
Aus dem Institut für Pathologie
Im Klinikum Augsburg
Akademisches Lehrkrankenhaus
der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Hans Arnholdt)

Histomorphometrische Untersuchung an Lymphknoten
in Kolonkarzinomen unter Berücksichtigung
histopathologischer Parameter und klinischem Verlauf

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Janine Natalie Rößle
aus
Ostfildern
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Arnholdt

Mitberichterstatter: PD Dr. med. David Horst

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Bruno Märkl

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 01. 08. 2014

Zum Dank an meine liebe Familie

Inhalt

Inhalt	1
1. Einleitung.....	6
1.1 Epidemiologie des Kolonkarzinoms	6
1.2 Therapie des Kolonkarzinoms	9
1.2.1 Endoskopische und operative Therapie.....	10
1.2.2 Chemotherapie beim Kolonkarzinom	12
1.3 Grundlagen der histopathologischen Diagnostik des Kolonkarzinoms.....	13
1.3.1 Praekanzeröse Läsion: Adenom	13
1.3.2 Frühkarzinom/ Invasives Karzinom	14
1.4 Klassifikation des Kolonkarzinoms	14
1.4.1 Histologische Typen	14
1.4.2 Familiäres Kolonkarzinom	15
1.4.3 TNM-Klassifikation	16
1.4.4 UICC-Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms	19
1.5 Histopathologische Aspekte des Lymphknotenstaging	20
1.5.1 Aktuelle Empfehlungen zur Mindestzahl zu untersuchender Lymphknoten beim Kolonkarzinom	20
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Zielsetzung.....	25
2.2 Studienaufbau	25
2.2.1 Patientenkollektiv	25
2.2.2 Lymphknotenpräparation	26
2.2.3 Statistik.....	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Studienkollektiv.....	29
3.2 Größenverteilung der Lymphknoten - alle Stadien.....	29
3.3 Prognostischer Effekt der Lymphknotengröße in nodal negativen Karzinomen	34

4. Diskussion.....	45
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literatur.....	59
7. Abbildungsverzeichnis.....	66
8. Tabellenverzeichnis.....	67
9. Abkürzungsverzeichnis.....	68
10. Danksagung.....	69

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Kolonkarzinoms

Das Kolonkarzinom ist eine der häufigsten bösartigen Neoplasien in den westlichen Industriestaaten. In Deutschland ist mit 70 000 Neuerkrankungen und ca. 30 000 Todesfällen pro Jahr (kolorektale Karzinome) zu rechnen (1, 2). Mit 9% ist das Kolonkarzinom nach dem Prostata- und Bronchialkarzinom der dritthäufigste bösartige Tumor bei Männern, bei Frauen sogar der zweithäufigste nach dem Mammakarzinom.

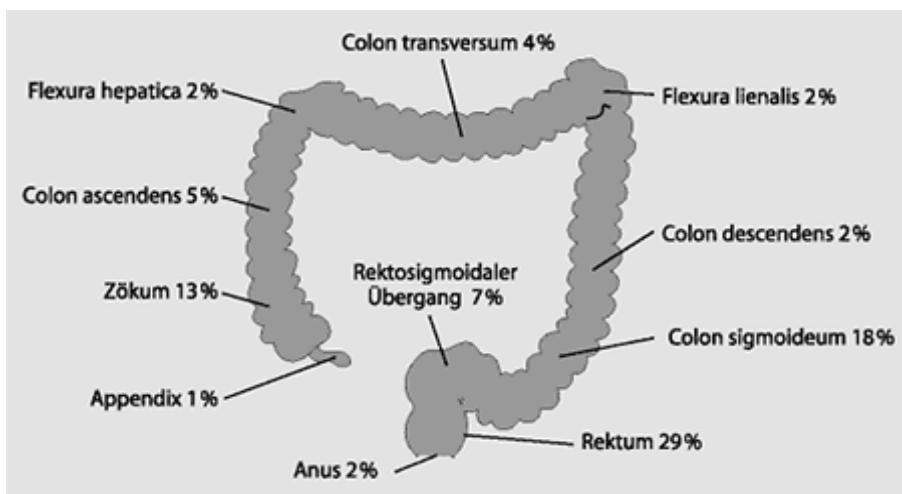


Abbildung 1: Verteilung der Lokalisation kolorektaler Karzinome (3).

Die Verteilung des Kolonkarzinoms wird im oben aufgeführten Schaubild verdeutlicht. Wenn man vom rektalen Karzinom absieht (rektosigmoidaler Übergang bis Anus inklusive), tritt das Kolonkarzinom mit 30% am häufigsten im Sigma auf. Cirka 22% sind im Caecum vorzufinden, im Colon transversum circa 14%. Das Vorkommen des Kolonkarzinoms im Colon ascendens (ca.8%) und Colon descendens (ca. 3%) ist eher gering (4).

Die Inzidenz des Kolonkarzinoms nimmt weiter zu. Der steigenden Häufigkeit steht jedoch eine abnehmende Mortalitätsrate gegenüber, da sich die Frühdiagnostik und Therapie deutlich verbessert haben (1). Die Sterberate liegt derzeit bei 3%.

Das Kolonkarzinom entwickelt sich aus Vorläuferläsionen, die als Polypen imponieren. Im Vordergrund steht hier die Entwicklung aus einem klassischen Adenom (Adenom-Karzinom-Sequenz), sowie die Entstehung über serratierter Karzinogenesewege (5, 6). Die anderen Präkanzerosen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Adenomatosis coli) sind nur mit 1% an der Entstehung eines Kolonkarzinoms beteiligt.

Der serratierter Karzinogeneseweg lässt sich in einen MSI-H (hohe Mikrosatelliteninstabilität) serratierten und einen MSI-L / MSS (niedrige oder keine Mikrosatelliteninstabilität) serratierten Weg einteilen.

Der erstgenannte Weg geht von einem sessilen serratierten Adenom als Präkanzerose aus, ist hauptsächlich proximal (rechtsseitig) lokalisiert und hat eine günstigere Prognose. Man spricht auch vom molekularen Typ 1 nach Jass (Low-risk-subtyp). Die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) beträgt über 70% (7, 8).

Der zweitgenannte Weg hat seinen Ursprung in einem traditionellen serratierten Adenom (TSA) und wird auch als molekularer Typ 3 nach Jass bezeichnet. Es tritt häufiger im distalen (linksseitigen) Kolon auf und hat eine ungünstigere Prognose als der molekulare Typ1 nach Jass. Die 5-JÜR beträgt weniger als 30% (7, 8).

Die Entstehung eines Kolonkarzinoms über den serratierten Weg unterscheidet sich grundsätzlich von dem der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz. Es liegt hier ein anderer molekularer Vorgang vor: Es kommt offenbar zu einer gestörten Apoptose in den Krypten des Dickdarms (9). Infolgedessen kommt es zu einem längeren Überleben der Epithelzellen und dadurch zu einer Methylierung der DNA. Im Laufe dieses

fehlerhaften Prozesses wird die Transkription von wichtigen Reparaturgenen abgeschalten („Silencing“), und es entsteht Mikrosatelliteninstabilität (10).

Mikrosatelliteninstabilität ist ein phänotypisches Kennzeichen eines fehlerhaften DNA Mismatch-Repair-Systems, welches in 10 - 20% bei Kolonkarzinomfällen beobachtet wird. Infolge defekter Reparaturgene wird der Einbau falscher Basen nicht korrigiert, und es kommt zu einer Verlängerung bestimmter DNA-Sequenzen („mismatch“). Es entstehen Mutationen in den neu hergestellten DNA-Abschnitten. Als Mikrosatelliten werden repetitive Sequenzen im Genom bezeichnet. Diese sind für Fehler besonders anfällig. Ein Ausfall des Mismatch-Repair-Systems wird in diesen Abschnitten als erstes wirksam. Lässt sich dieser als Mutation der Keimbahn feststellen, liegt hier ein genetischer Defekt vor, der wegen seiner Vererbbarkeit einer spezifischeren Vorsorge bedürftig ist (HNPCC oder Lynch-Syndrom) (11).

Das Kolonkarzinom wächst meistens über viele Jahre unentdeckt und symptomlos. Die Patienten bemerken häufig erst spät Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust. Zudem können Stuhlunregelmäßigkeiten (Obstipation, Diarröhö, beides im Wechsel oder sogar Bleistiftstuhl), Blut im Stuhl und Schmerzen ein Hinweis für ein Kolonkarzinom sein. Diese Symptome können allerdings auch der Hinweis für andere Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes sein.

Bei etwa 25% der Patienten haben sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Fernmetastasen manifestiert. Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt sind haben das gleiche Risiko an Krebs zu erkranken, wie Patienten mit einer ulzerierenden Colitis. Das Risiko einer Neubildung steigt bei diesen erkrankten Patienten signifikant nach ca. acht bis zehn Jahren um 0,5% bis 1% pro Jahr an und stagniert nach ca. 30 Jahren bei 15-20%. Damit liegt das Risiko insgesamt bei einem 20-fach erhöhten Wert im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung (12).

Neben zahlreichen weiteren Faktoren hängt die Prognose des Kolonkarzinoms im Wesentlichen davon ab, ob der Tumor kurativ behandelt werden kann oder nicht.

Weiterhin von entscheidender Bedeutung für die 5-JÜR ist das Tumorstadium. So sinkt diese von 83% in Stadium II auf 60% in Stadium III (13).

1.2 Therapie des Kolonkarzinoms

Behandlungskonzept des Kolonkarzinoms

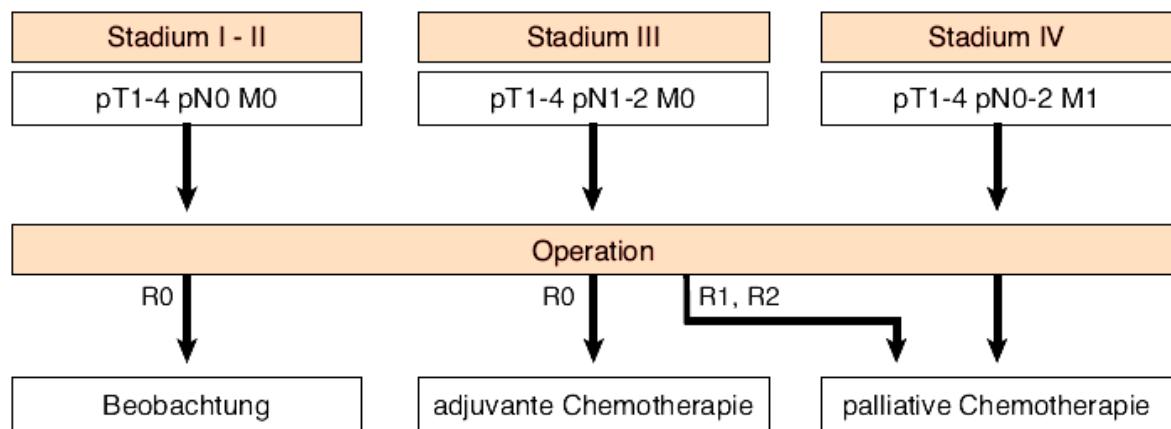


Abbildung 2: Stadienbezogene Therapie des Kolonkarzinoms (14)

Während Patienten mit einem festgestellten N+ Tumor routinemäßig eine adjuvante Chemotherapie erhalten, ist dies bei Patienten mit Stadium I/II (nodal negativ) nicht der Fall. Es ist daher wichtig zu wissen, ob man bei einem Kolonkarzinom wirklich von Lymphknoten Negativität, also Metastasenfreiheit sprechen kann oder nicht (15).

Ein Patient mit falsch negativem Nodalstatus würde somit in ein falsches Therapieregime rutschen, d.h. er würde postoperativ vermutlich keine adjuvante Chemotherapie erhalten, und es ist daher von einem ungünstigeren Verlauf auszugehen.

Die Therapiemöglichkeiten werden im Wesentlichen vom Stadium des Tumors bestimmt, d.h. von seiner Größe und Art, sowie der Lokalisation und dem Vorhandensein von Metastasen. Der Erfolg ist umso grösser, je früher das Karzinom

erkannt wird. Man unterscheidet daher die kurative von der palliativen Therapie. Letztere zielt nicht mehr auf eine Heilung ab, sondern auf eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Verlängerung des Überlebens.

1.2.1 Endoskopische und operative Therapie

Die derzeit einzige Möglichkeit, das Kolonkarzinom kurativ zu behandeln ist seine vollständige operative oder endoskopische Entfernung.

Bei der operativen Resektion wird der Primärtumor, je nach Lage, entsprechend der Gefäßversorgung samt seinem Lymphabflussweg entfernt. Das Ausmaß der Resektion wird von Tumorsitz, Lymphabflusswegen, Gefäßversorgung wie auch anatomisch-embryonalen Schichten bestimmt. Man unterscheidet verschiedene Operationstechniken:

Hemikolektomie rechts, Kolon-Transversum-Resektion, Hemikolektomie links und Sigmaresektion.

Tabelle 1: Standardoperationen des Kolonkarzinoms

Sitz des Primärtumors	Standardoperation	Lymphabflussgebiet/ Zentrales Gefäß
Caecum und Colon ascendens	Hemikolektomie rechts	A.ileocolica, A.colica dextra
Rechte Flexur und proximales Colon transversum	Erweiterte Hemikolektomie rechts	A.colica media, A. colica dextra,A.ileocolica
Colon transversum	Erweiterte Hemikolektomie rechts oder links je nach Lokalisation zu rechter oder linker Flexur	A. colica media
Linke Flexur	Erweiterte Hemikolektomie links	A. colica media, A. mesenterica inferior, (A. colica sinistra)
Colon descendens	Hemikolektomie links mit Transversorektostomie	A. mesenterica inferior
Sigma	Radikale Sigmaresektion	A. mesenterica inferior
Mehrfachkarzinome	Subtotale Kolektomie, totale Kolektomie	Entsprechend der Ausdehnung

Tabelle 1: Standardoperationen des Kolonkarzinoms (2)

Bei Low-risk-Tumoren (T1a, G1- G2) ist häufig eine lokale Tumorentfernung in Form der endoskopischen Exzision möglich.

Hierbei wird, da die Lymphknotenbefallsrate bei diesen Tumoren nur 2 - 4% beträgt, das regionäre Lymphabflussgebiet belassen. Die Voraussetzung für eine endoskopische Therapie ist eine R0-Resektion, laut Schmiegel et al (1) wird ein Sicherheitsabstand von 1mm kontrovers diskutiert. Eine Entfernung in Piecemeal-Technik wird als ausreichend empfunden. Hierbei wird die R-Situation bezüglich der seitlichen Ränder endoskopisch-makroskopisch beurteilt und in der Tiefe histologisch (basal R0). Das Entscheidende ist bei dieser Therapie die regelmäßige biopsisch-endoskopische Nachkontrolle in kurzen Zeitabständen, laut Schmiegel et al. (1) alle 2 - 6 Monate. Man geht nach vorliegenden Daten davon aus, dass nach der Behandlung lokale Rezidive, bei Low-risk-Tumoren in 0 - 5% der Fälle auftreten. (1)

Wenn es sich um einen Tumor handelt, der bereits benachbarte Organe infiltriert hat (T4b), ist eine Resektion des Darmabschnitts en bloc samt infiltriertem Nachbarorgan möglich, wobei eine Überlebensrate erzielt werden kann, die fast der einer alleinigen Darmresektion entspricht.

Von palliativen Operationen spricht man, wenn bei Patienten mit einem Tumorleiden, welches aufgrund seines Stadiums oder entsprechend schwerwiegender Begleiterkrankungen, nicht mehr kurativ behandelt werden können. Es wird hier ein komplikationsärmer möglichst gering ausgedehnter Eingriff durchgeführt, um die Symptome des Patienten zu lindern und seine Lebensqualität weit möglichst zu verbessern.

1.2.2 Chemotherapie beim Kolonkarzinom

Bekannt ist, dass bei frühen Tumorstadien (Stage I - II) ohne Lymphknotenbefall, in der Regel eine Chemotherapie nicht notwendig ist, bzw. nur mit einem geringen Überlebensvorteil assoziiert ist. Allerdings kann in bestimmten Risikosituationen eine adjuvante Chemotherapie auch im Stadium II sinnvoll sein. In höheren Tumorstadien besteht aufgrund der Verbesserung des Gesamtüberlebens eine klare Indikation für die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie. Die Verbesserung des rezidivfreien Überlebens konnte beim Kolonkarzinom (im Gegensatz zum Rektumkarzinom) jedoch nur für die adjuvante systemische Chemotherapie, nicht jedoch für die adjuvante Strahlentherapie nachgewiesen werden (1). Die heute in der Therapie des Kolonkarzinoms verwendeten Substanzen sind die Zytostatika 5-Fluorouracil und Folinsäure, deren orale „Prodrugs“ Uracil, Tegafur und Capecitabin, sowie Oxaliplatin und Irinotecan (14). Die Wirkung der Zytostatika erfolgt durch Wachstumshemmung der Tumorzellen. Durch die Verwendung der Chemotherapie im metastasierten Stadium

IV konnte in den letzten Jahren eine deutliche Verbesserung der medianen Überlebenszeit erreicht werden. Zusätzlich kommen seit einiger Zeit auch Antikörper zum Einsatz. Zugelassene Substanzen sind in der palliativen Therapie des Kolonkarzinoms Cetuximab, Panitumumab und Bevacizumab. Wie bereits erwähnt ist im UICC-Stadium I nach erfolgter R0-Resektion eine adjuvante Therapie nicht indiziert. Bei Patienten, die ein kurativ reseziertes Kolonkarzinom im Stadium II aufweisen, kann eine adjuvante Chemotherapie bei Vorliegen von bestimmten Risikosituationen sinnvoll sein. Dazu zählen z.B. ein lokal fortgeschrittener Tumor Stadium T4, OP unter Notfallbedingungen, z.B. bei Ileus, bei weniger als 12 untersuchten Lymphknoten, Tumorperforation oder Tumoreinriss.

Eine adjuvante Chemotherapie wird bei Patienten mit einem R0 resezierten Kolonkarzinom im UICC- Stadium III, das durch lokoregionäre Lymphknotenmetastasen gekennzeichnet ist, empfohlen (1, 16),(17). Hier wird eine Oxaliplatin- und 5-Fluorouracil-haltige Therapie bevorzugt.

1.3 Grundlagen der histopathologischen Diagnostik des Kolonkarzinoms

Das Kolonkarzinom wird nach histomorphologischen Kriterien und seiner Ausbreitung eingeteilt.

1.3.1 Praekanzeröse Läsion: Adenom

Adenome imponieren als polypöse Erhabenheiten der Dickdarmschleimhaut. Sie treten entweder in gestielter Form auf oder sitzen der Schleimhaut breitbasig auf. Feingeweblich können je nach zellulärer und architektonischer Atypie tubuläre, villöse und die Mischform tubulovillöse Adenome unterschieden werden. Wichtig ist zudem die Unterscheidung zwischen Läsionen mit leichtgradigen und solchen mit

schwergradigen intraepithelialen Neoplasien. Eine Sonderstellung nehmen die sog. sessilen serratirten Adenome ein, die zumeist keinerlei zelluläre Atypien aufweisen und deren adenomatöser Charakter sich zunächst in ausschließlich architektonischen Auffälligkeiten manifestiert (18).

1.3.2 Frühkarzinom/ Invasives Karzinom

Beim invasiven Karzinom handelt es sich um einen Tumor, der sich außerhalb der Lamina propria ausbreitet, in welcher er entstanden ist. Das invasive Kolonkarzinom infiltriert mindestens die Submukosa oder aber bereits die tiefer gelegenen Strukturen der Muskularis proria, der Subserosa oder Serosa. Es besitzt nun das Potential, zu metastasieren (19).

1.4 Klassifikation des Kolonkarzinoms

1.4.1 Histologische Typen

Laut WHO-Klassifikation unterscheidet man elf Karzinomtypen: Adenokarzinom, muzinöses Adenokarzinom, mikropapilläres Karzinom, serratirtes Adenokarzinom, Siegelringzellkarzinom, Kleinzelliges Karzinom, Plattenepithelkarzinom, Medulläres Karzinom, undifferenziertes Karzinom, adenosquamöses Karzinom und Spindelzellkarzinom. (18).

95% der Kolonkarzinome sind Adenokarzinome, die sich im Laufe der Zeit aus gutartigen Adenomen entwickeln. 80% der Adenokarzinome sind drüsig-solid differenziert, 10% schleimbildend und weitere 10% sind anaplastisch / undifferenziert. Die restlichen 5% der malignen Tumore sind Plattenepithelkarzinome, Neuroendokrine Tumore, Gastrointestinale Stromatumore (GIST), andere mesenchymale Tumore, sowie Lymphome (20).

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass die einzelnen Karzinome auch als Mischtypen auftreten können, sodass z. B. in großen Tumorarealen gleichzeitig Strukturen eines Siegelringkarzinoms und eines muzinösen Adenoms auftreten können.

1.4.2 Familiäres Kolonkarzinom

Es gibt unterschiedliche genetische Erkrankungen, die zu einem Kolonkarzinom führen können. Vererbte Tumorerkrankungen liegen in 5% aller Kolonkarzinom-Fälle vor. Die häufigsten hereditären Erkrankungen sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC) Syndrom, das Gardner-Syndrom und das Peutz-Jehgers-Syndrom.

Die FAP ist eine seltene obligate Präkanzerose (1% aller Kolonkarzinome), die im Laufe der Zeit sicher (zu 100%) zu Darmkrebs führt (1). Sie wird autosomal-dominant vererbt und manifestiert sich schon in jungen Jahren durch eine Überwucherung der Darmschleimhaut durch bis zu 1000 Polypen (1).

Häufiger als die FAP ist jedoch das HNPCC, auch Lynch-Syndrom genannt, mit einem Auftreten in 2-3% aller Kolonkarzinome (21).

Das HNPCC wird autosomal-dominant vererbt und kann neben dem Darmkrebs auch zu Brustkrebs, Endometrium- und Eierstockkrebs und anderen Tumoren führen.

Der Grund für diese Erkrankung ist eine Mutation in einem oder mehreren DNA-Mismatch-Reparaturgenen, wie bereits zuvor ausgeführt. Um Trägerfamilien finden zu können, wurden die sogenannten Amsterdam-Kriterien I und II, wie auch die Bethesda-Kriterien entwickelt.

Bei den Amsterdam-I-Kriterien müssen alle genannten Kriterien erfüllt sein: Es müssen mindestens drei Familienmitglieder an einem histologisch gesicherten kolorektalen Karzinom erkrankt sein, einer davon muss Verwandter ersten Grades sein, bei den zwei anderen muss die Erkrankung in darauffolgenden Generationen auftreten. Zudem muss

ein Patient die Diagnose des kolorektalen Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr gestellt bekommen. Eine FAP muss dabei ausgeschlossen werden. Die Amsterdam-I-Kriterien wurden im Wesentlichen von den Amsterdam-II-Kriterien ersetzt. Während bei den Amsterdam-I-Kriterien allein kolorektale Karzinome von Familienangehörigen berücksichtigt werden, schließen die Amsterdam-II-Kriterien alle Lynch-Syndrom assoziierten Tumore (wie z.B. das Endometriumkarzinom, das Urothelkarzinom, das Ovarialkarzinom und Hirntumore) ein. Die Kriterien bleiben inhaltlich identisch(22).

1.4.3 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation wurde entwickelt, um maligne Tumore nach bestimmten Stadien einzuteilen (sog. Staging) und sie basiert auf statistischen Untersuchungen, die es ermöglichen, Aussagen über die Prognose von Tumorerkrankungen zu machen (So kann sich beispielsweise ab einer bestimmten Größe des Tumors die Prognose erheblich verschlechtern). Die international anerkannte TNM-Klassifikation ermöglicht die Vergleichbarkeit von Studien. Man unterscheidet drei Komponenten, die das TNM-System formen: Die Abkürzung „T“ (Tumor) gibt die Ausdehnung des Primärtumors an, „N“ (Nodus) beschreibt das Vorhandensein bzw. das Fehlen von regionalen Lymphknotenmetastasen und „M“ (Metastase) das Vorhandensein bzw. dem Fehlen von Fernmetastasen.

Die Einstufung einer Tumorerkrankung in die einzelnen Kategorien des TNM-Systems erlaubt jedoch nicht nur prognostische Aussagen, sondern auch die Entwicklung therapeutischer Vorgaben (23).

Man unterscheidet eine prätherapeutische TNM-Klassifikation, auch cTNM (clinical) genannt, welche der klinischen Klassifikation entspricht, von der posttherapeutischen TNM-Klassifikation, pTNM (pathologische). Diese beschreibt die postoperative histopathologische Einteilung und wird zusätzlich noch durch das Grading (G) ergänzt.

Dieses gibt Auskunft über den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes. So unterscheidet man gut (G1), mäßig (G2), und wenig differenzierte (G3) Tumoren. Des Weiteren gibt es die R-Klassifikation (Residual), welche angibt, ob noch ein Tumorrest nach einer Therapie verblieben ist. R0 bedeutet daher, dass kein Tumor im Organismus vorhanden ist. R1 weist auf einen mikroskopischen Residualtumor hin, und R2 gibt dem nach Information über einen makroskopischen Tumorrest beziehungsweise auch belassene Metastasen (23).

1.4.3.1 TNM 7 2009 – deutsche Auflage 2010:

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der lamina propria
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/ oder perforiert das viszerale Peritoneum
T4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

Tabelle 2: T- Klassifikation des Kolonkarzinoms

Anmerkung:

Tis liegt vor, wenn Tumorzellen die Basalmembran der Drüsen nicht durchbrechen (intraepithelial) bzw. in der Lamina propria (intramukös) feststellbar sind, ohne dass eine Infiltration durch die Muscularis mucosae feststellbar ist.

Direkte Ausbreitung in der Kategorie T4b schließt auch die mikroskopisch bestätigte Infiltration anderer Segmente des Kolorekturns auf dem Weg über die Serosa ein, z.B. die Infiltration des Sigma durch ein Zölkarkarzinom und für Tumoren in retroperitonealer Lokalisation die direkte Invasion anderer Organe oder Strukturen auf dem Wege der Ausbreitung jenseits der Muscularis propria.

Ein Tumor, der makroskopisch an anderen Organen oder Strukturen adhären ist, wird als T4 klassifiziert. Ist bei der histologischen Untersuchung in den Adhäsionen kein Tumorgewebe

nachweisbar, soll der Tumor in Abhängigkeit von der Tiefe der Wandinfiltration als pT1 - pT3 klassifiziert werden.

N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/ perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Tabelle 3: NM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Anmerkung:

„Tumor deposits“ (Satelliten) sind makroskopische oder mikroskopische Nester oder Knötchen im perikolorektalen Fettgewebe des Lymphabflussgebietes des Primärtumors ohne histologisch erkennbare Residuen eines Lymphknotens. Wenn solche Tumorknötchen bei Läsionen, die sonst als T1 oder T2 klassifiziert werden, nachgewiesen werden, ändert sich die T-Klassifikation nicht, aber die Knötchen werden als N1c/pN1c gewertet (24).

1.4.3.2 Änderungen im Vergleich zu vorausgegangenen Auflagen:

Bei der 5. Auflage von 1997 wird beschrieben, dass ein mehr als 3mm großes Tumorknötchen im perirektalen bzw. perikolischen Bindegewebe ohne histologischen Anhalt für Lymphknotenreste in der N-Kategorie als regionäre Lymphknotenmetastase klassifiziert wird, während ein Tumorknötchen bis 3mm in der T-Kategorie als diskontinuierliche Ausbreitung T3 klassifiziert wird (23).

In der 6. Auflage von 2002 wird ein Tumorknötchen im perikolischen bzw. perirektalen Fettgewebe, ohne Anhalt für einen Lymphknotenrest, in der pN-Kategorie als regionäre Lymphknotenmetastase (bei glatter Kontur) bezeichnet. Bei Vorliegen einer irregulären Kontur soll das Tumorknötchen in der pT-Kategorie klassifiziert und auch als V1 (mikroskopische Veneninvasion) oder als V2 (makroskopische Veneninvasion) gekennzeichnet werden (25).

In der neuesten Auflage 7. werden „Tumor deposits“ (Satelliten) als makroskopische oder mikroskopische Nester oder Knötchen bezeichnet, welche im perikolischen Fettgewebe des Lymphabflussgebietes des Primärtumors ohne histologisch erkennbare Residuen eines Lymphknotens lokalisiert sind.

Sie können einer Veneninvasion (V1, V2), einer kontinuierlichen Ausbreitung oder komplett metastatisch durchsetzten Lymphknoten entsprechen. Wenn sie bei Läsionen, welche sonst als T1 oder T2 klassifiziert werden, nachgewiesen werden, bleibt die T-Klassifikation unverändert, aber die Knötchen werden als N1c/pN1c beschrieben (24).

1.4.4 UICC-Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms

Diese Stadieneinteilung wurde von der „Union internationale contre le cancer“ (UICC) erstellt. Sie fasst im Prinzip mehrere Faktoren des TNM-Systems zusammen und erlaubt eine Einteilung in vier Haupt-Stadien und lässt ebenso wie die TNM-Klassifikation prognostische Aussagen zu und ist Grundlage für weitere therapeutische Entscheidungen. Auch die sehr ähnliche Dukes-Klassifikation ist noch gültig, wird aber immer mehr von der UICC-Klassifikation ersetzt.

UICC- Klassifikation:

Stadium Ia	Beschränkung der Tumorinfiltration auf die Mukosa und Tela submukosa (Dukes A)
Stadium Ib	Beschränkung der Tumorinfiltration bis in die Tunica muscularis propria (Dukes A)
Stadium II	T3 oder T4 ohne Lymphknotenmetastasierung (Dukes B)
Stadium III	Lymphknotenmetastasierung (Dukes C)
Stadium IV	Fernmetastasen (Dukes D)

Tabelle 4: UICC- Klassifikation (14)

1.5 Histopathologische Aspekte des Lymphknotenstaging

Das Lymphknotenstaging ist elementarer Teil der histopathologischen Untersuchung kolorektaler Präparate. Im Folgenden werden wichtige grundlegende Aspekte dieser Thematik erörtert.

1.5.1 Aktuelle Empfehlungen zur Mindestzahl zu untersuchender Lymphknoten beim Kolonkarzinom

Die regionären Lymphknoten werden vom Operateur en bloc mit dem entsprechenden Darmsegment sowie den Blut- und Lymphgefäßen reseziert. Es obliegt danach dem Pathologen die Lymphknoten innerhalb des Präparates aufzufinden und zu präparieren. Es herrscht allerdings Uneinigkeit darüber, wie viele Lymphknoten bei Kolonkarzinomen präpariert und histologisch untersucht werden sollen. Trotz zahlreicher Veröffentlichungen konnte man bisher nicht endgültig klären, wie hoch die Mindestanzahl der zu untersuchender LK tatsächlich sein sollte, um eine korrekte Stadieneinteilung zu ermöglichen (26). Es ist zwar so, dass die UICC die Untersuchung von 12 Lymphknoten gefordert hat, dennoch gibt es diverse Studien, die zu anderen

Empfehlungen kommen. Die Anzahl der geforderten Lymphknoten schwankt zwischen 10 und > 30 (27), (28), (29, 30).

Goldstein et al. beschreiben anhand eines theoretischen Modells, dass bei Auffinden von 30 Lymphknoten die Wahrscheinlichkeit, eine hypothetische einzelne Lymphknotenmetastase zu finden, etwa 80% beträgt. Wong et al. stellen in ihrer retrospektiven Studie fest, dass mindestens 14 LK für eine ausreichende und genaue Stadieneinteilung benötigt werden, um korrekt über die Notwendigkeit einer nachfolgenden adjuvanten Chemotherapie entscheiden zu können (29). Scott et al. kommen in deren Studie zu dem Ergebnis, dass nach Auffinden von 13 LK 94% der nodal positiven Fälle richtig erkannt werden (31).

Zudem zeigen zahlreiche Studien aus verschiedenen Ländern (F, NL, C, UK), dass die von der UICC geforderte Anzahl der LK oft bzw. in der Mehrheit der Fälle in der Praxis nicht erreicht werden (13, 26, 32-34).

Märkl et al. untersuchen die LK-Ausbeute in insgesamt 60 Fällen mit konventionellen Techniken und mit den spezialisierten Methoden (Methylenblau-Technik und Fettaufhellungsmethode). In 8 Fällen konnte nach der konventionellen Technik die geforderte LK-Anzahl nicht erreicht werden (27%), während mit den spezialisierten Techniken nur ein einziger Fall mit 10 LK primär insuffizient präpariert wurde (3%) (13). Auch Edler et al. bestätigen, dass die geforderte LK-Anzahl häufig nicht erreicht wird. Sie untersuchen in einer umfangreichen Studie 1025 Patienten mit einem festgestellten Kolonkarzinom in Stadium II und III. Im Durchschnitt konnten 5 LK entdeckt werden. Nur bei 13% aller Patienten konnten mehr als 12 LK entdeckt werden (27). In der Studie von Bui et al. wird verdeutlicht, dass relativ geringe LK-Zahlen mit der Gefahr des Understagings verbunden sind, was eine inkorrekte Prognoseabschätzung sowie das Vorenthalten einer adjuvanten Therapie zur Folge hat (28).

1.5.1.1 Techniken zur Erhöhung der Anzahl aufgefunder Lymphknoten

Da die oben beschriebenen Probleme seit langer Zeit bekannt sind, wurden immer wieder Methoden entwickelt und untersucht, die das Präparieren und Auffinden von Lymphknoten erleichtern sollen, und so zu einer Verbesserung des LK-Stagings beitragen sollen.

1.5.1.1.1. Chemische Fettaufhellungstechniken

Fettaufhellungsmethoden stehen seit längerer Zeit zur Verfügung. Ihr Prinzip besteht in einer chemischen Entwässerung des Fettgewebes, das die Lymphknoten umgibt, was so zu einer erhöhten Transparenz des Fettgewebes und erleichterter Auffindbarkeit der Lymphknoten (35-37) führt. Es wurden mittlerweile zahlreiche Protokolle veröffentlicht, die sich alle als effektiv erwiesen haben. Nachteile dieser Methoden liegen in einem erhöhten Arbeitsaufwand, der Notwendigkeit potentiell toxischer Substanzen, den zusätzlichen Kosten und einer teilweise erheblichen Zeitverzögerung.

1.5.1.1.2. Methylenblau-Technik

Das Verfahren der Methylenblau-Technik beruht auf einer erhöhten Erkennbarkeit von Lymphknoten im Fettgewebe durch eine Anfärbung mittels Methylenblau. Diese wird durch eine ex-vivo durchzuführende intraarterielle Injektion des Farbstoffs erzielt. Die Methode erwies sich als einfach, kostengünstig und effektiv, was mittlerweile auch von mehreren Gruppen unabhängig bestätigt werden konnte (38-40). Ein suffizientes Lymphknotenstaging wird in 99% der Fälle gewährleistet. Im Mittel werden zwischen 14 ± 3 und 28 ± 7 LK ($p < 0,001$) aufgefunden.

1.5.1.2 Zusammenhang zwischen Anzahl der untersuchten Lymphknoten und der Prognose des Kolonkarzinoms

Das LK-Staging hat, wie bereits beschrieben, eine besondere Bedeutung bei der histopathologischen Untersuchung von Kolonkarzinomen. Bei Kolonkarzinompatienten, bei denen kein Lymphknotenbefall nachweisbar ist und die geforderte Mindestzahl von 12 Lymphknoten nicht erreicht wurde, besteht grundsätzlich die Gefahr eines Understagings. Um dies zu vermeiden wurden im Laufe der Zeit neue Techniken entwickelt, wie z.B. die Fettaufhellungstechnik oder die Methylenblau-Technik.

Es gibt zahlreiche Studien, die über einen Zusammenhang zwischen der Anzahl untersuchter Lymphknoten und dem Überleben des Patienten berichteten.

Im Rahmen einer großen Register-Studie (15) wurde bei Patienten mit T3N0 Kolonkarzinomen der Zusammenhang zwischen der Anzahl untersuchter LK und dem Krankheitsverlauf untersucht. Es wurden bei 35000 Patientenfällen durchschnittlich 10,1 bis 13,3 LK je nach Darmabschnitt untersucht. Der Mittelwert der gesamten LK-Ausbeute beträgt 9 LK. Die Ausbeute schwankt zwischen 0 > 30 Lymphknoten. Die 5-JÜR korreliert streng mit der Anzahl der untersuchten LK. So zeigten Fälle mit fünf oder weniger untersuchten LK einen Verlauf, der dem nodal positiver Fälle gleicht. Umgekehrt ist die Untersuchung von 30 und mehr LK mit einer exzellenten Prognose vergesellschaftet - ähnlich der von Stadium-1-Fällen mit 5-JÜR von über 90%.

Die Autoren stellen folglich fest, dass bei einer Anzahl von weniger als acht untersuchten LK ein Fall nicht mit ausreichender Sicherheit als nodal negativ klassifiziert werden könne. Hingegen sollten in jedem Fall mehr als 13 LK untersucht werden.

Dieser Zusammenhang zwischen LK-Ausbeute und Prognose wurde in zahlreichen Studien immer wieder bestätigt und kürzlich auch in einem systematischen Übersichtsartikel untersucht und nachgewiesen (41).

1.5.1.3 Stadienmigration als Erklärung für die prognostische Bedeutung der Lymphknotenanzahl (Will-Rogers-Phänomen)

Trotz einiger Studien, welche geringere LK- Zahlen für eine suffiziente Stadieneinteilung ausreichend halten (28), gibt es eine große Anzahl an Studien, die das Gegenteil bestätigen. So sehen z.B. Swanson et al. den Grund für den Zusammenhang zwischen der Anzahl untersuchter Lymphknoten und der Prognose des Kolonkarzinoms in der Exaktheit der Stadieneinteilung, die je nach LK-Ausbeute schwankt. Eine größere Anzahl untersuchter Lymphknoten erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass auch einzelne kleine Metastasen eher gefunden werden können, die bei unzureichender Untersuchung unentdeckt bleiben würden. Es ist daher anzunehmen, dass die Gefahr des sogenannten „Understagings“ durch eine hohe Anzahl untersuchter LK vermieden werden kann. Durch das inkorrekte Einordnen von Fällen in bestimmte Stadienkategorien kommt es zum Stadienmigrationseffekt, der auch als Will-Rogers-Phänomen bezeichnet wird. Vereinfacht dargestellt beschreibt das Phänomen eine vermeintlich bessere (oder aber auch schlechtere) Prognose durch eine Verschiebung von Fällen in andere Stadien (42). Die Zuverlässigkeit der Lymphknotenuntersuchung und die daraus folgende Stadieneinteilung haben somit erhebliche therapeutische Konsequenzen.

2. Material und Methoden

2.1 Zielsetzung

Auf der Basis von am Institut für Pathologie am Klinikum Augsburg vorliegender Daten wurde die Hypothese entwickelt, dass der günstigere Verlauf der Kolonkarzinom-Patienten, bei denen besonders viele Lymphknoten untersucht wurden, nicht allein auf einem sogenannten Stadien-Migrationseffekt beruht, sondern hier auch immunologische Phänomene eine Rolle spielen. Patienten, die eine besonders effektive Immunantwort entwickeln, könnten demnach eine lymphatische Hyperplasie entwickeln, was eine Vergrößerung der Lymphknoten zur Folge hat und deren Auffindbarkeit erhöht, und somit auch die Zahl der untersuchten Lymphknoten.

Das Ziel der hier vorliegenden Untersuchung besteht darin, diese Hypothese zu überprüfen.

2.2 Studienaufbau

2.2.1 Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden 237 Patientenfälle mit Kolonkarzinom untersucht, die zwischen Mai 2007 und August 2010 am Klinikum Augsburg operiert wurden. Bei all diesen Patienten wurde histologisch ein Kolonkarzinom gesichert. Die Einschlusskriterien waren ein onkologisch mit kurativem Ansatz reseziertes Kolonkarzinom, ein tumorfreier Resektionsrand und die Anwendung der Methylenblau-Methode oder der Fettaufhellungsmethode zur Optimierung der Lymphknotenausbeute. Ausschlusskriterien waren das Rektumkarzinom, ein primär palliativer Eingriff, ein Notfalleingriff oder das bekannte Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung.

Basisinformationen über Alter, Geschlecht der Patienten, sowie das Stadium des Tumors (Lokalisation und Staging) und histopathologische Parameter wurden in eine Datenbank

(Microsoft Access) aufgenommen. Des Weiteren wurden präoperative Therapie (Therapieschema, Vorbehandlung) und chirurgisches Vorgehen (Operationsverfahren, Tumorresektion, Technik und intraoperativer Befund) dokumentiert. 49 dieser Fälle waren Teil einer vorausgegangenen Studie.

2.2.2 Lymphknotenpräparation

2.2.2.1 Chemische Fettaufhellungstechniken

In 49 Studienfällen wurde nach Entnahme von Routineschnitten aus Tumorregion, Absetzungsrändern und einer initial konventionellen Lymphknotenpräparation das verbliebene, abpräparierte mesenteriale Fettgewebe chemisch aufgehellt. Hierfür wurde es innerhalb von drei Tagen in Isopropanol in aufsteigender Konzentration (70% und 100%) und anschließend in Xylol eingelegt. Danach erfolgte eine erneute Präparation von noch zurückgebliebenen Lymphknoten. Diese sekundäre Präparation wurde in all den Fällen, die mit der Fettaufhellungstechnik bearbeitet wurden, durchgeführt. Die LK wurden in Paraffin eingebettet, in 3µm dünne Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) eingefärbt. Schließlich wurden alle Schnitte nach Metastasen untersucht. Die Ergebnisse der primären und der sekundären Präparation wurden addiert.

2.2.2.2 Methylenblau-Technik

Hier wurde am unfixiert übersandten Präparat das arterielle Hauptgefäß dargestellt. Nachdem die Ligatur oder die Gefäßklammer entfernt wurde, erfolgte eine Kanülierung mit einem 16 - 20 Gauge Kunststoffkatheder. Im Anschluss wurden 15 - 20ml Methylenblau-Lösung in das Gefäß injiziert (50 mg/ 5ml mit 0,9 % NaCl im Verhältnis von 1:3).

Der Erfolg der Injektion wurde durch die unmittelbar folgende Blaufärbung der Schleimhaut und der Gefäße erkennbar. In einem Teil der Fälle musste noch ein zweites weiter distal

gelegenes Gefäß kanüliert werden, um eine gleichmäßige Färbung des Präparates zu ermöglichen. Nachdem das Präparat über Nacht in einer 10%igen, gepufferten Formalinlösung fixiert wurde, wurden Routineschnitte aus der Tumorregion entnommen und eingebettet. Im Anschluss wurde das Fettgewebe vorsichtig abgetrennt und lamelliert. Die Lymphknoten, die sich im Präparat durch deren Blaufärbung deutlich vom restlichen Fettgewebe abgrenzen, wurden entnommen.

2.2.2.3 Histopathologische Aufarbeitung der Lymphknoten

Lymphknoten mit Diametern von über 5 mm wurden halbiert bzw. auch mehrfach geteilt. Das Teilen von Lymphknoten wurde exakt dokumentiert, sodass eine korrekte Zählung anhand der histologischen Präparate sichergestellt werden konnte. Alle Lymphknoten wurden komplett in Einbettkapseln gegeben und standardmäßig prozessiert. Nach erfolgter Paraffineinbettung wurden mindestens zwei 3 μ m dünne Schnittstufen angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.2.2.4 Morphometrische Analyse

Alle histologischen Präparate (3 μ m dünne Paraffinschnitte; Hämatoxylin-Eosin- Färbung) wurden von einem erfahrenen Pathologen am Lichtmikroskop auf das Vorhandensein von Metastasen hin untersucht. Die Diameterbestimmung erfolgte bei Lymphknoten mit einem maximalen Durchmesser von 8 mm mit einer Digitalkamera mit einem kalibrierten Software-System (ProgRes C10, Jenoptik, Deutschland). Alle größeren Lymphknotendiameter wurden mit dem Lineal genau vermessen. Im Anschluss wurden die gemessenen Lymphknoten gemäß ihres maximalen Diameters in die Kategorien 1 bis 11 (1 mm – 10 mm in 1-mm Schritten und > 10mm) eingeteilt. Alle Daten wurden in die Datenbank eingegeben. Für jeden Fall wurde ein kumulativer Lymphknotendiameter (cLND) durch Addition aller LK- Diameter berechnet.

Der willkürlich gewählte Wert von 12 mm wurde schließlich für die letzte Kategorie (>10mm) verwendet.

Der Parameter LN5 präsentiert alle LK mit einem Diameter von > 5mm.

Angewandte Parameter:

cLND: kumulativer LK- Diameter: Addition aller LK- Diameter

LN5: alle LK mit einem Diameter > 5mm addiert

tLN: totale Anzahl aller LK- Diameter

N- Status: Anzahl der nodal positiven Fälle

2.2.3 Statistik

Der ungepaarte T-Test wurde verwandt zum Vergleich von normal verteilten, metrischen Parametern zweier Gruppen. In Fällen in denen eine Normalverteilung nicht gegeben war, wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwandt. Dichotome Daten wurden in Abhängigkeit von der Stichprobengröße unter Verwendung des Chi-quadrat-Tests oder des Fishers Exact-Tests verglichen. Alle Mittelwerte werden mit +/- einer Standardabweichung angegeben. Zur Ermittlung optimaler Schwellenwerte wurde eine Receiver Operating Characteristic-(ROC)-Analyse verwandt. Mit Log-Rank, einem Statistikverfahren, sowie der Multivariate- und Kaplan Meier-Analyse wurden die Überlebensraten verschiedener Gruppen verglichen. Ein P-Wert von < 0,05 wurde als signifikant gewertet. Alle Berechnungen erfolgten unter Verwendung des Sigma Plot 11.0 Softwarepaketes (Systat, Richmond, USA). Sämtliche Follow up-Daten wurden vom klinischen und populations-basierten Tumorregister Augsburg zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv

Die klinisch-pathologischen Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

	Alle Fälle (n = 237)	Nodal negativ (n = 115)	LN5-niedrig (n = 86)	LN5-hoch (n = 29)
Mittleres Alter ± SA	69 ± 12	71 ± 13	70 ± 11	66 ± 12
Jünger als 50 Jahre	17	6	3	3
Verhältnis: weibl.- männl.	1 : 1.37	1 : 1.61	1 : 1.61	1 : 1.63
Hemikolon rechts	90	39	17	22
Kolon transversum	6	1	0	1
Hemikolon links	23	13	10	3
Kolon sigmoideum	117	61	58	3
Gesamter Kolon	1	1	1	0
pT1	26	18	16	2
pT2	44	26	18	8
pT3	145	66	48	18
pT4	22	17	16	1
mittlere LK- Anzahl ± SA	33 ± 17	37 ± 18	29 ± 13	46 ± 23
nodal positiv	81	/	/	/
Gering differenziert	188	98	73	25
Hoch differenziert	49	17	13	4
Lymphatische Invasion	25	12	11	1
Venöse Invasion	29	9	7	2
Methylenblau- Technik*	212	99	74	25
Fettaufhellungsmethode	25	16	12	4

Tabelle 5: klinisch-pathologische Daten. SA= Standardabweichung, * beachte: in 24 Fällen wurde die Technik mit einem zweiten Fettaufhellungsschritt kombiniert.

3.2 Größenverteilung der Lymphknoten - alle Stadien

In dieser Studie wurden insgesamt 7877 Lymphknoten untersucht. Mit einem prozentualen Anteil von 5% wurden 305 metastasierte Lymphknoten gefunden. In den 237 von uns untersuchten Fällen ließen sich in 81 Fällen (34%) Lymphknotenmetastasen nachweisen.

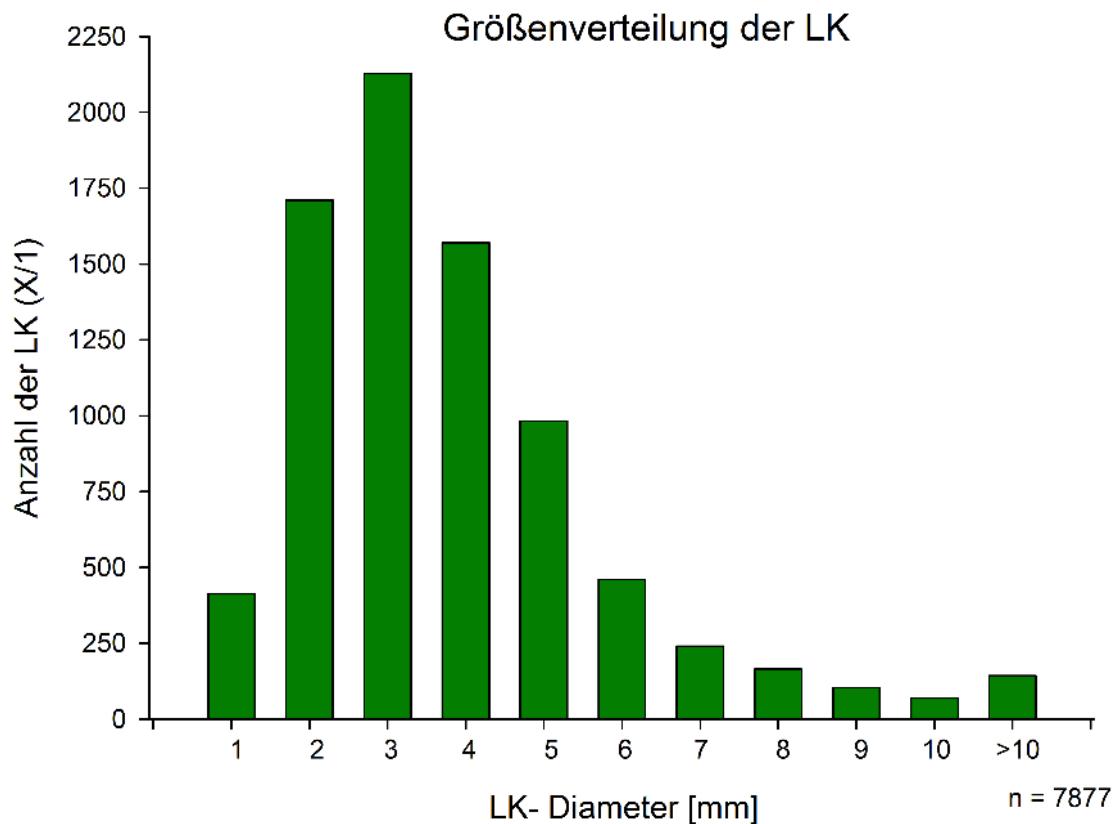


Abbildung 3: Verteilung der LK- Größen aller aufgefunder LK.

Die klinisch-pathologischen Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Größenverteilung aller 7877 untersuchten Lymphknoten ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Mehrheit der Lymphknotendurchmesser lag zwischen > 1 und < 5 mm, während größere Lymphknoten in einer erheblich geringeren Häufigkeit entdeckt wurden.

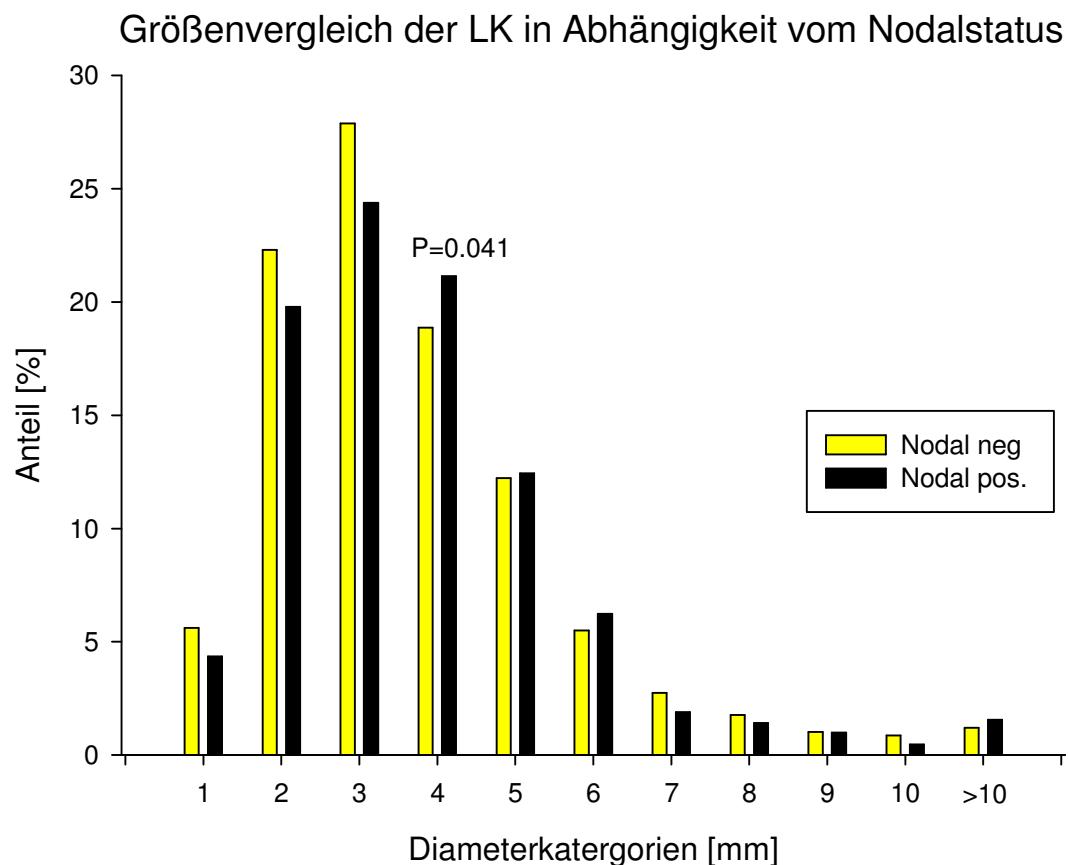


Abbildung 4: Größenverteilung aller Fälle in Abhängigkeit des jeweiligen Nodalstatus.

Beim Vergleich der nodal negativen mit den nodal positiven Fällen, fällt eine nahezu gleiche Größenverteilung in beiden Untergruppen auf (Abbildung 4). Nur der Anteil der 4mm durchmessenden Lymphknoten ist in der nodal positiven Gruppe signifikant häufiger ($P = 0.041$). Vor allem die Anzahl großer Lymphknoten wird vom Auftreten von Metastasen nicht beeinflusst.

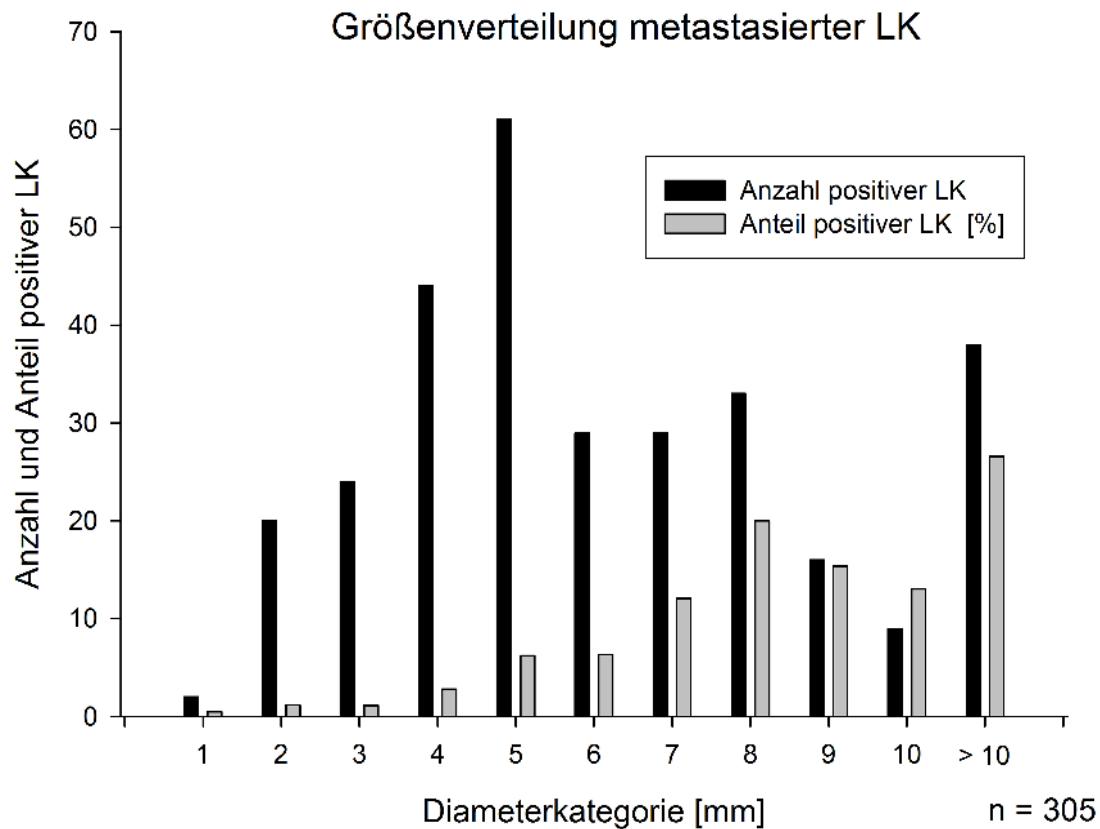


Abbildung 5: Größenverteilung aller metastasierter LK.

Eine Größenverteilung der 305 metastasierten Lymphknoten, sowie der prozentuale Anteil der verschiedenen Größen aller gefundenen Lymphknoten werden in Abbildung 5 dargestellt. Metastasen traten in allen Größen auf, jedoch in Lymphknoten kleiner als 1 mm nur äußerst selten. Nur in zwei von insgesamt 413 Lymphknoten dieser Größe konnten Metastasen nachgewiesen werden (0,5 %). Der prozentuale Anteil positiver Lymphknoten steigt mit dem Diameter der Lymphknoten. So sind nur 3% der 4mm großen Lymphknoten von Metastasen befallen, während bei der >10mm Gruppe bereits 27% positiv sind. Etwa ein Drittel aller gefundenen Metastasen wurde in Lymphknoten der Größen 3 - 5mm nachgewiesen.

An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass die Gruppe > 10 mm eine Summation aller Lymphknoten größer 10 mm darstellt, während alle anderen Gruppen nur Lymphknoten innerhalb eines Bereichs von 1 mm beinhalten (Abbildung 5).

Größter LK- Diameter um N+ bzw. den finalen N- Status zu erreichen

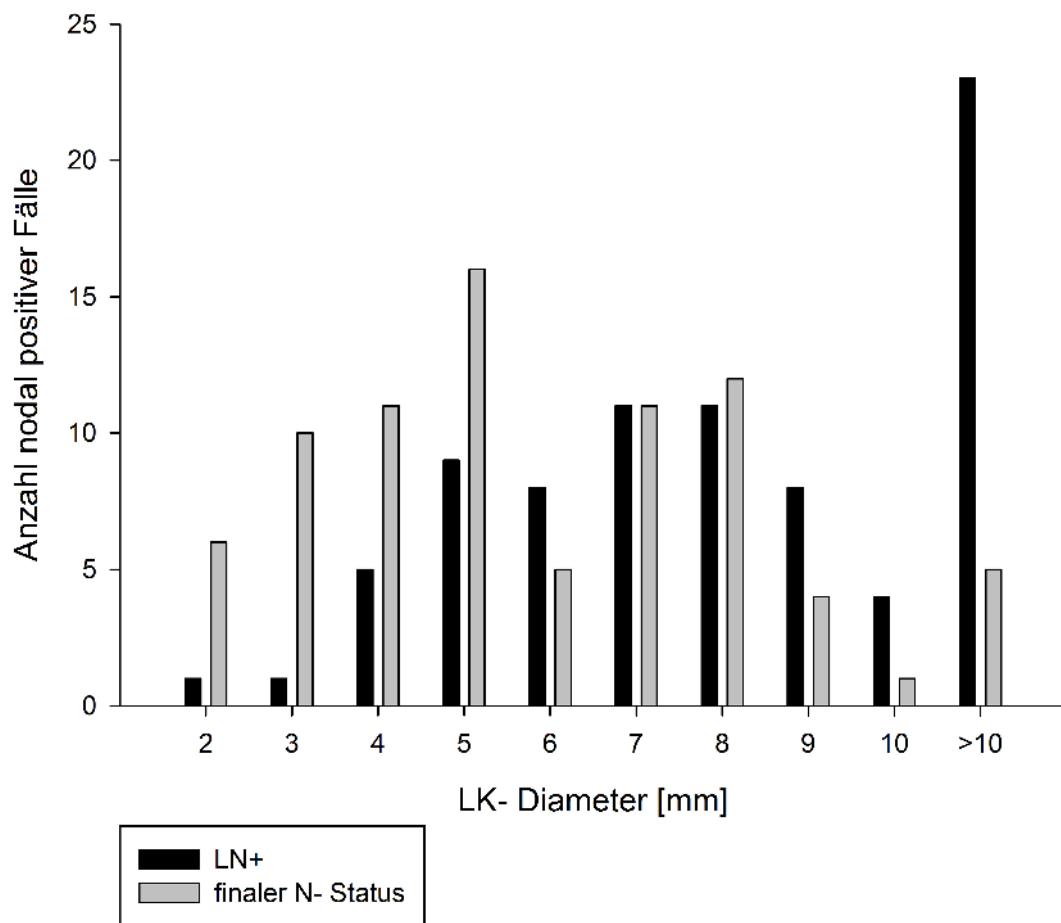


Abbildung 6: Darstellung der größten LK- Diameter für die Bestimmung des N+ und des exakten finalen N- Status.

In Abbildung 6 wird die Verteilung des jeweils größten befallenen LK aller 81 metastasierten Fälle dargestellt. Nur in zwei Fällen waren ausschließlich sehr kleine Lymphknoten mit Durchmessern von 2 beziehungsweise 3 mm befallen, während noch kleinere Lymphknoten (< 1mm) keine Rolle spielen, da sie nie den größten befallenen Lymphknoten in unseren Fällen darstellen. In 23 von 81 Fällen betrug der Diameter des größten befallenen LK > 10mm (28%). Die Diameter der größten positiven Lymphknoten, die den exakten endgültigen Nodalstatus mit entsprechender Subklassifizierung (pT1a – pT2b) bestimmen, sind ebenfalls in Abbildung 6 dargestellt. 43 dieser Lymphknoten waren ≤ 5 mm (53%).

3.3 Prognostischer Effekt der Lymphknotengröße in nodal negativen Karzinomen

Hier wird die Subgruppe nodal negativer Fälle behandelt. Die klinisch-pathologischen Daten werden ebenfalls in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst. Die Parameter totale LK-Anzahl (tLN), Anzahl der LK > 5mm (LN5) und der kumulative LK Diameter (cLND) wurden bezüglich ihres Zusammenhangs mit der Tumorprogression untersucht.

	Mittlere LK- Anzahl	P-Wert	LK- Anzahl > 5mm	P-Wert	Kumulativer LK-Diameter	P-Wert
Männer (n=71)	$33,2 \pm 17,2$		$4,6 \pm 5,0$		$125,6 \pm 74,2$	
Frauen (n=44)	$33,0 \pm 18,5$	n.s.	$4,2 \pm 3,9$	n.s.	$124,5 \pm 76,3$	n.s.
Alter <= 50 (n=6)	$55,7 \pm 35,7$		$9,8 \pm 10,0$		$226,2 \pm 170,8$	
Alter > 50 (n=109)	$31,8 \pm 15,5$	0,09	$4,1 \pm 4,0$	0,14	$119,6 \pm 63,1$	0,093
pT1 (n=18)	$27,6 \pm 13,8$		$2,2 \pm 3,4$		$92,4 \pm 64,0$	
pT2 (n=26)	$42,1 \pm 21,5$		$4,8 \pm 4,2$		$150,9 \pm 83,9$	
pT3 (n=66)	$30,7 \pm 16,1$		$4,8 \pm 4,8$		$122,4 \pm 71,6$	
pT4 (n=5)	$37,4 \pm 11,5$	< 0,001	$5,8 \pm 7,2$	n.s.	$146,2 \pm 73,5$	< 0,001
Gering differenziert (n=95)	$32,8 \pm 18,3$		$4,3 \pm 4,3$		$123,5 \pm 76,8$	
Hoch differenziert (n=20)	$34,8 \pm 13,7$	n.s.	$5,3 \pm 6,0$	n.s.	$133,6 \pm 66,0$	n.s.
Rechtes Colon (n=75)	$37,2 \pm 18,3$		$7,6 \pm 4,7$		$160,2 \pm 73,9$	
Linkes Colon (n=40)	$30,9 \pm 16,8$	0,029	$2,8 \pm 3,7$	< 0,001	$106,5 \pm 68,5$	< 0,001

Tabelle 6: Klinisch-pathologische Eigenschaften nodal negativer Fälle.

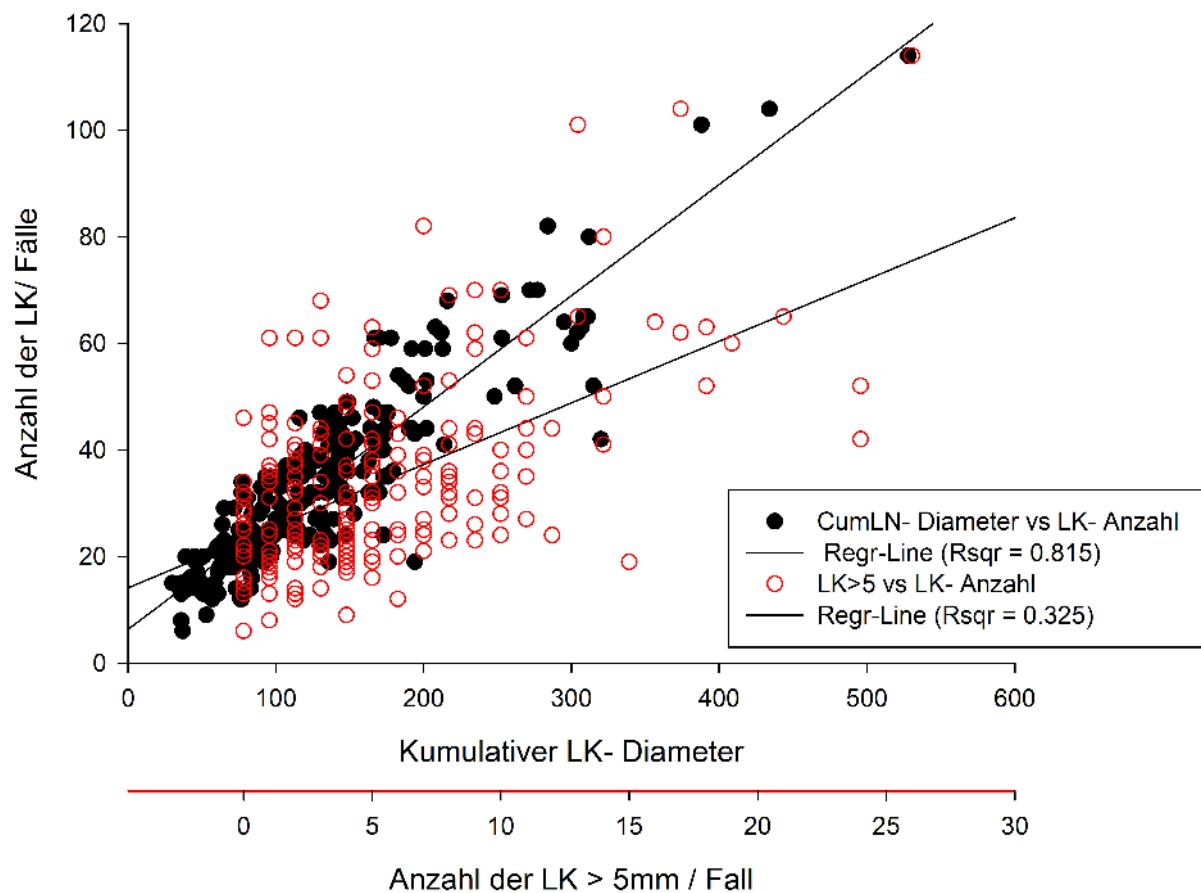


Abbildung 7: Darstellung der Abhangigkeit von tLN und cLND, sowie von tLN und LN5.

ROC-Analyse ROC- Kurve

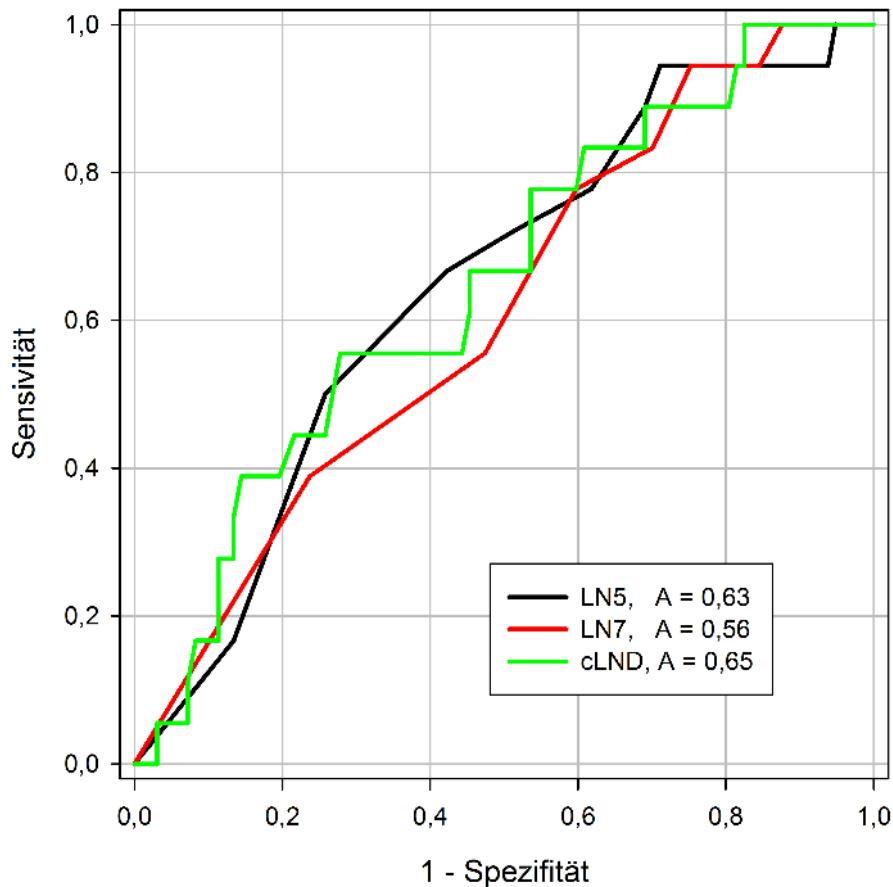


Abbildung 8: stellt die ROC- Kurve dar und beschreibt den Grenzwert der Prognose für Stadium I und II.

Die Untersuchung der linearen Regression zeigt eine starke Abhängigkeit zwischen tLN und cLND ($Rsqr = 0,815$). Im Gegensatz zu cLND war die Abhängigkeit zwischen LN5 und tLN beträchtlich schwächer ($Rsqr = 0,325$). Dies wird in Abbildung 7 verdeutlicht. Da demnach im vorliegenden Kollektiv für den Wert LN5 eine stärkere Unabhängigkeit von der Gesamtzahl der Lymphknoten vorliegt, erschien dieser Wert besser für die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Lymphknotengröße (immunologischer Antwort) und dem Krankheitsverlauf geeignet zu sein.

Die ROC-Analyse wird in Abbildung 8 dargestellt. Sie wurde durchgeführt, um einen bestmöglichen Grenzwert zur Risikoeinschätzung für das Auftreten einer Fernmetastase im Stadium I/II zu ermitteln. Sie zeigten nahezu ähnliche Bereiche unterhalb der Kurve (AUC) von LN5 und cLND mit 0,63 beziehungsweise 0,65. Die optimalen Grenzwerte von LN5 und cLND liegen bei sieben und 148. Wegen der geringen Abhängigkeit von tLN wurden, wie bereits weiter oben ausgeführt, die Überlebensanalysen mit dem Parameter LN5 durchgeführt. Es wurden entsprechend der ROC-Analyse zwei Gruppen gebildet: LN5-niedrig und –hoch, die Fälle mit < 7 LK und mit ≥ 7 LK der entsprechenden Diameter repräsentieren.

Beim Vergleich von fernmetastasierten (pN0 – pM1) und nicht metastasierten Fällen (pN0 – pM0) ergibt sich jeweils ein Unterschied in den Mittelwerten von cLND und LN5, der die Signifikanzschwelle nur knapp verfehlt (cLND: 130 ± 80 vs. 95 ± 43 , $P = 0,052$; LN5: 5 ± 5 vs. 3 ± 3 $P = 0,055$). Dies gilt allerdings nur für dieses hier untersuchte Kollektiv nodal negativer Fälle. Bei den nodal positiven Fällen ergab sich kein relevanter Unterschied.

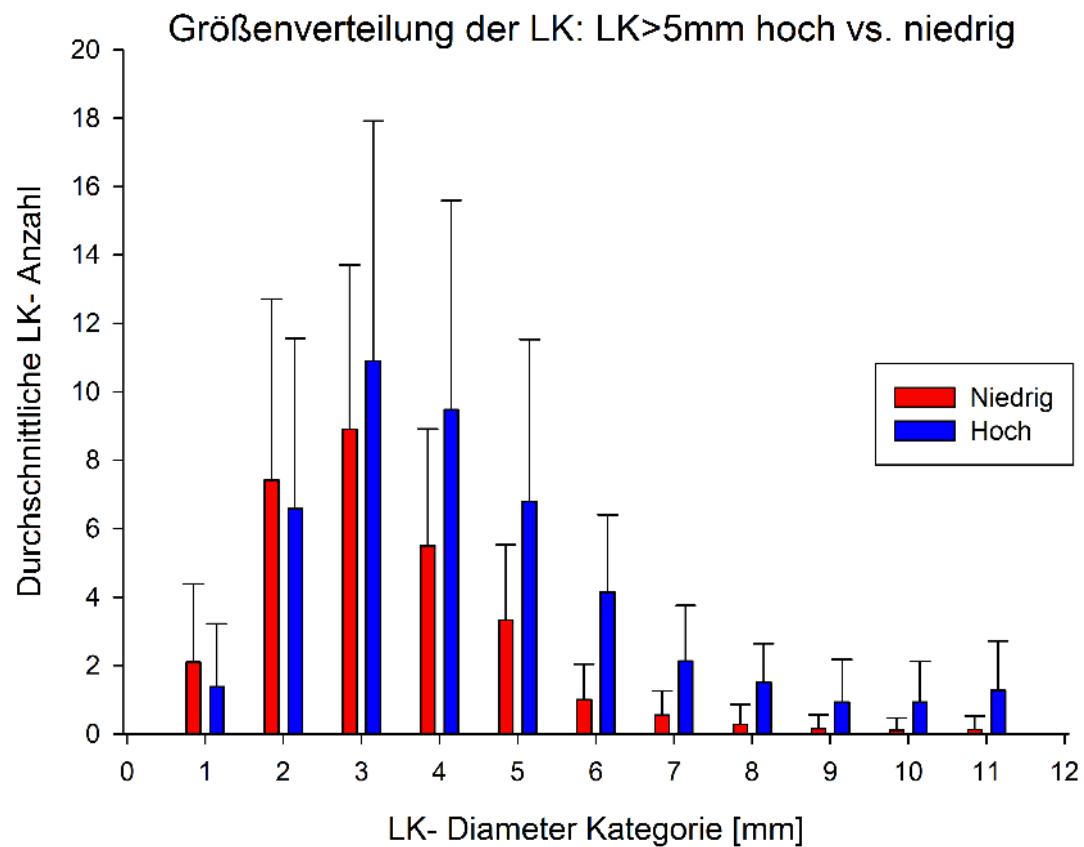


Abbildung 9: Größenverteilung der LK bei LN5-niedrig Gruppe und LN5-hoch Gruppe.

Vergleicht man die Lymphknoten-Größen der LN5-hoch Gruppe mit der Gruppe mit weniger als 7 LK dieser Größe wird deutlich, dass hier offensichtlich eine generelle Verschiebung hin zu größeren Diametern in der LN5-hoch Gruppe stattfindet (Abbildung 9).

Überleben in Abhängigkeit von der Anzahl von Lymphknoten mit Diametern > 5 mm

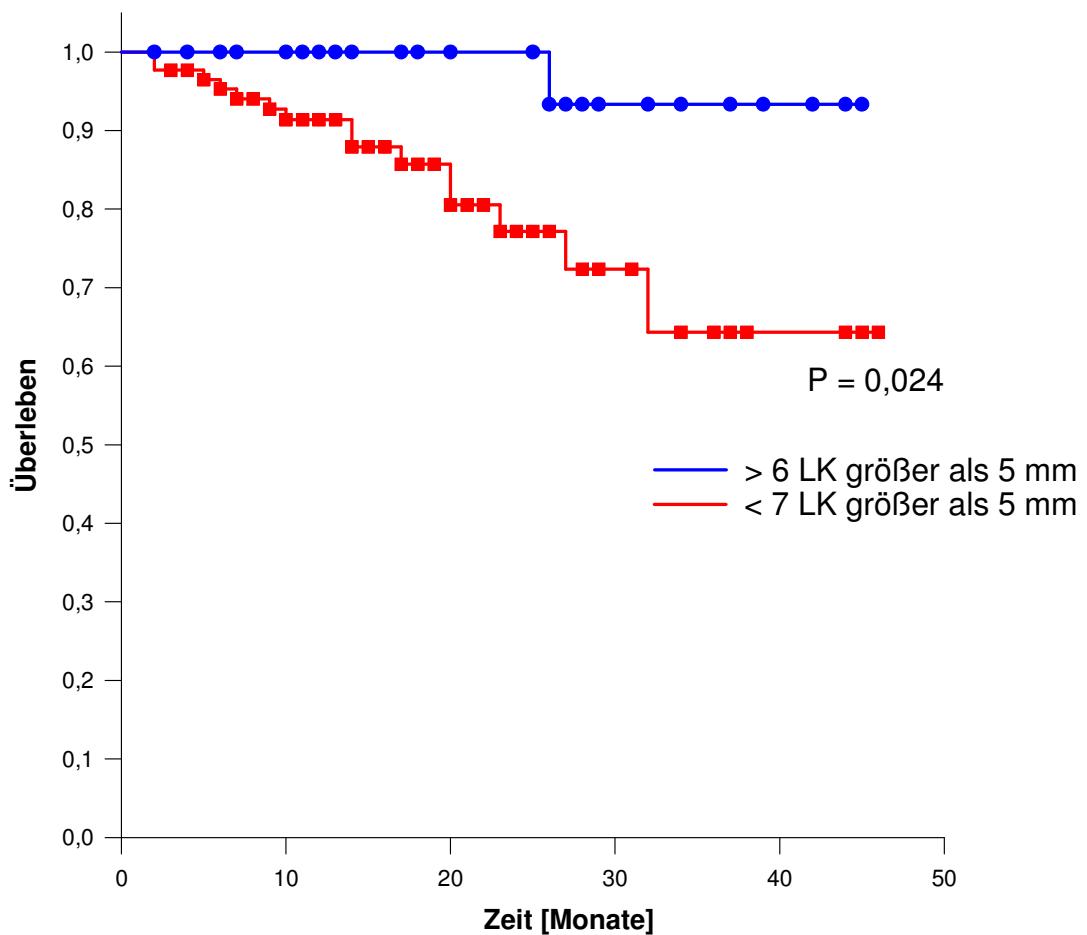


Abbildung 10: Vergleich des Gesamt-Überlebens zwischen Fällen mit ≥ 7 und < 7 Lymphknoten mit Diametern von > 5 mm.

Überleben in Abhängigkeit von der Anzahl von Lymphknoten mit Diametern > 5 mm und vom Tumorstadium

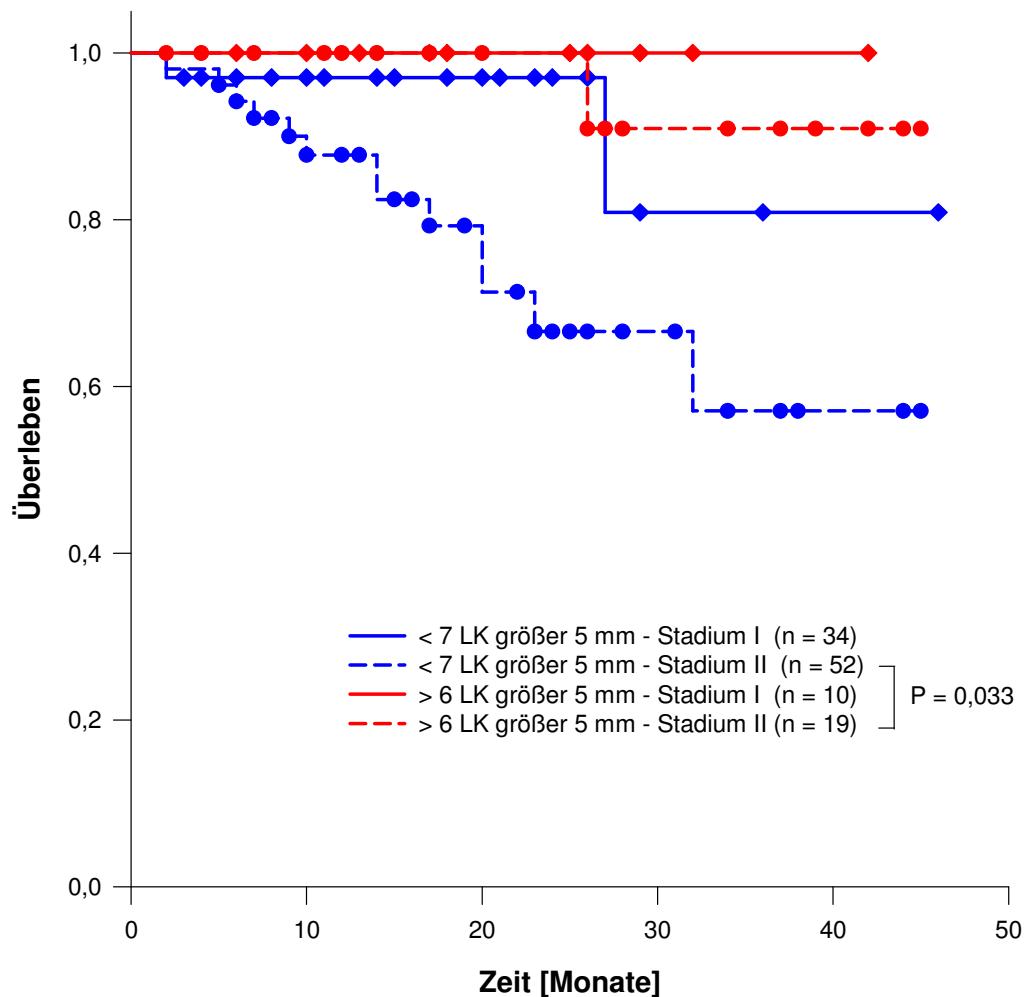


Abbildung 11: Vergleich des Gesamt-Überlebens zwischen Fällen mit ≥ 7 und < 7 Lymphknoten mit Diametern von > 5 mm unter Berücksichtigung des Tumorstadiums.

Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 10 zeigt einen signifikant günstigeren Verlauf ($P = 0,024$) der Fälle mit einer Anzahl von ≥ 7 LK, die einen Diameter von mehr als 5 mm aufweisen. Auch unter Berücksichtigung des Tumorstadiums ergibt der Vergleich der Gruppen einen günstigeren Verlauf für die Fälle mit hoher Anzahl größerer Lymphknoten (Abbildung 11).

Zur Überprüfung der Unabhängigkeit des Faktors LN5 von anderen Variablen wurde eine multivariable Regressionsanalyse durchgeführt. In einem ersten Durchgang wurden die Variablen T-Stadium, histologischer Grad, Tumorlokalisation, LN5 und tLN untersucht. Die Analyse ergab hierbei, dass das Auftreten von Fernmetastasen durch eine lineare Kombination der Variablen T-Stadium ($P < 0.001$) und LN5 ($P = 0.020$) vorhergesagt werden.

Eine zweite Analyse beinhaltet die Variablen LN5, T-Stadium, histologischer Grad, Lymphgefäß- und Blutgefäßeinbruch. Hier erwiesen sich die Faktoren Blutgefäßeinbruch ($P = 0.002$), T-Stadium ($P = 0.004$) und LN5 ($P = 0.04$) als unabhängig prädiktiv für das Auftreten von Fernmetastasen.

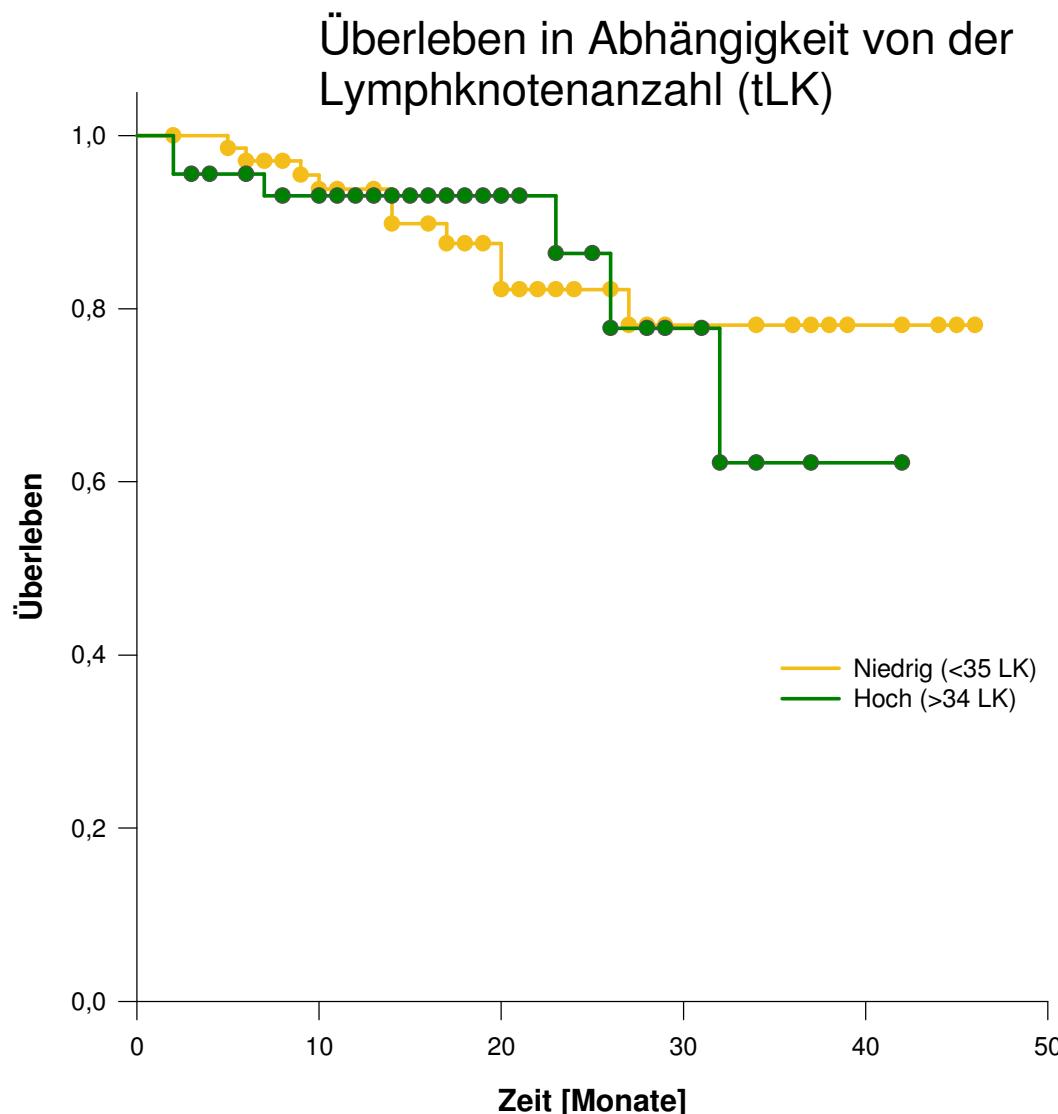


Abbildung 12: Vergleich des Gesamt-Überlebens zwischen Fällen mit ≥ 35 und < 35 aufgefundenen Lymphknoten.

Das Untersuchen einer überdurchschnittlich hohen Anzahl von Lymphknoten im hier vorliegenden Kollektiv zeigte keinen prognostischen Effekt wie in der Kaplan-Meier-Kurve der Abbildung 12 zu erkennen ist ($P = 0,844$).

Überleben in Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung

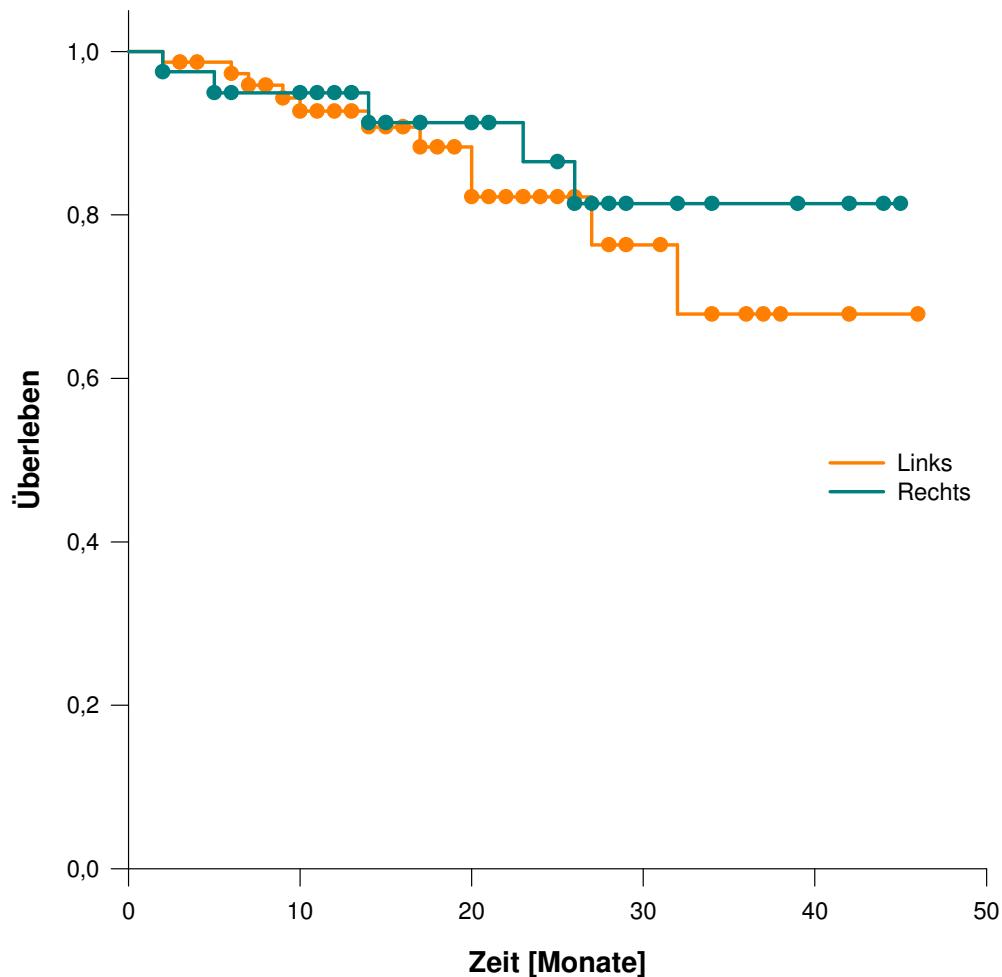


Abbildung 13: Vergleich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Tumorlokalisierung.

Wie aus den Tabellen 5 und 6 hervorgeht, treten Fälle mit hoher Anzahl von Lymphknoten mit Diametern $> 5\text{mm}$ hochsignifikant gehäuft im rechten Kolon auf. Um nun auszuschließen, dass der Überlebensvorteil der LN5-hoch Gruppe eine Funktion der Lokalisation des Tumors ist, wurde eine entsprechende Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt, die in Abbildung 13 zur Darstellung kommt. Diese offenbarte jedoch keinen Unterschied bezüglich der Gesamtlebensdauer zwischen rechts und links lokalisiertem Kolonkarzinom ($P = 0,478$). Informationen hinsichtlich Mikrosatelliten-Status bei jungen Patienten (bis 50 Jahre) und

immunhistochemischer MLH1-Expression bei Patienten über 50 Jahren waren in 26 von 29 Fällen innerhalb der LN5-hoch Gruppe verfügbar. Es ließ sich ein Verlust von MLH1 oder Mikrosatelliteninstabilität in sieben Fällen nachweisen. Diese Fälle wichen jedoch innerhalb dieser Gruppe hinsichtlich der Anzahl von LK > 5mm nicht signifikant von mikrosatellitenstabilen Fällen ab.

4. Diskussion

Um bei kolorektalen Kolonkarzinomen eine möglichst genaue Prognoseabschätzung gewährleisten zu können und eine damit verbundene korrekte Therapieentscheidung zu treffen, ist das LK-Staging von größter Bedeutung (43).

Während sich eine große Anzahl von Studien mit dem Zusammenhang von LK-Anzahl und Krankheitsverlauf (44), sowie dem LK-Verhältnis befassen (befallene LK / aufgefundenen LK) (45, 46) wurde ein möglicher Einfluss der Größe der LK auf den Krankheitsverlauf in Studien kaum untersucht.

Da am Institut für Pathologie am Klinikum Augsburg seit 2007 Kolonpräparate nahezu ausschließlich unter Verwendung erweiterter Präparationstechniken (Methylenblau-Technik, Fettaufhellungstechnik) untersucht werden, steht dort ein relativ großes Kollektiv mit sehr hohen Lymphknotenzahlen zur Verfügung. Pro Fall wurde im hier untersuchten Kollektiv eine mittlere LK-Anzahl von 33 ± 17 LK erreicht.

Märkl et al. konnte in zwei Studien den Erfolg der Methylenblau-Technik beim Kolonkarzinom nachweisen (13, 26). Es war möglich, durch die Blaufärbung der LK vor allem bei LK mittlerer Größe einen hochsignifikanten Unterschied zu konventionellen Techniken zu erreichen. Darüber hinaus wurde die Tauglichkeit der relativ neuen Technik von mehreren anderen Gruppen überprüft und bestätigt (47-51). Der positive Effekt der Fettaufhellungsmethode auf die Lymphknotenausbeute konnte ebenfalls in mehreren Studien nachgewiesen werden (36, 52, 53).

Die hier vorliegende Arbeit behandelt zwei verschiedene Themenbereiche. Im ersten Teil geht es vor allem um folgende Fragestellungen: Wie gestaltet sich die LK-Größenverteilung und welche Rolle wird den großen LK zugetragen? Welche LK (Diameter) sind häufiger von Metastasen befallen? Gibt es einen Unterschied bei der Größenverteilung nodal-positiver und

nodal-negativer Fälle? Und spielen darüber hinaus winzig kleine LK ($\leq 1\text{mm}$) überhaupt irgendeine Rolle?

Der zweite Teil der Studie untersucht den Zusammenhang zwischen der LK-Größe und dem anschließenden klinischen Verlauf.

Wichtig zu erwähnen ist hier noch die Tatsache, dass diese Studie ausschließlich an einem singulären Zentrum durchgeführt wurde. Somit waren Operationsverfahren der Chirurgen, sowie die Anwendung einer Standard-Präpariertechnik durch den Pathologen viel stärker standardisiert als dies in großen Registerstudien zu erwarten wäre. Es ist somit anzunehmen, dass der Einfluss von Störfaktoren geringer ist.

Da die LK-Ausbeute, wie zahlreiche populationsbasierte Studien belegen, in der täglichen Praxis deutlich geringer ausfällt (13, 26, 32, 33, 54), entsteht die Frage, ob man die Ergebnisse dieser Studie überhaupt auf den klinischen Alltag übertragen kann. Welche Rolle die LK-Größe tatsächlich spielt, kann jedoch nur anhand einer Fall-Sammlung, welche das Gesamtspektrum aller LK aufweist, untersucht werden. Das Auffinden großer LK wird als leicht angesehen, da diese auch ohne besondere Präpariertechnik gefunden werden können. Somit können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten, was den Einfluss großer beziehungsweise vergrößerter LK anbelangt, sicherlich gut auf die Situation in der Praxis übertragen werden.

In dieser Studie wurden ausschließlich Kolonkarzinome untersucht, da es bei der häufig angewandten präoperativen Strahlentherapie bei rektalen Karzinomen zu einer starken Beeinflussung der Anzahl aufzufindender Lymphknoten kommt (33) und so ein schwer einzugrenzender systemischer Fehler (Bias) kaum auszuschließen ist.

Zur Größenverteilung der LK lässt sich sagen, dass eindeutig die meisten LK in den Gruppen zwischen > 1 und ≤ 5 mm gefunden wurden. Dies wird in Abbildung 3 deutlich. Interessant festzustellen ist die Tatsache, dass es kaum einen Unterschied in der Größenverteilung zwischen nodal positiven und nodal negativen Fällen zu verzeichnen gibt (Abbildung 4). Die einzige Ausnahme ist die Gruppe der LK zwischen 3 und 4 mm, welche in nodal-positiven Fällen signifikant größer ist ($P = 0,041$).

In den Untersuchungen von Cserni et al. und Mönig et al. wurde ein durchschnittlich größerer LK-Diameter bei nodal positiven Fällen festgestellt (45, 55). Cserni et al. fanden mittlere Diameter von 4,7 mm und 4,3 mm in nodal positiven beziehungsweise nodal negativen LK ($P<0,01$). Ähnlich sind die Ergebnisse von Mönig und Mitarbeiter. Hier lag der durchschnittliche Diameter der nicht befallenen LK bei 3,9 mm, während der Mittelwert der befallenen LK 5,9 mm betrug ($P < 0,0001$). Da die Differenzen zwischen befallenen und nicht-befallenen LK-Größen nur sehr gering ausfallen, sind diese jedoch eher kaum von klinischer Bedeutung. In der hier vorliegenden Studie wurden praktisch alle Lymphknoten dieser Größe in einer Gruppe (4 – 6 mm) zusammengefasst.

Mit Zunahme der LK-Größe steigt die Wahrscheinlichkeit, eine Metastase zu entdecken (Abbildung 5). In dieser Studie konnte andererseits festgestellt werden, dass etwa 50% aller Metastasen in $LK < 6$ mm vorkamen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Cserni et al. (56). Hier konnten 53% aller Metastasen in $LK < 5$ mm nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Untersuchung konnten Metastasen in allen LK-Größen entdeckt werden. Die Metastasen-Rate in der Gruppe der $LK > 10$ mm ist am höchsten, beträgt allerdings nur 28%. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass 72% aller sehr großen LK metastasenfrei sind. 73% der metastasierten LK haben einen Diameter, der geringer als 10mm ist (Abbildung 4).

Gerade weil das radiologische LK-Staging hauptsächlich auf dem Nachweis großer LK (> 10mm) basiert, ist dieses Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen von hoher klinischer Bedeutung. Es ist somit durchaus erklärbar, weshalb die Vorhersagekraft der röntgenologischen bzw. sonographischen Bildgebung als gering einzustufen ist. So beschreiben Puli et al. in ihrer Arbeit, dass bildgebende Verfahren, wie das CT oder MRT bei der Sicherstellung eines von Metastasen befallenen LK beim Rektumkarzinom keine überzeugenden Ergebnisse liefern konnten. Die Vorhersagegenauigkeit lag beim CT bei 55 - 65% und beim MRT bei 60 - 65%. Auf der anderen Seite konnte mit dem endoskopischen Ultraschall eine Vorhersagegenauigkeit von ca. 75% erreicht werden (57). In einer Studie von Hermanek et al. werden 904 LK makroskopisch (Untersuchung nach Farbe, Größe und Konsistenz) als tumorfrei bewertet, davon werden jedoch nach histologischer Untersuchung in 208 der LK Metastasen gefunden (23%) (45, 58). Es ist daher kaum verwunderlich, dass radiologische Methoden kaum Werte von über 75% erreichen, wenn schon die makroskopische und palpatorische Untersuchung exstirpierter LK keine akzeptablen Ergebnisse liefert. Beim Vergleich der radiologischen mit den histopathologischen Messwerten ist zu bedenken, dass nahezu alle Gewebearten während des histologischen Prozesses schrumpfen. Auf der Grundlage eigener unveröffentlichter Untersuchungen, kann dieser Schrumpfungseffekt für Lymphknoten auf ca. 10% geschätzt werden. Dieser Effekt konnte ebenfalls von Mönig et al. nachgewiesen werden. Zudem stellten diese fest, dass kein Unterschied bei der Schrumpfung zwischen nodal positiven und nodal negativen Fällen festzustellen ist (45). Wenn man diese Tatsache berücksichtigt, ist davon auszugehen, dass ein histologisch mit 8 bis 10 mm gemessener LK tatsächlich bereits oberhalb der 10 mm Schwelle liegt. Kalkuliert man diesen systematischen Messfehler beim Vergleich der Daten ein, fällt die Spezifität, die mit dem 10 mm Grenzwert bezüglich der Diagnose von LK-Metastasen zu erreichen ist, noch weiter ab. Solange radiologisch keine besseren Kriterien als

der LK-Diameter zur Verfügung stehen, bleiben auf der einen Seite viele Metastasen unentdeckt. Auf der anderen Seite ist mit einer hohen Zahl von falsch positiven Befunden zu rechnen.

Obwohl die histologische Sicherung jedes weiteren positiven LK eine Auswirkung auf die Patientenprognose hat und deshalb bedeutend ist, ist das Auffinden des ersten positiven LK von größter Bedeutung, da dieser die Therapieentscheidung verändert.

Die klinische Bedeutung eines beispielsweise lediglich 3mm durchmessenden, positiven LK ist je nachdem, ob es sich um eine singuläre Metastase oder eine von multiplen zum Teil auch größeren Metastasen handelt, jeweils völlig anders zu bewerten. Im Falle eines isolierten Befalles würde diese hypothetisch angenommene Metastase in einem kleinen Lymphknoten die Indikation zur adjuvanten Therapie darstellen. In Gegenwart weiterer Metastasen in großen LK hätte diese zuvor erwähnte Metastase hingegen praktisch keine klinische Relevanz. Aus diesem Grund wurden die Diameter des jeweils größten LK in jedem nodal positiven Fall untersucht. Bei der Analyse zeigte sich, dass in den meisten nodal positiven Fällen mindestens einer der befallenen LK einen Diameter $> 5\text{mm}$ aufweist, und deshalb während der pathologischen Präparation leicht zu finden sein müsste. Nichtsdestotrotz zeigt ein vergleichsweise geringerer Anteil an Fällen ausschließlich sehr kleine befallene LK (ca. 2,5%, Abbildung 6), die im Rahmen einer eher oberflächlichen Untersuchung leicht übersehen werden können. Ein sogenanntes „Understaging“ ist die Folge. Das Auffinden kleiner LK ist vor allem für ein genaues Substaging wichtig. 53% der den finalen LK-Status der aktuellen TNM-Klassifikation bestimmenden LK sind kleiner als 6mm. Andererseits spielen LK, die kleiner als 1mm sind, in diesem Kontext praktisch keine Rolle. Nur 2 von 305 befallenen LK waren derart klein. Dieses Ergebnis lässt sich in Abbildung 5 nachvollziehen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Brown et al. berichtet. In deren Artikel über die Effizienz

der LK-Präparation kam heraus, dass nach Kompleteinbettung des parakolischen Fettgewebes 50% aller LK kleiner 1mm war, während sogar 82% einen Diameter von unter 2mm verzeichneten. 75% aller nodal positiver LK waren $\geq 2\text{mm}$ (53).

In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass im Stadium II aber auch im Stadium III die Anzahl untersuchter LK von großer prognostischer Bedeutung ist (15, 28, 30, 41, 55, 59-64). Der zweite Teil der hier vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie dieser Effekt zu erklären sein könnte.

Es gibt grundsätzlich drei potentielle Faktoren, welche die LK-Ausbeute und Prognose beeinflussen könnten: Der Chirurg, der Pathologe und der Patient mit seiner individuellen Erkrankung und seiner allgemeinen Konstitution (32, 33). Die Strahlentherapie hat, wie bereits oben beschrieben, beim Kolonkarzinom keinen Stellenwert.

Eine unzureichende chirurgische Technik kann zu einer unvollständigen LK-Resektion führen. Die klinische Bedeutung einer optimalen chirurgischen Technik wurde von Hohenberger et al. verdeutlicht. Sie stellten fest, dass mit einer Operationstechnik analog zur TME (Totalen Mesorektalen Exzision) und der Kenntnis über die genaue Verteilung der LK entlang der Lymphabflusswege bzw. der versorgenden Gefäße eine maximale LK-Ausbeute erzielt werden kann. Da die Anzahl gefundener LK mit der Prognose korreliert, könnte somit eine klinische Bedeutung der Operationstechnik postuliert werden (33, 65). Wong et al. untersuchten in ihrer Studie die LK-Ausbeute diverser Krankenhäuser in den USA. Sie stellten die Frage, ob LK-Zahlen ein Indikator für eine bessere Lebenserwartung sei. Es stellte sich heraus, dass die 5-JÜR (66), in Zentren mit deutlich mehr untersuchten LK im Vergleich zu Kliniken mit geringeren Zahlen, nicht signifikant höher war, was eigentlich zu erwarten gewesen wär. Trotz der erheblichen Unterschiede zwischen den Krankenhäusern hinsichtlich der LK-Ausbeute ergaben sich keine Unterschiede im Hinblick auf die Rate nodal positiver

Fälle. Erstaunlich ist allerdings, dass nach poolen der Daten aller Kliniken sehr wohl ein signifikant besserer Verlauf für Patienten mit einer Anzahl ≥ 12 untersuchter LK nachgewiesen werden konnte. Wäre hierfür eine unterschiedliche chirurgische Operationstechnik verantwortlich, müsste sich dies in einem Unterschied zwischen den einzelnen Kliniken darstellen, was jedoch nicht der Fall ist, so dass Wong et al. darüber spekulieren, dass solche mögliche Mängel seitens der Chirurgen weitgehend ausschließbar sind (29). Zweifelsohne kann zumindest theoretisch auch der Fall eintreten, dass der Chirurg den Tumor bzw. LK unvollständig entfernt, wobei metastasierte LK in situ belassen werden könnten. In diesem Fall wäre die Folge verhängnisvoll, da es aufgrund des Residualtumors mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Krankheitsprogression kommen würde. Andererseits liegt es auf der Hand, dass nach exzellentem chirurgischem Eingriff der Patient von allen metastasierten LK befreit ist und dadurch eine deutlich verbesserte Lebensprognose hat. Dennoch scheint ein Belassen von metastasierten Lymphknoten nicht beziehungsweise nur sehr selten vorzukommen.

Es ist unbestritten, dass der Pathologe einen erheblichen Einfluss auf die LK-Ausbeute hat. Unabhängig von der chirurgischen Qualität können so unterschiedlich große LK-Zahlen resultieren. Mekenkamp et al. befassten sich mit der Fragestellung in wie weit Chirurg, Pathologe, Patient und Tumor Einfluss auf die LK- Ausbeute bei Rektumkarzinomen nehmen. Die Ergebnisse lassen sich großteils auch auf das Kolonkarzinom übertragen. Sie verdeutlichen, dass sowohl der Chirurg als auch der Pathologe für eine nicht ausreichende LK-Anzahl verantwortlich sein könnten. So hängt die LK-Ausbeute zumindest in einem Teil der Fälle vom Pathologen ab (15, 33). Sorgfalt und der Einsatz von speziellen Methoden wie der Methylenblau-Technik und der Fettaufhellungsmethode spielen daher eine große Rolle(13, 36).

Kerwel und Märkl et al. konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass trotz formal suffizienter LK-Präparation (≥ 12 LK pro Fall) im Rahmen einer Nachpräparation Fälle gefunden werden können, die nachträglich von N0 nach N1 migrieren („Upstaging“) (13, 38, 66).

Die Fragen, die sich hier stellen sind wie oft es zu solch einem Phänomen kommt und ob der Effekt tatsächlich so groß ist, dass sich dadurch die bessere Prognose der Patienten erklären ließe? Wie bereits in der Einleitung beschrieben handelt es sich bei diesem Phänomen um den Stadien-Migrations-Effekt (Will-Rogers-Phänomen). Patienten, welche fälschlicherweise in Stadium II des Kolonkarzinoms eingeteilt wurden, korrekterweise jedoch im Stadium III befinden (wegen nicht ausreichender Anzahl untersuchter LK durch unzureichende histologische Aufarbeitung), verschlechtern die Überlebensrate in Stadium II. Wenn schließlich mehr LK beurteilt werden können, steigt der These folgend die Wahrscheinlichkeit die Fälle korrekt zu klassifizieren. Vergleicht man nun zwei Kollektive mit unterschiedlicher Klassifizierungsgenauigkeit, so würde sich die Prognose sowohl für Stadium II als auch III in dem genauer klassifizierten Kollektiv verbessern, da falsch nodal-negativ klassifizierte Fälle im Stadium II nicht auftreten würden. Die Schwere würde sich aufgrund einer höheren Anzahl von Fällen mit nur einer beziehungsweise sehr wenigen Metastasen im Stadium III im Mittel verringern. (42).

Man kann annehmen, dass in erster Linie kleine LK-Metastasen dem Auffinden entgehen. Unsere Daten zeigen, dass dieses Risiko etwa 9% in metastasierten Fällen und 3% im gesamten Kollektiv beträgt.

Basierend auf empirischen Daten (Märkl; unveröffentlicht) wird die Rate des „Understaging“ in der täglichen Praxis auf einen Bereich von 2-5% geschätzt. Dieser Betrag erscheint jedoch viel zu klein, um als Hauptgrund für den relativ starken prognostischen Effekt der LK-Anzahl in Frage zu kommen. Swanson et al. stellte eine 5-JÜR von 69% bei Patienten mit einem

pT3N0 gesicherten Kolonkarzinom fest, wenn weniger als 5 LK untersucht wurden. Im Vergleich steigt bei der Untersuchung von ≥ 30 LK die 5-JÜR auf 90% an (15).

Unter der Berücksichtigung, dass diese vermeintlich nodal negativen Patienten eventuell keine adjuvante Therapie erhalten haben, hätten jedoch etwa 90%¹ der vorliegenden Metastasen verborgen bleiben müssen, um dieses ungünstige Resultat zu erklären. Dieser Prozentsatz erscheint jedoch unrealistisch hoch.

In einer unserer neuen klinikinternen Studie untersuchte man, anhand zweier Gruppen, ob eine größere LK-Ausbeute mit einer höheren Sensitivität beim Auffinden von LK- Metastasen einhergeht, und damit die Patientenprognose verbessert wird. Gruppe 1 beinhaltet 669 Kolonkarzinom-Fälle, welche mit fortgeschrittenen Techniken (MB-Technik) untersucht wurden; Gruppe 2 mit 663 KK-Fällen, die mit konventionellen Methoden untersucht wurden. Man konnte zwar, Dank dem Auffinden einer deutlich größeren LK- Anzahl (34 ± 17 vs. 13 ± 5), ein suffizientes Staging in nahezu allen Fällen sichern (98% vs. 62%), jedoch konnten nicht mehr Metastasen festgestellt werden. Die Lebensprognose betreffend konnte in beiden Gruppen kein Unterschied festgestellt werden (67).

Simunovic und Baxter gehen in ihrem Leitartikel zum Thema der prognostischen LK- Ausbeute davon aus, dass es eine bislang „unbekannte“ Störvariable (evtl. immunologischer Faktor, systemischer Faktor) gibt, welche die wahre Erklärung für den Zusammenhang zwischen LK-Ausbeute und Krankheitsverlauf ist (68).

Es ist nun davon auszugehen, dass der Patient oder besser gesagt die Patientenreaktion auf die Krebserkrankung eine sogenannte „Störvariable“ sein könnte.

Einzelne Autoren spekulierten in der Vergangenheit darüber, dass der Erfolg der LK- Präparation durch die LK-Größe beeinflusst werden könnte (32, 59, 69). In der Studie von Søreide et al. wird beschrieben, dass die gewünschte Anzahl der zu untersuchenden LK von

¹ Dieser Wert beruht auf der Überlegung, dass ein entsprechendes Kollektiv aus zwei Subgruppen bestünde. 90% der Fälle mit Stage III Karzinomen (erwartetes 5-JÜR: 60%); 10% der Fälle mit Stage II Karzinomen (erwartetes 5-JÜR: 90%). Hypothetische 5-JÜR des Gesamt-Kollektivs: 63%

≥ 12 LK durch wichtige Faktoren beeinflusst wird. Vor allem große LK erleichterten die Untersuchung. Eine wichtige Rolle für das Auffinden von LK spielten aber auch rechtsseitige Tumorlokalisierung, geringer Differenzierungsgrad und Tumoren mit MSI (70).

Große LK könnten Ausdruck einer verstärkten Immunabwehr sein. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass das Auftreten großer LK mit einer besseren Prognose in der Subgruppe nodal negativer Fälle ($n = 115$) korreliert.

Ursprünglich bestand die Annahme, dass der Parameter cLND (kumulativer LK-Diameter), der sich aus der Summe aller LK-Diameter eines Falles errechnet, den möglichen Zusammenhang zwischen Lymphknotengröße und Prognose gut abbilden könnte. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die Größenverteilung mit diesem Parameter nicht sehr gut ausdrücken ließ. Hingegen zeigte der Parameter einen sehr starken Zusammenhang zur totalen LK-Anzahl. Gesucht wurde jedoch ein Parameter, der die Ausbildung großer Lymphknoten widerspiegelt. Der Wert cLND wurde im Wesentlichen von der großen Anzahl der kleinen Lymphknoten beeinflusst. Die im Vergleich eher geringe Zahl großer Lymphknoten trat in den Hintergrund. Im Gegensatz dazu lieferte das einfache Zählen von Lymphknoten mit einem Diameter $> 5\text{mm}$ eine von der Gesamtlymphknotenanzahl unabhängige Aussage (Abbildung 7).

Als Schwellenwert wurde nach Analyse mittels Grenzwertoptimierungskurve (sog. Receiver Operating Characteristic–ROC) (Abbildung 8) ein Wert von ≥ 7 LK mit einem Diameter $> 5\text{mm}$ ermittelt (LN5-hoch). Von den insgesamt 115 Fällen nodal negativer Kolonkarzinom-Fälle fielen 86 in die LN5-niedrig Gruppe und 29 in die LN5-hoch Gruppe (Tabelle 5).

In der Tat gab es in der LN5-hoch Gruppe nur einen Fall (3,3%) mit fortgeschrittenener Erkrankung und Fernmetastasen. Es handelt sich bei diesem einzelnen progressiven Fall um eine 74 Jahre alte Patientin, die trotz Tumorprogression 42 Monaten nach Erstdiagnose noch am Leben ist. Im Vergleich dazu traten in der LN5-niedrig Gruppe 16 Fälle (19%) mit

progressivem Verlauf auf. Dieser Unterschied verfehlte mit einem $P = 0.072$ trotz einer relativ geringen Fallzahl nur knapp das Signifikanz-Niveau. Anhand der Kaplan-Meier-Analyse kann bei der LN5-hoch Gruppe im Vergleich zur LN5-niedrig Gruppe ein signifikant besserer Krankheitsverlauf nachgewiesen werden (Abbildungen 10 und 11). Beim Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter der LN5-hoch Gruppe mit der LN5-niedrig Gruppe zeigt sich, dass es einen auffälligen Unterschied bezüglich der Lokalisation des Tumors gibt. Die LN5-hoch Gruppe zeigte hochsignifikant häufiger rechts als links lokalisierte Kolonkarzinome. Interessanterweise ergab sich jedoch in der vorliegenden Arbeit beim generellen Vergleich von rechts- mit linksseitigen Karzinomen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebensrate. Der günstigere Verlauf der Erkrankung ist offensichtlich nicht zumindest jedoch schwächer mit der Lokalisation assoziiert. Dies lässt sich aus Abbildung 13 der Kaplan-Meier-Analyse nachvollziehen. Mehrere Autoren berichteten, dass die rechte Lokalisation mit einer höheren Anzahl von LK korreliert (29, 32, 59, 69, 71, 72). Auch in der Studie von Søreide et al. konnte festgestellt werden, dass beim rechtslokalisierten Kolonkarzinom signifikant mehr LK entdeckt wurden (70). Der hier nachgewiesene Zusammenhang zwischen rechtsseitiger Lokalisation und Auftreten großer LK könnte die Erklärung für die von zahlreichen Autoren ermittelte erhöhte LK-Ausbeute bei Karzinomen in dieser Lokalisation darstellen. Durch die nachgewiesene Verbindung zwischen dem rechtsseitigen Kolonkarzinom und der starken Immunantwort in Form einer Vergrößerung von LK kommt die Frage auf, ob hier womöglich ein Zusammenhang mit dem Auftreten mikrosatelliteninstabiler Tumoren (MSI) besteht. Diese treten bekanntermaßen vorwiegend in rechter Lokalisation auf und lösen eine starke lymphozytäre Reaktion aus. Dies wird beispielsweise durch die Daten von Søreide et al. unterstützt, die eine deutlich höhere LK-Rate (≥ 12) bei MSI-Fällen nachweisen konnten. Tatsächlich konnte hier eine suffiziente LK-Rate von mindestens 12 LK bei 54% aller MSI Karzinome erreicht werden, während in

mikrosatellitenstabilen Tumoren nur in 36% aller Fälle ein suffizientes LK-Staging durchgeführt werden konnte. MSI wurde in deren Studie als ein unabhängiger Faktor identifiziert, der mit adäquater LK-Zahl in Stadium II und Stadium III einhergeht, jedoch keinen Zusammenhang mit dem Vorliegen von Metastasen hat. Auch dies unterstützt die These eines Einflusses einer immunologischen Antwort auf die LK-Ausbeute (70).

Bei der Untersuchung der LN5-hoch Gruppe konnten 7 MSI Fälle nachgewiesen werden. Es gibt allerdings noch eine Gruppe von mindestens 17 Fällen, bei der es keine Erklärung für die verstärkte lymphatische Antwort gibt. Möglicherweise stellt diese Gruppe eine bestimmte Untergruppe des Kolonkarzinoms dar, welche bevorzugt rechtsseitig lokalisiert ist und zudem noch einen günstigeren Krankheitsverlauf zeigt.

Es sollte an dieser Stelle noch einmal zur Geltung gebracht werden, dass die LK-Anzahl ein prognostischer Faktor nur für das Kolonkarzinom, nicht aber für das Rektumkarzinom ist. Dies unterstützt weiterhin die These, dass der Überlebensvorteil vor allen Dingen in einer Gruppe von überwiegend rechtsseitig gelegenen Tumoren auftritt, die sich hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens von linksseitigen Kolonkarzinomen und Rektumkarzinomen unterscheiden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die LK-Größe kein verlässlicher Indikator für das Auftreten von LK-Metastasen ist. Da winzige LK (< 1mm) augenscheinlich keine Rolle spielen, sollten diese in der Routinediagnostik nicht gewertet werden und im histopathologischen Bericht nicht zur Gesamtzahl der aufgefundenen Lymphknoten addiert werden. Die Wertung derart kleiner Lymphknoten führt eher zur Schönung der Befunde ggf. mit einer Verschleierung eines in Wirklichkeit vorliegenden insuffizienten LK-Stagings.

Hingegen ist das Auffinden relativ kleiner LK (1 - 5mm) für ein genaues LK-Substaging sehr wichtig. Darüber hinaus deuten unsere Daten auf eine prognostische Bedeutsamkeit der LK-

Größe hin. Der vielfach nachgewiesene Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl untersuchter Lymphknoten und einer günstigen Prognose ist sehr wahrscheinlich nicht in der Vermeidung eines sogenannten Understagings begründet. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit und der bestehenden Literatur erscheint ein immunologischer Effekt sehr viel plausibler. Demnach führt eine starke und offensichtlich effektive Immunantwort zu einer Hyperplasie regionärer Lymphknoten. Derartig veränderte Lymphknoten sind vom Pathologen leicht und in großer Anzahl aufzufinden, was wiederum den Zusammenhang mit der erfolgreichen Lymphknotenpräparation herstellt. Die Anzahl der Lymphknoten könnte so ein Gradmesser dieser immunologischen Reaktion darstellen.

5. Zusammenfassung

Die klinische Bedeutung der Lymphknotengröße bei Kolonkarzinomen wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Nur bei röntgenologischen Untersuchungen wird der LK-Größe üblicherweise Bedeutung geschenkt; so werden LK mit einem Diameter $\geq 10\text{mm}$ als pathologisch gewertet. Vereinzelte Studien, welche sich mit dieser Thematik befassten, gehen jedoch davon aus, dass die LK-Größe kein verlässlicher Indikator für das Vorhandensein von Metastasen ist. Des Weiteren vermuten wir, dass eine zunehmende LK-Größe mit einer günstigeren Prognose einhergeht. Bei der Durchführung einer morphometrischen Studie untersuchten wir die klinische Bedeutung der LK-Größe bei Kolonkarzinomen bezüglich Metastasenvorkommen und der Lebensprognose. Wir verwandten eine Sammlung von 237 Patientenfällen mit herausragender LK-Ausbeute (durchschnittliche LK-Ausbeute: 33 ± 17). Die Größenverteilung der nodal positiven und nodal negativen Fälle war nahezu identisch. Von den insgesamt 305 aufgefundenen Metastasen wurden 151 in LK-Diametern $\leq 5\text{mm}$ festgestellt (49,5%). In nur 25% aller LK $> 10\text{mm}$ konnten Metastasen entdeckt werden. Winzige Lymphknoten waren kaum betroffen (zwei von 81 Fällen). In 67% der Fälle war der größte befallene LK $< 10\text{mm}$. Für die Untersuchung der prognostischen Bedeutung der LK-Größe wurde eine Untergruppe von 115 nodal negativen Fällen (in Stadium I und II) gebildet. Das Vorkommen von ≥ 7 LK $> 5\text{mm}$ pro Fall war mit einer signifikant besseren Überlebensrate vergesellschaftet.

Unsere Daten verdeutlichen, dass die LK-Größe kein passender Faktor für das präoperative LK-Staging ist. Winzige LK spielen praktisch keine Rolle für ein histopathologisches LK-Staging. So könnten also große LK in Stadium I und II auf einen wesentlich günstigeren Krankheitsverlauf hindeuten.

6. Literatur

1. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, et al. [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. Z Gastroenterol. 2008 Aug;46(8):799-840.
2. Spatz H. AM. 42/6: 260–266Surgery of colon cancer(conventional open and laparoscopic surgery). European surgery 2010. 2010:42/6: 260–6.
3. Schmoll HJ AD, Lang A, Graeven U. Kolorektales Karzinom: Defintion. 2007.
4. Husmann G, Kaatsch, P., Katalinic, A., Bertz, J., Kraywinkel, K. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert-Koch- Institut(Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin, 2010. 2010:P. 36- 9.
5. Jass J, Smith, M. *sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer- a morphological, mucin and lectin histochemical study*. Pathology 24. 1992:233-42.
6. Yao T, Nishiyama, K., Oya, M. et al. *Multiple 'serrated adenocarcinomas' of the colon with a cell lineage common to metaplastic polyp and serrated adenoma. Case report of a new subtype of colonic adenocarcinoma with gastric differentiation*. J Pathol 190. 2000:444- 9.
7. Kirchner T, Reu, S. *Developement of molecular- pathologic entities of colorectal cancer*. Pathologe 29. 2008:264- 9.
8. Jass JR. *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. Histopathology. 2007 Jan;50(1):113-30.
9. Tateyama H, Li, W., Takahashi, E. et al. *Apoptosis index and apoptosis- related antigen expression in serrated adenoma of the colorectum: the saw- toothed structure may be related to inhibition of apoptosis*. Am J Surg Pathol 26. 2002:249- 56.
10. Toyota M, Ahuja, N., Ohe- Toyota, M. et al. *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A 96. 1999:8681- 6.
11. Heinemann K. *Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC(Hereditäres Kolorektal-Karzinom ohne generalisierte Polypose)*. schweizerische Ärztezeitung 81, Nr 36. 2000.
12. Odze R, Goldblum, J. *Colitis- associated Neoplasia*. Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. second Edition:634.

13. Märkl B, Kerwel TG, Jähnig HG, Oruzio D, Arnholdt HM, Schöler C, et al. *Methylene Blue-Assisted Lymph Node Dissection in Colon Specimens: A Prospective, Randomized Study*. Am J Clin Pathol. 2008 Dec 1;130(6):913-9.
14. Tumorzentrum Freiburg R, G., Hopt, U.Otto, F., Deschler, B. et al. *Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Kolorektales Karzinom*. Tumorzentrum Freiburg.
15. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. *The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined*. Ann Surg Oncol. 2003 Jan-Feb;10(1):65-71.
16. Schrag D, Rifas-Shiman S, Saltz L, Bach PB, Begg CB. *Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer*. J Clin Oncol. 2002 Oct 1;20(19):3999-4005.
17. Investigators IB. *Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2)* Investigators. J Clin Oncol. 1999 May;17(5):1356-63.
18. Bosman FT, Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D., editor. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4. ed. Lyon: WHO; 2010.
19. Odze R, Goldblum, J. *Conventionel adenoma, pathologic features*. Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas, 2 Edition. 2009.
20. Renz-Polster H, Krautzig, S.,Braun, J., editor. Basislehrbuch Innere Medizin4. Auflage.
21. Steinke V EC, Büttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P. *Heditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)/ Lynch Syndrome*. Deutsches Ärzteblatt International. 2013;3:32- 8.
22. Bosman FT, Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D., editor. Lynch Syndrome. Lyon2010.
23. Wittekind Cea, editor. TNM- Klassifikationen maligner Tumoren, 5. Auflage1997.
24. Wittekind Cea, editor. TNM- Klassifikationen maligner Tumoren, 7. Auflage2010.
25. Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sabin LH. *TNM residual tumor classification revisited*. Cancer. 2002 May 1;94(9):2511-6.

26. Märkl B, Kerwel T, Jähnig H, Anthuber M, Arnholdt H. *[Lymph node preparation in colorectal cancer : Ex vivo methylene blue injection as a novel technique to improve lymph node visualization.]* J. Pathologe. 2008 Jul;29(4):274-9.
27. Edler D, Ohrling K, Hallstrom M, Karlberg M, Ragnhammar P. *The number of analyzed lymph nodes - a prognostic factor in colorectal cancer.* Acta Oncol. 2007;46(7):975-81.
28. Bui L, Rempel E, Reeson D, Simunovic M. *Lymph node counts, rates of positive lymph nodes, and patient survival for colon cancer surgery in Ontario, Canada: a population-based study.* J Surg Oncol. 2006 May 1;93(6):439-45.
29. Wong SL, Ji H, Hollenbeck BK, Morris AM, Baser O, Birkmeyer JD. *Hospital lymph node examination rates and survival after resection for colon cancer.* JAMA. 2007 Nov 14;298(18):2149-54.
30. Goldstein NS. *Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities.* Am J Surg Pathol. 2002 Feb;26(2):179-89.
31. Scott KW, Grace RH. *Detection of lymph node metastases in colorectal carcinoma before and after fat clearance.* Br J Surg. 1989 Nov;76(11):1165-7.
32. Johnson PM, Malatjalian D, Porter GA. *Adequacy of nodal harvest in colorectal cancer: a consecutive cohort study.* J Gastrointest Surg. 2002 Nov-Dec;6(6):883-88; discussion 9-90.
33. Mekenkamp LJ, van Krieken JH, Marijnen CA, van de Velde CJ, Nagtegaal ID. *Lymph node retrieval in rectal cancer is dependent on many factors--the role of the tumor, the patient, the surgeon, the radiotherapist, and the pathologist.* Am J Surg Pathol. 2009 Oct;33(10):1547-53.
34. Mainprize KS HJ, Savage A, Mortensen N, Warren BF. *How many lymph nodes to stage colorectal cancer?* J Clin Pathol. 1998;55:165- 6.
35. Vogel C, Kirtil T, Oellig F, Stolte M. *Lymph node preparation in resected colorectal carcinoma specimens employing the acetone clearing method.* Pathol Res Pract. 2008;204(1):11-5.
36. Haboubi NY, Clark P, Kaftan SM, Schofield PF. *The importance of combining xylene clearance and immunohistochemistry in the accurate staging of colorectal carcinoma.* J R Soc Med. 1992 Jul;85(7):386-8.

37. Hermanek P. *Methodik der histopathologischen Untersuchung von Resektaten kolorektaler Karzinome*. Chirurgische Gastroenterologie. 2000;16(3):255-9.
38. Kerwel TG, Spatz J, Anthuber M, Wunsch K, Arnholdt H, Markl B. *Injecting methylene blue into the inferior mesenteric artery assures an adequate lymph node harvest and eliminates pathologist variability in nodal staging for rectal cancer*. Dis Colon Rectum. 2009 May;52(5):935-41.
39. Markl B, Kerwel TG, Jahnig HG, Oruzio D, Arnholdt HM, Scholer C, et al. *Methylene blue-assisted lymph node dissection in colon specimens: a prospective, randomized study*. Am J Clin Pathol. 2008 Dec;130(6):913-9.
40. Markl B, Kerwel TG, Wagner T, Anthuber M, Arnholdt HM. *Methylene blue injection into the rectal artery as a simple method to improve lymph node harvest in rectal cancer*. Mod Pathol. 2007 Jul;20(7):797-801.
41. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. *Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review*. J Natl Cancer Inst. 2007 Mar 21;99(6):433-41.
42. Feinstein A, Sosin, D., Wells, C. *The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer*. N Engl J Med. 1985;312(25):1604-8.
43. Compton CC. *Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features*. Mod Pathol. 2003 Apr;16(4):376-88.
44. Schofield JB MNea. *The Importance of accurate pathological assessment of lymph node involvement in colorectal cancer*. Blackwell Publishing Ltd Colorectal Disease 8. 2006:460-70.
45. Monig SP, Baldus SE, Zirbes TK, Schroder W, Lindemann DG, Dienes HP, et al. *Lymph node size and metastatic infiltration in colon cancer*. Ann Surg Oncol. 1999 Sep;6(6):579-81.
46. Rodriguez-Bigas MA, Maamoun S, Weber TK, Penetrante RB, Blumenson LE, Petrelli NJ. *Clinical significance of colorectal cancer: metastases in lymph nodes < 5 mm in size*. Ann Surg Oncol. 1996 Mar;3(2):124-30.
47. Frasson M FC, Garcia-Granero A, Puga R, Flor-Lorente B, Cervantes A, Navarro S, Garcia-Granero E. *Pathological evaluation of mesocolic resection quality and ex vivo*

methylene blue injection: what is the impact on lymph node harvest after colon resection for cancer? Dis Colon Rectum. 2012;55:197- 204.

48. Martijnse IS DR, Kusters M, Rutten HJ, Nieuwenhuijzen GA, Wasowicz-Kemps DK. *Patent blue staining as a method to improve lymph node detection in rectal cancer following neoadjuvant treatment.* Eur J Surg Oncol. 2012;38:252- 8.
49. Jepsen RK IP, Lund EL. *Upstaging of early colorectal cancers following improved lymph node yield after methylene blue injection.* Histopathology. 2012;61:788- 94.
50. Klepšytė E SN. *Injection of methylene blue solution into the inferior mesenteric artery of resected rectal specimens for rectal cancer as a method for increasing the lymph node harvest.* Tech Coloproctol. 2012;16:207-11.
51. Törnroos A SI, Drugefors B, Arbman G, Olsson H. *Postoperative intra-arterial methylene blue injection of colorectal cancer specimens increases the number of lymph nodes recovered.* Histopathology. 2011;58:408- 13.
52. Herrera- Ornelas L JJ, Castillo N, Petrelli N, Stulc J, Mittelman A. *Metastases in small lymph nodes from colon cancer.* Arch Surg. 1987;122:1253- 6.
53. Brown HG, Luckasevic TM, Medich DS, Celebrezze JP, Jones SM. *Efficacy of manual dissection of lymph nodes in colon cancer resections.* Mod Pathol. 2004 Apr;17(4):402-6.
54. Mainprize KS, Kulacoglu H, Hewavisinthe J, Savage A, Mortensen N, Warren BF. *How many lymph nodes to stage colorectal carcinoma?* J Clin Pathol. 1998 Feb;51(2):165-6.
55. G C. *The influence of nodal size on the staging of colorectal carcinomas.* J Clin Pathol. 2002;55:386- 90.
56. Cserni G. *The influence of nodal size on the staging of colorectal carcinomas.* J Clin Pathol 2002 2002;55:386-90.
57. Puli SR, Reddy JB, Bechtold ML, Choudhary A, Antillon MR, Brugge WR. *Accuracy of endoscopic ultrasound to diagnose nodal invasion by rectal cancers: a meta-analysis and systematic review.* Ann Surg Oncol. 2009 May;16(5):1255-65.
58. Hermanek P. *Lymphadenectomy from the viewpoint of pathology.* Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd. 1996;113:64-9.
59. Sarli L, Bader G, Iusco D, Salvemini C, Mauro DD, Mazzeo A, et al. *Number of lymph nodes examined and prognosis of TNM stage II colorectal cancer.* Eur J Cancer. 2005 Jan;41(2):272-9.

60. Baxter NN, Virnig DJ, Rothenberger DA, Morris AM, Jessurun J, Virnig BA. *Lymph node evaluation in colorectal cancer patients: a population-based study*. J Natl Cancer Inst. 2005 Feb 2;97(3):219-25.
61. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. *Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089*. J Clin Oncol. 2003 Aug 1;21(15):2912-9.
62. Jestin P, Pahlman L, Glimelius B, Gunnarsson U. *Cancer staging and survival in colon cancer is dependent on the quality of the pathologists' specimen examination*. Eur J Cancer. 2005 Sep;41(14):2071-8.
63. Cianchi F, Palomba A, Boddi V, Messerini L, Pucciani F, Perigli G, et al. *Lymph node recovery from colorectal tumor specimens: recommendation for a minimum number of lymph nodes to be examined*. World J Surg. 2002 Mar;26(3):384-9.
64. Law CH, Wright FC, Rapanos T, Alzahrani M, Hanna SS, Khalifa M, et al. *Impact of lymph node retrieval and pathological ultra-staging on the prognosis of stage II colon cancer*. J Surg Oncol. 2003 Nov;84(3):120-6.
65. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. *Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation--technical notes and outcome*. Colorectal Dis. 2009 May;11(4):354-64; discussion 64-5.
66. Kerwel T, Spatz H, Anthuber M, Probst A, Arnholdt H, Märkl B. *Injecting methylene blue into the inferior mesenteric artery improves and assures an adequate lymph node harvest in rectal cancer*. Diseases of the Colon and Rectum. 2009.
67. Märkl B ST, Krammer I, Cacchi C, Arnholdt HM, Schenkirsch G, Kretsinger H, Anthuber M, Spatz H. *Methylene blue- assisted lymph node dissection technique is not associated with an increased detection of lymph node metastases in colorectal cancer*. Modern Pathology. 2013:1- 9.
68. Simunovic M, Baxter, N. *Lymph Node Counts in Colon Cancer Surgery: Lessons for Users of Quality Indicators*. JAMA. 2007;298(18):2194-5.
69. Dillman RO, Aaron K, Heinemann FS, McClure SE. *Identification of 12 or more lymph nodes in resected colon cancer specimens as an indicator of quality performance*. Cancer. 2009 Feb 10.

70. Soreide K, Nedrebo, B.S., Soreide, J.A. et al. *Lymph Node Harvest in Colon Cancer: Influence of Microsatellite Instability and Proximal Tumor Location*. World J Surg. 2009;33:2695-703.
71. Hsu CW LC, Wang JH, Wang HT, Ou WC, King TM. *Factors that influence 12 or more harvested lymph nodes in early-stage colorectal cancer*. World J Surg. 2009;33:333- 9.
72. Stocchi L, Fazio, V.W.,Lavery, I. et al. *Individual Surgeon, Pathologist, and Other Factors Affecting Lymph Node Harvest in Stage II Colon Carcinoma. Is a Minimum of 12 Examined Lymph Nodes Sufficient?* Ann Surg Oncol. 2011;18:405-12.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Lokalisation kolorektaler Karzinome

Abbildung 2: Stadienbezogene Therapie des Kolonkarzinoms

Abbildung 3: Verteilung der LK-Größe aller aufgefunder LK

Abbildung 4: Größenverteilung aller Fälle in Abhängigkeit des jeweiligen Nodalstatus

Abbildung 5: Größenverteilung aller metastasierter LK

Abbildung 6: Darstellung der größten LK-Diameter für die Bestimmung des N+ und des exakten finalen N-Status

Abbildung 7: Darstellung der Abhängigkeit von tLN und cLND, sowie von tLN und LN5

Abbildung 8: stellt die ROC-Kurve dar und beschreibt den Grenzwert der Prognose für
Stadium I und II

Abbildung 9: Größenverteilung der LK bei LN5-niedrig Gruppe und LN5-hoch Gruppe

Abbildung 10: Vergleich des Gesamt-Überlebens zwischen Fällen mit ≥ 7 und < 7
Lymphknoten mit Diametern von $> 5\text{mm}$

Abbildung 11: Vergleich des Gesamt-Überlebens zwischen Fällen mit ≥ 7 und < 7
Lymphknoten mit Diametern von $> 5\text{mm}$ unter Berücksichtigung des
Tumorstadiums

Abbildung 12: Vergleich des Gesamt-Überlebens zwischen Fällen mit ≥ 35 und < 35
aufgefundenen LK

Abbildung 13: Vergleich des Gesamt-Überlebens in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardoperationen des Kolonkarzinoms

Tabelle 2: T-Klassifikationen des kolorektalen Karzinoms, 7. Auflage, 2010

Tabelle 3: NM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms, 7. Auflage, 2010

Tabelle 4: UICC-Klassifikation

Tabelle 5: klinisch-pathologische Daten

Tabelle 6: klinisch-pathologische Eigenschaften nodal negativer Fälle

9. Abkürzungsverzeichnis

KK	Kolonkarzinom
LK	Lymphknoten
MB-Technik	Methylenblau-Technik
MSI	Mikrosatellitenstabilität
MSI-H	hohe Mikrosatellitenstabilität
MSI-L	niedrige Mikrosatellitenstabilität
5- JÜR	5- Jahresüberlebensrate
TSA	Traditionelles serratiertes Adenom
GIST	Gastrointestinale Stromatumore
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HNPPCC	hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
cLND	kumulativer LK-Diameter
LN5	alle LK-Diameter > 5mm addiert
LN5-hoch	≥ 7 LK > 5mm
LN5-niedrig	< 7 LK > 5mm
tLN	totale Anzahl aller LK-Diameter pro Fall
N-Status	Anzahl aller nodal positiver Fälle

10. Danksagung

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD. Dr. med. Märkl für seine überragende, liebenswerte Betreuung bedanken. Vielen Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit mit all ihrem Einsatz, Wissen und ihrer Menschlichkeit. Es hat mich sehr motiviert, dass sie immer an mich geglaubt haben. Sie waren der beste Doktorvater, den man sich wünschen kann. Vielen, vielen Dank für Alles!

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Arnholdt und seinem gesamten Team in der Pathologie für die stets freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die mir immer entgegengebracht wurde und mir ein Gefühl des Dazugehörens vermittelte.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzen Herzen bei meinen Eltern und meinem Mann für all ihren Zuspruch und unübertroffene Unterstützung bedanken, ohne die ich zwischendurch wahrscheinlich verzweifelt wäre. Ich danke euch und bin sehr froh, dass ich euch habe!

Eidesstattliche Versicherung

Rößle, Janine Natalie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
Histomorphometrische Untersuchung an Lymphknoten in Kolonkarzinomen unter Berücksichtigung histopathologischer Parameter und klinischem Verlauf

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Gersthofen, 04.09.14

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand