanalysen wurden Kaplan-Meier-Graphen mit Hilfe der GraphPadPrism Software erstellt. Diese stellen die zu vergleichenden Gruppen in Form von Überlebenskurven dar. Die x-Achse spiegelt dabei das Überleben nach Metastasen-chirurgie in Monaten wider. Der prozentuale Anteil der Überlebenden ist der y-Achse zu entnehmen. Dieser Wert verringert sich, wenn in der jeweiligen Gruppe

das Ereignis „Tod“ eintritt. Patienten, bei denen während des gesamten Beobachtungszeitraumes kein Ereignis eingetreten ist, werden als „zensiert“ bezeichnet und im Kaplan-Meier-Graphen durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet. Die Zensierung kann beispielsweise dadurch erklärt werden, dass ein Patient zum Ende der Studie noch am Leben war oder eine Kontaktaufnahme zum Patienten nicht mehr möglich war. Es wird angenommen, dass die Daten dieser Patienten bis zum Eintritt des nächsten Todesfalls im untersuchten Kollektiv in die Wahrscheinlichkeitsberechnungen mit eingehen. Danach findet der zensierte Patient keine Berücksichtigung bei der Berechnung des Kaplan-Meier-Schätzers mehr. Das Kaplan-Meier-Verfahren beinhaltet somit bei der Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten zu den einzelnen Zeitpunkten auch zensierte Patienten (64).

Um herauszufinden, ob sich die Überlebenszeiten in den untersuchten Gruppen statistisch unterscheiden, wurde der Log-rank-Test verwendet. Ein  $p < 0,050$  stellt einen signifikanten Unterschied der Überlebensraten dar.

Das Hazard Ratio ist ein Maß dafür, um wie viel die Sterberate einer Gruppe höher ist als die der anderen. Es wird zusammen mit einem 95 % Konfidenzintervall angegeben.

Bei Angaben zur Überlebenszeit wird das mediane Überleben in Monaten mit dem dazugehörigen Standardfehler genannt.

Aktuelle Informationen zum Follow-Up, bereitgestellt vom Tumorzentrum Regensburg, lagen bei allen 69 Patienten vor. Patienten, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch am Leben waren, wurden anhand der letzten Kontaktaufnahme mit dem Tumorzentrum erfasst.

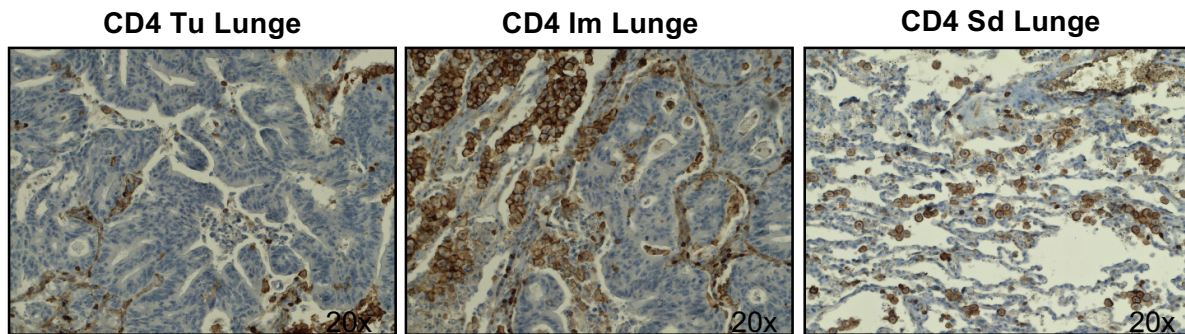
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Unterschiede der Immunzellinfiltration bei kolorektalen Lungen- und Lebermetastasen

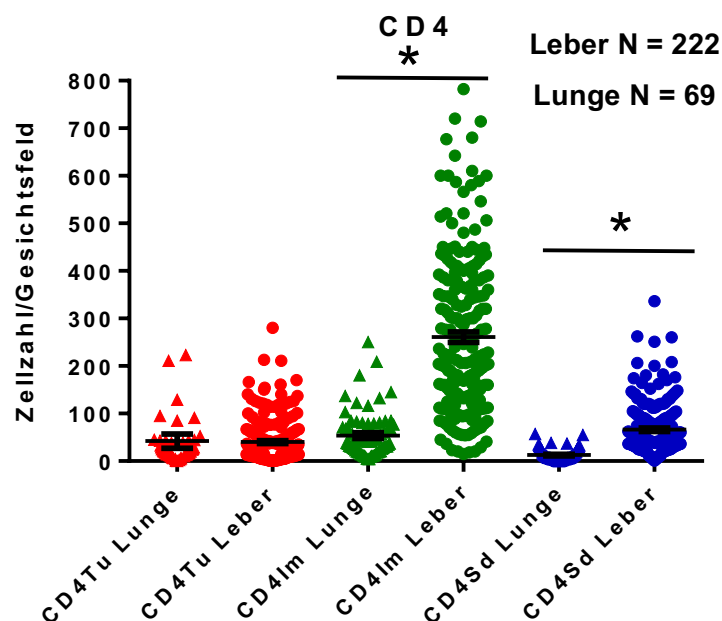
Um mögliche Gemeinsamkeiten bei der Immunzellinfiltration, wie diese beispielweise zwischen Primärtumor und Lungenmetastasen nachgewiesen werden konnten, zu erforschen, wurden die Mittelwerte der positiv-gefärbten Zellen der beiden Gruppen mit Lungenmetastasen und Lebermetastasen jeweils für die drei Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und peripheres Stroma analysiert (59). Dabei wurden die Ergebnisse aus den Färbungen gegen  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $CD45RO^+$  Zellen, die in beiden Studien durchgeführt worden waren, mittels des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Anschließend wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests die drei Bereiche der Lungenschnitte untereinander auf die Verteilung der Zellen hin verglichen. Dabei wurden zusätzlich die Färbungen gegen  $CD20^+$  und  $CD68^+$  Zellen untersucht, die nur bei den Lungenpräparaten durchgeführt worden waren.

Im Folgenden werden neben dem jeweiligen p-Wert der statistischen Tests auch die Mittelwerte der Zellzahlen mit dem dazugehörigen Standardfehler aufgeführt.

Die Infiltration von  $CD4^+$  Zellen im Tumorzentrum war bei Leber- und Lungenschnitten (Leber  $40 \pm 3$  gegenüber Lunge  $42 \pm 15$  Zellen/Gesichtsfeld;  $p = 0,0521$ ) vergleichbar, wohingegen die Zellzahlen im Tumordinfiltrationsrand (Leber  $261 \pm 11$  gegenüber Lunge  $54 \pm 6$  Zellen/Gesichtsfeld;  $p < 0,0001$ ) und auch im peripheren Stroma (Leber  $66 \pm 4$  gegenüber Lunge  $13 \pm 2$  Zellen/Gesichtsfeld;  $p < 0,0001$ ) der Leberschnitte signifikant höhere Zahlen an  $CD4^+$  Zellen als die Lungenschnitte zeigten (Abb. 4 und 5).

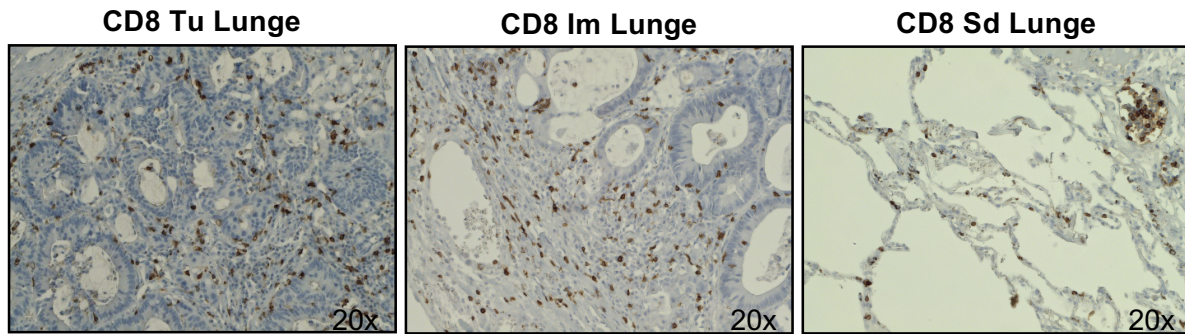


**Abbildung 4** Immunhistochemische Darstellung von CD4. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumorfunktionsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung.

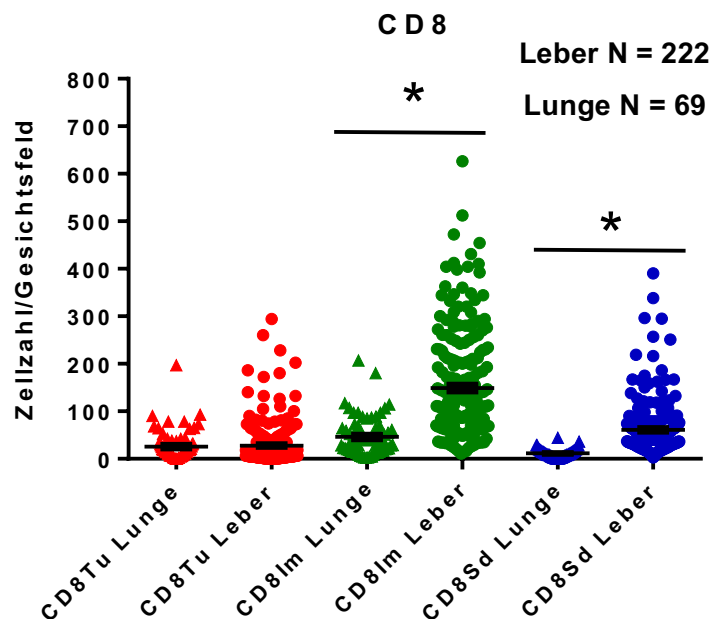


**Abbildung 5** Infiltration CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen im Vergleich mit kolorektalen Lebermetastasen. Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung. \* p < 0,050

Bezüglich der CD8<sup>+</sup> Zellen fanden sich vergleichbare Zellzahlen in den Tumorzentren der beiden Gruppen (Leber 28 ± 3 gegenüber Lunge 26 ± 4 Zellen/Gesichtsfeld; p = 0,2665), während sich bei den Leberschnitten sowohl im Tumorfunktionsrand (Leber 149 ± 7 gegenüber Lunge 46 ± 5 Zellen/Gesichtsfeld; p < 0,0001) als auch im peripheren Stroma (Leber 61 ± 4 gegenüber Lunge 11 ± 1 Zellen/Gesichtsfeld; p < 0,0001) signifikant höhere Zellzahlen als im Lungengewebe zeigten (Abb. 6 und 7).

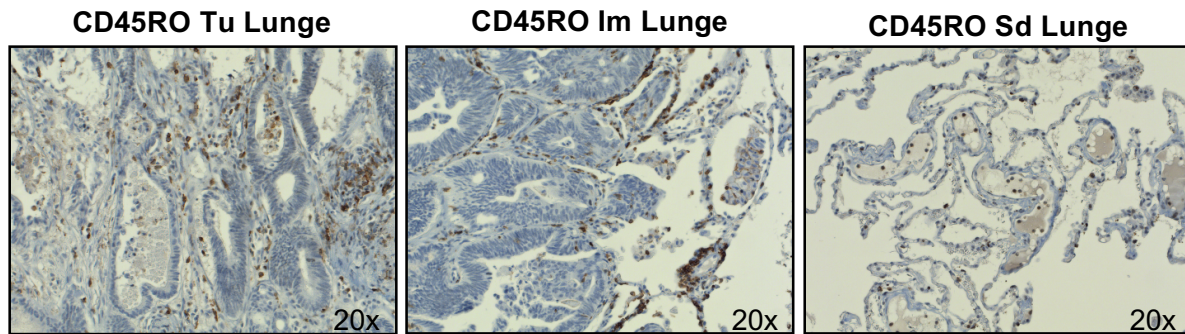


**Abbildung 6** Immunhistochemische Darstellung von CD8. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumorfunktionsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung.

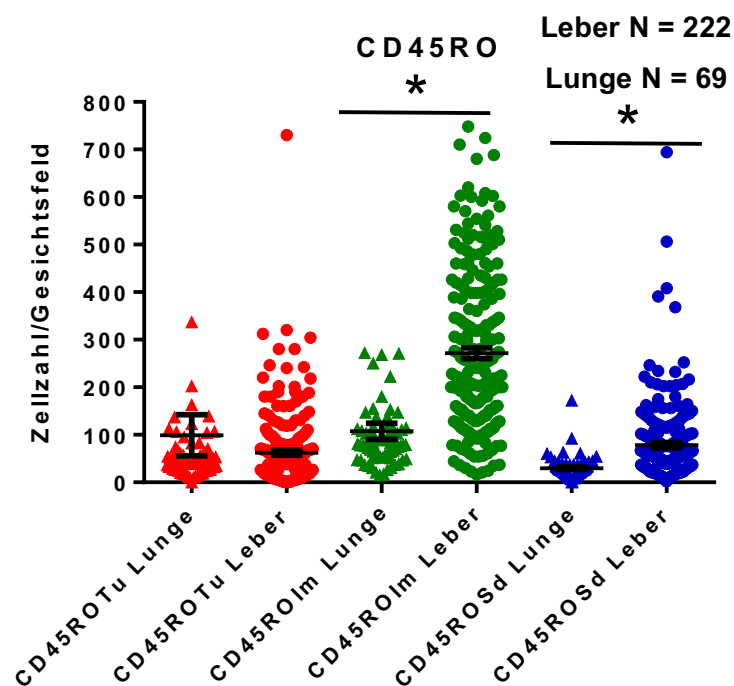


**Abbildung 7** Infiltration CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen im Vergleich mit kolorektalen Lebermetastasen. Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung. \* p < 0,050

Auch die Infiltration von CD45RO<sup>+</sup> Zellen im Tumorzentrum erbrachte eine vergleichbare Anzahl an Immunzellen in Leber und Lunge (Leber 62 ± 5 gegenüber Lunge 99 ± 43 Zellen/Gesichtsfeld; p = 0,1808). Die Zellzahlen bei den Lebermetastasen waren im Tumorfunktionsrand (Leber 272 ± 11 gegenüber Lunge 107 ± 17 Zellen/Gesichtsfeld; p < 0,0001) sowie im peripheren Stroma (Leber 78 ± 6 gegenüber Lunge 30 ± 3 Zellen/Gesichtsfeld; p < 0,0001) signifikant höher als bei den Lungenmetastasen (Abb. 8 und 9).

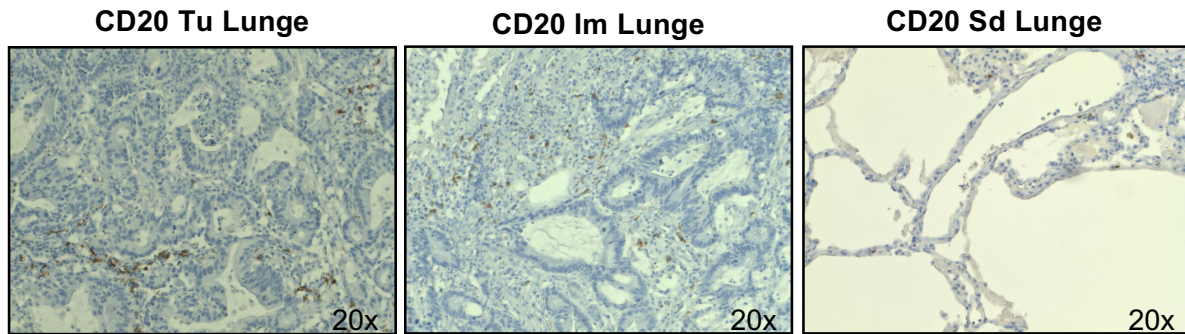


**Abbildung 8** Immunhistochemische Darstellung von CD45RO. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung.

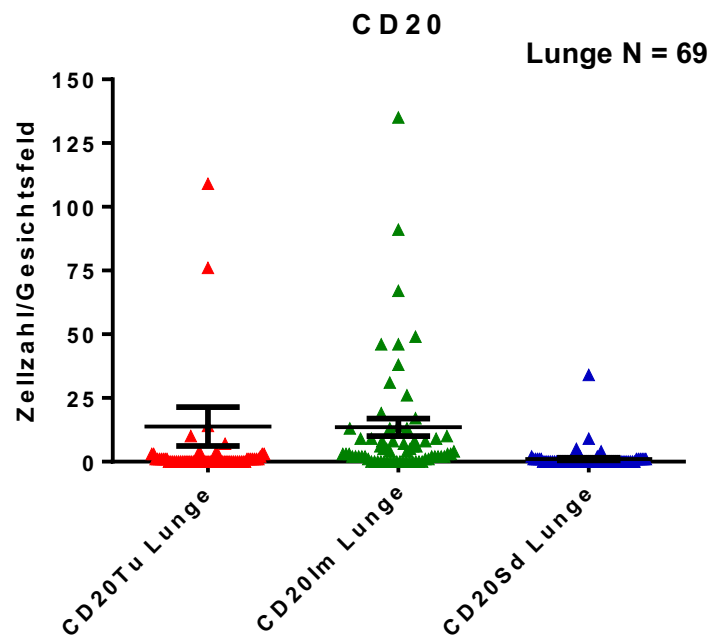


**Abbildung 9** Infiltration CD45RO<sup>+</sup> T-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen im Vergleich mit kolorektalen Lebermetastasen. Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung. \*  $p < 0,050$

Unter Zuhilfenahme des Kruskal-Wallis-Tests wurden zusätzlich die drei Bereiche der Lungenschnitte (Tu, Im, Sd) untereinander verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei den CD4, CD8, CD45RO und CD20 (Tu  $14 \pm 8$ ; Im  $14 \pm 3$ ; Sd  $1 \pm 1$  Zellen/Gesichtsfeld;  $p < 0,0001$ ; Abb. 10 und 11) Färbungen signifikant weniger Zellen in der Lungenperipherie als im Tumorzentrum und Tumordinfiltrationsrand vorliegen ( $p < 0,0001$ ).

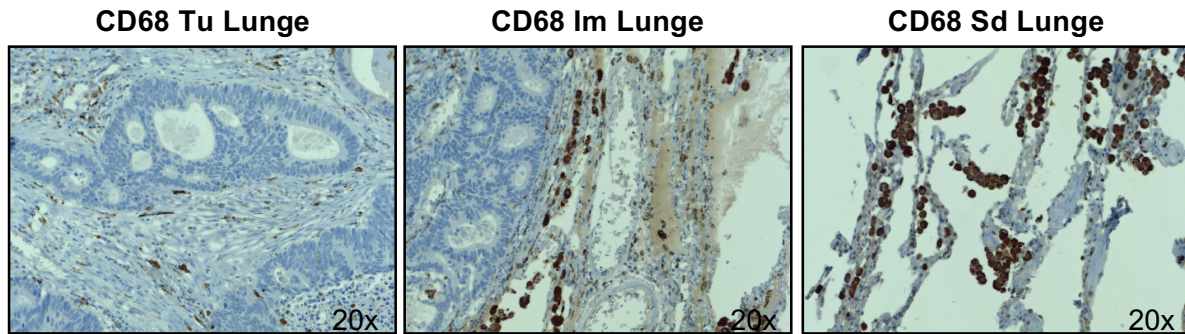


**Abbildung 10** Immunhistochemische Darstellung von CD20. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumorinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung.

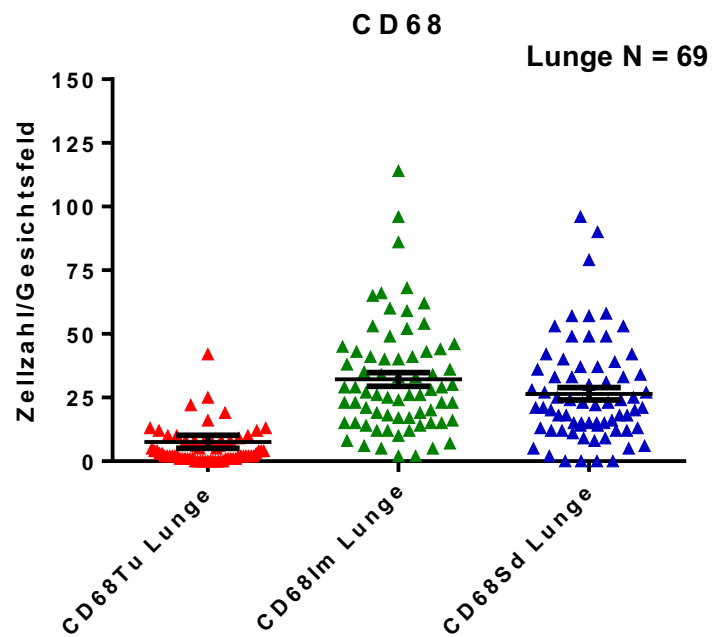


**Abbildung 11** Immunzellinfiltrat bestehend aus CD20<sup>+</sup> B-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen in den drei ausgezählten Bereichen (Tu, Im, Sd). Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung.

Bei der CD68 Färbung hingegen zeigten sich statistisch signifikant niedrigere Zellzahlen im Tumorzentrum als im Tumorinfiltrationsrand und peripheren Stroma (Tu  $8 \pm 3$ ; Im  $32 \pm 3$ ; Sd  $26 \pm 2$  Zellen/Gesichtsfeld;  $p < 0,0001$ ; Abb. 12 und 13).



**Abbildung 12** Immunhistochemische Darstellung von CD68. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumorinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung.



**Abbildung 13** Immunzellinfiltrat bestehend aus CD68<sup>+</sup> Zellen bei kolorektalen Lungenmetastasen in den drei ausgezählten Bereichen (Tu, Im, Sd). Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung.

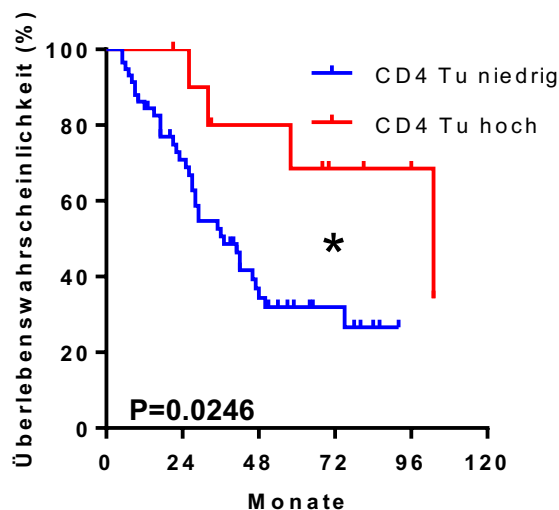
## 4.2 Überlebenszeitanalyse

### 4.2.1 Einfluss der Immunzellinfiltration auf das Patientenüberleben

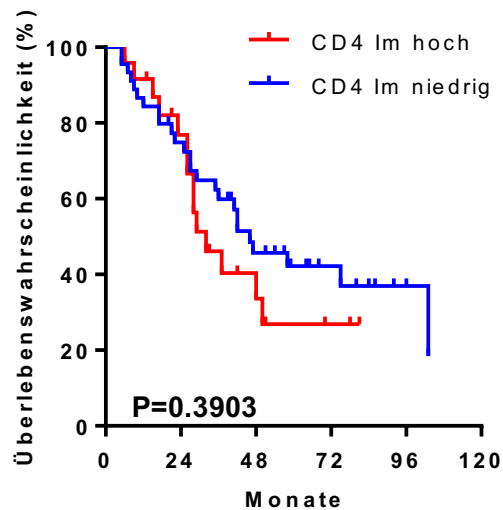
Aus Studien zum Primärtumor und zu Lebermetastasen ist bereits bekannt, dass eine spezifische Ansammlung von Immunzellen einen Einfluss auf das Patientenüberleben hat (53, 61, 65, 66).

Wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, wurden die Patienten für die Überlebenszeitanalysen in zwei Gruppen mit hoher und niedriger Infiltration durch die entsprechenden Zellarten unterteilt.

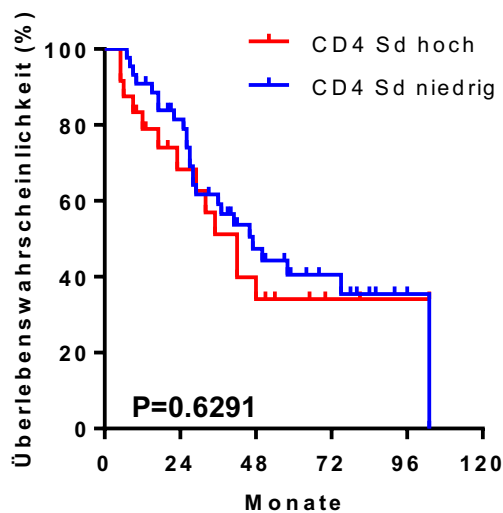
Die Auswertung der Testverfahren und Kaplan-Meier-Graphen zeigte eine signifikant erhöhte Überlebensrate bei Patienten mit einer hohen Anzahl CD4<sup>+</sup> Zellen im Tumorzentrum im Vergleich zu Patienten mit niedrigen Zellzahlen (103 ± 33 gegenüber 37 ± 6 Monate; Hazard Ratio 2,91 (95 % KI 1,17-4,98); p = 0,0246; Abb. 14). Im Gegensatz dazu konnte kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der CD4 Zellinfiltration im Tumordinfiltrationsrand (p = 0,3903; Abb. 15) und der Lungenperipherie (p = 0,6291; Abb. 16) gefunden werden.



**Abbildung 14** Kaplan-Meier-Graph: Hinsichtlich des kumulativen Überlebens ist im Beobachtungszeitraum ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit hohen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum als bei Patienten mit niedrigen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen festzustellen. \* p = 0,0246

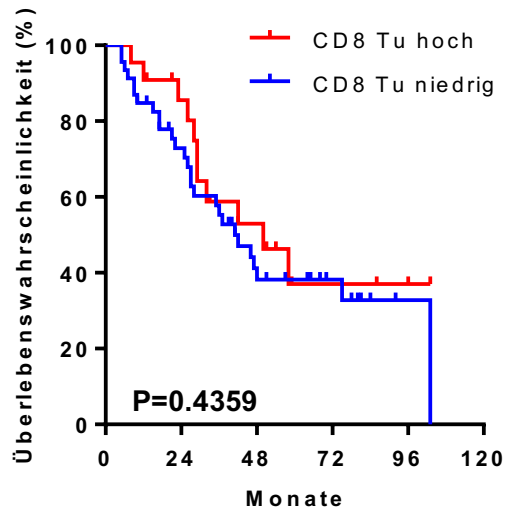


**Abbildung 15** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumordinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,3903

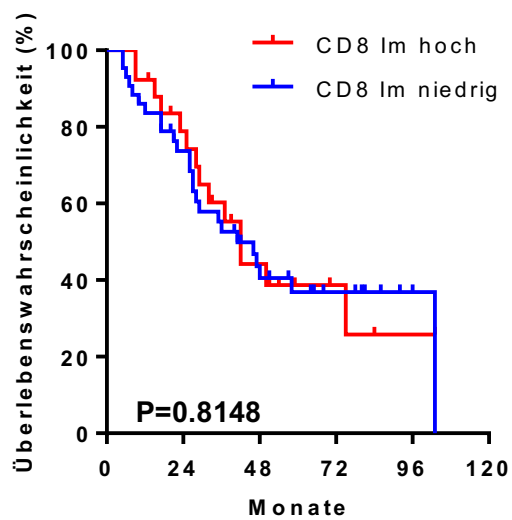


**Abbildung 16** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,6291

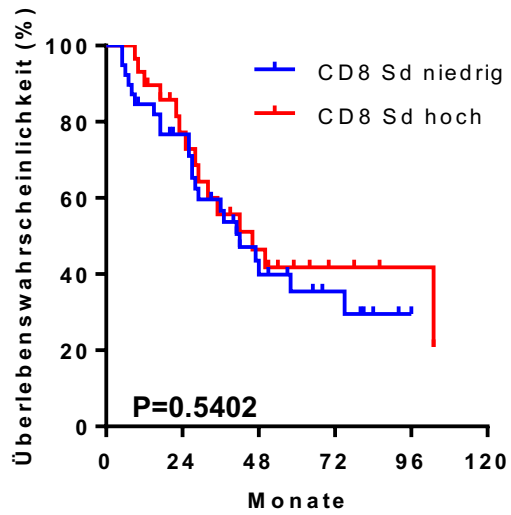
Des Weiteren fand sich kein Unterschied im Überleben der Patienten mit einer hohen Anzahl an CD8<sup>+</sup> (Tu p = 0,4359; Im p = 0,8148; Sd p = 0,5402; Abb. 17-19), CD45RO<sup>+</sup> (Tu p = 0,5368; Im p = 0,3343; Sd p = 0,8156; Abb. 20-22), CD20<sup>+</sup> (Tu p = 0,6110; Im p = 0,6475; Sd p = 0,8420; Abb. 23-25) und CD68<sup>+</sup> Zellen (Tu p = 0,8298; Im p = 0,2302; Sd p = 0,2591; Abb. 26-28) im Vergleich zu Patienten mit niedrigen Zellzahlen der entsprechenden Zellen in den drei untersuchten Bereichen.



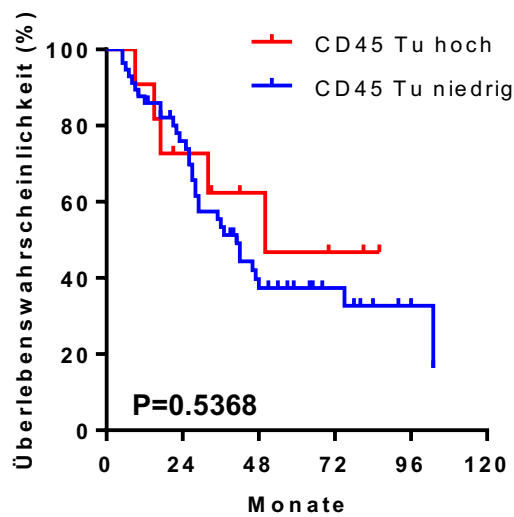
**Abbildung 17** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD8<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD8<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,4359



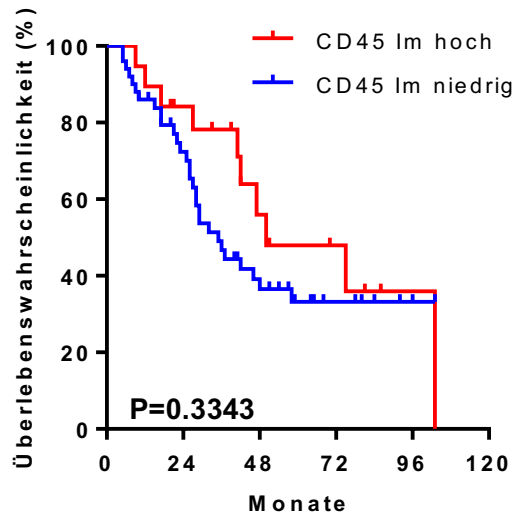
**Abbildung 18** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD8<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD8<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8148



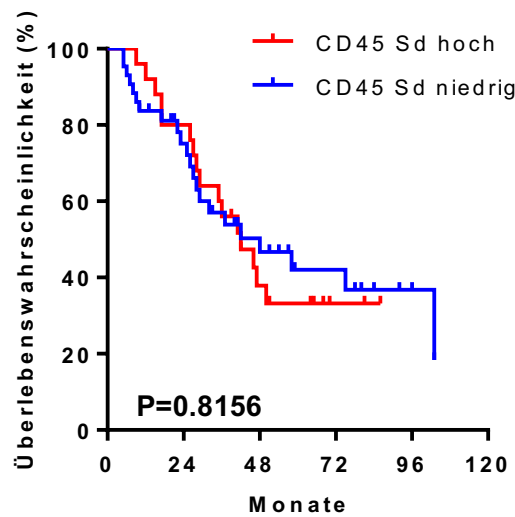
**Abbildung 19** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD8<sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD8<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,5402



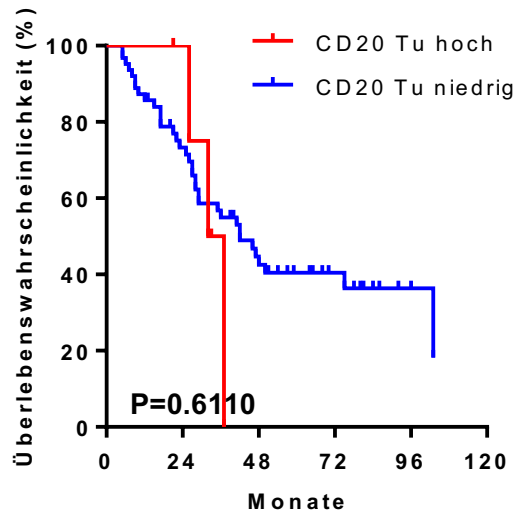
**Abbildung 20** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD45<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD45<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,5368



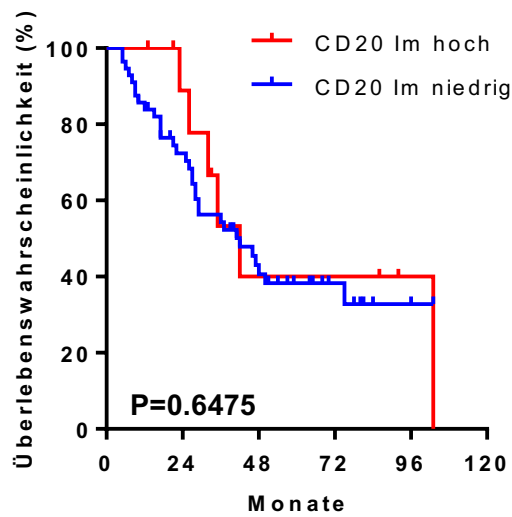
**Abbildung 21** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD45<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumordinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD45<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,3343



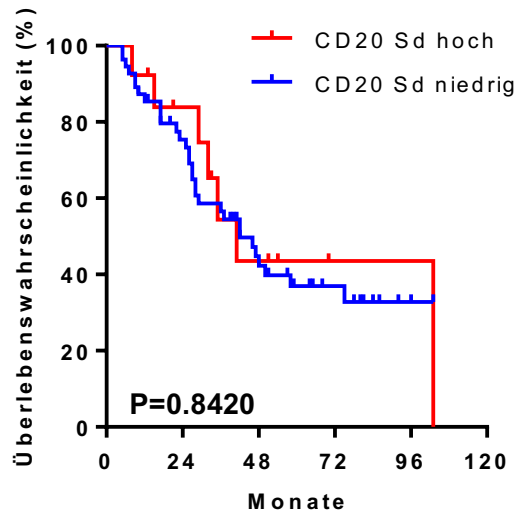
**Abbildung 22** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD45<sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD45<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8156



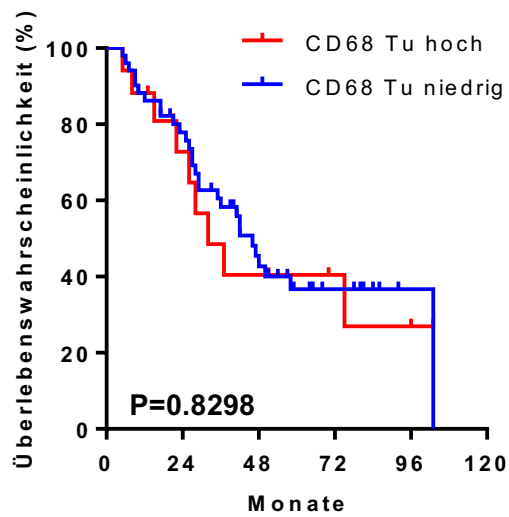
**Abbildung 23** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD20<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD20<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,6110



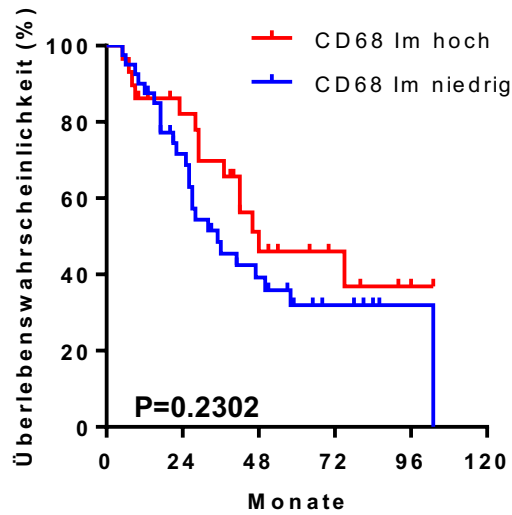
**Abbildung 24** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD20<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD20<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,6475



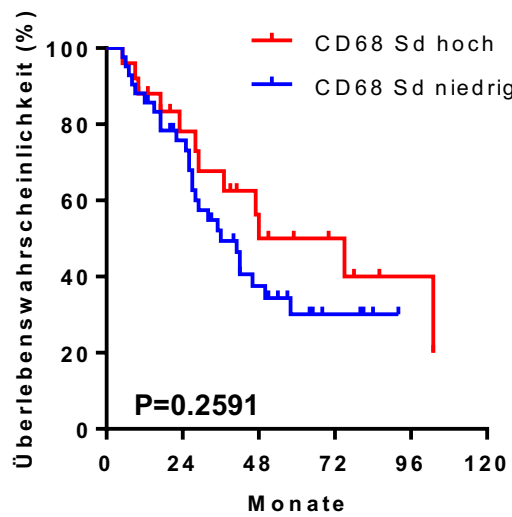
**Abbildung 25** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD20<sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD20<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8420



**Abbildung 26** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD68<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD68<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8298



**Abbildung 27** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD68<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD68<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,2302



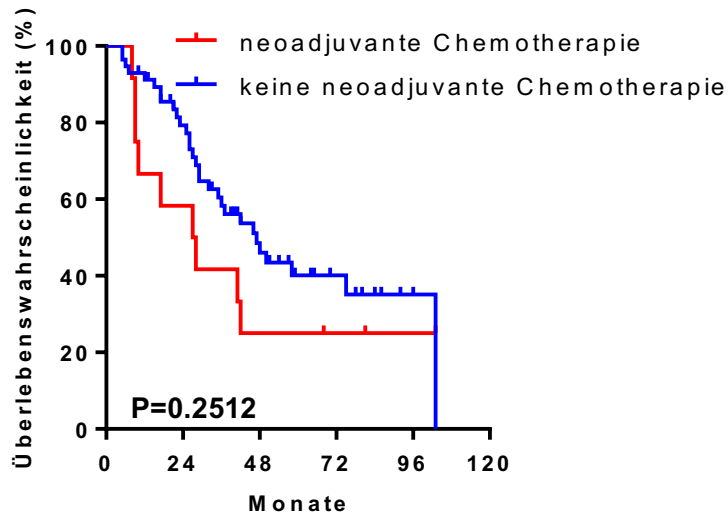
**Abbildung 28** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD68<sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD68<sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,2591

#### 4.2.2 Einfluss von Chemotherapie auf das Patientenüberleben

Außerdem wurde der Einfluss von neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie auf das Überleben der Patienten überprüft. Dafür wurden die entsprechenden Patientengruppen, die eine Chemotherapie erhalten hatten, mit den Patienten ohne eine Chemotherapie zunächst mit Hilfe von Kreuztabellen und der Anwendung des Chi-Quadrat-Tests hinsichtlich klinischer Faktoren verglichen. Die jeweiligen Gruppen waren in Bezug auf das Geschlecht, den Nikotinabusus, den Resektionsstatus der Lungenmetastasen, die Anzahl der Lungenmetastasen, die Durchführung einer Lymphadenektomie im Rahmen der Lungenmetastasenoperation, die Lokalisation des Primärtumors, den Lymphknoten- und den Resektionsstatus des Primärtumors vergleichbar.

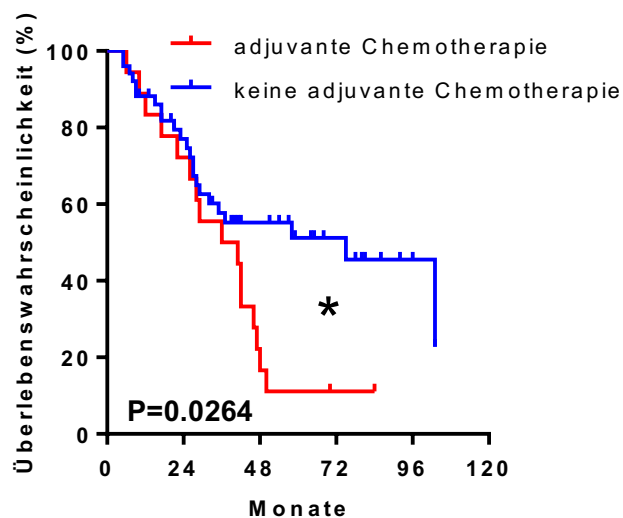
Der einzige Unterschied zwischen den Patientengruppen bestand darin, dass Patienten mit einer pulmonalen Vorerkrankung keine neoadjuvante Chemotherapie ( $p = 0,014$ ) erhielten und dass Patienten mit positivem pulmonalem Lymphknotenstatus öfter mit einer adjuvanten Chemotherapie ( $p = 0,026$ ) behandelt wurden.

Anschließend wurden unter der Anwendung von Kaplan-Meier-Graphen und des Log-rank-Tests die Auswirkungen der neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie auf das Überleben untersucht. Wenngleich diese Ergebnisse aufgrund des geringen Umfangs der Stichprobe mit Vorsicht interpretiert werden müssen, konnte in dieser Untersuchung kein Überlebensvorteil bei Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, im Vergleich zu Patienten, denen keine neoadjuvante Chemotherapie verabreicht worden war, festgestellt werden ( $27 \pm 10$  gegenüber  $47 \pm 8$  Monate; Hazard Ratio 1,53 (95% KI 0,71-3,87);  $p = 0,2512$ ; Abb. 29).



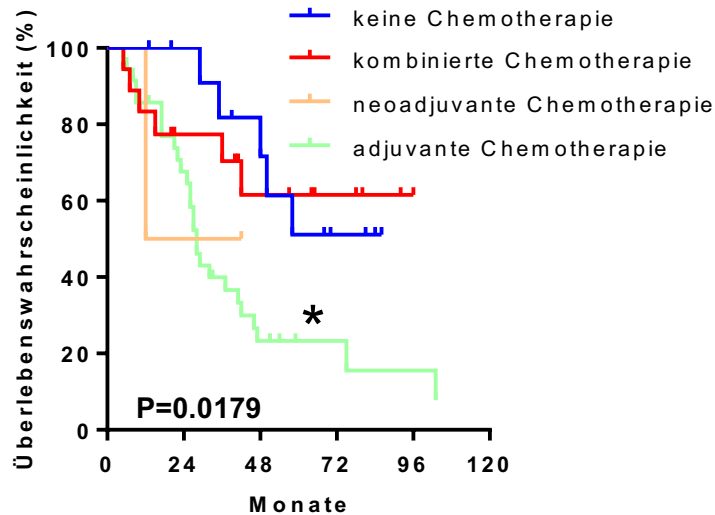
**Abbildung 29** Kaplan-Meier-Graph: Das Überleben der Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie war vergleichbar mit dem Überleben der Patienten ohne neoadjuvanter Chemotherapie.  $p = 0,2512$

Ferner zeigten Patienten, die mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt worden waren, ein schlechteres Überleben im Vergleich zu Patienten, denen keine adjuvante Chemotherapie appliziert worden war ( $36 \pm 13$  gegenüber  $75 \pm 18$  Monate; Hazard Ratio 2,01 (95% KI 1,12-4,69);  $p = 0,0264$ ; Abb. 30).



**Abbildung 30** Kaplan-Meier-Graph: Hinsichtlich des kumulativen Überlebens ist im Beobachtungszeitraum ein signifikant besseres Überleben bei Patienten ohne adjuvanter Chemotherapie als bei Patienten mit adjuvanter Chemotherapie festzustellen. \*  $p = 0,0264$

Beim Vergleich aller Chemotherapie-Varianten untereinander zeigten Patienten, die entweder keine Chemotherapie oder eine Kombination aus neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie erhalten hatten, ein signifikant längeres Überleben im Gegensatz zu Patienten, die nur mit neoadjuvanter oder adjuvanter Chemotherapie versorgt worden waren ( $p = 0,0179$ ; Abb. 31).

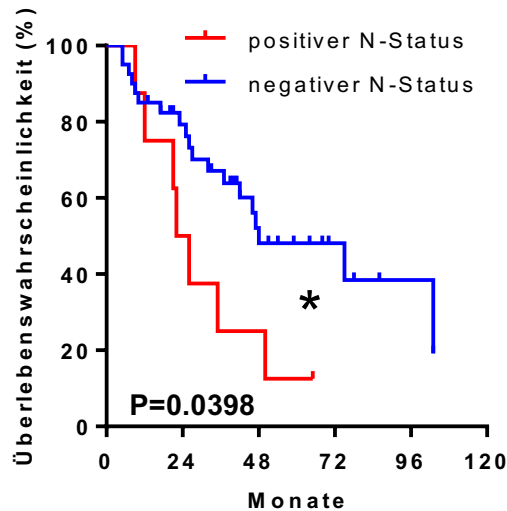


**Abbildung 31** Kaplan-Meier-Graph: Beim Vergleich der verschiedenen Chemotherapie-Varianten untereinander zeigten Patienten ohne Chemotherapie oder Patienten mit kombinierter Chemotherapie im Vergleich zu Patienten mit alleiniger neoadjuvanter/adjuvanter Chemotherapie eine signifikant bessere Überlebensrate. \*  $p = 0,0179$

#### 4.2.3 Einfluss weiterer klinischer Faktoren auf das Patientenüberleben

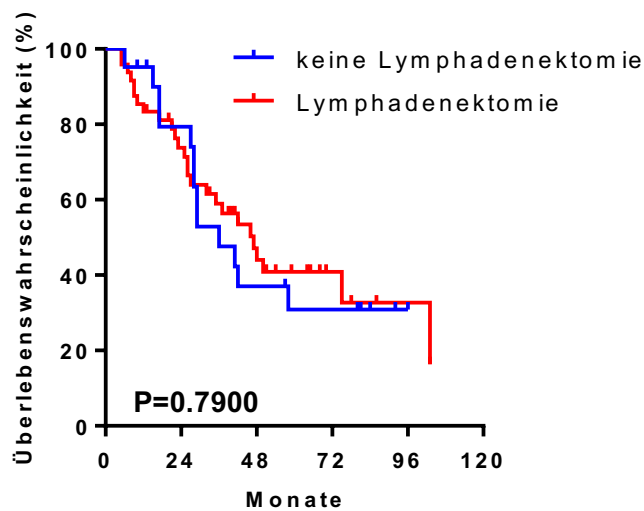
Die im Rahmen verschiedener Studien zu Lungenmetastasen kolorektaler Karzinome identifizierte prognostischen Faktoren - wie bereits in Kapitel 1.1.3. erwähnt - wurden auch in dieser Studie hinsichtlich ihres Einflusses auf das Patientenüberleben nach Metastasenoperation untersucht. (22, 34, 67)

Dabei fanden sich kürzere Überlebensraten bei Patienten mit positivem pulmonalem Lymphknotenstatus als bei Patienten mit negativem pulmonalem Lymphknotenstatus ( $22 \pm 4$  gegenüber  $48 \pm 15$  Monate; Hazard Ratio 2,39 (95% KI 1,07-10,27);  $p = 0,0398$ ; Abb. 32).



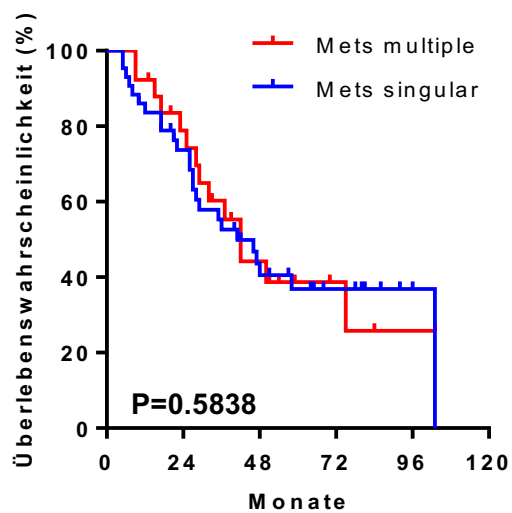
**Abbildung 32** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit negativem pulmonalem Lymphknotenstatus zeigten im Vergleich zu Patienten mit positivem pulmonalem Lymphknotenstatus im Beobachtungszeitraum ein signifikant besseres Überleben. \* p=0,0398

Dagegen zeigten Patienten, die eine systematische Lymphadenektomie während der Resektion der pulmonalen Metastasen erhalten hatten, und Patienten, bei denen keine systematische Lymphadenektomie durchgeführt worden war, vergleichbare Überlebenszeiten ( $47 \pm 7$  gegenüber  $36 \pm 7$  Monate; Hazard Ratio 0,91 (95% KI 0,46-1,79);  $p = 0,7900$ ; Abb. 33).

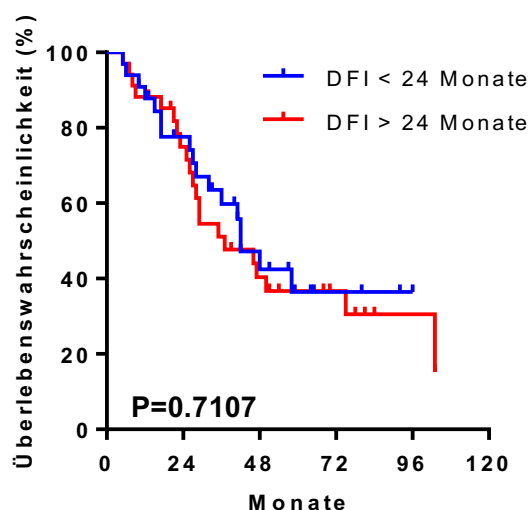


**Abbildung 33** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit systematischer Lymphadenektomie und Patienten ohne systematische Lymphadenektomie zeigten vergleichbare Überlebensraten im Beobachtungszeitraum.  $p=0,7900$

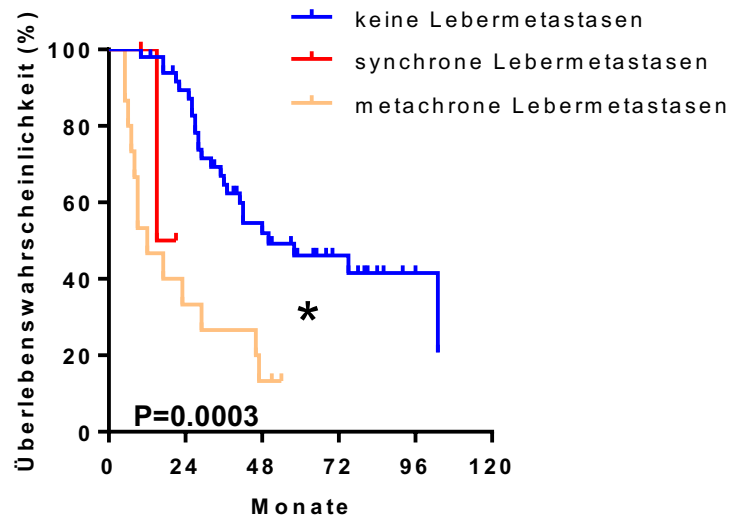
Darüber hinaus gab es keine Unterschiede im Überleben hinsichtlich der Anzahl der Lungenmetastasen (singulär gegenüber multiple;  $p = 0,5838$ ; Abb. 34). Patienten mit einem DFI > 24 Monaten zeigten zudem keinen Überlebensvorteil beim Vergleich mit Patienten mit einem DFI < 24 Monaten ( $p = 0,7107$ ; Abb. 35). Eine signifikant bessere Überlebensrate wurde bei Patienten ohne zusätzliche Metastasierung in der Leber als bei Patienten mit synchronen oder metachronen Lebermetastasen gefunden ( $p = 0,0003$ ; Abb. 36).



**Abbildung 34** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit singulären und multiplen Lungenmetastasen zeigten vergleichbare Überlebensraten.  $p=0,5838$



**Abbildung 35** Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit einem DFI > 24 Monaten zeigten keinen Überlebensvorteil beim Vergleich mit Patienten mit einem DFI < 24 Monaten.  $p=0,7107$



**Abbildung 36** Kaplan-Meier-Graph: Patienten ohne zusätzliche Metastasierung in der Leber zeigten ein signifikant besseres Überleben als Patienten mit synchronen oder metachronen Lebermetastasen. \* p=0,0003

## **5 Diskussion**

Bei der Erforschung der Tumorentstehung und -bekämpfung lag der Fokus lange auf den Tumorzellen selbst, ohne dass dabei die Bedeutung des eigenen Immunsystems berücksichtigt wurde. Mit Hilfe immunhistochemischer und molekularer Methoden konnte in zahlreichen Studien ein umfangreiches tumorspezifisches Infiltrat an Immunzellen identifiziert werden (38). Dabei wurde im Rahmen von Überlebenszeitanalysen für die Verteilung und Dichte bestimmter Immunzellen ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil festgestellt (39, 50, 51). Außerdem konnte durch die Kombination zweier unterschiedlicher Immunzelltypen ein prognostisches Mittel entwickelt werden, das der klassischen AJCC/UICC TNM-Klassifikation überlegen war (37). Eine eigens dafür gegründete Kommission aus internationalen Experten beschäftigt sich noch immer mit der Integration und Validierung des sogenannten Immunscores in das bisher benutzte Staging System (60, 62, 66).

Neben der prognostischen Wertigkeit lieferten die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen zudem spezifische Ansatzpunkte für neue Therapien. Durch die gezielte Stimulation einzelner Immunzelltypen oder die Beimpfung des Patienten mit antigen-beladenen Vektoren konnten erste vielversprechende Ergebnisse in Studien zur Immuntherapie von Tumoren erzielt werden (60).

Bisher wurde vor allem das Immuninfiltrat solider Primärtumore analysiert. Um jedoch auch für Patienten mit metastasierter Tumorerkrankung Aussagen bezüglich der Prognose und des Überlebens treffen zu können, muss gezielt das Immuninfiltrat der Metastasen untersucht werden.

### **5.1 Ergebnisse der Untersuchungen**

In dieser Arbeit wurde das Immuninfiltrat kolorektaler Lungenmetastasen mit dem von kolorektalen Lebermetastasen aus einer an unserem Institut durchgeführten Studie verglichen. Darüber hinaus wurde untersucht, welche Verteilung die Immunzellen bei kolorektalen Lungenmetastasen aufweisen und inwiefern einzelne Zelltypen eine prognostische Aussagekraft hinsichtlich des Überlebens der Patienten be-

sitzen. Außerdem wurde der Einfluss bestimmter klinischer Faktoren auf die Prognose und das Überleben erforscht.

### **5.1.1 Unterschiede der Immunzellinfiltration bei kolorektalen Lungen- und Lebermetastasen**

Eine wichtige Frage, um die Rolle von Immunzellen bei fortgeschrittenen Tumoren zu verstehen, ist, ob das Immuninfiltrat des Primärtumors Gemeinsamkeiten mit dem Infiltrat seiner Metastasen besitzt. In einer von Remark et. al durchgeführten Studie wurde das Immuninfiltrat von kolorektalen Karzinomen und Nierenzellkarzinomen mit dem ihrer Lungenmetastasen verglichen. Dabei konnte für das kolorektale Karzinom eine positive Korrelation bei der Dichte aller untersuchten Zellen zwischen dem Primärtumor und den Lungenmetastasen nachgewiesen werden (59). Eine von Halama et al. veröffentlichten Studie wiederum konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Infiltrat von kolorektalen Lebermetastasen und ihrem Primärtumor feststellen (68).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun herausgefunden werden, ob das Immuninfiltrat bei Metastasen desselben Primärtumors Gemeinsamkeiten aufweist. Hierfür wurden die Patienten dieser Studie mit Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen verglichen. Dabei zeigten sich nicht nur bei der Verteilung der Immunzellen in den einzelnen Bereichen, sondern auch bei der Art der infiltrierenden Immunzellen, die Auswirkungen auf das Überleben haben, Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Der Vergleich der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> Zellen in den beiden Gruppen, ergab vergleichbare Zellzahlen im Tumorzentrum, wohingegen die Zelldichte im Infiltrationsrand und in der tumorfreien Peripherie bei den Lebermetastasen signifikant höhere Werte zeigte.

Bei Patienten mit Lebermetastasen stellt der Infiltrationsrand das Zentrum der Immunreaktion dar. Dort konnte die höchste Dichte an Immunzellen gefunden werden. Halama et al. bestätigten diese Erkenntnis in einer Studie, die den Einfluss des Immuninfiltrates auf ein Ansprechen der Chemotherapie hin untersuchte (58). Die von Brunner et al. durchgeführte Studie konnte ebenfalls die Bedeutung des Infiltrationsrandes bei kolorektalen Lebermetastasen hervorheben. Hohe Zellzahlen CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>

und CD45RO<sup>+</sup> Zellen in diesem Bereich zeigten einen signifikanten Überlebensvorteil (57).

Patienten mit kolorektalen Lungenmetastasen hingegen zeigten eine homogene Infiltration von Tumorzentrum und Infiltrationsrand und signifikant weniger Zellen in der Peripherie. Dies verdeutlicht, dass sich die Interaktion zwischen Immunzellen und Tumorzellen bei kolorektalen Lungenmetastasen auf das Tumorzentrum und den Infiltrationsrand konzentriert.

Aus den Ergebnisse der vorliegenden Studie und bisheriger Forschungsarbeiten kann geschlossen werden, dass das Immuninfiltrat des Primärtumors nicht mit jeder metastatischen Absiedlung korreliert. Vielmehr müssen zum Verständnis des Immuninfiltrates von Tumoren auch Faktoren wie die Eigenschaften des Zielorgans der Metastase berücksichtigt werden.

### **5.1.2 Einfluss des Immunzellinfiltrats auf das Überleben**

Um zu beweisen, dass das zuvor nachgewiesene lungenspezifische Immuninfiltrat Auswirkungen auf das Überleben der Patienten nach Metastasenresektion hat, wurden Überlebenszeitanalysen angefertigt, die Patienten mit hohen und niedrigen Zellzahlen in den entsprechenden Bereichen miteinander vergleichen. Hohe Zellzahlen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Tumorzentrum waren dabei mit einem signifikant längerem Überleben assoziiert. Übereinstimmend dazu konnte in vorhergehenden Studien zum Primärtumor ein günstiger Einfluss CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen auf das Gesamtüberleben der Patienten gefunden werden (53, 61, 65, 66). Die für die CD4<sup>+</sup> Zellen im Tumorzentrum gefundenen Unterschiede im Überleben konnten weder im Infiltrationsrand noch in der tumorfreien Lungenperipherie nachgewiesen werden, was die immunologische Bedeutung des Tumorzentrums bei kolorektalen Lungenmetastasen unterstreicht. Dieses Erkenntnis wird auch von einer Studie unterstützt, die Lungenmetastasen des kolorektalen Karzinoms und des Nierenzellkarzinoms mit ihrem jeweiligen Primärtumor verglich. Eine hohe Infiltration des Tumorzentrums kolorektaler Lungenmetastasen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen und DC-LAMP<sup>+</sup> dendritische Zellen war dabei mit einem verbesserten Patientenüberleben assoziiert (59). In unserer Studie konnte der Überlebensvorteil für Patienten mit einer hohen Dichte CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorzentrum

nicht bestätigt werden. Dennoch tragen die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich des Überlebensvorteils bei hohen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zum Verständnis des immunologischen Tumormilieus kolorektaler Lungenmetastasen bei.

### **5.1.3 Einfluss klinischer Faktoren auf das Überleben**

In zahlreichen Studien konnte für verschiedene klinische Faktoren ein Einfluss auf das Überleben und die Prognose festgestellt werden. Die Überlebenszeitanalysen unserer Studie erbachten dabei folgende Ergebnisse:

Eine neoadjuvante Chemotherapie vor der Resektion der Lungenmetastasen bewirkte keine Verlängerung des Überlebens. Ferner führte eine nach der Metastasenoperation durchgeführte adjuvante Chemotherapie zu einem signifikant schlechteren Überleben der Patienten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass entweder keine Chemotherapie oder die Kombination aus neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie zu einem verbesserten Überleben führte. Diese Ergebnisse erfordern aufgrund der niedrigen Anzahl an Patienten in unserer Studie eine vorsichtige Interpretation. Allerdings konnte auch in der von Gonzalez et al. durchgeführten Metaanalyse, bestehend aus 25 Studien und einer Gesamtheit von 2925 Patienten, festgestellt werden, dass die Behandlung mit einer Chemotherapie nicht mit einem verlängerten Überleben nach Resektion von kolorektalen Lungenmetastasen assoziiert war (22). In einer von Park et al. durchgeführten Studie konnte für Patienten mit adjuvanter Chemotherapie nach Metastasenresektion im Vergleich zu Patienten ohne adjuvanter Chemotherapie zwar ein verlängertes DFI nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich kein Unterschied in Hinsicht auf das Gesamtüberleben in den beiden Gruppen (69). Auch die multivariaten Analysen von Lee et al. und Saito et al. fanden keinen statistisch signifikanten Einfluss einer perioperativen Chemotherapie auf das Überleben der Patienten (70, 71). Generell fehlen prospektive, randomisierte kontrollierte Studien, die den Einfluss einer Chemotherapie nach Resektion der kolorektalen Lungenmetastasen untersuchen (72). Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nutzen der neoadjuvanten Chemotherapie und das schlechtere Überleben bei Patienten, die mit adjuvanter Chemotherapie behandelt wurden, könnte durch die Tatsache gegeben sein, dass besonders Patienten mit ausgedehntem und aggressivem Tumorfall eine Chemotherapie erhalten. So erhielten Patienten mit positivem pulmonalem

Lymphknotenstatus und somit einem fortgeschritteneren Krankheitsstadium in unserer Studie häufiger eine adjuvante Chemotherapie als Patienten ohne pulmonale Lymphknotenmetastasen.

In der Metaanalyse von Gonzalez et al. konnte zudem eine Assoziation zwischen einem negativen pulmonalen Lymphknotenstatus bei der Resektion der Lungenmetastasen und einem verlängertem Überleben der Patienten gezeigt werden (22). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten auch in unserer Studie Patienten mit negativem Lymphknotenstatus ein längeres Überleben. Interessanterweise konnte bei Patienten, die eine systematische Lymphadenektomie erhalten hatten, im Vergleich zu Patienten ohne systematische Lymphadenektomie kein Überlebensvorteil beobachtet werden. Diese widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse könnten durch die geringe Anzahl an Patienten in unserer Studie bedingt sein. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Anteil an positiven Lymphknoten, die bei der systematischen Lymphadenektomie in unserer Studie entfernt worden waren, mit 16,7 % verhältnismäßig niedrig war. Zudem vergrößert die systematische Entfernung der Lymphknoten das Trauma des chirurgischen Eingriffs am Thorax und geht daher mit einer potentiell erhöhten Morbidität einher, die etwaige Überlebensvorteile beeinträchtigen könnte. Hamaji et al. konnten in ihrer Studie keinen Überlebensvorteil bei Patienten mit systematischer Lymphadenektomie feststellen. Vielmehr ermöglichte die Entfernung pulmonaler Lymphknoten im Rahmen der Metastasektomie ein akkurateres Staging der Tumorerkrankung, als dass sie selbst einen bedeutenden prognostischen Faktor darstelle (24). Eine von Meimarakis et al. durchgeführte Studie konnte zwar einen Trend für ein verlängertes Überleben, jedoch keinen signifikanten Überlebensvorteil bei Patienten, die eine systematische Lymphadenektomie erhalten hatten, nachweisen (73). Unter diesen Umständen sollte das Ausmaß der Resektion der Lungenmetastasen und der systematischen Lymphadenektomie für jeden Patienten individuell im Rahmen der Tumorkonferenz diskutiert werden.

Zum Einfluss des DFI und der Anzahl der Lungenmetastasen auf das Überleben finden sich kontroverse Aussagen in der Literatur. In unserer Studie konnte weder für ein DFI > 24 Monate noch für eine singuläre Lungenmetastase ein Überlebensvorteil festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden auch in einem von Pfannschmidt et al. veröffentlichtem Review aufgeführt, in dem nur ein erhöhtes präoperatives CEA als

negativer prognostischer Faktor identifiziert werden konnte (35). Dieser Parameter wurde in der Patientengruppe unserer Studie nicht zur präoperativen Diagnostik abgenommen und lag daher nicht zur statistischen Auswertung vor. Ein kurzes DFI und multiple Lungenmetastasen führten dagegen in anderen Studien zu einem signifikant kürzerem Überleben (22, 34). Die Bedeutung und der Einfluss dieser klinischen Faktoren auf die Prognose ist weiterhin unklar und sollte im Rahmen prospektiver Studienmodelle genauer erforscht werden.

Patienten die neben einer Metastasierung in die Lunge zusätzlich auch Lebermetastasen entwickelten, zeigten eine signifikant schlechtere Überlebensrate als Patienten ohne zusätzliche Lebermetastasen. Diese Ergebnisse könnten durch eine höhere Tumorlast oder eine aggressivere Tumorbilologie erklärt werden. Allerdings konnte in vorausgegangenen Studien kein negativer Einfluss auf die Prognose bei einer hepato-pulmonalen Metastasierung festgestellt werden (74-76).

## **5.2 Kritische Anmerkungen**

Verschiedene Punkte müssen bei der Betrachtung der Studie kritisch hinterfragt werden. So birgt das hier verwendete retrospektive Studienmodell gewisse Limitationen. Die klinischen Daten, die zur Auswertung dieser Studie verwendet wurden, konnten nur aus Arztbriefen, pathologischen Befunden oder mit Hilfe des Tumorzentrums gewonnen werden. Dies hatte zur Folge, dass bei einigen Patienten unvollständige Datensätze für die statistischen Analysen vorlagen.

Außerdem ist im Rahmen retrospektiver Studien ein kausaler Einfluss gewisser Störgrößen im Nachhinein schwer zu beurteilen und daher kaum zu berücksichtigen. Der potenzielle Einfluss, der durch eine neoadjuvante Chemotherapie auf das Immunzellinfiltrat ausgeübt wird, konnte in unseren Untersuchungen nicht erfasst werden, da alle Lungenpräparate von der Metastasenresektion stammen und somit erst nach der neoadjuvanten Chemotherapie hergestellt wurden. Ein Vergleich mit dem Infiltrat vor einer neoadjuvanten Chemotherapie war daher nicht möglich.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellt die geringe Größe unserer Stichprobe dar. Dies hat Auswirkungen auf die Power der Studie, eine Beschreibung der Aussagekraft eines statistischen Tests. Eine hohe Power bedeutet, dass ein statistischer Test mit hoher Wahrscheinlichkeit einen existierenden Unterschied zwischen zwei Gruppen erkennt. Eine niedrige Fallzahl, eine zu große Streuung der Messwerte und ein zu kleiner Unterschied zwischen den Studiengruppen führen zu einer niedrigen Power (77).

Bei der Verarbeitung der in Paraffin fixierten Gewebeproben konnten aufgrund der Gewebeeigenschaften nicht alle histologischen Schnitte in die Auswertung aufgenommen werden. So war der Resektionsrand einiger Präparate so knapp, dass auf den Gewebeschnitten keine Lungenperipherie miterfasst war. Außerdem konnten einige der Schnitte aufgrund der schlechten Gewebebeschaffenheit nicht analysiert werden. Dies erklärt die differierende Anzahl an Patienten bei der Durchführung der Überlebenszeitanalysen, bei der nur die auswertbaren Färbungen eingeschlossen wurden.

Die Methodik der Immunhistochemie birgt aufgrund einer fehlenden Standardisierung zudem Probleme bei der Auswertung und Interpretation. Diese entstehen zum einen durch die Anwendung verschiedener Färbeprotokolle und Antikörper. Zum anderen wird die Auswertung der positiv gefärbten Zellen durch die Subjektivität des Untersuchers beeinflusst. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der Resultate mit anderen Studien erschwert. Darüber hinaus argumentieren Gutkin. et al, dass immunhistochemische Färbungen zwar die gewünschten Zellen zur Darstellung bringen, jedoch keine Aussage über deren funktionellen Status liefern. Hierfür postulieren sie den Einsatz der Durchflusszytometrie, die allerdings auf frisch gewonnenes Tumorgewebe angewiesen ist und somit nicht für unsere Studie in Frage kam (78).

Weiterhin wurden die Ergebnisse unserer Studie nicht in einer unabhängigen randomisierten Kontrollgruppe bestätigt. Dies wäre von besonderer Bedeutung gewesen, wenn anhand der Ergebnisse der Überlebenszeitanalysen ein Immunscore erstellt worden wäre, da sich somit die Genauigkeit des Testinstruments und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüfen ließe.

### 5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das Immuninfiltrat kolorektaler Lungen- und Lebermetastasen unterscheidet. Die Verteilung und Dichte von Immunzellen in Metastasen wird somit nicht nur vom Primärtumor beeinflusst, sondern scheint auch von den morphologischen Eigenschaften des Zielorgans abzuhängen. Interessant wäre es herauszufinden, ob diese Resultate in einer Studie, die das Immuninfiltrat von Patienten mit hepato-pulmonalen Metastasen mit dem des Primärtumors vergleicht, reproduzierbar sind.

Eine hohe Dichte CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorzentrum war mit einem signifikant verlängerten Überleben assoziiert. Dieses Ergebnis verdeutlicht die besondere immunologische Rolle dieses T-Zell Subtyps bei kolorektalen Lungenmetastasen und liefert wichtige Informationen bezüglich des lungenspezifischen Immuninfiltrats. Künftige Forschungsarbeiten, die sich mit den immunologischen Prozessen bei kolorektalen Lungenmetastasen beschäftigen, sollten diesen Zelltyp in ihren Analysen berücksichtigen und auch hinsichtlich der Fragestellung nach dem Aktivitätsprofil untersuchen. Außerdem sollten weitere immunohistochemische Färbungen von kolorektalen Lungenmetastasen aus einer größeren Stichprobe angefertigt werden. Ergänzend zu dieser Studie könnten Färbungen von weiteren Immunzellen, die bei den Untersuchungen zum Primärtumor eine Rolle gespielt hatten, durchgeführt werden, um einen Immunscore erstellen zu können.

Die prognostische Relevanz klinischer Faktoren bleibt weiterhin unklar. Ein negativer Lymphknotenstatus war in unserer Studie mit einem signifikanten Überlebensvorteil assoziiert. Dieses Ergebnis konnte in zahlreichen anderen Studien bestätigt werden (24, 79-81). Der Einfluss des DFI und der Anzahl der Metastasen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (4). Diese Faktoren sollten in künftigen prospektiven Studien weiter untersucht werden. Schwieriger gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse bezüglich einer neoadjuvanten und adjuvanten Chemotherapie. So konnte in unserer Studie kein Überlebensvorteil bei Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie festgestellt werden. Patienten mit adjuvanter Chemotherapie zeigten sogar eine kürzere Überlebensrate als Patienten ohne adjuvante Chemotherapie. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu bestätigen, müssten für die beiden Therapieansätze pros-

pektive randomisiert-kontrollierte Studien durchgeführt werden. Es wäre jedoch ethisch nicht vertretbar, einem Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf als Teil der Kontrollgruppe einer Studie keine Chemotherapie zu verabreichen. Somit wird auch in Zukunft die Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboards getroffen werden.

## 6 Zusammenfassung

Pulmonale Metastasen treten bei 10 - 20 % der Patienten mit kolorektalem Karzinom auf und haben maßgeblichen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Eine individuelle Prognoseabschätzung für den einzelnen Patienten fällt durch die Variabilität der Überlebenszeit innerhalb eines Stadiums der AJCC/UICC TNM-Klassifikation schwer. Dieser Problematik kann mit Hilfe eines neuen Scoring-Systems unter Einbezug der Immunzellen im Tumor entgegengewirkt werden. In dieser Arbeit wurde das Immuninfiltrat kolorektaler Lungen- und Lebermetastasen miteinander verglichen und der Einfluss einzelner Immunzelltypen auf das Überleben von Patienten mit kolorektalen Lungenmetastasen untersucht. Zudem wurde die prognostische Relevanz ausgewählter klinischer Faktoren erforscht.

Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen gegen die CD4, CD8, CD45RO, CD20 und CD68 Antigene an Gewebeschnitten von kolorektalen Lungenmetastasen durchgeführt. Die Präparate wurden auf das Vorliegen der entsprechenden Zelltypen in den drei Bereichen Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie analysiert. Die positiv gefärbten Zellen der CD4, CD8 und CD45RO Färbung der Lungenmetastasen wurden in den drei Bereichen mit den entsprechenden Zellzahlen bei kolorektalen Lebermetastasen verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Immuninfiltrate kolorektaler Lungen- und Lebermetastasen unterscheiden. Bei kolorektalen Lungenmetastasen konzentriert sich die Immunreaktion auf das Tumorzentrum und den Infiltrationsrand, wohingegen bei Lebermetastasen der Tumordinfiltrationsrand die größte Rolle spielt.

Anschließend wurden mit Hilfe klinischer Daten Überlebenszeitanalysen und Kaplan-Meier-Graphen erstellt. Eine hohe Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Tumorzentrum kolorektaler Lungenmetastasen war mit einem verlängerten Überleben assoziiert. Patienten, die mit einer neoadjuvanten Chemotherapie behandelt wurden, zeigten keinen Überlebensvorteil im Vergleich zu Patienten ohne neoadjuvanter Chemotherapie. Eine adjuvante Chemotherapie war in unserem Kollektiv sogar mit einer schlechteren Prognose verbunden. Obwohl ein negativer Lymphknotenstatus das Überleben der Patienten signifikant verlängerte, konnte kein Überlebensvorteil bei der Durchführung einer systematischen Lymphadenektomie festgestellt werden.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass diese Studie als erstes gezielt das Immuninfiltrat kolorektaler Lungenmetastasen analysierte. Dabei konnten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen im

Tumorzentrum als wichtigster Zelltyp für das Überleben der Patienten identifiziert werden. Außerdem wurden in dieser Studie erstmalig die Immuninfiltrate zweier Metastasen desselben Primärtumors miteinander verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied bei der Dichte und Verteilung der untersuchten Zellen festgestellt werden.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Krebs in Deutschland 2015 (1).....	6
Abbildung 2	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2012. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Krebs in Deutschland 2015 (1).....	7
Abbildung 3	Therapiealgorithmus des kolorektalen Karzinoms im UICC Stadium 4. Eigene Darstellung, in Anlehnung an Hofheinz et al. 2016 (28). <sup>1</sup> Patienten mit potenziell resektablen Leber- und / oder Lungenmetastasen nach Ansprechen auf neoadjuvante Therapie; Patienten mit tumorbedingte Symptome, Organkomplikationen oder raschem Progress. <sup>2</sup> Patienten mit multiplen Metastasen ohne Aussicht auf eine Resektion nach Metastasenrückbildung; Patienten ohne tumorbezogene Symptome oder Organkomplikationen und / oder mit schwerer Komorbidität. ....	14
Abbildung 4	Immunhistochemische Darstellung von CD4. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung. ....	40
Abbildung 5	Infiltration CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen im Vergleich mit kolorektalen Lebermetastasen. Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung. * p < 0,050.....	40
Abbildung 6	Immunhistochemische Darstellung von CD8. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung. ....	41
Abbildung 7	Infiltration CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen im Vergleich mit kolorektalen Lebermetastasen. Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung. * p < 0,050.....	41
Abbildung 8	Immunhistochemische Darstellung von CD45RO. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung. ....	42
Abbildung 9	Infiltration CD45RO <sup>+</sup> T-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen im Vergleich mit kolorektalen Lebermetastasen. Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung. * p < 0,050 .....	42
Abbildung 10	Immunhistochemische Darstellung von CD20. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung. ....	43
Abbildung 11	Immunzellinfiltrat bestehend aus CD20 <sup>+</sup> B-Lymphozyten bei kolorektalen Lungenmetastasen in den drei ausgezählten Bereichen (Tu, Im, Sd). Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung. ....	43
Abbildung 12	Immunhistochemische Darstellung von CD68. Vergleich der drei Bereiche Tumorzentrum, Tumordinfiltrationsrand und Lungenperipherie. Jeweils 20-fache Vergrößerung. ....	44
Abbildung 13	Immunzellinfiltrat bestehend aus CD68 <sup>+</sup> Zellen bei kolorektalen Lungenmetastasen in den drei ausgezählten Bereichen (Tu, Im, Sd). Absolute Zellzahlen pro Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung.....	44
Abbildung 14	Kaplan-Meier-Graph: Hinsichtlich des kumulativen Überlebens ist im Beobachtungszeitraum ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit hohen CD4 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum als bei Patienten mit niedrigen CD4 <sup>+</sup> Zellzahlen festzustellen. * p = 0,0246 .....	45

Abbildung 15 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD4 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD4 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,3903 .....	46
Abbildung 16 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD4 <sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD4 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,6291 .....	46
Abbildung 17 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD8 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD8 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,4359 .....	47
Abbildung 18 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD8 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD8 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8148 .....	47
Abbildung 19 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD8 <sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD8 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,5402 .....	48
Abbildung 20 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD45 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD45 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,5368 .....	48
Abbildung 21 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD45 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD45 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,3343 .....	49
Abbildung 22 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD45 <sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD45 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8156 .....	49
Abbildung 23 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD20 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD20 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,6110 .....	50
Abbildung 24 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD20 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD20 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,6475 .....	50
Abbildung 25 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD20 <sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD20 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8420 .....	51
Abbildung 26 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD68 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorzentrum zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD68 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,8298 .....	51
Abbildung 27 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD68 <sup>+</sup> Zellzahlen im Tumorinfiltrationsrand zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD68 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,2302 .....	52
Abbildung 28 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit hohen CD68 <sup>+</sup> Zellzahlen in der Lungenperipherie zeigten vergleichbare Überlebensraten wie Patienten mit niedrigen CD68 <sup>+</sup> Zellzahlen. p = 0,2591 .....	52
Abbildung 29 Kaplan-Meier-Graph: Das Überleben der Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie war vergleichbar mit dem Überleben der Patienten ohne neoadjuvanter Chemotherapie. p = 0,2512 .....	54
Abbildung 30 Kaplan-Meier-Graph: Hinsichtlich des kumulativen Überlebens ist im Beobachtungszeitraum ein signifikant besseres Überleben bei Patienten ohne adjuvanter Chemotherapie als bei Patienten mit adjuvanter Chemotherapie festzustellen. * p = 0,0264 .....	54

Abbildung 31 Kaplan-Meier-Graph: Beim Vergleich der verschiedenen Chemotherapie-Varianten untereinander zeigten Patienten ohne Chemotherapie oder Patienten mit kombinierter Chemotherapie im Vergleich zu Patienten mit alleiniger neoadjuvanter/adjuvanter Chemotherapie eine signifikant bessere Überlebensrate. * $p = 0,0179$ .....	55
Abbildung 32 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit negativem pulmonalem Lymphknotenstatus zeigten im Vergleich zu Patienten mit positivem pulmonalem Lymphknotenstatus im Beobachtungszeitraum ein signifikant besseres Überleben. * $p=0,0398$ .....	56
Abbildung 33 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit systematischer Lymphadenektomie und Patienten ohne systematische Lymphadenektomie zeigten vergleichbare Überlebensraten im Beobachtungszeitraum. $p=0,7900$ ..	56
Abbildung 34 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit singulären und multiplen Lungenmetastasen zeigten vergleichbare Überlebensraten. $p=0,5838$ .....	57
Abbildung 35 Kaplan-Meier-Graph: Patienten mit einem DFI > 24 Monaten zeigten keinen Überlebensvorteil beim Vergleich mit Patienten mit einem DFI < 24 Monaten. $p=0,7107$ .....	57
Abbildung 36 Kaplan-Meier-Graph: Patienten ohne zusätzliche Metastasierung in der Leber zeigten ein signifikant besseres Überleben als Patienten mit synchronen oder metachronen Lebermetastasen. * $p=0,0003$ .....	58

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auswahl von Studien zur prozentualen Häufigkeit von Lungenmetastasen basierend auf der Lokalisation des Primärtumors.....	8
Tabelle 2 Ausgewählte Studien seit 2000, Patientenzahl > 100. Tabelle nach Limmer 2014 (4).....	9
Tabelle 3 TNM-Klassifikation. Eigene Darstellung nach Sobin et al. 2010 (36). .....	19
Tabelle 4 AJCC/UICC-Stadien. Vereinfachte Darstellung nach Sobin et al. 2010 (36).....	19
Tabelle 5 Histopathologische Aspekte des Primärtumors.....	28
Tabelle 6 Klinisch-pathologische Aspekte des Patientenkollektivs. ....	29
Tabelle 7 Antikörper der Immunhistochemischen Färbungen.....	31

## 9 Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2011/2012. Berlin: Robert Koch-Institut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2015.
2. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;74(2):106-33.
3. Siewert JR, Lordick F, Rothmund M, Schumpelick V. *Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.
4. Limmer S. *Lungenmetastasen: Diagnostik - Therapie - Tumorspezifisches Vorgehen*: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
5. Clasen S, Remp H, Pereira PL. Metastases of colorectal carcinoma. *Der Radiologe*. 2008;48(11):1032.
6. Ridge JA, Daly JM. Treatment of colorectal hepatic metastases. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1985;161(6):597-607.
7. Leporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006;93(4):465-74.
8. Tan KK, Lopes Jr. GdL, Sim R. How Uncommon are Isolated Lung Metastases in Colorectal Cancer? A Review from Database of 754 Patients Over 4 Years. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2008;13(4):642-8.
9. Ding P, Liska D, Tang P, Shia J, Saltz L, Goodman K, et al. Pulmonary recurrence predominates after combined modality therapy for rectal cancer: an original retrospective study. *Ann Surg*. 2012;256(1):111-6.
10. Mantke R, Schmidt U, Wolff S, Kube R, Lippert H. Incidence of synchronous liver metastases in patients with colorectal cancer in relationship to clinico-pathologic characteristics. Results of a German prospective multicentre observational study. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38(3):259-65.
11. Watanabe K, Saito N, Sugito M, Ito M, Kobayashi A, Nishizawa Y. Incidence and predictive factors for pulmonary metastases after curative resection of colon cancer. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(4):1374-80.
12. Kobayashi H, Mochizuki H, Sugihara K, Morita T, Kotake K, Teramoto T, et al. Characteristics of recurrence and surveillance tools after curative resection for colorectal cancer: a multicenter study. *Surgery*. 2007;141(1):67-75.
13. Nozawa H, Sunami E, Nakajima J, Nagawa H, Kitayama J. Synchronous and metachronous lung metastases in patients with colorectal cancer: A 20-year monocentric experience. *Exp Ther Med*. 2012;3(3):449-56.
14. Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 1989;7(10):1407-18.
15. Giantonio B, Levy D, O'Dwyer P, Meropol N, Catalano P, Benson A. A phase II study of high-dose bevacizumab in combination with irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin, as initial therapy for advanced colorectal cancer: results from the eastern cooperative oncology group study E2200. *Annals of Oncology*. 2006;17(9):1399-403.
16. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014 15.02.2015:[149--82 pp.]. Available from: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/021-007OLI\\_S3\\_KRK\\_2014-08.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_KRK_2014-08.pdf).
17. Pfannschmidt J, Egerer G, Bischof M, Thomas M, Dienemann H. Surgical intervention for pulmonary metastases. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109(40):645-51.

18. Thomford NR, Woolner LB, Clagett OT. The Surgical Treatment of Metastatic Tumors in the Lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1965;49:357-63.
19. Sponholz S, Bölükbas S, Oguzhan S, Schirren M, Schirren J. Surgical strategy for the treatment of colorectal lung metastases. *Der Onkologe.* 2014;20(8):740-5.
20. Park JH, Kim TY, Lee KH, Han SW, Oh DY, Im SA, et al. The beneficial effect of palliative resection in metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer.* 2013;108(7):1425-31.
21. Stoelben E, Gossmann A, Steinmetz T, Pfannschmidt J. Therapie von Lungenmetastasen kolorektaler Karzinome. *best practice onkologie.* 2014;9(5):27-34.
22. Gonzalez M, Poncet A, Combescure C, Robert J, Ris HB, Gervaz P. Risk factors for survival after lung metastasectomy in colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Annals of surgical oncology.* 2013;20(2):572-9.
23. Ercan S, Nichols FC, III, Trastek VF, Deschamps C, Allen MS, Miller DL, et al. Prognostic significance of lymph node metastasis found during pulmonary metastasectomy for extrapulmonary carcinoma. *The Annals of Thoracic Surgery.* 77(5):1786-91.
24. Hamaji M, Cassivi SD, Shen KR, Allen MS, Nichols FC, Deschamps C, et al. Is lymph node dissection required in pulmonary metastasectomy for colorectal adenocarcinoma? *Ann Thorac Surg.* 2012;94(6):1796-800.
25. Tampellini M, Ottone A, Bellini E, Alabiso I, Baratelli C, Bitossi R, et al. The role of lung metastasis resection in improving outcome of colorectal cancer patients: results from a large retrospective study. *Oncologist.* 2012;17(11):1430-8.
26. McCormack PM, Burt ME, Bains MS, Martini N, Rusch VW, Ginsberg RJ. Lung resection for colorectal metastases. 10-year results. *Arch Surg.* 1992;127(12):1403-6.
27. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2012;23(10):2479-516.
28. Hofheinz R, Arnold D, Borner M, Folprecht G, Graeven U, Hebart H. Kolonkarzinom - onkopedia Leitlinie: DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2016 [Available from: <http://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/kolonkarzinom>.
29. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-42.
30. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol.* 2007;25(12):1539-44.
31. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(21):2240-7.
32. Kubicka S. Systemic therapy of metastatic colorectal cancer. *Der Onkologe.* 2014;20(8):725-32.

33. Vogl TJ, Panahi B, Fischer S, Naguib N, Nour-Eldin N-EA, Gruber T, et al. Interventional therapy of lung and liver metastases. *Der Onkologe*. 2014;20(8):746-56.
34. Salah S, Watanabe K, Welter S, Park JS, Park JW, Zabaleta J, et al. Colorectal cancer pulmonary oligometastases: pooled analysis and construction of a clinical lung metastasectomy prognostic model. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(10):2649-55.
35. Pfannschmidt J, Dienemann H, Hoffmann H. Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal cancer: a systematic review of published series. *Ann Thorac Surg*. 2007;84(1):324-38.
36. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against Cancer. *TNM classification of malignant tumours*. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010. xx, 309 p. p.
37. Galon J, Pages F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med*. 2012;10:1.
38. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
39. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):610-8.
40. Zamarron BF, Chen W. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *International Journal of Biological Sciences*. 2011;7(5):651-8.
41. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1014-22.
42. Holländer GA, Barthlott T. *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*: Elsevier, Urban & Fischer; 2006. 302 p.
43. Luttmann W. *Der Experimentator: Immunologie*. 4. ed: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
44. Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunological Reviews*. 2006;212(1):86-98.
45. Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, et al. FOXP3 Defines Regulatory T Cells in Human Tumor and Autoimmune Disease. *Cancer Research*. 2009;69(9):3995-4000.
46. Salama P, Phillips M, Grieco F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):186-92.
47. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*. 2004;10(9):942-9.
48. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(18):5423-34.
49. Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(3):902-11.

50. Diederichsen AC, Hjelmborg J, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(7):423-8.
51. Lavotshkin S, Jalas JR, Torisu-Itakura H, Ozao-Choy J, Lee JH, Sim MS, et al. Immunoprofiling for prognostic assessment of colon cancer: a novel complement to ultrastaging. *J Gastrointest Surg.* 2015;19(6):999-1006.
52. Broussard EK, Disis ML. TNM staging in colorectal cancer: T is for T cell and M is for memory. *J Clin Oncol.* 2011;29(6):601-3.
53. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5944-51.
54. Katz SC, Pillarisetty V, Bamboat ZM, Shia J, Hedvat C, Gonen M, et al. T cell infiltrate predicts long-term survival following resection of colorectal cancer liver metastases. *Annals of surgical oncology.* 2009;16(9):2524-30.
55. Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol.* 2005;174(5):2591-601.
56. Katz SC, Bamboat ZM, Maker AV, Shia J, Pillarisetty VG, Yopp AC, et al. Regulatory T cell infiltration predicts outcome following resection of colorectal cancer liver metastases. *Annals of surgical oncology.* 2013;20(3):946-55.
57. Brunner SM, Kesselring R, Rubner C, Martin M, Jeiter T, Boerner T, et al. Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection. *Br J Surg.* 2014;101(13):1681-91.
58. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2011;71(17):5670-7.
59. Remark R, Alifano M, Cremer I, Lupo A, Dieu-Nosjean MC, Riquet M, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2013;19(15):4079-91.
60. Pernet S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol.* 2014;20(14):3738-50.
61. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010;29(8):1093-102.
62. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014;232(2):199-209.
63. Szoke T, Kortner A, Neu R, Grosser C, Sziklavari Z, Wiebe K, et al. Is the mediastinal lymphadenectomy during pulmonary metastasectomy of colorectal cancer necessary? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010;10(5):694-8.
64. Zwiener I, Blettner M, Hommel G. Survival analysis— part 15 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(10):163-9.

65. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2011;71(4):1263-71.
66. Galon J, Franck P, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med.* 2012;10(1):205.
67. Cho S, Song IH, Yang HC, Jheon S. Prognostic factors of pulmonary metastasis from colorectal carcinoma. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013;17(2):303-7.
68. Halama N, Spille A, Lerchl T, Brand K, Herpel E, Welte S, et al. Hepatic metastases of colorectal cancer are rather homogeneous but differ from primary lesions in terms of immune cell infiltration. *Oncoimmunology.* 2013;2(4):e24116.
69. Park HS, Jung M, Shin SJ, Heo SJ, Kim CG, Lee MG, et al. Benefit of Adjuvant Chemotherapy After Curative Resection of Lung Metastasis in Colorectal Cancer. *Annals of surgical oncology.* 2016;23(3):928-35.
70. Lee WS, Yun SH, Chun HK, Lee WY, Yun HR, Kim J, et al. Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: prognostic factors and survival. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(6):699-704.
71. Saito Y, Omiya H, Kohno K, Kobayashi T, Itoi K, Teramachi M, et al. Pulmonary metastasectomy for 165 patients with colorectal carcinoma: A prognostic assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124(5):1007-13.
72. Treasure T, Milosevic M, Fiorentino F, Macbeth F. Pulmonary metastasectomy: what is the practice and where is the evidence for effectiveness? *Thorax.* 2014;69(10):946-9.
73. Meimarakis G, Angele MK, Schneider C, Weidenhagen R, Kalaitzis N, Molki A, et al. [Impact of systematic lymph node dissection in the resection of pulmonary metastases of solid extrapulmonary tumours]. *Zentralbl Chir.* 2010;135(6):556-63.
74. Shah SA, Haddad R, Al-Sukhni W, Kim RD, Greig PD, Grant DR, et al. Surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal carcinoma. *J Am Coll Surg.* 2006;202(3):468-75.
75. Neeff H, Horth W, Makowiec F, Fischer E, Imdahl A, Hopt UT, et al. Outcome after resection of hepatic and pulmonary metastases of colorectal cancer. *J Gastrointest Surg.* 2009;13(10):1813-20.
76. Kobayashi K, Kawamura M, Ishihara T. Surgical treatment for both pulmonary and hepatic metastases from colorectal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;118(6):1090-6.
77. Röhrig B, Prel J-Bd, Blettner M. Study Design in Medical Research. *Dtsch Arztebl International.* 2009;106(11):184-9.
78. Gutkin DW, Shurin MR. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(1):45-57.
79. Pfannschmidt J, Muley T, Hoffmann H, Dienemann H. Prognostic factors and survival after complete resection of pulmonary metastases from colorectal carcinoma: experiences in 167 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(3):732-9.
80. Welter S, Jacobs J, Krbek T, Poettgen C, Stamatis G. Prognostic impact of lymph node involvement in pulmonary metastases from colorectal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007;31(2):167-72.
81. Renaud S, Alifano M, Falcoz PE, Magdeleinat P, Santelmo N, Pages O, et al. Does nodal status influence survival? Results of a 19-year systematic

lymphadenectomy experience during lung metastasectomy of colorectal cancer.  
Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2014;18(4):482-7.

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Augsburg, April 2018

## 11 Danksagung

Für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit möchte ich einigen Menschen danken, die mir immer tatkräftig zur Seite standen.

Allen voran geht mein herzlicher Dank an meinen Doktorvater PD Dr. med. Stefan Brunner, dessen wertvolle Ratschläge und Ideen essentiell für den Fortschritt und Erfolg dieser Arbeit waren. Mein Dank gilt auch Dr. med. Tonia Jeiter, die mich zu Beginn dieser Arbeit in allen Belangen umgehend und freundlich unterstützt hat.

Ich danke allen Mitarbeitern im Labor der Universitätsklinik Regensburg für ihre freundliche und kompetente Einarbeitung in die Strukturen, Abläufe und Geräte sowie den Rückhalt und Rat bei Problemen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, im Besonderen meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während meines gesamten Studiums sowie im Verlauf der Dissertation immer unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei Laura bedanken, die mir auf den letzten Metern meiner Promotion eine wichtige Stütze war.

