

Aus dem Institut für Pathologie am Klinikum Augsburg
Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Chefarzt: Prof. Dr. med. Bruno Märkl

Zirkulierende Zytokeratin-positive Zellen im peripheren Blut von Darmkrebspatienten

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

vorgelegt von
Narjes Wilhelms, geb. Nematollahi
aus Shiraz
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bruno Märkl

Mitberichterstatterin: PD Dr. Dorit Di Gioia

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2019

Zum Dank an meine liebe Familie

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Prognose des Kolonkarzinoms	1
1.2	Ätiologie, Risikofaktoren	1
1.3	Diagnostik	2
1.3.1	Darmspiegelung und histopathologische Untersuchung	2
1.3.2	Weitere diagnostische Untersuchungsverfahren	2
1.4	Therapieverfahren beim Kolonkarzinom	3
1.4.1	Kurative und palliative Darmkrebsoperationen	3
1.4.2	Chemotherapie	3
1.5	Histopathologische Diagnostik beim Kolonkarzinom	5
1.5.1	Grundlagen	5
1.5.1.1	<i>Klassifikation des Kolonkarzinoms</i>	5
1.5.1.1.1	<i>Histologische Typen</i>	5
1.5.1.1.2	<i>Spontanes und familiäres Kolonkarzinom</i>	5
1.5.1.1.3	<i>TNM-Klassifikation</i>	6
1.5.1.1.4	<i>UICC-Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms</i>	8
1.5.2	Diagnostische Beurteilungen	8
1.5.2.1	<i>Methylenblau-Methode</i>	8
1.5.2.2	<i>Histopathologische Aspekte</i>	8
1.5.2.2.1	<i>Zirkulierende Tumorzellen</i>	8
1.5.2.2.2	<i>Tumor Budding</i>	10
1.6	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Studienaufbau	12
2.1.1	Studienkollektiv	12
2.1.2	Blutuntersuchung	12
2.1.2.1	<i>Blutentnahme und Methylenblau-Injektion</i>	12
2.1.2.2	<i>Blutprobenvorbereitung und Immunzytochemie</i>	13
2.1.3	Histologische Untersuchung	15
2.1.3.1	<i>Gewebevorbereitung und Erstellung von Standardpräparaten für die Lichtmikroskopie</i>	15
2.1.3.2	<i>Histopathologische Beurteilung, Immunzytochemie und Beurteilung des Tumor Budding</i>	15
2.2	Statistik	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Studienkollektiv	17
3.2	Histopathologische Beurteilung	17
3.3	Überlebensanalyse	18
4	Diskussion	22
5	Zusammenfassung	27
6	Literaturverzeichnis	28
7	Anhang	36
7.1	Ergänzende Tabelle	36
7.2	Abbildungsverzeichnis	36
7.3	Tabellenverzeichnis	37
7.4	Abkürzungsverzeichnis	38
7.5	Curriculum vitae	40
7.6	Danksagung	41
	Eidesstattliche Erklärung	42

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Prognose des Kolonkarzinoms

Das Kolorektalkarzinom (colorectal carcinoma [CRC]) ist weltweit die dritthäufigste Krebsart und macht 10 % aller neuen Krebsdiagnosen aus (1, 2). Es wird geschätzt, dass etwa die Hälfte aller Patienten mit Kolorektalkarzinom im Verlauf ihrer Erkrankung eine lokale Rezidiv- oder Fernmetastase entwickeln (3).

In den letzten 10 Jahren wurde das mediane Gesamtüberleben (overall survival [OS]) von Patienten, bei denen ein metastasiertes CRC (mCRC) diagnostiziert worden war, von 9 auf 30 Monate verbessert. Trotzdem liegt das OS weiterhin bei nur 5–15 % (4, 5).

Die Prognose und die Therapie des Kolorektalkarzinoms hängt stark vom UICC-Tumorstadium (Tumorentwicklungsstufe; UICC: Internationale Vereinigung gegen Krebs) ab. Ist die Prognose im Stadium I/II noch sehr günstig, fällt sie dann allerdings ab und ist bei Stadium III und IV ungünstiger. Es ist es aber bekannt, dass auf der einen Seite ein Teil der Patienten mit einer Stadium-I/II-Krebsart einen aggressiven klinischen Verlauf entwickelt, auf der anderen Seite zeigen aber immerhin etwa 40 % der Stadium-III-Patienten trotz des Auftretens regionaler Lymphknotenmetastasen ein günstiges Ergebnis. Daher sind alternative oder zusätzliche prognostische Faktoren notwendig, um sowohl die Prognoseschätzung und die Therapiegestaltung bei Darmkrebs zu verbessern. Ein vielversprechender Ansatz dafür ist die Erkennung, Quantifizierung und Analyse von sogenannten zirkulierenden Tumorzellen (CTC). Diese Zellen, die – wie der Name sagt – im Blutstrom zirkulieren oder im Knochenmark gefunden werden, sind vermutlich die Ursache für die Entstehung entfernter Metastasen. Es handelt sich dabei um Epithelzellen, die einen intakten Kern aufweisen und die Expression von Zytokeratin zeigen (6).

1.2 Ätiologie, Risikofaktoren

Unter Darmkrebs wird eine bösartige Veränderung im Bereich des Intestinums verstanden, die sich aus gutartigen Schleimhautwucherungen entwickelt (7).

Das Darmkrebsrisiko wird durch eine Reihe von Faktoren erhöht. Rauchen und Übergewicht sind die am stärksten wirkenden prädisponierenden Faktoren. Bewegungsmangel und ballaststoffarme Ernährung sind weitere Ursachen. Wer sehr viel rotes Fleisch isst oder auch regelmäßig Alkohol trinkt, hat ebenfalls ein höheres Risiko, an Darmkrebs zu erkranken (8). Ferner sind überdurchschnittlich häufig Verwandte ersten Grades von Patienten mit Darmkrebs betroffen (8). Bereits in jüngeren Jahren besteht außerdem bei seltenen erblichen Erkrankungen (wie bei der familiären adenomatösen Polyposis [FAP] und beim hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom [HNPCC]) ein sehr hohes Risiko zu erkranken (8). Darüber hinaus steigern chronisch entzündliche Darmerkrankungen ebenfalls das

Erkrankungsrisiko (1). So haben Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ein größeres Risiko, an CRC zu erkranken. Es ist 20-fach erhöht im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung.

Die Patienten bemerken, dass sie erkrankt sind, häufig erst durch ständige Müdigkeit, Mattigkeit und wenn sie an Gewicht verlieren. Gleichzeitig wechseln Symptome wie Durchfall und Obstipation einander ab. Außerdem kann Blut im Stuhl und Schmerzen beim Stuhlgang ein Hinweis auf ein Kolonkarzinom sein (8).

1.3 Diagnostik

1.3.1 Darmspiegelung und histopathologische Untersuchung

Es ist erwiesen, dass eine Darmspiegelung, auch Koloskopie genannt, die sicherste Methode ist, Darmkrebs zu diagnostizieren. Im Rahmen dieses Untersuchungsverfahrens kann sofort eine Entfernung von Darmpolypen, die sich zu bösartigen Tumoren entwickeln könnten, durchgeführt werden. Falls der Befund unauffällig ist, besteht vonseiten der Krankenkassen Anspruch auf eine Wiederholungskoloskopie nach zehn Jahren (9).

1.3.2 Weitere diagnostische Untersuchungsverfahren

Es gibt weitere diagnostische Wege, unter anderem (9):

- digital-rektale Untersuchung
- Abdomensonographie
- Röntgen-Thorax zum Ausschluss oder Nachweis von Lungenmetastasen

1.4 Therapieverfahren beim Kolonkarzinom

1.4.1 Kurative und palliative Darmkrebsoperationen

Die Prognose und die Therapie eines Kolonkarzinoms hängen stark vom UICC-Tumorstadium ab (Tabelle 1). Dabei spielt die TNM-Klassifikation eine Rolle, die den Ausbreitungsgrad des Tumors angibt. Auf diese Klassifikation wird im Detail im Abschnitt 1.5.1.1.3 eingegangen.

Tabelle 1 UICC-Klassifikation

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten (LK)	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
	T3a (< 1 mm)		
	T3b (1–5 mm)		
	T3c (5–15 mm)		
IIB	T3d (< 15 mm)	N0	M0
	T4		
IIIA	T1–2	N1 (1–3 betroffene LK)	M0
IIIB	T3–4	N1 (1–3 betroffene LK)	M0
IIIC	alle T	N2 (> 4 betroffene LK)	M0
IV	alle T	alle N	M1

T: Tumor, N: Nodus, M: Fernmetastasen; Quellen: 33–39.

Das Ziel einer kurativen Darmkrebsoperation ist die Heilung dieser Tumorerkrankung, in der der Chirurg versucht, den kompletten Tumor und mögliche Metastasen zu entfernen. Sind im fortgeschrittenen Stadium benachbarte Organe befallen, dann muss der Tumor selbst und die befallenen Organe im Ganzen entfernt werden. Bei einer palliativen Darmkrebsoperation hingegen versucht der Chirurg, die tumorbedingten Beschwerden zu lindern (10).

1.4.2 Chemotherapie

Die Indikation für die Anwendung einer adjuvanten Therapie bei einer Krebserkrankung wird je nach Krankheitsstadium, Tumorwachstum und Allgemeinzustand des Patienten individuell entschieden (11–13). Bei Patienten mit einem höheren Rezidivrisiko wird angenommen, dass sie bei einer postoperativen Chemotherapie größere Vorteile erzielen könnten als Patienten mit einem geringen Rezidivrisiko (14). Seit mehr als drei Jahrzehnten hat die postoperative Chemotherapie zunächst mit Fluoropyrimidinen (FU) und kürzlich auch in Kombination mit Oxaliplatin das Risiko eines Tumorrezidivs reduziert und Überlebensraten

bei Patienten mit reseziertem Kolonkarzinom verbessert. Somit ist die adjuvante Chemotherapie im Stadium III als Standardtherapieform etabliert (14). Der Nutzen der Zugabe von Oxaliplatin zu FU oder Capecitabin führt zu einer relativen Risikoreduktion um ungefähr 20 % für das krankheitsfreie Überleben. Eine adjuvante Chemotherapie bei Hochrisikopatienten im Stadium II hingegen hat nur einen geringen Überlebensvorteil gezeigt (14).

FU-basierte Therapien haben eine große Bedeutung für die Behandlung bei Krebserkrankungen im Stadium III und sind als Monotherapie eine geeignete adjuvante Behandlungsoption für Patienten im fortgeschrittenen Alter. Außerdem kommen adjuvanten Therapien mit FU (oder dessen Vorstufe Capecitabin) in Kombination mit oder ohne Oxaliplatin für Patienten im Stadium II mit erhöhtem Risiko infrage. Die Zugabe von zielgerichteten Wirkstoffen während der Therapie, nämlich Bevacizumab und Cetuximab, haben jedoch keinen Nutzen im Vergleich zu Standardchemotherapien im Stadium III gezeigt. Außerdem wurden Fernmetastasen durch eine FU-basierte adjuvante Behandlung bei Patienten mit Tumoren, die eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) aufwiesen, im Stadium II nicht reduziert (14). Eine entsprechende FU-basierte Therapie erscheint damit nicht sinnvoll. In Bezug auf Stadium III ist die günstige prognostische Wirkung bei Tumorpatienten mit MSI deutlich weniger gegeben (14). Wichtig ist, dass Stadium-III-Kolorektalkarzinom-Patienten mit MSI in klinischen Studien zur Beurteilung von FU- oder Oxaliplatin-basierten Regimes von einer adjuvanten Therapie profitierten, jedoch ohne Unterschied im Vergleich zu der Population mit Mikrosatellitenstabilität (MSS) (14).

Prognostische und prädiktive Marker können helfen, Therapien mit einer höheren Chance auf einen Nutzen – unabhängig vom Tumorstadium – zu individualisieren. Doch in Bezug auf Stufe II oder III des Kolorektalkarzinoms fehlen leider noch solche allgemein akzeptierten Marker, um Vorteile einer adjuvanten Chemotherapie zu erzielen. Mithilfe von retrospektiven Studien konnten aber immerhin die perineurale Invasion (PNI) und die lymphovaskuläre Invasion als Hochrisikomarker im Frühstadium identifiziert werden (15).

Tumorbiomarker wie die Gene KRAS und BRAF sowie die MSI, die im kolorektalen Krebsgewebe identifiziert wurden, werden verwendet, um eine Chemotherapie zu individualisieren (15). Darüber hinaus ist die Aussagekraft von BRAF- oder KRAS-Mutationen als zusätzliche Risikofaktoren im Stadium III größer, wenn der Mikrosatellitenstatus und die Tumorlokalisierung berücksichtigt werden (15). So wurde eine BRAF-Mutation konsistent als unabhängiger prognostischer Faktor im Frühstadium der Kolorektalkarzinome validiert. Auch das Vorhandensein von KRAS-Mutationen weist auf eine schlechtere Prognose hin. Die Mikrosatelliteninstabilität schließlich, so wurde herausgefunden, unterstützt die Verlaufsbeobachtung nach Tumoroperation bei Krebskrankheit im Stadium II (15).

1.5 Histopathologische Diagnostik beim Kolonkarzinom

1.5.1 Grundlagen

Die histopathologische Diagnostik des Kolonkarzinoms umfasst die histologische Untersuchung von

- präkanzerösen Läsionen, die je nach zellulärer und architektonischer Atypie unterschieden werden (16).

Beim invasiven Karzinom ist die Bestimmung folgender Parameter erforderlich:

- histologischer Typ
- Infiltrationstiefe (17)
- Grading
- Lymph- und Blutgefäßeinbrüche
- Perineuralscheideninfiltrate
- Befall regionärer Lymphknoten
- Resektionsränder

Um Fernmetastasen zu untersuchen, werden häufig Stanzbiopsien entnommen und zellbiologisch beurteilt (5, 18). Werden Metastasen chirurgisch reseziert, ist auch eine Untersuchung des Metastasenorgans erforderlich.

1.5.1.1 Klassifikation des Kolonkarzinoms

1.5.1.1.1 Histologische Typen

In 95 % der Fälle handelt es sich bei Kolonkarzinomen um Adenokarzinome. Diese können unterschieden werden in klassische Adenokarzinome, muzinöse Adenokarzinome, Siegelringzellkarzinome und adenosquamöse Karzinome. Andere Tumortypen (zum Beispiel gastrointestinale Stromatumore [GIST], Lymphome) sind vergleichsweise selten und machen nur 5 % der Kolonkarzinome aus (19).

1.5.1.1.2 Spontanes und familiäres Kolonkarzinom

Kolorektalkarzinome können durch unterschiedliche genetische Erkrankungen hervorgerufen werden. Die häufigsten sind:

- das Gardner-Syndrom
- die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)
- das Peutz-Jeghers-Syndrom
- das hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC)

Die FAP ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, bei der sich im Dickdarm massenhaft Polypen bilden. Die Entartung eines oder mehrerer dieser Polypen mit der

Ausbildung von Darmkrebs liegt unbehandelt bei nahezu 100 %. Die Erkrankung ist selten. Es wird geschätzt, dass 5–10 % der Menschen von der Genmutation betroffen sind (20, 21).

Das HNPCC (auch Lynch-Syndrom genannt) tritt häufiger auf als die FAP. Bei dem HNPCC handelt es sich wie bei der FAP um eine autosomal dominant vererbte Darmkrebsform, jedoch ohne Auftreten von vielen Polypen im Darm.

Das Risiko, an der HNPCC zu erkranken, beruht auf einem Defekt bei der DNA-Reparatur, der wiederum durch eine Mutation eines MMR-Gen (MMR: Mismatch-Reparatur) hervorgerufen wird (22). Das HNPCC ist mit etwa 2–3 % der häufigste Tumor des Kolorektalkarzinoms. Fallen die sogenannten Amsterdam- oder Bethesda-Kriterien (Kriterien für die Diagnostik dieser Tumorform) positiv aus, sollte eine molekularpathologische Untersuchung des Karzinoms auf HNPCC-typische Merkmale (Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität [MSI] und immunzytochemische Darstellung [IHC] der MMR-Proteine) durchgeführt werden (23).

Für die Diagnose HNPCC müssen demnach folgende Punkte zutreffen (24):

- Alle Amsterdam-II-Kriterien müssen erfüllt sein.
- Mindestens drei Familienmitglieder müssen an einem histologisch gesicherten kolorektalen Karzinom leiden. Einer von ihnen muss Verwandter ersten Grades sein. Zwei weitere (der Folgegeneration) müssen ebenfalls erkranken.
- Bei dem Patienten muss vor dem 50. Lebensjahr die Diagnose kolorektales Karzinom gestellt worden sein.
- Andere Erkrankungen wie FAP müssen ausgeschlossen werden können.

1.5.1.1.3 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation dient zur Einteilung von malignen Tumoren in verschiedene Stadien. Sie basiert auf statistischen Untersuchungen, die es ermöglichen, Aussagen über das voraussichtliche Verhalten von Tumoren und über Prognosen von Tumorerkrankungen sowie Therapiestratifizierung zuzulassen (25, 26). Die drei wichtigsten Kategorien des TNM-Systems entsprechen den drei Komponenten T, N und M, die jeweils für ein Merkmal stehen. Die Abkürzung „T“ (Tumor) beschreibt die Ausdehnung und das Verhalten des Primärtumors, „N“ (Nodus: Lymphknoten) deutet auf das Fehlen bzw. das Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen hin und „M“ (Metastasen) schließlich bezieht sich auf das Fehlen bzw. das Vorhandensein von Fernmetastasen.

Man unterscheidet zwei TNM-Klassifikationen: Wird die Tumorstadieneinteilung (sog. Staging) durch kleinere Eingriffe und klinische Untersuchungen durchgeführt, so spricht man von einer prätherapeutischen TNM-Klassifikation, auch cTNM (c: clinical) genannt. Beruht aber ein Staging auf einem größeren chirurgischen Eingriff und auf histopathologischen Untersuchungen, wird dieses als pTNM (p: pathologisch oder postoperativ histopathologisch)

bezeichnet und wird zusätzlich noch durch das Grading (G) ergänzt (27–31). Die Tabellen 2 bis 4 geben Einblick in die TNM-Klassifikation, bezogen auf das kolorektale Karzinom.

Tabelle 2 T-Klassifikationen des kolorektalen Karzinoms

T-Tumor	Eigenschaften
Tx	Ausgangstumor („Primärtumor“), kann nicht beurteilt werden.
T0	kein Anhaltspunkt für Primärtumor.
Tis	Carcinoma in situ (nur innerhalb der Darmschleimhaut finden sich Krebszellen)
T1	Tumor in dünne Bindegewebsschicht unterhalb der Darmschleimhaut (Submukosa) ausgebreitet
T2	Tumor in Muskelschicht unterhalb der Schleimhaut (Muskularis propria) ausgebreitet
T3	Tumor über die Muskelschicht unterhalb der Schleimhaut hinaus in die Subserosa oder das Fettgewebe ausgebreitet
T4	Befall andere Organe oder des Bauchfells
T4a	Befall des Bauchfells
T4b	Befall anderer Organe

Quellen: 32–38.

Tabelle 3 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

N-Lymphknoten	Eigenschaften
Nx	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	kein Befall regionärer Lymphknoten
N1	Befall von 1–3 regionären Lymphknoten
N1a	1 Lymphknoten befallen
N1b	2–3 Lymphknoten befallen
N1c	Tumorknötchen im Fettgewebe unterhalb der Schleimhaut ohne regionäre Lymphknoten
N2	Befall von 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	4–6 Lymphknoten befallen
N2b	7 oder mehr Lymphknoten befallen

Quellen: 32–38.

Tabelle 4 M-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

M-Fernmetastasen	Eigenschaften
Mx	Fernmetastasen (Tochtergeschwülste) können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen in einem Organ
M1b	Fernmetastasen in mehreren Organen

Quellen: 32–38.

1.5.1.1.4 UICC-Stadieneinteilung des Kolonkarzinoms

Auf Grundlage der TNM-Klassifikation, also des Ausbreitungsgrades des Tumors, werden verschiedene Stadien von Enddarmkrebs unterschieden. Diese Stadieneinteilung wurde von der „Union internationale contre le cancer“ (UICC) erstellt.

1.5.2 Diagnostische Beurteilungen

1.5.2.1 *Methylenblau-Methode*

In der Praxis erweist er sich als schwierig, die nach onkologischen Grundsätzen geforderten 12 Lymphknoten für ein adäquates Lymphknotenstaging aufzufinden. Vor wenigen Jahren konnte hier mithilfe der Methylenblau-Technik eine deutliche Verbesserung erzielt werden. Methylenblau ist ein basischer Farbstoff, der in wässriger Lösung dunkelblau erscheint. Die Lymphknoten werden nach Gefäßinjektion nach Gewebeentnahme blau, weshalb sie gut zu erkennen sind. Dafür wird das Präparat im frischen Zustand in die Pathologie verbracht (ohne vorherige Fixation). Dort werden die zuvor intraoperativ gesetzten Gefäßclips bzw. Ligaturen entfernt und es wird Methylenblau intraarteriell injiziert. In diesem Zusammenhang ist auch möglich, aus dem venösen Schenkel des Präparats Blut zu entnehmen und dieses für weitere Untersuchungen (zum Beispiel zur Darstellung von isolierten Tumorzellen oder zirkulierende Tumorzellen) zu verwenden (39).

1.5.2.2 *Histopathologische Aspekte*

1.5.2.2.1 Zirkulierende Tumorzellen

Zirkulierende Tumorzellen (CTC) sind definiert als zirkulierende Zellen im Blutstrom, die entweder vom primären Tumor oder von Metastasen stammen. Sie gehören zu einem hoch heterogenen Pool von Tumorzellen (40). Sie finden sich im zentralen venösen Blutkompartiment, im peripheren Blutanteil oder innerhalb des arteriellen Blutsystems. Es wird vermutet, dass täglich etwa 10^6 Zellen pro Gramm Primärtumor in den systemischen Kreislauf freigesetzt werden (41). Die meisten dieser Zellen sind nicht in der Lage, im Blutkreislauf zu überleben oder entfernte Metastasen zu bilden, da sie letztendlich durch

Apoptose zugrunde gehen oder aufgrund von Scherkräften innerhalb des Blutstroms sterben (42). Aber es wird davon ausgegangen, dass diese Zellen zumindest die Fähigkeit haben, in das lymphatische System einzudringen und entfernte Metastasen zu bilden. Unter anderem ist wahrscheinlich, aber nicht bewiesen, dass Metastasen selbst die Fähigkeit besitzen, Tumorzellen in den Kreislauf oder das lymphatische System als sekundäre disseminierte Tumorzellen (DTC) freizusetzen (43, 44).

Es ist zu beachten, dass CTC auch durch Manipulation des Tumors, zum Beispiel durch mechanische Kräfte während der Operation oder der Koloskopie, freigesetzt werden können (45–48). Sie können auch als Zellcluster oder Tumor-Mikroemboli gefunden werden (49). Disseminierte Tumorzellen können in das Knochenmark gelangen und dort in einem ruhenden Zustand verbleiben oder mithilfe des mesenchymal-epithelialen Übergangs (mesenchymal-epithelial transition [MET]) den Gefäßstrukturen wieder entgehen. Bei späterer Wiedererkrankung werden die DTC als ein Teil der Schlüsselemente angesehen (43, 50, 51).

Disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten werden als isolierte Tumorzellen (isolated tumor cells [ITC]) bezeichnet. Mikrometastasen und ITC sind Tumorzellen in Lymphknoten, die nicht durch konventionelle Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung erkannt werden, die vom Pathologen routinemäßig durchgeführt wird. Sie werden vielmehr nur durch immunzytochemische Färbungen oder molekularbiologische Techniken wie Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) detektiert (52).

Zirkulierende Tumorzellen sind bei fast allen Krebserkrankungen, einschließlich beim Kolonkarzinom, nachgewiesen worden. Sie sind bereits vor der Entwicklung von Metastasen nachweisbar und sind bei Patienten ohne Tumormalignität extrem selten (53, 54). Ein Kriterium für ein frühes Stadium des metastatischen Prozesses ist die sporadische Ausscheidung von malignen Zellen aus dem Primärtumor in den Blutkreislauf (55).

Zirkulierende Tumorzellen besitzen unter anderem physikalische Eigenschaften, wie erhöhte Zellelastizität, die möglicherweise ihre Fähigkeit zur Intravasation in das periphere Blut unterstützen (102). Auch nach hämatogener Verbreitung sind Tumorzellen in hohem Maße fähig zur Extravasation und das anschließende Wachstum ist sehr stark. Ein kleiner Teil der extravasierten Zellen können Mikrometastasen bilden, von denen die meisten jedoch wieder durch Apoptose zugrunde gehen und nur wenige führen zu makroskopisch erkennbaren Tumoren (56, 57). Dieser Prozess der Extravasation und des Wachstums fördert die Bindung von Tumorzellen an das vaskuläre Endothel, woraufhin eine Krebszellaggregation an diesen Bindungsstellen erfolgt (58, 59). Ein weiterer Beitrag, den CTC zur Progression der Malignität leisten können, ist die Entwicklung hochmetastatischer Phänotypen durch genetischen Austausch zwischen den Tumorzellen (60, 61). Darüber hinaus kann ein weiterer Schlüsselschritt für die Metastasierung von CTC der epithelial-mesenchymale

Übergang (EMT) sein (62–68). Dieser EMT vermittelt in den meisten Fällen kolorektaler Karzinome die Fähigkeit zur Zellmigration. Das dient als Ausgangspunkt der Tumorprogression (73).

Für die Metastasierung durchlaufen die Zellen einen umgekehrten Prozess, der bereits oben erwähnt wurde: den mesenchymal-epithelialen Übergang (MET) (69). Es ist jedoch noch nicht eindeutig belegt, ob der EMT ein zwingend notwendiger Schritt zur Entwicklung von Metastasen ist, da es Hinweise darauf gibt, dass eine Zellinvasion auch ohne EMT auftreten kann, und ob der MET überhaupt eine wichtige Rolle spielt (70–72).

1.5.2.2.2 Tumor Budding

Die Tumorknospung (engl. tumor budding) ist das Vorhandensein von einzelnen Tumorzellen oder kleinen Tumorzellclustern an der Invasionsfront von Karzinomen (73). („Tumorzelldissoziation“ ist ein Synonym für Tumor Budding, das hauptsächlich in der älteren Literatur verwendet wird.) Einige grundlegende molekulare Merkmale und nachfolgende Modifikationen sind notwendig, damit ein Tumor überhaupt Tumor Budding entwickeln kann. Schließlich ist es so, dass einzelne Zellen oder kleine Cluster von Tumor Budding sich in einigen Merkmalen vom Haupttumor unterscheiden (74).

Dieses Tumor Budding ist ein etablierter unabhängiger prognostischer Faktor bei kolorektalem Karzinom (74), es liefert also einen Hinweis auf die Progression eines malignen Tumors, nämlich zum Fortschreiten von der lokalen hin zur systemischen Erkrankung. Außerdem wird es als histomorphologisches Korrelat des EMT angesehen. Das Tumor Budding kann histologisch während der routinemäßigen Bewertung von malignen Polypen oder von chirurgischen Proben beurteilt werden. In einem Übersichtsartikel von Märkl und Arnholdt (2011) Studien zu Krebs an allen Lokalisationen – von der Speiseröhre bis zum Rektum – untersucht und es wurde fast immer von ähnlichen Ergebnisse berichtet: Unabhängig von der Lokalisation ist die Tumorbildung in der Regel mit Lymphknotenmetastasen und aggressivem Verhalten assoziiert und sie ist meist unabhängig von anderen negativen Faktoren (73). Ein relevanter Kritikpunkt war in der Vergangenheit die Tatsache, dass es uneinheitliche Bewertungskriterien bezüglich des Tumor Budding gab. Es war daher das Ziel der 2016 in der Schweiz durchgeführten internationalen Tumor-Budding-Konsensus-Konferenz (ITBCC), dieses Problem zu lösen. Dabei einigten sich international anerkannte Experten auf ein evidenzbasiertes standardisiertes Scoring-System für Tumorsprossen bei Darmkrebs. Dort legte man folgende zehn Aussagen fest (74):

1. Tumorknospung ist definiert als eine einzelne Tumorzelle oder als ein Zellcluster, bestehend aus vier Tumorzellen oder weniger.
2. Tumorknospung ist ein unabhängiger Prädiktor für Lymphknotenmetastasen in pT1-kolorektalen Karzinomen.

3. Tumorknospung ist ein unabhängiger Prädiktor für das Überleben von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium II.
4. Tumorknospen sollten zusammen mit anderen klinisch-pathologischen Merkmalen multidisziplinär berücksichtigt werden.
5. Bei der Tumorknospung werden mittels HE-Färbung die Zellen gezählt.
6. Tumorknospung existiert bei Darmkrebs weltweit und wurde mit Lymphknotenmetastasen in Verbindung gebracht.
7. Tumorknospung wird in einem mikroskopischen Hotspot (in einem Feld von 0,785 mm² Größe) an der invasiven Tumorfront beurteilt.
8. Zur Erleichterung der Risikostratifizierung bei kolorektalem Karzinom sollte ein dreistufiges System zusammen mit der Keimzahlbestimmung verwendet werden.
9. Tumorknospung und Tumorgrad sind nicht gleichzusetzen.
10. Tumorknospung sollte in Richtlinien/Protokollen für Darmkrebsberichterstattung enthalten sein.

Wenngleich die Konferenz das Problem der uneinheitlichen Bewertungskriterien lösen konnte, so besteht dennoch nach wie vor die Schwierigkeit einer relativ hohen Interobserver-Variabilität. Besonders Fälle, die zwischen einem eindeutig negativen und einem eindeutig positiven Budding-Ergebnis liegen, bereiten Schwierigkeiten bezüglich der objektiven Einstufung. In diesen besonders schwierigen Fällen könnte die Beurteilung durch mehrere unabhängige Untersucher mit Findung einer Konsensusbeurteilung Abhilfe schaffen (75).

1.6 Ziel der Arbeit

Aufgrund vorliegender Daten des Instituts für Pathologie am Klinikum Augsburg und aufgrund der Erfahrungen mit der Handhabung und der Kanülierung von frischen kolorektalen Proben (39) zur Hervorhebung von Lymphknoten für die Tumordiagnostik wurde die Hypothese entwickelt, dass im ausreichend vorhandenen venösen Blut von Kolonresektaten von Patienten mit Kolonkarzinom CTC detektierbar sein müssen. Der Nachweis von Tumorzellen in solchen Proben könnte für die hämatogene Tumorverbreitung und die fortschreitende Erkrankung prognostisch sein. Es war also von Interesse, ob das Auftreten von zirkulierenden epithelialen Zellen – Zytokeratin-positiven Zellen (CK+-Zellen) – mit Tumor Budding assoziiert ist. Das Ziel der vorliegenden Studie, die an 56 Patienten mit Darmkrebs stattfand, bestand in der retrospektiven Analyse und der Bewertung, ob diese CK+-Zellen eine prognostische Rolle bei Kolonkarzinomen spielen (76).

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer Bayern genehmigt und wurde nach den nationalen Vorschriften durchgeführt. Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert (76).

2.1.1 Studienkollektiv

Das Studienkollektiv bestand aus insgesamt 56 Darmkrebsfällen, die zwischen September 2007 und Juli 2008 am Klinikum Augsburg für die geplante Untersuchung gesammelt worden waren. Bei all diesen Patienten war ein kolorektales Karzinom nachgewiesen oder es war Darmkrebs vermutet worden. Einschlusskriterien der Studie waren sowohl tumorfreie Absetzungsränder der Darmproben als auch eine kurative Intention, die Patienten zu behandeln. Für die Überlebensanalyse wurden nur maligne Fälle mit einer minimalen prognostischen Überlebenszeit von 2 Monaten eingeschlossen. Follow-up-Daten dieser Patienten wurden vom Klinischen Krebsregister Augsburg zur Verfügung gestellt. Zusätzliche Daten, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind vom Klinikum Augsburg (mit angeschlossenenem Labor) bezogen worden. Eine schriftliche Zustimmung zur Datenerhebung war im Vorfeld nach ausführlicher Information über diese Studie von allen Patienten eingeholt worden. Die anamnestischen Daten der Patienten (Alter, Geschlecht etc.) wurden den medizinischen Unterlagen entnommen.

2.1.2 Blutuntersuchung

2.1.2.1 Blutentnahme und Methylenblau-Injektion

Unmittelbar nach der Resektion wurden die kolorektalen Proben im frischen und unfixierten Zustand in das Labor des Instituts für Pathologie des Klinikums Augsburg gebracht. Die Präparate wurden nicht eröffnet, um eine Kontamination durch Schleimhautepithelien zu vermeiden. Manuelle Manipulationen wurden auf ein Minimum reduziert, um die Wahrscheinlichkeit einer künstlichen Tumorverbreitung zu reduzieren.

Nach vorsichtiger Reinigung wurden die Proben zunächst auf eine saubere Platte gelegt und die Hauptblutgefäße wurden am proximalen Ende des Darmabschnitts abgeklemmt. Dann wurde die Ligation oder der Clip, die/der von dem Chirurgen platziert worden war, entfernt. Das venöse Gefäß wurde anschließend mit einem Standard-i.v.-Katheter (17 Gauge; Braun, Melsungen, Deutschland) kanüliert. Unter Verwendung von NH₄-Heparin-Blutsammelröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden 0,5 ml bis 8,0 ml (Mittelwert: 3,8 ml; SD: 2,6 ml) venöses Blut gewonnen (Abbildung 1). Unmittelbar danach wurde die Blutprobe zur weiteren Verarbeitung in das hämatologische Labor des Klinikums Augsburg verbracht.

Im Anschluss an die Blutentnahme erfolgte die intraarterielle Methylenblau-Injektion, um eine erleichterte Lymphknotenpräparation am Folgetag zu ermöglichen. Danach wurde das Präparat eröffnet, gewaschen und über Nacht in 10%igem Formalin fixiert.



Abbildung 1 Blutentnahme aus der Mesenterialvene

Kanülierung zur Blutentnahme aus der Mesenterialvene mittels eines Standard-i.v.-Katheters nach Entfernung des intraoperativ gesetzten Clips am proximalen Ende des kolorektalen Resektats.

2.1.2.2 Blutprobenvorbereitung und Immunzytochemie

Das aus den kolorektalen Resektaten gesammelte Blut sollte hinsichtlich des Auftretens von CK⁺-Zellen bewertet werden. Das Protokoll zur Herstellung der dafür notwendigen zytologischen Proben basierte auf dem im Institut für Pathologie des Klinikums Augsburg etablierten Protokoll zum Nachweis von CK⁺-Zellen in Knochenmarkaspiraten (77, 78). Die mononuklearen Zellen wurden durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation (Dichte: 1,077 g pro Mol) bei 900 g für 30 Minuten aufgetrennt. Die Zellen wurden dann (Institut für Pathologie des Klinikums Augsburg) gewaschen und 5 Minuten bei 150 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden ungefähr 1×10^6 Zellen auf Objektträgern ausgestrichen. Zur Identifikation der (Zytokeratin-haltigen) Epithelzellen im peripheren Blut wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Zytokeratin 18 (1: 100; Chemicon, Hofheim, Deutschland) verwendet. Die Reaktionen wurden mit der Alkalischen-Phosphatase-anti-alkalischen-Phosphatase (APAAP)-Technik entwickelt, kombiniert mit einer Neufuchsin-Färbung, um die Antikörperbindung darzustellen (77, 78). Einzelne CK⁺-Zellen sowie -Zellcluster wurden manuell ausgezählt (Abbildung 2, 3).

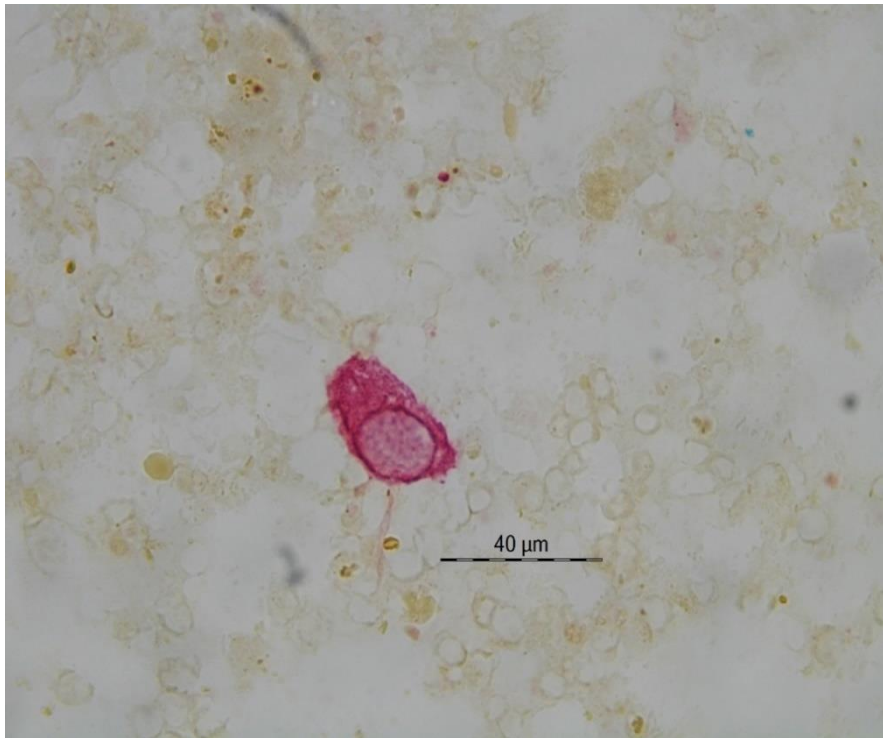


Abbildung 2 Eine einzelne CK+-Zelle

CK18-(Klon-CK2)-Zytochemie. Einzelne Zytokeratin-positive Zelle. Lichtmikroskopie, 1000-fache Vergrößerung.

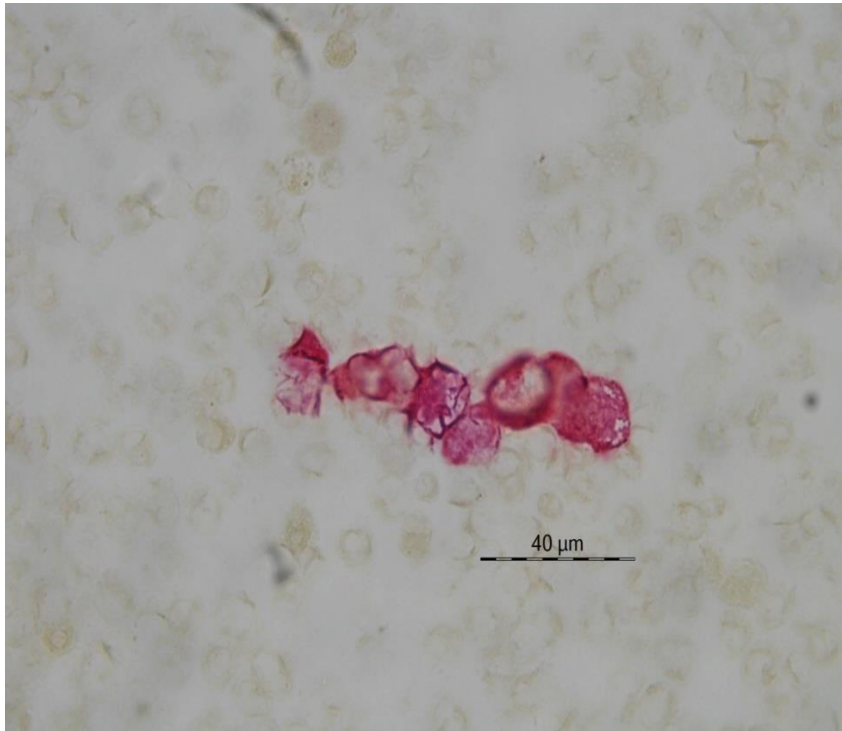


Abbildung 3 Ein CK+-Zellencluster

CK18-(Klon-CK2)-Zytochemie. Ein Zytokeratin-positiver Zellcluster. Lichtmikroskopie, 1000-fache Vergrößerung.

2.1.3 Histologische Untersuchung

2.1.3.1 Gewebepreparation und Erstellung von Standardpräparaten für die Lichtmikroskopie

Damit ein histologischer Gewebeschnitt für die Lichtmikroskopie zur Verfügung steht, muss eine Gewebeprobe mehrere Schritte durchlaufen. Diese waren standardmäßig: Fixierung des Präparats, Entwässerung, Paraffin-Einbettung, Anfertigung der Gewebeschnitte und schließlich die Färbung. Auf die einzelnen Schritte soll im Folgenden etwas genauer eingegangen werden.

Veränderungen des Gewebes wie zum Beispiel Schwellung, Schrumpfung oder Autolyse müssen verhindert werden. Deshalb verfolgt die möglichst frühzeitige Fixierung des Gewebes das Ziel, den Zustand des Gewebes so naturgemäß wie möglich beizubehalten (79). Das Präparat muss durch aufsteigende Alkoholreihen entwässert werden, bevor das fixierte Gewebe mit flüssigem Paraffin durchtränkt wird. Unter Verwendung des Lösungsmittels Toluol (oder Xylol) soll Ethanol entfernt werden, um dann dieses Intermedium durch flüssiges Paraffin zu ersetzen. Das Präparat härtet nach dem Einbetten in flüssiges Paraffin mit dem Abkühlen aus und wird damit schneidbar (79–81). Durch das Hinzugeben des richtigen organischen Lösungsmittels wie zum Beispiel Xylol wird das gewünschte Ergebnis, das Entparaffinieren, erreicht. Die behandelten Gewebeschnitte werden anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und gefärbt. Der Färbeprozess dient dazu, die grundlegenden Strukturen des Gewebes so darzustellen, damit sich diese möglichst gut voneinander differenzieren lassen (79, 80).

2.1.3.2 Histopathologische Beurteilung, Immunzytochemie und Beurteilung des Tumor Budding

Die kolorektalen Proben wurden nach Fixierung über Nacht in 10%igem gepuffertem Formalin makroskopisch beurteilt. Die Lymphknoten wurden nach dem Methylenblau-Verfahren zerlegt (39, 72). Es waren Proben aus den Resektionsrändern, dem Tumorbereich und anderen auffälligen Bereichen in Paraffin eingebettet worden.

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden mit HE gefärbt und von einem erfahrenen Pathologen ausgewertet. Basierend auf der HE-Morphologie der Strukturen wurden Folien für eine weitere Pan-Zytokeratin-Färbung ausgewählt, die durchgeführt wurde, um eine optimale Beurteilung der Tumorknospenbildung zu ermöglichen. Für diese Auswertung wurde der monoklonale Maus-Antikörper AE1/AE3 verwendet (Verdünnung 1:50; Institut für Pathologie des Klinikums Augsburg). Immunreaktionen wurden unter Verwendung eines markierten Streptavidin-Biotinsystems (DAKO Real Detection System) entwickelt. Alle Reaktionen wurden auf einem Dako-Autostainer-System (DAKO, Glostrup, Dänemark) durchgeführt. Das Tumor Budding wurde von einem Pathologen (BM) ausgewertet. Es wurde als abgetrennte einzelne Tumorzelle oder als Zellcluster von bis zu

vier Zellen definiert. Der Cut-off-Wert für hochgradiges Tumor Budding wurde im Jahr 2002 von Ueno et al. (82) definiert als ≥ 30 Knospen pro Gesichtsfeld in 20-facher Vergrößerung (= 1,3 mm²) (76).

2.2 Statistik

Die erhobenen metrischen Daten wurden unter Verwendung des Wilcoxon-Rang-Summentests verglichen. Dichotome Daten wurden mit dem χ^2 -Test (auch Fisher's Exact Test genannt) in Abhängigkeit von der erwarteten Häufigkeit der Beobachtungen analysiert. Mittelwerte werden ± 1 Standardabweichung (SD) dargestellt. Die lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um Korrelationen zwischen metrischen Daten zu berechnen. Für die Überlebensanalysen wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und Log-Rank-Tests durchgeführt.

Zur Bestimmung der optimierten Schwellenwerte wurden ROC-Analysen durchgeführt (ROC: receiver operating characteristics). Die Berechnung der Nachbeobachtungszeit erfolgte nach Schemper und Smith (83). Ein p-Wert < 0.05 wurde als signifikant angesehen. Alle Berechnungen wurden mit dem Statistikpaket Sigma Plot 13.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Studienkollektiv

Die Patientengruppen sind in Tabelle 5 zusammengefasst – in Abhängigkeit davon, ob CK+-Zellen oder -Zellcluster nachgewiesen wurden oder nicht.

Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 74 (95 %-Konfidenzintervall [CI]: 68, 79 Monate) und 80 Monate ([CI]: 77, 83 Monate).

Tabelle 5 Einteilung der Patienten in Gruppen

Einteilung der Patienten in Gruppen, je nachdem, ob Zytokeratin-positive (CK+) Zellen oder -Zellcluster nachgewiesen werden konnten oder nicht. Diesen Angaben wurden die anamnestischen Erhebungen gegenübergestellt. n: Anzahl der Patienten, SD: Standardabweichung. LK: Lymphknoten, n. c.: nicht berechnet.

Klinik – pathologische Daten des Studienkollektivs							
	vollständiges Kollektiv n = 56	CK+-Zelle negativ n = 27	CK+-Zelle positiv n = 29	p-Wert	CK+-Zellcluster negativ n = 42	CK+-Zellcluster positiv n = 14	p-Wert
Alter +/- SD	70 +/- 13	71 +/- 11	69 +/- 11	0.844	71 +/- 12	66 +/- 13	0.167
Geschlecht (m : w)	1 : 1,5	1 : 1,7	1 : 1,0	1.0	1 : 2	1 : 0,8	0.538
laparoskopische Chirurgie	15 (27 %)	5 (19 %)	10 (34 %)	n. c.	10 (24 %)	5 (36 %)	n. c.
offene Chirurgie	41 (73 %)	22 (81 %)	19 (66 %)	0.223	32 (76 %)	9 (64 %)	0.489
rechtes Kolon	21 (38 %)	10 (37 %)	11 (38 %)	n. c.	16 (38 %)	5 (36 %)	n. c.
linkes Kolon	29 (52 %)	13 (48 %)	16 (55 %)	0.927	21 (50 %)	8 (57 %)	0.979
Rektum	6 (11 %)	4 (15 %)	2 (7 %)	0.414	5 (12 %)	1 (7 %)	1.0
mittlere LK-Anzahl	32 +/- 19	29 +/- 16	35 +/- 21	0.219	30 +/- 16	36 +/- 25	0.961
LK-positiv	20 (36 %)	11 (41 %)	9 (31 %)	0.632	16 (38 %)	4 (29 %)	0.747
Niedrigwert	33 (59 %)	17 (63 %)	22 (76 %)	n. c.	28 (67 %)	11 (79 %)	n. c.
Höchstwert	20 (36 %)	8 (30 %)	6 (21 %)	0.576	11 (26 %)	3 (21 %)	0.735
nicht bösartig	3 (5 %)	2 (7 %)	1 (3 %)	n. c.	3 (21 %)	0 (0 %)	n. c.
pT1/2	16 (29 %)	7 (26 %)	9 (31 %)	n. c.	11 (26 %)	5 (36 %)	n. c.
pT3/4	37 (66 %)	18 (67 %)	19 (66 %)	0.977	28 (67 %)	9 (64 %)	0.736
mittlere Knospung	21 +/- 27	20 +/- 23	22 +/- 30	0.957	19 +/- 20	21 +/- 26	0.663
hochgradige Knospung	16 (29 %)	6 (22 %)	10 (34 %)	0.472	10 (24 %)	6 (43 %)	0.190
Fernmetastase	11 (20 %)	5 (19 %)	6 (21 %)	1.0	8 (19 %)	3 (21 %)	1.0

3.2 Histopathologische Beurteilung

Mit diesem Verfahren wurden CK+-Zellen und -Zellcluster und ihre Beziehung zu klinisch-pathologischen Merkmalen untersucht.

CK+-Zellen wurden in 29 von den untersuchten 56 Fällen (52 %) mit einer mittleren Anzahl von 12 ± 14 Zellen pro 10^6 Zellen gefunden. Bei einem dieser Fälle lag keine maligne Erkrankung vor, sondern eine Sigmadivertikulitis. Es waren hierbei 2 CK+-Zellen pro 10^6 Zellen nachweisbar.

CK+-Zellcluster wurden in 14 Fällen (25 %) nachgewiesen. Die mittlere Anzahl von Clustern betrug dabei 3 ± 3 Cluster pro 10^6 Zellen. Es wurden keine Cluster in nicht malignen Fällen gefunden. Es bestand eine starke Korrelation zwischen CK+-Zellen und -Zellclustern ($R =$

0,727; $p < 0.001$). Diese Cluster waren stets auch mit dem Auftreten von einzelnen CK+-Zellen vergesellschaftet. Keines der untersuchten klinisch-pathologischen Merkmale (Alter, Geschlecht, Lokalisation, Lymphknotenzahl, Grading, T-Stadium, Metastasen) zeigte eine Assoziation mit dem Auftreten von CK+-Zellen oder -Zellclustern (Tabelle 5). Insbesondere war weder das Vorkommen von CK+-Zellen noch das von CK+-Zellclustern mit Tumor Budding assoziiert ($R = 0,180$; $p = 0.185$ und $R = 0,0637$; $p = 0.647$). Die chirurgische Technik (offene vs. laparoskopische Technik) beeinflusste das Auftreten von CK+-Zellen oder -Zellclustern nicht (Tabelle 5).

3.3 Überlebensanalyse

In 48 von den 56 Fällen (85 %) waren die Einschlusskriterien für die Überlebens-Analyse erfüllt, das heißt, es wurden nur maligne Fälle mit einer minimalen prognostischen Überlebenszeit von 2 Monaten berücksichtigt. Die Analyse des krankheitsspezifischen Überlebens (CSS) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Fällen mit oder ohne Nachweis von CK+-Zellen (Abbildung 4). Auch hinsichtlich des Gesamtüberlebens (OS) ergaben sich keinerlei Unterschiede (Abbildung 5).

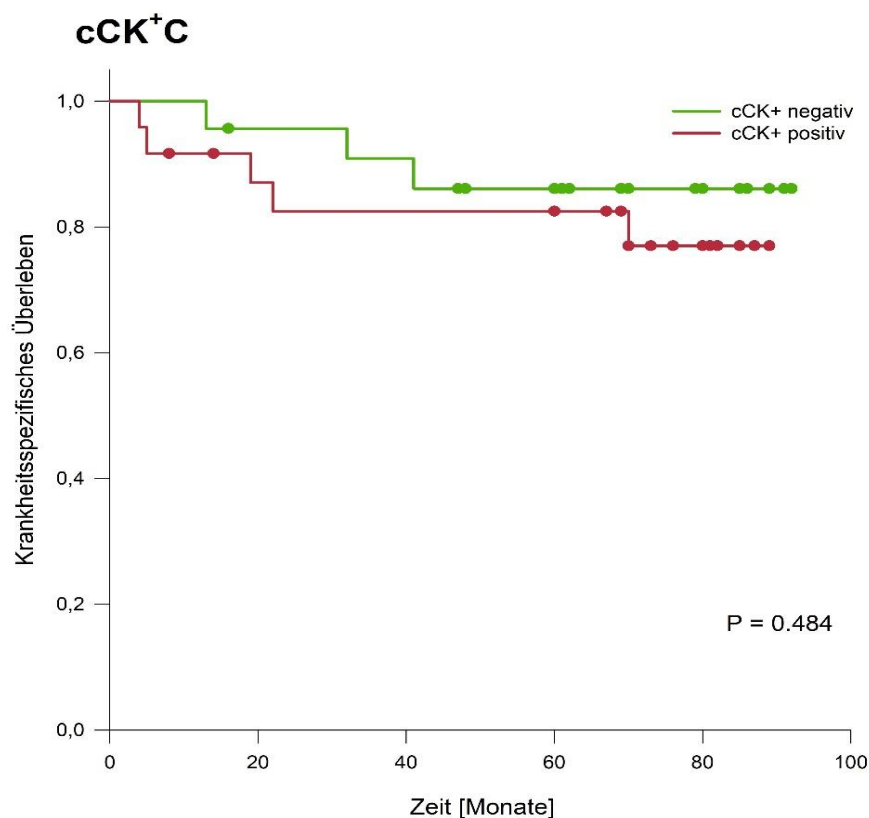


Abbildung 4 Kaplan-Meier-Kurve zum krankheitsspezifischen Überleben in Bezug auf Zytokeratin-positive Zellen

Untersucht wurden 48 von 56 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Teils wurden Zytokeratin-positive (CK+) Zellen nicht nachgewiesen (grüne Linie), teils wurden sie nachgewiesen (braune Linie). cCK⁺C: zirkulierende CK+-Zellen.

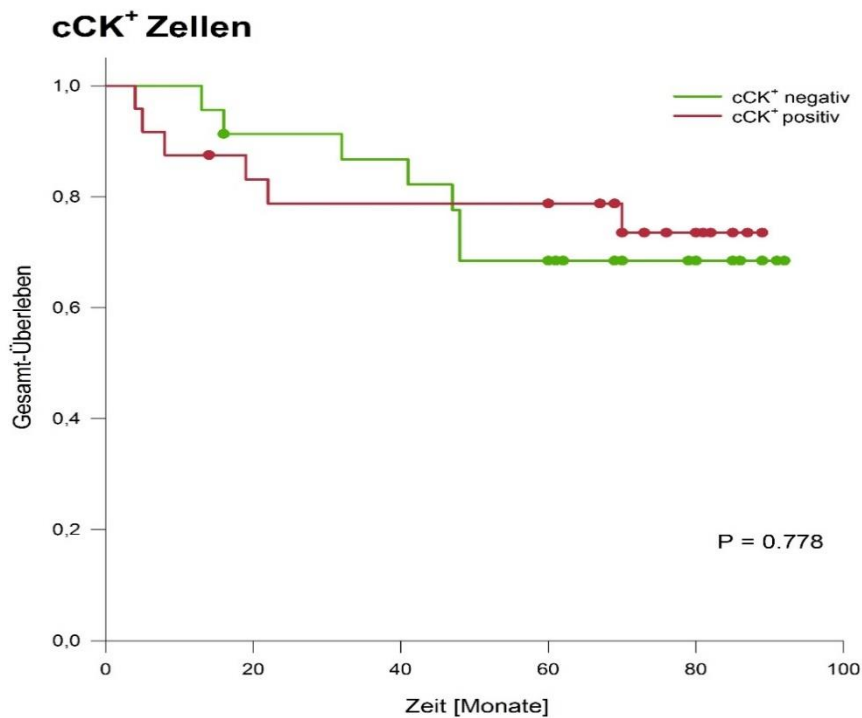


Abbildung 5 Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben in Bezug auf Zytokeratin-positive Zellen

Untersucht wurden 48 von 56 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Teils wurden Zytokeratin-positive (CK+) Zellen nicht nachgewiesen (rote Linie), teils wurden sie nachgewiesen (braune Linie). cCK⁺C: zirkulierende CK+-Zellen.

Trotz fehlender Signifikanz zeigt die Kaplan-Meier-Kurve in Bezug auf CK+-Zellen einen Unterschied zwischen CK+-positiven und -negativen Fällen mit mittleren CSS-Zeiten von 75 Monaten (CI: 61; 88) gegenüber 83 Monaten (CI: 72; 95) (Abbildung 4). Keinerlei Unterschiede ergaben sich diesbezüglich bei den Fällen mit und ohne CK+-Zellclustern bezogen auf das OS (Abbildung 6).

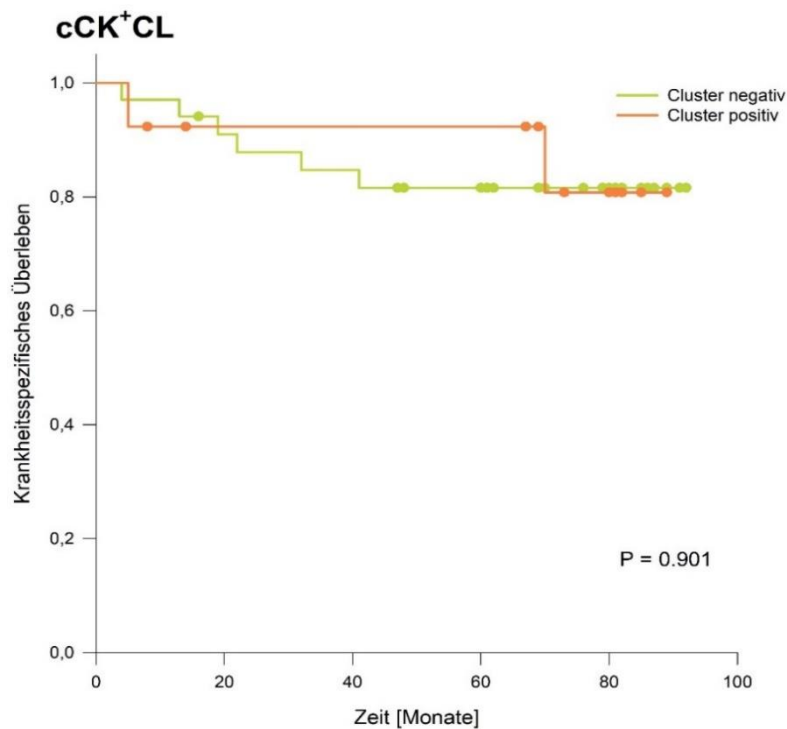


Abbildung 6 Kaplan-Meier-Kurve zum krankheitsspezifischen Überleben in Bezug auf Zytokeratin-positive Zellcluster

Untersucht wurden 48 von 56 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Teils wurden Zytokeratin-positive (CK+) Zellcluster nicht nachgewiesen (grüne Linie), teils wurden sie nachgewiesen (orange Linie). cCK⁺CL: zirkulierende CK+-Zellcluster.

Das krankheitsspezifische Überleben (Abbildung 6) war nahezu identisch mit durchschnittlichen Gesamtüberlebenszeiten von 80 Monaten (CI: 63; 98) gegenüber 79 Monaten (CI: 69; 89) (Abbildung 5). Mittels einer ROC-Kurven-Analyse konnte ein Schwellenwert für CK+-Zellen oder -Zellcluster ermittelt werden, der den Faktoren eine höhere prognostische Aussagekraft als die einfache Unterscheidung zwischen strikt negativen und positiven Fällen zuweist. Die Fälle unterhalb der Kurve (area under the curve [AUC]) lagen zwischen 0,51 und 0,55 (ohne Abbildung).

Der Vergleich von Fällen mit und ohne hochgradigem Tumor Budding ergab einen nicht signifikanten Trend hinsichtlich eines ungünstigeren Krankheitsverlaufs von

Fällen mit hochgradigem Tumor Budding, 71 Monaten (CI: 53; 89 Monate) gegenüber 83 Monaten (CI: 73; 93 Monate) in Fällen mit niedriggradigem Tumor Budding ($p = 0.187$; Abbildung 7).

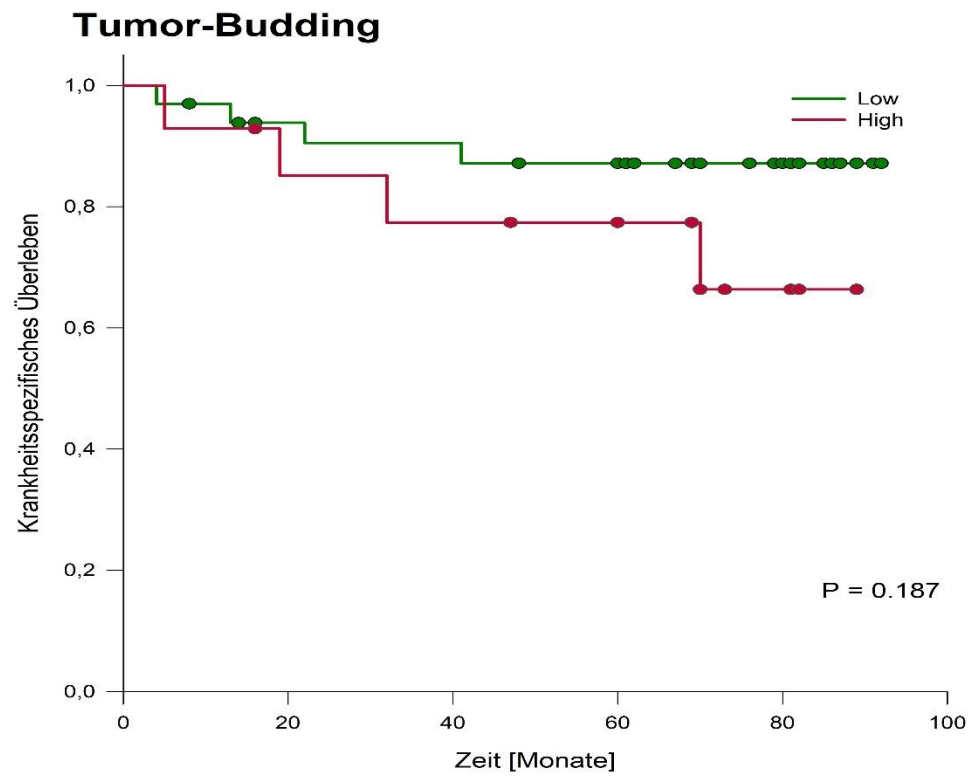


Abbildung 7 Kaplan-Meier-Kurve zum krankheitsspezifischen Überleben in Bezug auf Tumor Budding

Untersucht wurden 48 von 56 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Teils war dieses Phänomen geringgradig ausgeprägt (grüne Linie), teils war es hochgradig ausgeprägt (rote Linie).

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, welche prognostische Rolle zirkulierende CK+-Zellen und -Zellcluster im Hinblick auf das Gesamtüberleben und das krankheitsspezifische Überleben der 56 untersuchten Patienten mit kolorektalem Karzinom spielen. Diese zirkulierenden CK+-Zellen und -Zellcluster sind aus dem venösen peripheren (nämlich mesenterialen) Blut von kolorektalen Proben gewonnen worden. Die Hypothese war, dass das Blut dieser Proben mit zirkulierenden CK+-Zellen und -Zellclustern angereichert sein müsste. Das Phänomen des Tumor Budding (Tumorknospung) ist als prognostischer Faktor bei kolorektalem Karzinom zu werten (74) und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls beurteilt.

Zum Nachweis der CK+-Zellen und -Zellcluster wurde eine Technik verwendet, die für den Nachweis dieser Zellen im Knochenmark von Brust-, Prostata-, Lungen- und Dickdarmkrebs-Patienten gut etabliert ist. Damit kann der Nachweis der CK+-Zellen als prognostisch verwendet werden (77, 78, 84, 85).

In der aktuellen Studie wurden zirkulierende CK+-Zellen und -Zellcluster im mesenterialen Blut mit einem hohen Anteil von 52 % bzw. 25 % gefunden. Dieses Ergebnis liegt damit in dem in der Literatur veröffentlichten Bereich (siehe Tabelle 6 im Anhang). Es muss jedoch angemerkt werden, dass lediglich Leather et al. (1993) eine immunzytochemische Untersuchung durchgeführt haben, um zirkulierende CK+ Zellen im Mesenterialblut nachzuweisen (86). In allen anderen Studien wurden jedoch molekulare oder Durchflusszytometrietekniken verwendet (87–103).

Unter Berücksichtigung der Fallzahlen der einzelnen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Studie die mittlere Positivitätsrate berechnet. Die Ergebnisse ergaben eine Rate von 43 %. Als diese Berechnung auf Stadium-IV-Fälle beschränkt wurde, betrug die mittlere Positivitätsrate 55 %.

Zu beachten ist, dass in dieser aktuellen Studie in einem nicht malignen Fall mit Divertikulitis auch zwei CK+-Zellen pro 10^6 Zellen gefunden worden waren. Das Phänomen der zirkulierenden Epithelzellen im Blut in Abwesenheit eines bösartigen Tumors wurde auch von anderen Autoren entdeckt. Pantel et al. (104) berichteten 2012 über den Nachweis von CK+-Zellen bei gutartigen Darmerkrankungen (wie z. B. Morbus Crohn, bei benignen Polypen) mit zwei verschiedenen validierten CTC-Assays, dem epithelialen Immunospot Assay (EPISPOT, Erfassen tumorspezifischer Proteine) in 18,9 % und dem CELLSEARCH[®]-System in 11,3 % der Fälle. Diese CELLSEARCH[®]-Technik ist die einzige vollständig standardisierte und von der United States Food and Drug Agency (FDA) genehmigte Nachweismethode, bei der ein Epithelzelladhäsionsmolekül (EpCAM)-abhängiger Anreicherungsschritt verwendet wird (47, 49). (Epithelzelladhäsionsmoleküle werden auf Epithelzellen und vielen Karzinomzellen exprimiert und können daher zum Nachweis von

CTC dienen.) Dieses System wurde von der FDA nur für die Detektion und Aufzählung von CTC bei Patienten mit metastasiertem Kolorektal-, Prostata- und Brustkrebs zugelassen. Neue Technologien werden in der Regel mit dem CELLSEARCH[®]-System verglichen (47). Allerdings ist es unklar, ob CTC ihren epithelialen Phänotyp behalten, vor allem während des EMT. Tests für CTC müssen sehr spezifisch und empfindlich sein, da CTC relativ selten im Blut sind im Vergleich zu der hohen Anzahl von hämatopoetischen Zellen (105). Der EPISPOT detektiert nur lebensfähige CK19-freisetzende CTC, die durch Depletion von CD45+-Leukozyten angereichert wurden, während mit dem CELLSEARCH[®]-System zirkulierende CK+-Tumorzellen nach positiver EpCAM-basierter immunomagnetischer Anreicherung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die CELLSEARCH[®]- und EPISPOT-Verfahren komplementäre Werkzeuge zum Nachweis von zirkulierenden Epithelzellen sind (104). Insgesamt kann daraus geschlossen werden, dass inflammatorische Zytokine die Migration von Epithelzellen stimulieren (106) und Epithelzellen aus nicht malignen Kolonepithelien unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. Entzündungen, in den Blutkreislauf gelangen können (104).

Zusammenfassend zeigt dies, dass die mit der immunzytochemischen Methode der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse mit anderen Techniken vergleichbar und gültig sind.

Trotz der Verwendung einer offensichtlich sensitiven Methode konnte die Hypothese, dass zirkulierende Epithelzellen im Mesenterialblut ein prognostischer Marker für Kolorektalkarzinome sind, die mit Tumor Budding korrelieren, nicht bestätigt werden. Diese Studie war durch eine relativ kleine Fallzahl ($n = 56$) demnach nicht geeignet, um eindeutige Effekte zu erkennen und belastbare Ergebnisse zu erzielen.

Bei der Planung der Studie gingen wir davon aus, dass der prognostische Effekt des Nachweises von CK+-Zellen mindestens so stark ist, wie der der positiven Knoten. Andere Studien haben gezeigt, dass die Anzahl zirkulierender Tumorzellen, die aus dem peripheren Blut nach Resektion des Primärtumors bestimmt worden waren, eine signifikante Korrelation mit der regionalen Lymphknotenbeteiligung und dem Krankheitsstadium gezeigt haben. Dementsprechend liefern diese Werte Informationen über die Prognose und die Therapie des Patienten (107). Tatsächlich zeigte der Lymphknotenstatus in dieser Studie eine gute Diskriminierung in Bezug auf das krankheitsspezifische Überleben mit einem p-Wert von 0.058.

Die Stärken der vorliegenden Studie liegen in der langen Nachbeobachtungszeit und der präzisen Auswertung histologischer Merkmale, einschließlich einer immunzytochemischen Beurteilung des Tumor Budding (73, 108). Im Allgemeinen werden die grundlegenden molekularen Veränderungen in diesem Zusammenhang als epithelial-mesenchymaler Übergang (EMT) beschrieben, der es Tumorzellen ermöglicht zu wandern, in Gefäße

einzufragen und sich im Organismus zu verbreiten. Es muss jedoch betont werden, dass in dieser Studie nicht gezeigt wurde, dass Tumor Budding mit EMT gleichzusetzen ist. Daher könnte es angemessener sein, es als einen EMT-ähnlichen Prozess zu beschreiben. Trotz erheblicher Einschränkungen aufgrund der damals noch fehlenden allgemein akzeptierten Definition für Tumor Budding und einer nur mäßigen Interobserver-Übereinstimmung wurde dies in vielen Studien gezeigt (73, 108).

Wie bereits in dieser Arbeit dargestellt, ist keiner der in Tabelle 6 (siehe Anhang 7.1) gezeigten Studien und auch sonst in keinen weiteren Untersuchungen die mögliche Beziehung zwischen dem Phänomen der Tumorzellisierung bei der Invasion von kolorektalen Karzinomen und dem Auftreten von CTC im Blut hergestellt worden. Cao et al. (2015) postulierten in einer Übersicht, dass EMT zu Tumor Budding und nachfolgender Blutgefäßinvasion führt (109). Dies wird jedoch von anderen Referenzen nicht gestützt. In dieser Studie schien es zunächst ziemlich offensichtlich, dass eine Korrelation zwischen diesen beiden Faktoren besteht. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Es konnte keine Korrelation zwischen Tumor Budding und zirkulierenden CK + Zellen festgestellt werden und es konnte nicht bestätigt werden, dass eine Kombination aus Tumor Budding und CK+-Zellen prognostisch war. Die Signifikanz wurde jedoch aufgrund der kleinen Stichprobenzahl wahrscheinlich nicht erreicht (76).

Zirkulierende Tumorzellen sind Epithelzellen, die in Krebspatientenblut gefunden werden, die einen intakten Kern aufweisen und die Expression von Zytokeratin zeigen (6). Die genaue Rolle dieser CTC, die bei Patienten mit Metastasen nachgewiesen werden, bleibt unbekannt. Einige dieser CTC können von dem Primärtumor zu Orten geschwemmt werden, wo sich Metastasen bilden können. Diese Theorie würde die Tatsache erklären, dass der Nachweis von CTC mit einem schlechten Ergebnis bei Patienten mit metastasiertem CRC assoziiert ist (110).

CTC sind bezüglich ihrer Oberflächenantigene und in ihren genetischen Eigenschaften stark heterogen. Sie können mittels verschiedener Technologien, mit denen ihre physikalischen und biologischen Eigenschaften genutzt werden, angereichert und nachgewiesen werden. In den letzten Jahren wurden wesentliche technologische Fortschritte entwickelt, um CTC zu identifizieren (111–113). So bedeuten der Nachweis von CTC und freier Nukleinsäure (DNA) im peripheren Blut eine wichtige Möglichkeit für die Diagnose, die Prognose sowie die therapeutischen Ergebnisse bei Patienten mit CRC (114).

Da CTC bei Patienten ohne Malignität nicht vorhanden sind und bei Patienten mit fast allen Krebsarten nachgewiesen werden, sind CTC für das Verstehen der frühen Phase der Metastasierung von großer Bedeutung und werden zur Diagnose eingesetzt (115). In dieser Studie und unter anderem bei anderen Autoren wurden im gutartigen Fall allerdings doch CTC gefunden. Die meisten Studien zeigten CTC bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien

von Krebs auf. Wie die primären Tumorzellen exprimieren auch CTC Epithelmarker wie Epithelzelladhäsionsmoleküle (EpCAM) oder bestimmte Zytokeratine. CTC zirkulieren im peripheren Blut von Patienten mit metastasierendem Krebs mit einer extrem niedrigen Frequenz von etwa einer CTC pro 10^5 mononuklearen Zellen. Diese Zahlen sind noch niedriger bei Patienten, bei denen der Krebs noch nicht gestreut hat (116, 117). Aktuelle Verfahren zum Nachweis von CTC umfassen Anreicherungs- und Nachweisschritte. Dabei basiert die Anreicherung dieser Zellen auf Zellgröße, Dichte und auf positiver Immunoselektion (z. B. Epithelzelladhäsionsmolekül auf antikörperbasierter Anreicherung von CTC (118) oder negativer Immunoselektion (z. B. Reduzierung von Leukozytenzahl durch CD45-Antikörper [119, 120]). Verfahren zur CTC-Detektion werden weitgehend in nukleinsäurebasierte Ansätze (PCR-Targeting verschiedener epithelialer mRNAs, Zytokeratine [115] und EpCAM) sowie in immunologische (Immunzytochemie mit Anti-CK- oder -EpCAM-Antikörpern) und epitheliale Immunospot (EPISPOT) Assays unterteilt (105). Der wahre Ursprung von CTC und DTC ist nicht immer klar und die Angaben zu ihrer prognostischen Bedeutung sind widersprüchlich (121). Ihr Phänotyp kann sich im Laufe der Krankheit oder sogar während des Prozesses der Verbreitung ändern (48). Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass CTC/DTC von prognostischer Bedeutung sind (111, 122). Zwei Meta-Analysen adressierten dieses Thema. Katsuno et al. (2008) beschränkten ihre Analyse auf molekular nachgewiesene CTC im Mesenterialblut und schlossen weitere neun Studien ein. Sie fanden ein positives Ergebnis bei CTC-negativen Patienten (Hazard Ratio 0,4–0,08).

Die Studie von Rahbari et al. (2010) enthielt 36 Untersuchungen mit insgesamt 3094 Patienten. Sie identifizierten auch eine prognostische Wirkung von CTC. Eine Stratifizierung nach dem Probenahmekompartiment ergab jedoch, dass CTC des peripheren Blutes prognostisch waren, die des Mesenterialbluts jedoch nicht (123). Ähnliches konnte mit der vorliegenden Studie belegt werden, nämlich dass die Identifizierung von CK+-Zellen oder -Zellcluster keine prognostische Wirkung hatte. Darüber hinaus scheiterte in der aktuellen Untersuchung der Ansatz, bei dem ROC-Analysen verwendet wurden. Damit sollte eigentlich durch Ausschluss bestimmter Zellen eine Prognose abgeleitet werden, was aber nicht gelang.

CTC scheinen verschiedene Zelltypen neoplastischen und nicht neoplastischen Ursprungs zu umfassen. Darüber hinaus ist es sehr wahrscheinlich, dass Krebszellen ein unterschiedliches Potenzial haben, der immunogenen Zerstörung zu entkommen und an einer entfernten Stelle Tumorwachstum zu etablieren. Je nach Kompartiment können Zellen sich phänotypisch verändern.

Wie bereits erwähnt, ist EMT ein entscheidender Prozess bei der Krebsprogression und mit ungünstigem Outcome assoziiert (124, 125). Zellen, die einen EMT durchlaufen, verlieren

ihren epithelialen Phänotyp und erlangen mesenchymale Merkmale (126). Somit weisen Blutzellen aufgrund ihres mesenchymalen Ursprungs normalerweise keine nachweisbare Expression von Epithelmarkern auf, weshalb in dieser Studie vermutlich keine Ck+-Zellen nachgewiesen werden konnten, obwohl sie vielleicht da waren (105).

Methoden, die für den Nachweis von Epithelzellen optimiert sind, reagieren auf alle CTC und liefern daher unter Umständen falsch positive Ergebnisse. Und umgekehrt ist es möglich, dass mittels dieser Methoden relevante Zellen (also epitheliale Zellen) nicht erkannt werden (126).

Nach derzeitigem Stand der Literatur scheint weder das Blut, das beim Patienten direkt entnommen wurde, noch das Mesenterialblut aus dem Resektat das optimale Material für den Nachweis von CTC zu sein. Hier scheint das Knochenmark eine bessere Quelle für den Nachweis für die Verbreitung von Tumorzellen zu sein. In diesem Zusammenhang ist es sicher interessant, zukünftig Zellen mit Stammzeleigenschaften (aus dem Knochenmark) zu untersuchen. Die Entwicklung einer schnellen, genauen und kostengünstigen technischen Methode zum Nachweis dieser Zellen ist wahrscheinlich der vielversprechendste Ansatz.

5 Zusammenfassung

In Rahmen dieser Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass der immunzytochemische Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen im mesenterialen Blut von kolorektalen Karzinomproben mit Tumor Budding korreliert und als einfach zu bestimmender prognostischer Faktor dienen könnte. Die Entnahme des Blutes nach der Resektion würde in der Praxis eine erhebliche Zeitersparnis bedeuten und ein zusätzliches Risiko während der Operation vermeiden. Keine dieser Hypothesen jedoch konnte mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Weder das Blut, das beim Patienten direkt entnommen wurde, noch das Mesenterialblut aus dem Resektat scheint nach wie vor das optimale Material für den Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen zu sein. Hier scheint das Knochenmark eine bessere Quelle für den Nachweis für die Verbreitung von Tumorzellen zu sein.

Komplexere Techniken als die in dieser Studie verwendeten, einschließlich molekularer Ansätze, sind relativ teuer und ihre Verfügbarkeit ist begrenzt.

Dennoch sollte in Erwägung gezogen werden, zukünftige Untersuchungen damit durchzuführen, denn sie haben das Potenzial, genau die Zellen zu detektieren, die für den klinischen Verlauf der Erkrankung und damit für die Einschätzung der Prognose am relevantesten sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Tseng JY, Yang CY, Liang SC, Liu RS, Jiang JK, Lin CH. Dynamic changes in numbers and properties of circulating tumor cells and their potential applications. *Cancers*. 2014;6(4):2369–86.
2. Böckelman C, Engelmann BE, Kaprio T, Hansen TF, Glimelius B. Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III: a systematic review and meta-analysis of recent literature. *Acta Oncol*. 2015;54(1):5–16.
3. Kamiyama H, Noda H, Konishi F, Rikiyama T. Molecular biomarkers for the detection of metastatic colorectal cancer cells. *World J gastroenterol*. 2014;20(27):8928–38.
4. Paget, S. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet*. 1889(133):571–3.
5. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003(3):453–8.
6. Powell AA TA, Zhang H et al.. Single cell pro ling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines.. *PLoS ONE* 2012;7(5): e33788
7. Fan C, Younis A, Bookhout CE, Crockett SD. Management of Serrated Polyps of the Colon. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2018; 16(1):182–202.
8. Odze RD, Goldblum JR. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 2nd ed. p 634.
9. Aggarwal C, Meropol NJ, Punt CJ et al. Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(2):420–8.
10. leading-medicine-guide.de [Internet]. Heidelberg: Deutscher Verlag für Gesundheitsinformation GmbH [cited 2017 Jul 01]. Available from: <https://www.leading-medicine-guide.de/zertifizierte-Zentren/Darmkrebsvorsorge>.
11. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):540–50.
12. Mazzocca A, Fransvea E, Dituri F, Lupo L, Antonaci S, Giannelli G. Down-regulation of connective tissue growth factor by inhibition of transforming growth factor beta blocks the tumor- stroma cross-talk and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51(2):523–34.
13. Divella R, Danielle A, Gadaleta C, Tufaro A, Venneri MT, Paradiso A, Quaranta M. Circulating transforming growth factor- β and epidermal growth factor receptor as related to virus infection in liver carcinogenesis. *Anticancer Res*. 2012;32(1):141–5.
14. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol*. 2015;33(16):1787–96.
15. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(16):1196–206.
16. Remmele W (ed). *Verdauungstrakt*. In: *Pathologie Bd. 2*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1996.

17. Odze R, Goldblum J. Conventional adenoma, pathologic features. Surgical pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2009.
18. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275–92.
19. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun, J. Basislehrbuch Innere Medizin. 4th ed. München, Jena: Elsevier GmbH, Urban & Fischer;
20. Piper W. Innere Medizin. Heidelberg: Springer; 2007. p. 378.
21. Herold G. Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln: Gerd Herold; 2012.
22. Engel C, Rahner N, Schulmann K et al. Efficacy of annual colonoscopic surveillance in individuals with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(2):174–82.
23. Lamberti C, Mangold E, Pagenstecher C et al. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer among unselected patients with colorectal cancer in Germany. *Digestion*. 2006;74(1):58–67.
24. Bosman FT Carneiro F, Hruban, RH, Theise ND., editor. Lynch Syndrome. Lyon 2010.
25. Kopetz S, Taberno J, Rosenberg R et al. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors. *Oncologist*. 2015;20(2):127–33.
26. Gray RG, Q P, Handley K et al. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(35):4611–9.
27. Fritz A, Percy C, Jack A et al., editors. International Classification of Diseases for Oncology. 3rd ed. Genf: WHO; 2000.
28. Wittekind C, editor. TNM Klassifikation maligner Tumoren. 8th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2017.
29. Wittekind C, Compton CC, Brierley J, Sobin LH (editors). TNM-Supplement: Erläuterungen zur einheitlichen Anwendung. 4th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014.
30. Wittekind C, Sobin LH (editors). TNM Atlas. 7th ed. New York: John Wiley & Sons; 2014.
31. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene F, Trotti A. AJCC Cancer staging handbook. 7th ed. Heidelberg: Springer; 2010.
32. Eickhoff A, Bechtler M, Riemann JF. Früherkennung des kolorektalen Karzinoms. Aktuelle Vorgehensweise: Koloskopie, Stuhltest, Radiologie. *best practice onkologie*. 2009;4(4):4–13.
33. Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Cancer*. 2010;46(14):2555–62.
34. Halle M, Schoenberg MH. Körperliche Aktivität in der Prävention und Therapie des kolorektalen Karzinoms. *Dtsch Arztebl*. 2009;106(44):722–7.

35. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL. 2013.
36. Lippert H. Lehrbuch Anatomie. 6th ed. München, Jena: Elsevier GmbH, Urban & Fischer. 2003.
37. Robert Koch-Institut, editor. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7th ed. Berlin 2010.
38. Schneider ARJ, Caspary WF. Diagnostik kolorektaler Karzinome. Aktueller Stand. Der Radiologe. 2003;43(2):105–12.
39. Märkl B, Kerwel TG, Jähnig HG et al. Methylene blue-assisted lymph node dissection in colon specimens: a prospective, randomized study. Am J Clin Pathol. 2008;130(6):913–9.
40. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. Breast Cancer Res. 2011;13(6):228.
41. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(26):14608–13.
42. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxy- uridine. J Natl Cancer Inst. 1970;45(4):773–82.
43. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. Int J Cancer. 2008;123(9):1991–2006.
44. Janni W, Vogl FD, Wiedswang G et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse – a European pooled analysis. Clin Cancer Res. 2011;17(9):2967–76.
45. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer Nat Rev Cancer. 2004;4(6):448–56.
46. Schmidt T, Koch M, Antolovic D et al. Influence of two different resection techniques (conventional liver resection versus anterior approach) of liver metastases from colorectal cancer on hematogenous tumor cell dissemination – prospective randomized multicenter trial. BMC Surg. 2008;8:6.
47. Koch M, Kienle P, Sauer P et al. Hematogenous tumor cell dissemination during colonoscopy for colorectal cancer. Surg Endosc. 2004;18(4):587–91.
48. Koch M, Antolovic D, Kienle P et al. Increased detection rate and potential prognostic impact of disseminated tumor cells in patients undergoing endorectal ultrasound for rectal cancer. Int J Colorectal Dis. 2007;22(4):359–65.
49. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. Ther Adv Med Oncol. 2010;2(6):351–65.
50. Slade MJ, Payne R, Riethdorf S et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. Br J Cancer. 2009;100(1):160–6.

51. Mani SA, Guo W, Liao MJ et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704–15.
52. Rahbari NN, Bork U, Motschall E et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2012;30(1):60–70.
53. Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004;10(20):6897–904.
54. Glaves D. Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastases. *Br J Cancer*. 1983;48(5):665–73.
55. Mayhew E, Glaves D. Quantitation of tumorigenic disseminating and arrested cancer cells. *Br J Cancer*. 1984;50(2):159–66.
56. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998;153(3):865–73.
57. Barbera-Guillem E, Weiss L. Cancer-cell traffic in the liver. III Lethal deformation of B16 melanoma cells in liver sinusoids. *Int J Cancer*. 1993;54(5):880–4.
58. Al-Mehdi AB, Tozaea K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*. 2000;6(1):100–2.
59. Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res*. 2003;63(13):3805–11.
60. Glinsky GV, Glinskii AB, Berezovskaya O et al. Dual-color-coded imaging of viable circulating prostate carcinoma cells reveals genetic exchange between tumor cells in vivo, contributing to highly metastatic phenotypes. *Cell Cycle*. 2006;5(2):191–7.
61. Tome Y, Tsuchiya H, Hayashi K et al. In vivo gene transfer between interacting human osteosarcoma cell lines is associated with acquisition of enhanced metastatic potential. *J Cell Biochem*. 2009;108(2):362–7.
62. Kallergi G, Papadaki M, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011;13(3): R59.
63. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res*. 2012;14(1): R15.
64. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4): R46.patients. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4): R46.
65. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(9):1338–41.

66. Raimondi C, Gradilone A, Naso G et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):449–55.
67. Armstrong AJ, Marengo M, Oltean S et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res.* 2011;9(8):997–1007.
68. Yu M, Bardia A, Wittner BS et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science.* 2013;339(6119):580–4.
69. Khoja L, Backen A, Sloane R et al. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. *Br J Cancer.* 2012;106(3):508–16.
70. Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res.* 2009;69(18):7135–9.
71. Wicki A LF, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell.* 2006;9(4):261–72.
72. Kerwel TG, Spatz J, Anthuber M, Wünsch K, Arnholdt H, Märkl 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;52(5):935–41.
73. Märkl B, Arnholdt HM. Prognostic significance of tumor budding in gastrointestinal tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11:1521–33.
74. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017;30(9):1299–311.
75. Martin B, Schäfer E, Jakubowicz E et al. Interobserver variability in the H&E-based assessment of tumor budding in pT3/4 colon cancer: does it affect the prognostic relevance. *Virchows Arch.* 2018;473(2):189–97.
76. Märkl B, Wilhelms N, Anthuber M, Schenkirsch G, Schlimok G, Oruzio D. Circulating cytokeratin-positive cells and tumor budding in colorectal cancer. *World J Clin Oncol.* 2016;7(6):433–40.
77. Braun S, Pantel K, Müller P et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* 2000;342(8):525–33.
78. Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M et al. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow. *J Hematother;* 1994;3(3):165–73.
79. Lüllmann-Rauch R. *Histologie.* Stuttgart, New York: Georg Thieme; 2003.
80. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H (editors). *Repetitorium Pathologie*, 4th ed. München, Jena: Elsevier GmbH, Urban & Fischer; 2008.
81. Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK (editors). *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie.* 11th ed. München, Jena: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2008.

82. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;40(2):127–32.
83. Gassmann P, Enns A, Haier J. Role of tumor cell adhesion and migration in organ specific metastasis formation. *Onkologie*. 2004;27(6):577–82.
84. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992;340(8821):685–9.
85. Weckermann D, Polzer B, Ragg T et al. Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:1549–56.
86. Leather AJ, Gallegos NC, Kocjan G et al. Detection and enumeration of circulating tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg*. 1993;80(6):777–80.
87. Nakamori S, Kameyama M, Furukawa H et al. Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(10): S29–S36.
88. Luo C, Li S. The detection and its clinical significance of cancer cells in portal vein blood of patients with colorectal carcinoma. *Zhonghua Waike Zazhi* 1999;37:214–5.
89. Iinuma H, Okinaga K, Adachi M et al. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2000;89(4):337–44.
90. Taniguchi T, Makino M, Suzuki K, Kaibara N. Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen mRNA levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 2000;89:970–6.
91. Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg*. 2000;232(1):58–65.
92. Etoh T, Ueo H, Inoue H et al. Clinical significance of K-Ras mutations in intraoperative tumor drainage blood from patients with colorectal carcinoma. *Ann Surg Onco*. 2001;8(5):407–12
93. Fujita S, Kudo N, Akasu T, Moriya Y. Detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in peripheral and mesenteric blood from colorectal cancer patients and their prognosis. *Int J Colorectal Dis*. 2001;16(3):141–6.
94. Guller U, Zajac P, Schnider A et al. Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2002;236(6):768–75.
95. Tien YW, Lee P, Wang SM, Hsu SM, Chang KJ. Simultaneous detection of colonic epithelial cells in portal venous and peripheral blood during colorectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum* 2002;45(1):23–9.
96. Akashi A, Komuta K, Haraguchi M et al. Carcinoembryonic antigen mRNA in the mesenteric vein is not a predictor of hepatic metastasis in patients with resectable colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(12):1653–8.

97. Nozawa H, Watanabe T, Ohnishi T et al. Detection of cancer cells in mesenteric vein and peripheral vessels by measuring telomerase activity in patients with colorectal cancer. *Surgery*. 2003;134(5):791–8.
98. Sunouchi K, Machinami R, Mori M et al. Clinical impact of carcinoembryonic antigen messenger ribonucleic acid expression in tumor-draining vein blood on postoperative liver metastasis in patients with colorectal carcinoma: a prospective, cohort study. *Dis Colon Rectum* 2003;46(4):467–73.
99. Sadahiro S, Suzuki T, Ishikawa K et al. Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA-expressing cells in portal and peripheral blood during surgery does not influence relapse in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005;12(12):988–94.
100. Zhang XW, Yang H, Fan P, Yang L, Chen GY. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2005;11(3):436–8.
101. Iinuma H, Okinaga K, Egami H et al. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2006;28(2):297–306.
102. Kanellos I, Zacharakis E, Kanellos D et al. Prognostic significance of CEA levels and detection of CEA mRNA in draining venous blood in patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2006;94:3–8.
103. Tseng JY, Yang CY, Yang SH, Lin JK, Lin CH, Jiang JK. Circulating CD133(+)/ESA(+) cells in colorectal cancer patients. *J Surg Res*. 2015;199(2):362–70.
104. Pantel K, Denève E, Nocca D et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem*. 2012;58(5):936–40.
105. Bork U, Grutzmann R, Rahbari NN, Scholch S, Distler M, Reissfelder C, et al. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(30):10296–304.
106. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–7.
107. Katsuno H, Zacharakis E, Aziz O et al. Does the presence of circulating tumor cells in the venous drainage of curative colorectal cancer resections determine prognosis? A meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2008;15(11):3083–91.
108. Puppa G, Senore C, Sheahan K et al. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology* 2012;61(4):562–75.
109. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract*. 2015;211(8):557–69.
110. Powell AA, Talasz AAH, Zhang H et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS ONE* 2012;7(5): e33788.
111. Groot Koerkamp B, Rahbari NN, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(7):2156–65.

112. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6302–9.
113. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(8):781–91.
114. Lim SH, Becker TM, Chua W et al. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer letters.* 2014;346(1):24–33.
115. Pantel K, Brankenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008;8(5):329–40.
116. Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumour cells in clinical practice: Methods of detection and possible characterization. *Methods.* 2010;50(4):289–97.
117. Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry Part A.* 2007;71(3):154–62.
118. Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: More than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol.* 2007;171(2):386–95.
119. Goodale D, Phay C, Brown W et al. Flow cytometric assessment of monocyte activation markers and circulating endothelial cells in patients with localized or metastatic breast cancer. *Cytometry Part B Clin Cytom.* 2009;76(2):107–17.
120. Goodale D, Phay C, Postenka CO, Keeney M, Allan AL. Characterization of tumor cell dissemination patterns in preclinical models of cancer metastasis using flow cytometry and laser scanning cytometry. *Cytometry Part A* 2009;75(4):344–55.
121. Hardingham JE, Grover P, Winter M, Hewett PJ, Price TJ, Thierry B. Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer – 20 Years of Progress. *Mol Med* 2015;21: S25–S31.
122. Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B et al. Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1993;53:3455–8.
123. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(5):1714–26.
124. Lim SH, Becker TM, Chua W, Ng WL, de Souza P, Spring KJ. Circulating tumour cells and the epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology.* 2014;67(10):848–53.
125. Guinney J, Dienstmann R, Wang X et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21(11):1350–6.
126. Grover PK, Cummins AG, Price TJ, Roberts-Thomson IC, Hardingham JE. Circulating tumour cells: the evolving concept and the inadequacy of their enrichment by EpCAM-based methodology for basic and clinical cancer research. *Ann Oncol* 2014;25(8):1506–16.

7 Anhang

7.1 Ergänzende Tabelle

Tabelle 6 Zirkulierende Tumorzellen im mesenterialen Blut

a: Blut; b: Blut und Peritonealflüssigkeit; c: keine separate Auswertung für Blutproben; d: mehrere Messungen, e: mesenteriales Blut; f: peripheres Blut; g: mesenterial; n. a.: nicht verfügbar; u.v.: univariable; m.v.: multivariable; ICC: Immunocytochemie; PCR: Polymerase-Kettenreaktion; MACS: magnetisch aktivierte Zellsortierung; FACS: fluoreszenzaktivierte Zellsortierung.

Literaturrecherche: Studien über zirkulierende Tumorzellen im mesenterialen Blut								
Autor	Quelle	Jahr	n	Nachweismethode	Material	Stadien	% positiv	prognostische Relevanz
Leather	86	1993	42	ICC	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III, IV	15	n. a.
Nakamori	87	1997	35	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I,II,III,IV	26	u.v.; prädiktiv für das Wiederauftreten
Luo	88	1999	54	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I,II,III, IV	76	prädiktiv für Metastasen
Taniguchi	90	2000	53	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III	68	u.v.; Überleben
Yamaguchi	91	2000	52	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III, IV	44	m.v.; Überleben
Iinuma	89	2000	23	MACS	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III, IV	39	u.v.; Überleben
Fujita	93	2001	35	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III	29	u.v.; Rezidiv/Überleben
Etoh	92	2001	24	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III, IV	29	u.v.; Rezidiv/Überleben
Guller	94	2002	39	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III	8 ^a /28 ^b	c
Tien	95	2002	58	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	II, III, IV	45 ^d	n. a.
Akashi	96	2003	80	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III	44	u.v.; metastatische Krankheit
Nozawa	97	2003	41	RTA	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III, IV	37	u.v.; prädiktiv für metastatische Krankheit
Sunouchi	98	2003	37	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III, IV	43	u.v.; Überleben
Zhang	100	2005	58	PCR	Knochenmark, Pfortaderblut, peripheres Blut	I, II, III, IV	74	Korrelation mit Stage / kein analytisches Ergebnis
Sadahiro	99	2005	100	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III	45 ^e /48 ^f	n. a.
Kanellos	102	2006	108	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III	11	u.v.; metastatische Krankheit / Überleben
Iinuma	101	2006	167	PCR	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III, IV	10/34 ^g	m.v.; Überleben
Tseng	103	2015	135	FACS	mesenteriales und peripheres Blut	I, II, III	68	m.v.; Überleben

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Blutentnahme aus der Mesenterialvene.....	13
Abbildung 2	Eine einzelne CK+-Zelle	14
Abbildung 3	Ein CK+-Zellencluster	14
Abbildung 4	Kaplan-Meier-Kurve zum krankheitsspezifischen Überleben in Bezug auf Zytokeratin-positive Zellen	18
Abbildung 5	Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben in Bezug auf Zytokeratin-positive Zellen	19
Abbildung 6	Kaplan-Meier-Kurve zum krankheitsspezifischen Überleben in Bezug auf Zytokeratin-positive Zellcluster.....	20
Abbildung 7	Kaplan-Meier-Kurve zum krankheitsspezifischen Überleben in Bezug auf Tumor Budding.....	21

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	UICC-Klassifikation.....	3
Tabelle 2	T-Klassifikationen des kolorektalen Karzinoms.....	7
Tabelle 3	Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	7
Tabelle 4	M-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	8
Tabelle 5	Einteilung der Patienten in Gruppen.....	17
Tabelle 6	Zirkulierende Tumorzellen im mesenterialen Blut.....	36

7.4 Abkürzungsverzeichnis

APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
AUC	area under the curve (Bereich unterhalb der Kurve)
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CK+	Zytokeratin-positiv
CRC	colorectal carcinoma (Kolorektalkarzinom)
CSS	cancer specific survival (krebsspezifisches Überleben)
CTC	circulating tumor cells (zirkulierende Tumorzellen)
cTNM	klinische TNM-Klassifikation
DTC	disseminated tumor cells (disseminierte Tumorzellen)
EMT	epithelial-mesenchymal transition (epithelial-mesenchymaler Übergang)
EpCAM	Epithelzelladhäsionsmolekül
EPISPOT	enzyme linked immunospot assay
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FDA	United States Food and Drug Agency
FU	Fluoropyrimidine
g	Erdbeschleunigung in Meter pro Sekunde-Quadrat [m/s^2]
G	Grading
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPPC	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
ITC	isolated tumor cells (isolierte Tumorzellen)
LK	Lymphknoten
M	Fernmetastasen
mCRC	metastasiertes Kolorektalkarzinom
MET	mesenchymal-epithelial transition (mesenchymal-epithelialer Übergang)
MMR	Mismatch-Reparatur
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
N	Nodus (Lymphknoten)
OS	overall survival (Gesamtüberleben)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNI	perineurale Invasion

pTNM	pathologische TNM-Klassifikation; postoperative histopathologische TNM-Klassifikation
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	standard deviation (Standardabweichung)
T	Tumor
UICC	Union internationale contre le cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)

7.5 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Adresse: Herrenweg 17b, 97204 Höchberg
Telefon: 0170 / 7009979
E-Mail: narjes.wilhelms@yahoo.de
Geburtsdatum / -ort: 10.09.1981 / Shiraz
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

2000 Abitur in Shiraz, Iran
2000–2002 Vorbereitungskurs für die Universität,
Fächer Mathematik/Physik
2002–2005 Deutsch-Intensivkurs an der Universität Erlangen
2005–2007 Studienkolleg in Nordhausen und Potsdam
2007–2010 Medizinstudium (Vorklinik) Lübeck
Erstes Staatsexamen
2010–2016 Medizinstudium (Klinik) München
Zweites und Drittes Staatsexamen

7.6 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bruno Märkl, Leiter des Instituts für Pathologie am Klinikum Augsburg.

Mit seiner großartigen Kompetenz, seiner unendlichen Geduld, seiner Menschlichkeit und nicht zu vergessen seinem Humor hat er mich mit großer Wertschätzung mir gegenüber auf diesem Weg begleitet.

Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können. Tausend Dank hierfür!

Besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Atmosphäre, für die vielen wertvollen Anregungen und stetige Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht auch an meinen Onkel Hossein.

Er hat es mir überhaupt erst ermöglicht, dass ich in Deutschland Medizin studieren konnte. Vielen Dank!

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter und meinem Mann bedanken, die immer für mich da waren, mich mit viel Geduld bei meinem Studium unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Zirkulierende Zytokeratin-positive Zellen im peripheren Blut von Darmkrebspatienten

selbständig 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Höchberg 31.05.2019

Narjes Wilhelms

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin