

Aus dem
Universitätsklinikum Augsburg
2. Medizinische Klinik
ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Klaus Markstaller

**Korrelation des zellulären Immunstatus im peripheren Blut mit
Gewebeinfiltrierenden Lymphozyten im Primärtumor und
regionalen Lymphknoten bei Patienten mit Kolonkarzinom**

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

vorgelegt von
Pia Nerlinger

aus
Augsburg

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Rank

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Frank Kolligs

Prof. Dr. David Horst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Johanna Waidhauser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2025

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen	5
Liste der verwendeten Tabellen	7
Liste der verwendeten Abbildungen	7
1. Zusammenfassung	9
2. Einleitung	10
2.1 Maligne Darmtumore	11
2.2 Epidemiologie, Vorsorgeuntersuchungen und Klinik der Kolorektalen Karzinome	12
2.3 Pathophysiologie des Kolorektalen Adenokarzinoms	15
2.4 Aufbau und Funktion des Immunsystems	16
2.5 Immunseneszenz	20
3. Aktueller Stand der Forschung	21
4. Hypothesen und Fragestellungen	28
5. Material und Methoden	28
5.1 Studiendesign	28
5.2 Rekrutierung der Probandenkohorte – Ein und Ausschlusskriterien	29
5.3 Histologische Beurteilung des Primarius und der regionalen Lymphknoten	30
5.4 Zellulärer Immunstatus im peripheren Blut	33
5.5 Statistische Analyse	36
6. Ergebnisse	37
6.1 Patientencharakteristika	37
6.2 Analyse der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten	38
6.2.1 Vergleich der KRK-Patienten mit der gesunden Kontrollkohorte (univariate Analyse)	38
6.2.1.1 Einfluss des Tumorstadiums (UICC I/II versus UICC III/IV)	41
6.2.1.2 Einfluss der Lokalisation des Kolonkarzinoms (Seitigkeit)	42
6.2.2 Einfluss des Geschlechts (univariate Analyse)	44
6.2.3 Einfluss des Alters (univariate Analyse)	44
6.3 Gewichtung von Tumorstadium, Alter und Geschlecht in der multivariaten Analyse	49
6.3.1 Alter als Parameter der multivariaten Analyse	49

6.3.2	Geschlecht als Parameter der multivariaten Analyse _____	50
6.3.3	Tumorstadium als Parameter der multivariaten Analyse _____	50
6.4	Gewichtung von Tumorlokalisation (Seitigkeit) und Mikrosateliten(in)stabilität in der multivariaten Analyse _____	56
6.5	Korrelation von gewebsständigen und im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten _____	61
6.5.1	Vergleich von nodal negativen und nodal positiven Patienten _____	61
6.5.2	Vergleich der nodal negativen Patienten nach Einteilung der Lymphknotenausbeute _____	63
6.5.3	Vergleich der nodal-positiven Patienten in Abhängigkeit des Verhältnisses aus Metastasengröße und Lymphknotengröße _____	63
6.5.4	Kombinierte Betrachtung der LN5- und MSR-Kategorie zur Unterteilung der Patienten mit hoher und niedriger Immunantwort _____	64
6.5.5	Lymphknotenresektion _____	65
6.5.6	Korrelation zwischen den Tumor-infiltrierenden und im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten _____	66
7.	Diskussion.....	68
8.	Eigenen Publikationen _____	78
9.	Literaturverzeichnis _____	78
10.	Danksagung _____	83
11.	Eidesstattliche Versicherung _____	84

Liste der verwendeten Abkürzungen

CD3 ⁺	Unreife T-Lymphozyten, nicht geprägt
CD3 ⁺ CD56 ⁺	Humane T-Zellen, die CD56 exprimieren, sind nach Aktivierung mit Interleukin-2 zur Tumorzelllyse fähig ¹
CD4 ⁺	T-Helferzellen
CD4 ⁺ CD69	T-Zellen in Frühphase einer Immunaktivierung < 24 Stunden ²
CD4 ⁺ -CM	Zentrale Gedächtniszellen
CD4 ⁺ -EM	Effektorgedächtniszellen
CD4 ⁺ -EMRA	Effektorgedächtniszellen, die CD45RA T-Zellen reexprimieren (CD45RA ist normalerweise auf naiven T-Zellen zu finden)
CD4 ⁺ -HLA-DR	T-Zellen in Spät bzw. Folgephase (chron.) > 48 Stunden ²
CD4 ⁺ -IL2R ⁺	Interleukin 2 affine T-Helferzellen
CD4 ⁺ -Memory	Gedächtniszellen
CD4 ⁺ -Naive	naive T-Zellen
CD4 ⁺ -Regulatory	FoxP3 ⁺ T-Zellen
CD4 ⁺ -Th1	T-Helferzellen, fördern die zellvermittelte Immunität durch zytotoxische T-Zellen und Makrophagen ³
CD4 ⁺ -Th2	T-Helferzellen, fördern die Antikörperproduktion ³
CD4 ⁺ -Th17	T-Helferzellen fördern die Entzündung im Gewebe ³
CD8 ⁺	T-Suppressorzellen
CD8 ⁺ CD69	T-Zellen in Frühphase einer Immunaktivierung < 24 Stunden ²
CD8 ⁺ -CM	Zentrale Gedächtniszellen
CD8 ⁺ -Early	frühe T-Zellen
CD8 ⁺ -EM	Effektorgedächtniszellen
CD8 ⁺ -EMRA	Effektorgedächtniszellen, die CD45RA T-Zellen reexprimieren (CD45RA ist normalerweise auf naiven T-Zellen zu finden)
CD8 ⁺ -Exhausted	Erschöpfte T-Zellen
CD8 ⁺ -HLA-DR	T-Zellen in Spät bzw. Folgephase (chron.) > 48 Stunden ²
CD8 ⁺ -Intermediate	T-Zellen in der Reifung/Differenzierung
CD8 ⁺ -IL2R ⁺	Interleukin 2 affine T-Zellen ⁴
CD8 ⁺ -Late	Späte T-Zellen
CD8 ⁺ -Memory	Gedächtniszellen
CD8 ⁺ -Naive	Naive T-Zellen
CD8 ⁺ -Regulatory	Regulatorische T-Zellen
CD8 ⁺ -Terminal effector	Terminale Effector T-Zellen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CME	Komplette mesokolische Resektion
IF	Invasionsfront
IL	Interleukin
IM-Score	Immunoscore
ITL	Intratumorale T-Lymphozyten
KRK	Kolorektales Karzinom
LK	Lymphknoten
LN5	Lymphknotengröße mit einem Durchmesser ≥ 5 mm
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSR	Verhältnis von Metastasen zur Lymphknotengröße
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zelle
NLR	Neutrophilen-zu-Lymphozyten-Score
PB-Lymphozyten	Lymphozyten im peripheren Blut
TC	Tumorzentrum
Tc	Zytotoxische T-Lymphozyten
TCR	T-Zellrezeptor
Th	T-Helferzellen
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrose Faktor
UICC 0	Carcinoma in situ (Submukosa ist nicht betroffen)
UICC I	Infiltration des Karzinoms bis zur der Tunica muscularis, keine Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastasen
UICC II A	Karzinom infiltriert die Subserosa (intraperitoneale Anteile) oder das perikolische bzw. perirektale Fettgewebe (sekundär retroperitoneale Anteile), keine Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastase
UICC II B	Karzinom infiltriert das viszerale Peritoneum, keine Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastasen
UICC III A	Infiltration des Karzinoms bis zur der Tunica muscularis, 1-3 Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastasen oder Karzinom infiltriert die Submukosa, 4-6 Lymphknotenmetastasen, kein Fernmetastase
UICC III B	Karzinom infiltriert die Subserosa (intraperitoneale Anteile) oder das perikolische bzw. perirektale Fettgewebe (sekundär retroperitoneale Anteile)/Karzinom infiltriert das viszerale Peritoneum, 1-3 Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastasen oder Karzinom infiltriert die Tunica muscularis/ Karzinom infiltriert die Subserosa (intraperitoneale Anteile) oder das perikolische bzw. perirektale Fettgewebe (sekundär retroperitoneale Anteile), 4-6 Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastasen oder Karzinom infiltriert die Submukosa/Karzinom infiltriert die Tunica muscularis, mehr als 7 Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastasen
UICC III C	Karzinom infiltriert andere Strukturen, 1-3 Lymphknotenmetastasen/mehr als 7 Lymphknotenmetastasen, keine Fernmetastasen
UICC IV A	unabhängig der Infiltration des Karzinoms, unabhängig der Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen in einem Organ
UICC IV B	unabhängig der Infiltration des Karzinoms, unabhängig der Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen in einem oder mehreren Organen oder anderen Lokalisationen ohne Peritonealbefall
UICC IV C	unabhängig der Infiltration des Karzinoms, unabhängig der Lymphknotenmetastasen, Peritonealbefall mit oder ohne Fernmetastasen in anderen Organen oder anderen Lokalisationen

Liste der verwendeten Tabellen

Tabelle	1	Fluorchrom-Antikörper-Konjugate
Tabelle	2	Charakteristika der Studienpatienten
Tabelle	3	Lymphozytenuntergruppen bei gesunden Kontrollen und Patienten
Tabelle	4	Lymphozytenuntergruppen bei Patienten in Abhängigkeit der Tumorseitigkeit
Tabelle	5	Univariate Analyse der altersabhängigen Lymphozytenveränderungen pro zehn Jahre für die gesamte Kohorte
Tabelle	6	Multivariate Analyse der Lymphozytenuntergruppen in Bezug auf Alter, Geschlecht und Kolonkarzinom

Liste der verwendeten Abbildungen

Abbildung	1	Zellzählung mit einer digitalen Quantifizierungssoftware (VMscope, Berlin, Deutschland), Immunhistochemische Färbung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Tumorzentrum am Beispiel eines Patienten mit einem kolorektalem Karzinom
Abbildung	2	Gating-Strategie am Durchflusszytometer (FC500 von Beckmann Coulter)
Abbildung	3	Vergleich der Lymphozyten-Untergruppen zwischen Kolonkarzinompatienten und gesunden Kontrollpersonen
Abbildung	4	Altersabhängige Verteilung der Zellzahlen und mediane Abnahme im Laufe der Lebensdauer
Abbildung	5	Einfluss von Alter, Geschlecht und Kolonkarzinom auf Lymphozytenuntergruppen, berechnet in multivariater Analyse

-
- Abbildung 6 Medianwerte tumorinfiltrierender Lymphozyten bei (A) nodal negativen vs. nodal-positiven Patienten, (B) nach der LN5-Kategorie, (C) nach der MSR-Kategorie, (D) Patienten mit einer niedrigen oder hohen Lymphknotenimmunaktivierung und (E) bei stabilen oder instabilen Mikrosatellitenpatienten
- Abbildung 7 Vergleich der zirkulierenden Lymphozyten-Untergruppen zwischen Patienten mit einer niedrigen oder hohen Lymphknotenimmunaktivierung
- Abbildung 8 Korrelation von tumorinfiltrierenden und ausgewählten zirkulierenden Lymphozyten
- Abbildung 9 Hypothesen zur prognostischen Wirkung des Lymphknotenertrags Darmkrebs.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die zelluläre Immunantwort bei Patienten mit einer Karzinomerkrankung ist von großer Bedeutung für die individuelle Tumorkontrolle. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass grundsätzlich solide Malignome die Anzahl zirkulierender Lymphozyten beeinflussen. Darüber hinaus korreliert die Anzahl der Tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) mit der Größe der lokoregionalen Lymphknoten von Karzinompatienten. Letzteres wurde bisher aber „nur“ in retrospektiven Analysen gezeigt.

In dieser prospektiven Arbeit konnten wir den zellulären Immunstatus im peripheren Blut von 47 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom (KRK) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollkohorte sehr detailliert durch die Analyse von über 30 Lymphozytensubpopulationen charakterisieren. Für viele Subpopulationen wurden bei KRK-Patienten erniedrigte Werte gemessen. Dabei wurde insbesondere das Patientenalter und –geschlecht mitberücksichtigt, die einen teils erheblichen Einfluss auf die Lymphozytenzahl haben. Diese Analyse stellt eine wesentliche Grundlage zur Interpretation des Immunsystems von KRK-Patienten dar. Als zweites wesentliches Ergebnis dieser Arbeit konnten wir durch immunhistologische Untersuchungen am Primärtumor bzw. der zugehörigen regionalen Lymphknoten eine positive Korrelation zwischen den im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten und den Tumorinfiltrierenden Lymphozyten nachweisen. Dieser Zusammenhang spricht dafür, dass eine reduzierte Lymphozytenzahl im peripheren Blut von KRK-Patienten nicht durch eine „Rekrutierung“ in das (KRK-) Tumorgewebe zustande kommt, sondern Ausdruck eines erniedrigten Gesamtpools von Lymphozyten ist. Und drittens konnten die retrospektiven Daten unserer Arbeitsgruppe zur Beurteilung vergrößerter regionaler Lymphknoten mit Hilfe der vorliegenden Promotionsarbeit prospektiv bestätigt werden. Hierbei zeigte sich im Wesentlichen, dass Patienten mit einer höheren Anzahl an großen regionalen Lymphknoten auch eine höhere Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten haben. Dies gilt unabhängig vom Metastasierungsstatus und ist zumindest anhand der retrospektiven Daten mit einer besseren Prognose der Patienten verbunden. Eine verstärkte Immunreaktion scheint somit in ihren verschiedenen Teilen kongruent zu sein. Diese Erkenntnisse stellen für künftige immunologische Untersuchungen bei KRK-Patienten eine wichtige Grundlage dar. Ausgehend von diesen Daten kann versucht

werden, unter einer systemischen Immun-/Chemotherapie Veränderungen des zellulären Immunsystems als möglichen frühen Prognosemarker zu untersuchen. Dies würde eine bessere Therapiesteuerung ermöglichen.

2. EINLEITUNG

Das Kolorektale Karzinom (K RK) ist mit etwa 64.000 Neuerkrankungen und ca. 16.000 Todesfällen pro Jahr in Deutschland einer der häufigsten malignen Tumore.⁵ Mit Hilfe von öffentlichen Aufklärungskampagnen zur Krebsvorsorge und neuen Therapieoptionen sowohl in der adjuvanten als auch in metastasierten Situationen lassen sich seit dem Jahr 2000 Rückgänge der Darmkrebssterblichkeit verzeichnen. Trotzdem liegt diese noch immer bei 28 Prozent für Frauen und 22 Prozent für Männer.⁶

Dabei hängen die Überlebenschancen eines Patienten mit einem Kolon-Karzinom vor allem vom Lebensalter und dem Tumorstadium bei Erstdiagnose ab. Der Pathologe legt durch histologische Untersuchung des Resektionspräparates das definitive Tumorstadium bei lokal begrenzter Erkrankung fest. Hierfür wird eine komplette Entfernung des Primärtumors einschließlich einer ausreichenden Anzahl an regionalen Lymphknoten von mindestens 12 vorausgesetzt. In den letzten Jahren wachsen die Erkenntnisse über die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese maligner Erkrankungen, denn auch immunologische Aspekte bestimmen die Prognose des Patienten. Besonderes Augenmerk verdient hier der Infiltrationsgrad des Primarius durch T-Lymphozyten. Die Dichte der infiltrierenden T- Lymphozyten korreliert dabei positiv mit der Länge des Rezidiv-freien Überlebens der Patienten⁷ und spiegelt sich wiederum in der absoluten Anzahl der zirkulierenden zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut wieder.⁸ Zudem konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Größe der regionalen Lymphknoten bei Erstdiagnose eines lokal begrenzten Karzinoms nicht nur von der Ausdehnung der Tumorerinfiltration in den Lymphknoten abhängt, sondern auch vom Ausmaß immunologischer Prozesse, insbesondere durch die lymphozytäre Infiltration.⁹ Häufig unterscheidet sich die regionale Lymphknotengröße nodal-negativer Patienten nicht von nodal-positiven Fällen. Dies kann zur Überschätzung des nodalen Tumorstadiums in der präoperativen Bildgebung führen.¹⁰ Aus diesem Grund stellt die alleinige Größe regionaler Lymphknoten keinen sicheren Prädiktor für die Prognose dar. Für Patientenfälle mit nodal-negativem Karzinom konnte sogar eine inverse Korrelation bzgl. der Überlebensraten in Abhängigkeit von

der Lymphknotengröße gezeigt werden¹¹. Diese Erkenntnisse wurden aus retrospektiven Analysen gewonnen. In der vorliegenden Arbeit war es das Ziel diese Daten prospektiv zu verifizieren und mit dem zellulären Immunstatus der Patienten, welcher neben einer Vielzahl an aktiven, zytotoxischen Lymphozytenpopulationen auch regulatorische, meist inhibitorisch wirkende T-Zellen erfassen soll, zu korrelieren.

2.1 Maligne Darmtumore

Unter dem Begriff Darmkrebs werden alle malignen Tumore des Darms zusammengefasst. Dabei sind mehr als 95 Prozent Kolorektalkarzinome. Diese kolorektalen Karzinome befinden sich meist im Zökum, im Kolon und im Rektum. Die Hälfte dieser Tumore betrifft das Rektum. Nur zwei Prozent aller Darmtumore betreffen den Dünndarm. Histologisch gesehen handelt es sich bei den meisten Darmkarzinomen um Adenokarzinome und selten um neuroendokrine Tumore, Lymphome, Sarkome oder Plattenepithelkarzinome.¹²

Schon im Wintersemester 1862 – 1863 hielt der Pathologe Rudolf Virchow Vorlesungen über „Die krankhaften Geschwülste“. Hier veranschaulichte er unter anderem die Pathogenese der Krebserkrankungen an Schleimhäuten. Er beobachtete die Entwicklung von Tumoren an Schleimhäuten an vorher entzündlich verändertem Gewebe. Zudem entdeckte er Leukozyten in neoplastischem Gewebe. Weiter führte er aus, dass aus diesen einfach entzündlichen Hyperplasien Polypen hervorgehen können, welche dann im Verlauf den Trend zur malignen Entartung zeigen.¹³ Der Arzt und Forscher Paul Ehrlich beschäftigte sich 1909 mit der individuellen Leistung des Immunsystems gegen Tumorerkrankungen. Er spricht hier erstmals von „Tumorimmunität“ und stellt die These auf, dass sich das Immunsystem auch gegen Krebserkrankungen richten kann.¹⁴ Doch erst in den 1960er-Jahren konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem in der Lage ist Krebserkrankungen zu bekämpfen.¹⁵ In den darauffolgenden 30 Jahren wurde weiter geforscht und die T-Zellen, als diejenigen Zellen identifiziert, welche maligne entartete Zellen erkennen können.¹⁶ Dies wird heute als Immunediting bezeichnet.¹⁷

Die primäre Therapie der Patienten mit einem lokalisierten kolorektalen Karzinom ist je nach Tumorstadium zunächst die chirurgische Resektion und in Abhängigkeit eines regionalen Lymphknotenbefalls die anschließende Nachsorge bzw. adjuvante Chemotherapie. Die Nachsorge und das Verhindern bzw. frühzeitige Erkennen einer

rezidivierenden Erkrankung ist von besonderer Bedeutung. Hierfür versuchten verschiedene Arbeitsgruppen Prognosemarker herauszuarbeiten. In einer Übersichtsarbeit von Nicholson BD et al. von 2015 versuchte die Arbeitsgruppe das Wiederauftreten von Darmkrebs durch eine Blutuntersuchung auf Carcinoembryonales Antigen (CEA) zu erkennen. Sie stellten fest, dass ein niedriger Schwellenwert Patienten mit einem Rezidiv als richtig positiv erkennt, allerdings kommt es durch den Nachweis von erhöhten CEA-Werten auch in einer relativ hohen Fallzahl zu falsch positiven Ergebnissen. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei ungefähr 20 Prozent der Patienten der CEA-Wert falsch negativ ausfiel. Die damalige Evidenz unterstützte die Anwendung des höchsten Schwellenwertes von 10 µg/l und die zusätzliche Notwendigkeit einer weiteren Diagnostik um letztendlich alle Fälle zu erfassen.¹⁸

Aufgrund der Individualität des Immunsystems ergibt sich zum einen die Forderung nach einer individualisierten Therapie der malignen Erkrankung der Betroffenen und zum anderen die Überlegung des Nachweises eines spezifischen Markers für eine rezidivierende Erkrankung. Hierfür könnten Veränderungen von Lymphozyten-Subpopulation eine prognostische Rolle spielen.

2.2 Epidemiologie, Vorsorgeuntersuchungen und Klinik der Kolorektalen Karzinome

Krebsneuerkrankungen des Darms liegen mit 11,1 Prozent bei Frauen auf Platz zwei nach dem Mammakarzinom und bei Männern mit 12,5 Prozent auf Platz drei nach dem Prostata- und Lungenkarzinom. Mit 10,3 Prozent macht das Kolorektale Karzinom die dritthäufigste Krebstodesursache beider Geschlechter aus.¹⁹ Bis in das hohe Lebensalter steigt das Erkrankungsrisiko, mehr als die Hälfte der Patienten erkranken nach dem 70. Lebensjahr und nur 10 Prozent der Betroffenen erkranken vor dem 55. Lebensjahr. Daraus resultiert ein hohes mittleres Erkrankungsalter von 76 Jahren bei Frauen bzw. 72 Jahren bei Männern. Die altersstandardisierte Sterberate in beiden Geschlechtern lag in den letzten 10 Jahren bei etwa 20 Prozent.^{19,12,20}

Im Prozess der Früherkennung von Darmkrebs sieht die S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ drei Optionen vor. Bei gesunden Männern ab 50 Jahren und gesunden Frauen ab 55 Jahren ist das Standardverfahren eine Koloskopie, alternativ kann jährlich ein Stuhltest auf okkultes Blut (nach Früherkennungsrichtlinien) durchgeführt werden. Bei gesunden Frauen kann im Alter von 50 bis 54 Jahren jährlich ein immunologischer Test auf okkultes Blut im Stuhl durchgeführt werden. Das gesetzliche Früherkennungsprogramm sieht ab dem Alter von 55 Jahren bei Männern und Frauen

eine Koloskopie und eine digital rektale Untersuchung vor.⁵ Darmpolypen, welche eine Präkanzerose darstellen, können dabei abgetragen werden. Ist die Koloskopie ohne pathologischen Befund, soll nach 10 Jahren eine erneute Darmspiegelung durchgeführt werden. Als Alternative, falls eine Koloskopie abgelehnt wird, kann alle 5 Jahre eine Sigmoidoskopie und jährlich der Stuhltest auf okkultes Blut durchgeführt werden, ergibt sich hier der Nachweis von Blut, ist eine anschließende Koloskopie empfohlen. Andere Empfehlungen gelten hier für Patienten mit erhöhtem Erkrankungsrisiko wie bei genetisch bedingten Darmkrebserkrankungen.¹⁹

Das Kolorektale Karzinom macht mit mehr als 95 Prozent aller malignen Darmtumore den größten Anteil aus, dabei betreffen sie das Zökum, das Kolon und/oder das Rektum. Die Häufigkeit der Lokalisation steigt nach aboral an, so befinden sich 50 Prozent der Tumore im Rektum, 30 Prozent im Colon sigmoideum, 10 Prozent im Colon transversum und Colon descendens sowie 10 Prozent im Zökum und Colon ascendens. Lediglich 2 Prozent aller malignen gastrointestinalen Erkrankungen betreffen den Dünndarm.¹² Laut den Krebsdaten des Robert-Koch-Institutes nehmen mit Ausnahme von Karzinomen im Colon ascendens die Rate der Neuerkrankungen in allen anderen Darmabschnitten ab.¹⁹

Das Wachstum eines Tumors im Dick- und/oder Enddarm ist langsam. Diese Tatsache führt dazu, dass Betroffene eine lange Zeit asymptomatisch sind und häufig erst im fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert werden, charakteristische Frühsymptome fehlen. Symptomatisch werden die Patienten erst dann, wenn das Karzinom aufgrund seines Größenwachstums das Darmlumen obstruiert oder eine Blutung auslöst. Hier spielt die Lokalisation des Tumors eine entscheidende Rolle, physiologischer Weise ist der aufsteigende Anteil des Darms großlumiger als der absteigende Anteil. Deshalb kommt es hier erst spät zu einem stenosierenden Effekt durch das Tumorwachstum. Auch die Konsistenz des Stuhls beeinträchtigt die Symptomwahrnehmung, so ist der Stuhlgang im Colon ascendens noch flüssig und vermeintliches Blut mischt sich unter, ohne vom Patienten wahrgenommen zu werden.¹²

Frühsymptome eines kolorektalen Karzinoms sind meist unspezifisch und werden oft nicht als schwerwiegend interpretiert. Typische Symptome, welche auf einen Darmkrebs hinweisen können, sind veränderte Stuhlgewohnheiten. Dabei spielen die Häufigkeit des Stuhlgangs eine Rolle sowie ein Wechsel von Obstipation und Diarrhoe. Als paradoxe Diarrhoe wird eine Stase des Stuhls im Stenosebereich verstanden, es kommt zur bakteriellen Zersetzung und Gärung und dadurch zum Abgang von verflüssigtem Stuhl. Weitere Auffälligkeiten des Stuhls können Blut- oder

Schleimbeimengungen sein, übelriechender oder durch die Stenose bedingter bleistift dünner Stuhl. Desweiteren treten Verdauungsbeschwerden auf im Sinne von starken Darmgeräuschen, Blähungen und Flatulenzen mit ungewolltem Stuhlabgang. Nach der Nahrungsaufnahme kann es zu Übelkeit oder Völlegefühl kommen. Schmerzhafter Stuhlgang und auch kolikartige Bauchschmerzen unabhängig vom Stuhlgang können hinweisend auf eine maligne Erkrankung des Darms sein. Zudem sind allgemeine Symptome einer Tumorerkrankung, welche unter der B-Symptomatik zusammengefasst werden nicht selten die ersten Symptome bei einem Kolorektalem Karzinom.¹² In fortgeschrittenen Krankheitsstadien präsentieren sich die Patienten oft mit einer Anämie und stark leistungsgemindert bedingt durch chronische Tumorblutungen. Häufig fallen sie durch eine Tumorkachexie auf, welche sich durch das konsumierende Malignom sowie durch eine verminderte Nahrungsaufnahme begründet. In der körperlichen Untersuchung des Abdomens kann eher selten eine Resistenz palpabel sein. Bei Fortschreiten des Primärtumors kann es zu einer Ileussyndromatik mit starken abdominalen Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen, zum Teil auch Stuhlerbrechen, kommen. Hierbei ist eine umgehende Operation indiziert.¹²

Für das Kolorektale Karzinom besteht nach UICC folgende traditionelle Klassifikation, hier wird die Tumorlast (T), das Vorkommen von Krebszellen in drainierenden und regionalen Lymphknoten (N) und der Nachweis von Metastasen (M) bewertet.²¹

Klassifikation der Tumorstadien (UICC)²⁰

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1 – 2	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T1	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
IIIB	T3-4	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T2-3	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T1-2	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
IIIC	T4a	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T3-T4a	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	jedes T	jedes N	M1a (Fernmetastasen in einem Organ oder einer Lokalisation ohne Peritonealbefall)
IVB	jedes T	jedes N	M1b (Fernmetastasen in zwei oder mehr Organen oder Lokalisationen ohne Peritonealbefall)
IVC	jedes T	jedes N	M1c (Peritonealbefall mit oder ohne Fernmetastasen in anderen Organen oder Lokalisationen)

2.3 Pathophysiologie des kolorektalen Adenokarzinoms

Das kolorektale Karzinom entsteht pathogenetisch typischerweise aus dysplastisch veränderter gastrointestinaler Schleimhaut. Diese Dysplasie wird als intraepitheliale Neoplasie bezeichnet. Sie wächst nicht invasiv und zeichnet sich mit den charakteristischen histologischen Merkmalen zellulärer Atypien, veränderter Zelldifferenzierung und –architektur aus. Dabei folgt die Entwicklung des Karzinoms der sogenannten „Adenom-Karzinom-Sequenz“, welche schon seit den 1980er Jahren bekannt ist.^{22,23} Mit dem Begriff Adenom wird eine Vorläuferläsion des Adenokarzinoms beschrieben. Anhand des histologischen Wachstumsmuster können diese Adenome weiter unterteilt werden. Diese Unterteilung ist dahingehend wichtig, da sich die Karzinomentwicklung je nach Adenomtyp zeitlich unterscheidet.²² Die Zeit der Tumorentwicklung kann 8-15 Jahre betragen.²³ Unterschieden werden tubuläre, villöse und tubulo-villöse Adenome. Je villöser die Architektur ausfällt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der malignen Entartung. Nicht nur der histologische Aspekt, sondern auch der molekulargenetische Status ist bei der Betrachtung der „Adenom- Karzinom-Sequenz“ wichtig. Die wichtigste Mutation ist hier die des APC-Gens, neben Mutationen von TP53 und KRAS. Zudem spielt die Anzahl der Adenome und das Lebensalter des Betroffenen eine Rolle in der Tumorgenese.²²

Dies beschreibt den häufigsten Weg der Karzinomentwicklung, allerdings wurden in den letzten Jahren weitere Entstehungsmöglichkeiten untersucht, wie zum Beispiel die serratierte Karzinogenese aus „sessilen serratierten Adenomen“. Hier befindet sich die Schlüsselmutation im BRAF-Gen. Zudem findet sich eine Promoter (CpG)-Methylierung, ein konsekutiver Genausfall und eine hohe Mikrosatelliteninstabilität. Ein weiterer Pfad der Karzinogenese wird als „Mischtyp“ bezeichnet, welcher die molekularen Veränderungen der beiden anderen Entstehungswege enthält und als präkanzeröse Läsion das „traditionelle serratierte Adenom“ aufweist. Klinische Bedeutung erlangen diese neuen Wege der Karzinogenese dadurch, dass sie sich in ihrer Lokalisation im Gastrointestinaltrakt und ihrer Prognose hinsichtlich der 5-Jahres-Überlebensrate unterscheiden. So finden sich Karzinome die aus serratierten Adenomen entstanden sind vorwiegend im Colon ascendens und haben eine gute Prognose im Gegensatz zu den Karzinomen des Mischtyps, welche eher linksseitig lokalisiert sind und eine schlechte Prognose aufweisen.²²

Werden kolorektale Adenome frühzeitig erkannt und entfernt, beträgt die Chance auf Heilung bis zu 90 Prozent. Hier bekommt die Krebsvorsorge eine entscheidende Bedeutung.

Andere Möglichkeiten der Tumorgenese ergeben sich durch die maligne Entartung einer Adenomatose oder einer entzündlichen Darmerkrankung zum Beispiel der Colitis ulcerosa, wobei dies nur etwa 1 Prozent der Patienten mit KRK betrifft.²³

2.4 Aufbau und Funktion des Immunsystems

Das Immunsystem im menschlichen Organismus findet sich zum einen in soliden Organen wie der Milz und dem Thymus, zum anderen diffus verteilt im peripheren Blut, Knochenmark und dem lymphatischen System bestehend aus Lymphgefäßen und den dazugehörigen Lymphknoten sowie gewebeständigen Lokalisationen (z.B. in der Submucosa des Gastrointestinaltraktes). Neben der Bekämpfung infektiöser Krankheitserreger wie Bakterien, Pilzen und Viren ist es an der Ausbildung einer anhaltenden Impfantwort und auch an der Beseitigung/Bekämpfung von malignen Zellen beteiligt. Dabei gliedert es sich in das angeborene (unspezifische) und erworbene (spezifische) Immunsystem. Beide Achsen sind unerlässlich für eine immunologische Reaktion des Körpers und ergänzen sich über verschiedene Mechanismen.²⁴

Während das angeborene Immunsystem per se bereits bei Geburt vorhanden ist und nur in sehr eingeschränktem Ausmaß zwischen den einzelnen Erregern unterscheidet, muss das spezifische Immunsystem seine Fähigkeit der Immunabwehr erst durch gezielte Prägung erlernen.²⁵ Hierbei beinhaltet das angeborene Immunsystem verschiedene Zellen und humorale Systeme, welche unmittelbar auf eindringende Krankheitserreger reagieren können. Hierzu zählen: Granulozyten, welche sich weiter in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten unterteilen lassen und Monozyten/Makrophagen. Zum humoralen System gehören verschiedene Zytokine, Interferone und das Komplementsystem. Diese Bestandteile lösen verschiedene Effektormechanismen aus. Es werden Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Prostaglandine freigesetzt, weitere Zytokine sezerniert, Krankheitserreger phagozytiert und direkte Schädigungen von Erregern durch aktive Sauerstoffmetabolite und/oder das Komplementsystem initiiert.²⁵

Das spezifische Immunsystem besteht im Wesentlichen aus T- und B-Lymphozyten, welche durch Antigene von Krankheitserregern erst aktiviert und geprägt werden müssen. Beide Zellreihen entwickeln sich aus undifferenzierten Progenitorzellen im Knochenmark, die noch keine T- oder B-Zellprägung aufweisen. Die Prägung und damit den Erwerb ihrer typischen Fähigkeiten erfahren die Lymphozytenvorläuferzellen in den primären lymphatischen Organen, dem Knochenmark und Thymus. Dabei entstehen die B-Lymphozyten durch ihre Prägung im Knochenmark und T-Lymphozyten durch ihre Prägung im Thymus. Die B-Zellen machen ca. 15 Prozent der Lymphozyten im Blut aus und sind als Plasmazellen durch die Bildung und Sezernierung von löslichen Antikörpern für die spezifische humorale Immunreaktion verantwortlich. Die größere Population bilden die T-Zellen mit ca. 70-80 Prozent der Lymphozyten im Blut. Diese befinden sich aber nicht ständig im Blut, sondern halten sich hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten oder der Milz auf. Nachdem sie durch den Kontakt mit pathogenen Antigenen stimuliert wurden vermehren sie sich und differenzieren sich entweder zu langlebigen T-Gedächtnis- oder zu T-Effektorzellen. Die verbleibenden ca. 10 Prozent der Lymphozytenpopulation bilden die NK-Zellen (natürliche Killerzellen), diese lassen sich anhand ihrer Oberflächenmerkmale weder den B- noch den T-Lymphozyten zuordnen.²⁵

Zu Beginn der T-Zellentwicklung migrieren die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus. Sie sind undifferenziert, exprimieren keine spezifischen lymphatischen Marker und sind doppelt negativ für das Oberflächenprotein CD4 wie für das Oberflächenprotein CD8. Um die hohe Variabilität der T-Zellen zu erreichen kommt es in zentraleren Abschnitten des Thymus zur somatischen Rekombination (Rearrangement) der T-Zellrezeptor-Gen-Fragmente, hierbei erfolgt aus einer statistisch hohen Vielzahl von möglichen Umlagerungen pro Zelle nur eine spezifische Rekombination. Im weiteren Differenzierungsprozess kommt es zu zellinternen Translokationen der Gensequenz der DNA, welche zur Bildung einer zusätzlichen Alpha-Kette des TCR (T-Zellrezeptor) führt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen positiv für CD4 und CD8 (doppelt positiv). Als nächstes differenzieren die doppelt positiven Zellen entweder zu einer nur CD4 oder nur CD8 positiven Zelle indem entweder der CD4-Marker oder das CD8-Antigen supprimiert wird. Am Ende der T-Zellentwicklung liegen reife Lymphozyten vor, welche im Immunsystem als CD4⁺ Helferzellen oder als CD8⁺ zytotoxische T-Zellen fungieren.²⁶

Die CD4⁺-Lymphozyten synthetisieren Zytokine und setzen diese frei. Grundsätzlich werden zahlreiche funktionelle Typen von CD4⁺-Zellen unterschieden. Vier dieser Subtypen sind von praktischer Bedeutung. Die TH1-, TH2-, TH17- und Treg-Zellen. TH1-Zellen sezernieren Interleukin 2, Interferon γ und TNF. TH2-Zellen synthetisieren IL-4, IL-5, IL-9, IL-13. Diese sezernierten Zytokine lösen weitere Effekte aus. Unter anderem aktivieren sie Makrophagen, fördern die Produktion von Immunglobulinen in B-Lymphozyten, aktivieren NK-Zellen und stimulieren die Differenzierung der CD8⁺-Lymphozyten zu zytotoxischen T-Zellen. TH17-Zellen induzieren die spezifische Immunantwort durch die Freisetzung von Interleukinen (IL-17, IL-22 und IL-23), rekrutieren neutrophile Granulozyten und fördern somit Entzündungsreaktionen.²⁷

Treg-, regulatorische T-Zellen oder früher auch Suppressorzellen genannt bewirken eine kontrollierte Suppression von Autoimmunprozessen und sind damit wichtig für die körpereigene Immuntoleranz.²⁶ TH17-Zellen und Treg-Zellen stehen in einem wechselseitigen Gleichgewicht zueinander, wobei TH17-Zellen die Autoimmunität stimulieren und Treg-Zellen diese hemmen.²⁷

Stimulierte und damit aktivierte CD8⁺-Zellen (zytotoxische T-Zellen) sind als Effektorzellen in der Lage infizierte körpereigene oder als körperfremd erkannte Zellen mit Hilfe der gebildeten Mediatorstoffen Perforin und Granzyme B direkt abzutöten.

Neben kurzlebenden Lymphozyten enthält der menschliche Körper langlebige sogenannte Memory-Zellen. Diese sind eine Unterfraktion der antigenspezifisch geprägten T-Zellen und entwickeln nach dem Kontakt mit einem Antigen ein immunologisches Gedächtnis. Kommt es zu einer erneuten Exposition mit diesem spezifischen Antigen teilen sich diese Zellen aufgrund der vorangegangenen immunologischen Prägung rasch und eliminieren das Antigen. Die Memory-Zellen tragen als Oberflächenproteine entweder CD4 oder CD8 und exprimieren typischerweise CD45RO.²⁶

Eine weitere Zellpopulation der T-Zellen bilden die NKT-Zellen (natürliche Killer-T-Zelle). Diese Zellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche ebenfalls das Oberflächenprotein CD3 und nehmen eine Brückenfunktion zwischen dem unspezifischen und spezifischen Immunsystem ein. Nach einem Antigenkontakt kommt es zur Aktivierung der NKT-Zelle, woraufhin es sowohl zur Zytokinausschüttung und damit zur Induktion des spezifischen Immunsystems als auch zur direkten Zerstörung der betroffenen Zellen durch die Freisetzung der Mediatorstoffe Perforin und Granzyme B kommt. Somit besitzt die natürliche Killer-T-Zelle Eigenschaften von Th- und Tc- Zellen.²⁶

Die Entwicklung der B-Lymphozyten erfolgt im Knochenmark. Insgesamt können vier Reifungsstufen unterschieden werden. Jede Reifungsstufe ist durch unterschiedliche Oberflächenproteine charakterisiert, so exprimieren unreife Zellen CD34, TdT, und CD10. Ein Merkmal für die Reife eines B-Lymphozyten ist das Tragen von Oberflächen-Immunglobulinen der Klasse IgM und IgD und der Nachweis von CD19, CD20, CD21 und CD22. Antigene werden mit Hilfe der Immunglobuline erkannt. Kommt es zum Antigenkontakt transformiert ein B₁-Lymphozyt zu einem B-Immunoblasten und anschließend differenziert diese Zelle zu einer Plasmazelle. Die Plasmazelle ist im Gegensatz zu allen anderen lymphatischen Zellen nicht mehr teilungsfähig.²⁶

Eine weitere wichtige Zellpopulation im peripheren Blut bilden die natürlichen Killerzellen (NK), diese machen 15 Prozent der Lymphozyten aus und dürfen nicht mit den NKT-Zellen verwechselt werden. Hier handelt es sich um Non-B- und Non-T-Zellen, wobei sie aufgrund ihrer Entwicklung aus einer gemeinsamen Progenitorzelle mit den T-Lymphozyten verwandt sind. Sie tragen Oberflächenmarker der T-Zellen wie zum Beispiel CD2, CD7 und CD8. Zusätzlich exprimieren NK-Zellen die spezifischen Marker CD16, CD56 und CD57. Die NK-Zellen lassen sich anhand ihres Expressionsmuster von CD16 und CD56 in drei Subtypen unterteilen. Zellen des Typ 1 (CD56^{bright}/CD16^{dim}) charakterisieren sich durch eine starke Zytokinsynthese und schwache zytotoxische Aktivität, womit sie funktionell einem „jugendlichem“ NK-Zelltyp entsprechen. Die Zellpopulation mit CD56⁺/CD16⁺ Expression beinhaltet die

„adulten“ NK-Zellen und stellt die überwiegende NK-Zellpopulation dar (Typ 2). NK-Zellen des Typ 3 (CD56^{dim}/CD16^{bright}) weisen eine starke zytotoxische Aktivität auf, sezernieren aber nur in geringem Ausmaß Zytokine. Zu den sezernierten Zytokinen zählen Interferon γ und proinflammatorische Zyto- und Chemokine, welche zu einer Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Retikulumzellen führen. Ihre Funktion in der Immunabwehr erfüllen die natürlichen Killerzellen über zwei Wege. Zum einen zerstören sie direkt infizierte Zellen und zum anderen kommt es über das CD16-Molekül zu einer Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität.²⁶

In den letzten Jahren wird dem Immunsystem zudem eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese, dem Mikromilieu des Tumors und damit der Prognose der an Krebs erkrankten Patienten zugesprochen.

2.5 Immunseneszenz

Im Alter nimmt die Häufigkeit von Infektionen, Krebserkrankungen und chronisch entzündlichen Prozessen zu. Dies liegt vor allem daran, dass mit zunehmendem Alter jede einzelne Zelle des Körpers altert und damit auch das Immunsystem. Dieser Prozess wird mit dem Begriff der Immunseneszenz beschrieben und beginnt im Grunde schon im Kindesalter mit der Involution des Thymus. Ausnahmslos sind alle Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems von diesen Alterungsprozessen betroffen bis hin zur hämatopoetischen-Stammzelle und den lymphoiden Vorläuferzellen im Thymus und Knochenmark. Dabei scheint es Unterschiede zwischen einem biologischen und einem vorzeitigen beschleunigten Altern zu geben.²⁸ Zudem spielt das Geschlecht eine wesentliche Rolle bei den altersbedingten Veränderungen des Immunsystems. So haben Frauen zum Beispiel in jedem Alter eine höhere Thymusfunktion als Männer, was einen höheren Anteil naiver T-Zellen im peripheren Blut bedingt.²⁹

Die Immunseneszenz äußert sich in den verschiedenen Zellpopulationen auf unterschiedliche Art und Weise. So bleibt die absolute Zahl der neutrophilen Granulozyten konstant, es kommt aber zu erheblichen funktionellen Einbußen. Sie verlieren die Fähigkeit der Phagozytose und sind nur noch in geringem Ausmaß zytotoxisch wirksam. Auch die Zahl der Monozyten im peripheren Blut bleibt bis in das hohe Lebensalter konstant, aber auch sie büßen ihre Phagozytosefähigkeit ein. Dies bedeutet auch, dass sie in geringerem Ausmaß Antigene an ihrer Oberfläche präsentieren und damit CD4⁺-Zellen weniger aktivieren und prägen können. Die Konzentration von Zytokinen wie Interleukin-6, Interleukin-1 β und TNF- α im Blut ist dagegen mit zunehmendem Alter erhöht. Dies kann zu proinflammatorischen Prozessen im menschlichen Organismus führen und ist ein entscheidender Faktor für altersassoziierte chronische Entzündungen.²⁸ Dies wird als Inflamm-Aging („entzündliches Altern“) bezeichnet.²⁹ Die Zellen des erworbenen Immunsystems verlieren im Alter ebenfalls an Effektivität in der Bekämpfung von Pathogenen, zudem sinkt ihre Variabilität und damit die Fähigkeit sich gegen neue Erreger zu wehren. Bei den T-Zellen kommt es zum Rückgang von naiven T-Zellen und zu einem Anstieg der Gedächtnis- und aktivierten T-Zellen^{30,31}, die Gesamtzahl der T-Zellen im peripheren Blut bleibt dabei konstant. Das bedeutet, dass sich das Verhältnis zwischen naiven und Effektor-/Memory-T-Zellen hin zu den differenzierten Zellen verschiebt. Dies betrifft

die CD8⁺-Zellen schon früh und dann mit zunehmendem Alter auch die CD4⁺-Zellen. Obwohl die Zahl der zytotoxischen-Zellen verhältnismäßig erhöht ist, kommt es trotz alledem zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen und Krebserkrankungen. Ursache hierfür ist eine Abnahme der zytotoxischen Funktion dieser Zellpopulation. Zudem kommt es auf der Oberfläche der CD8⁺-Zellen zum Verlust des Moleküls CD28. Dies führt zur Reduzierung der Zellvermehrung und zum partiellen Funktionsverlust der Zellen. Allerdings sind CD8⁺CD28⁻-Zellen besonders langlebig, reichern sich an und verhindern so die Neubildung naiver T-Zellen. Dieser Effekt wird als „Feedback-Hemmung“ bezeichnet. Eine andere Population der zytotoxischen Zellen (CD8⁺CD45RO⁺CD25⁺-Zellen) können den Verlust von CD8⁺-Zellen ausgleichen und stellen so einen möglichen Biomarker für ein „erfolgreiches“ Altern des Immunsystems dar. Auch regulatorische T-Zellen werden mit zunehmendem Alter geschwächt, bedingt durch eine geringere IL-2-Freisetzung und reduzierte Expression des IL-2-Rezeptors. Im Gegensatz dazu wird in höherem Alter eine Zunahme an Th₁₇-Zellen beschrieben, was ebenso von Bedeutung für die Zunahme von proinflammatorischen Prozessen im Alter sein kann.²⁸

Ebenfalls nimmt im höheren Alter die Zahl der naiven B-Zellen ab. Dies ist am ehesten darin begründet, dass es mit zunehmender Anzahl von dysfunktionalen Memory-B-Zellen in den Organen des Immunsystems zu einer „Feedback-Hemmung“ im Knochenmark kommt.²⁸

Unter Berücksichtigung des Geschlechts lässt sich ergänzen, dass Männer im Vergleich zu Frauen früher von altersbedingten Veränderungen des Immunsystems betroffen sind. Vor allem unterscheiden sich die Prozesse der Immunseneszenz in der Population der B-Zellen. Dabei sind die Zellen des adaptiven Immunsystems bei Frauen im höheren Lebensalter stärker aktiv als die bei Männern. Ferner haben Männer eine stärkere Aktivität der Monozyten.²⁹

3. AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG

Das kolorektale Karzinom wird aktuell Stadien gerecht therapiert. Hierfür wird vor Therapiebeginn die klinische Situation des Patienten eingeschätzt und das Therapieziel festgelegt. Drei Faktoren gehen in die Entscheidung der Erstlinientherapie ein: der Allgemeinzustand des Patienten, die Lokalisation und Ausdehnung des Tumors und der molekulare Status des Tumors zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

Der Therapieanspruch für Patienten, welche bei Erstdiagnose in das klinische Stadium I – III eingeteilt werden, ist kurativ. Diese Patienten werden primär operativ versorgt und erhalten anschließend, je nach Tumorstadium, entweder nur eine Nachsorge oder eine adjuvante Chemotherapie. Operativ werden dabei chirurgisch onkologische Grundsätze verfolgt. Diese umfassen die Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes mit der Resektion von ≥ 12 Lymphknoten (komplette mesokolische Resektion), einen angemessenen Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe, in der Regel 10 cm, und eine En-Bloc-Resektion von tumoradhärenten Organen.²⁰ Durch die komplette mesokolische Exzision (CME) wird lokal vollständig reseziert und eine hohe Lymphknotenausbeute erreicht. Wird die CME konsequent durchgeführt, kommt es laut bisherigen Erkenntnissen zur Verbesserung der Überlebensraten. Dabei korreliert die Anzahl der resezierten Lymphknoten auch bei nodal negativen Karzinomen mit der Prognose.⁵ Mit der anschließenden Analyse des Lymphknotenstatus wird zum einen zwischen dem Stadium I und II unterschieden und zum anderen wird versucht lymphogene Lokalrezidive zu vermeiden. Die Unterscheidung zwischen Stadium I und II hat sowohl prognostische, als auch therapeutische Konsequenzen. So verbessert eine adjuvante medikamentöse Therapie die Prognose der Patienten mit Tumorstadium I nicht. Im Tumorstadium II kann bei Vorliegen eines Risikofaktors eine adjuvante Chemotherapie in Erwägung gezogen werden. Als Risikofaktoren gelten das Tumorstadium T4, eine Tumorperforation, ein intraoperativer Tumoreinriss, eine Notfall-Operation oder die Untersuchung von weniger als 12 Lymphknoten, wobei mindestens einer dieser Risikofaktoren vorliegen muss. Dann kann die adjuvante medikamentöse Therapie mit 5-Fluorouracil-haltigen Medikamenten die 5-Jahres-Überlebensrate erhöhen und die Rezidivrate bei Patienten mit Tumorstadium II reduzieren. Allerdings spielt hier zusätzlich der molekulare Status der Tumore im Stadium II eine entscheidende Rolle bezüglich des Ansprechens auf eine adjuvante Chemotherapie. Der Nachweis von Mikrosatelliten-Instabilitäten im Tumorgewebe spricht hier gegen eine adjuvante Chemotherapie, da der Gewinn der Therapie geringer ist als der Effekt der Nebenwirkungen. Betroffene im Stadium III erhalten ausnahmslos eine adjuvante medikamentöse Therapie. Die Reduktion der Rezidivrate und die Erhöhung der 5-Jahres-Überlebensrate werden dadurch signifikant positiv beeinflusst.²⁰

Dahingegen ist das Therapieziel von Patienten im Tumorstadium IV palliativ, wobei dieses Ziel in den letzten 20 Jahren vor allem für hepatisch und pulmonal metastasierte Tumorentitäten relativiert werden konnte und durch Einsatz sogenannter oligometastatischer Konzepte auch hier eine Heilung erreicht werden kann. Zur

Berechnung und prognostischen Bewertung von Risikofaktoren existieren mehrere Modelle, wobei die Kriterien nach Fong bei Patienten mit Lebermetastasen am häufigsten angewendet werden.²⁰

Aktuell werden die Patienten mit einem KRK nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Hier ist vor allem der Nodalstatus wichtig, da dieser noch immer den stärksten prognostischen Parameter darstellt. Fällt das Staging positiv aus, erhalten die Patienten eine adjuvante Chemotherapie. Im UICC-Stadium II ist der Nutzen der adjuvanten Chemotherapie wie bereits oben beschrieben gering und ihr Einsatz hängt von zusätzlichen Risikofaktoren ab.¹⁰ Deshalb verwundert es nicht, dass das Lymphknoten-Staging in verschiedensten Studien kontrovers diskutiert wird. Nicht nur der Nachweis von Lymphknotenmetastasen, sondern auch die Anzahl der entnommenen Lymphknoten besitzt prognostische Relevanz vor allem bei Patienten im UICC-Stadium II und III. Allgemeiner Konsens ist dabei die Beurteilung von mindestens 12 Lymphknoten.^{9,32} Im klinischen Alltag kommt es gelegentlich zur Entnahme einer zu geringen Anzahl von Lymphknoten. Hypothetisch führt dies zu einem fehlerhaften Staging nodal-negativer Patienten in der Annahme, Tumor-befallene Lymphknoten nicht erfasst zu haben. Hiermit verbessert die Beurteilung einer hohen Anzahl von Lymphknoten das Gesamtüberleben der Patienten und eine geringe Anzahl an Lymphknoten ist mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert.⁹ Das Gesamtüberleben verbessert sich zudem signifikant mit dem Vorhandensein von ≥ 7 Lymphknoten mit einem Durchmesser größer 5 mm.¹⁰ Die Größe der Lymphknoten und damit die Wahrscheinlichkeit der Resektion kann zum einen durch eine Metastasierung, eine M. Chron ähnliche Entzündungsreaktion, als auch durch eine immunologische Aktivierung begründet sein.¹¹ Die immunologische Reaktion führt zur Hyperplasie der Lymphknoten, wodurch diese leichter nachweisbar sind.^{9,10} Bereits 1980 untersuchten Phil et al. die prognostische Relevanz der Lymphknotenhyperplasie und –größe bei Patienten mit KRK.¹¹ Auch Märkl et al. postulierte, dass die Anzahl der resezierten Lymphknoten und die Lymphknotengröße durch immunologische Effekte beeinflusst wird.³³ Allerdings kann auch durch die fortschrittlichste Technik der Lymphknotenresektion und einer damit verbundenen ausreichenden Lymphknotenanzahl ein fehlerhaftes Staging (Understaging) nicht verhindert werden.¹¹ Auf der anderen Seite wurde kein Zusammenhang einer hohen Lymphknoten-Ausbeute mit einer höheren Anzahl von Lymphknotenmetastasen festgestellt. Trotzdem beeinflusst die Größe der Lymphknoten letztendlich die Resektionsrate und damit das Outcome des Patienten.¹¹ Die

lymphatische Hyperplasie könnte demnach beim KRK einen prognostischen Faktor darstellen.¹⁰

Eine geringe Anzahl an Lymphknoten größer 5 mm scheint für ein ungünstigeres Outcome zu sprechen.¹¹ Dabei stellt bei nodal-negativen Patienten die Lymphknotengröße einen prognostischen Faktor dar.¹¹ Märkl et al. untersuchte die absolute Lymphknotenanzahl, die Anzahl der Lymphknoten größer 5 mm (LN5) und den kumulativen Lymphknotendurchmesser hinsichtlich der Tumorprogression.¹⁰ Dabei korreliert die Gesamtzahl der resezierten Lymphknoten stark mit dem kumulativen Lymphknotendurchmesser.¹⁰ Die Gesamtzahl der Lymphknoten und die Größe größer 5 mm korreliert schwächer miteinander.¹⁰ Die Dichte der intratumoralen T-Lymphozyten (ITL) CD3⁺- und CD8⁺-Zellen ist bei Patienten mit einer ausreichenden resezierten Lymphknotenanzahl und einer hohen Anzahl mit einer durchschnittlichen Größe größer 5 mm signifikant erhöht.³³ Interessanterweise haben Patienten mit einem linksseitig lokalisierten Kolonkarzinom weniger Lymphknoten größer 5 mm als Patienten deren Karzinom im rechten Hemikolon liegt, wobei die Lokalisation hinsichtlich des Gesamtüberlebens keinen Unterschied ergab.¹⁰ Das krebsspezifische Gesamtüberleben ist bei Patienten mit hoher ITL-Dichte signifikant verbessert.³³ Insgesamt sind die meisten resezierten Lymphknoten zwischen 1 und 5 mm groß (>1 und ≤ 5 mm).¹⁰ Dabei unterscheidet sich diese Größenverteilung in nodal-positiven Fällen im Vergleich zu nodal-negativen Fällen nur geringfügig mit Ausnahme in der Größenkategorie von 3 und 4 mm.¹⁰ Diese Größe ist bei nodal-positiven Fällen signifikant größer.¹⁰ Lymphknotenmetastasen konnten in jeder Größenkategorie nachgewiesen werden, dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung mit der Lymphknotengröße zu¹⁰, wobei die meisten der größeren Lymphknoten frei von einer Metastasierung sind und die Metastasen positiven Lymphknoten in der Regel kleiner als 10 mm sind.¹⁰ Märkl et. al schätzt nach seinen Beobachtungen das Understaging im Alltag auf 2-5 Prozent.¹⁰ Patienten mit einer hohen Anzahl von LN5 haben ein geringeres Risiko einer progredienten Erkrankung.¹⁰

Die Dichte der intratumoral gelegenen CD3⁺- und CD8⁺-Zellen sind dabei unabhängig prognostisch und mit dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls und der Lymphknotengröße bei nodal-negativen Kolonkarzinom-Patienten assoziiert.³⁴ FOXP3 ist ein wichtiger intrazellulär gelegener funktioneller Faktor in CD4⁺CD25⁺-T-Zellen (regulatorischen T-Zellen). Seine Funktion ist immunsupprimierend. Im Gegensatz der Erwartung führt eine erhöhte intratumorale Dichte von FOXP3⁺-T-Zellen bei Patienten

mit einem Kolonkarzinom zu einem günstigeren klinischen Verlauf. FOXP3⁺ scheint dabei das Mikromilieu des Tumors zu verändern. Dabei ist der Nachweis von FOXP3 in den Tumorzellen prognostisch günstig.³⁴ Eine Korrelation mit der Anzahl oder der Größe der Lymphknoten konnte nicht nachgewiesen werden. Aber wie auch schon in anderen Studien untersucht, ist eine geringe Anzahl von großen Lymphknoten und eine niedrige Dichte von FOXP3⁺ Tregs prognostisch ungünstig zu werten.³⁴ Die Rolle des adaptiven Immunsystems wird aber auch bezüglich des Tumorwachstums und der Rezidivwahrscheinlichkeit kontrovers diskutiert. Galon et al. legte dar, dass das adaptive Immunsystem über die Anzahl der Th₁-Zellen einen positiven Effekt auf das klinische Ergebnis ausübt.⁷ Dabei scheinen infiltrierende Lymphozyten das Tumorwachstum bei Patienten mit KKR zu hemmen. Entscheidend ist hier der Verbleib von memory T-Zellen (CD45RO⁺) im betroffenen Gewebe.⁷ Die Gedächtnis-T-Zellen begrenzen die Tumorausbreitung. Tumordinfiltrierende T-Zellen scheinen das Tumorstroma oder die Tumorzellen so zu verändern, dass sie ein geringeres Metastasierungspotenzial aufweisen.⁷ Postoperativ führt dies zur Abtötung von noch weiterhin persistierenden Tumorzellen und zu einer Reduzierung der Rezidivwahrscheinlichkeit.⁷ Von prognostischen Wert ist hier „die Art, die Dichte und die Lokalisation von Immunzellen“.⁷ Diese Aspekte sind der UICC-TNM-Klassifikation überlegen und unabhängig von dieser Klassifikation.⁷ Das Gesamtüberleben und die Rezidivwahrscheinlichkeit sind dabei abhängig vom lokalen adaptiven Immunsystem. Patienten mit einer hohen Dichte an infiltrierenden T-Zellen haben ein geringeres Risiko bzgl. der Tumorausbreitung, sowohl in regionale Lymphknoten als auch in vaskuläre und perineurale Strukturen. Dies wird als Immunediting bezeichnet, das Immunsystem der Patienten ist in der Lage das Tumorwachstum und die Tumorausbreitung zu kontrollieren. Dieser Effekt wird heute medikamentös unterstützt und verstärkt.¹⁷ Die Therapiemethoden verfolgen dabei verschiedene Strategien um die körpereigene Immunantwort auf den Tumor zu verstärken, beispielsweise mit Checkpoint-Inhibitoren oder monoklonalen Antikörpern.³⁵ Galon et al. untersuchte zudem die adaptive Immunantwort im Tumorzentrum (TC) und am invasiven Rand (IF) in situ bei 415 Patienten mit KKR.⁷ Dabei stellte er fest, dass Tumore von Patienten die kein Rezidiv entwickelten sowohl im TC als auch am IF eine höhere Dichte an Immunzellen aufweisen als diejenigen Patienten deren Tumorerkrankung rezidierte. Untersucht wurden CD3⁺-, CD8⁺-Zellen und ihr zytotoxisches Molekül (GZMB) und memory T-Zellen (CD45RO⁺).⁷ Die Immunreaktion der Patienten in den beiden untersuchten Tumorregionen korreliert dabei mit einer günstigen Prognose unabhängig

vom UICC-Tumorstadium I, II und III. Patientenfälle mit einer niedrigen Dichte an CD3⁺-Zellen und CD45R0⁺-Zellen haben eine ähnlich schlechte Prognose wie Patienten im UICC-Stadium IV.⁷ Das Verhältnis aus CD3⁺-TC/CD3⁺-IF-Dichte ist dabei der stärkste unabhängige prognostische Faktor.⁷ Diese Untersuchungen sollen letztendlich Hochrisikopatienten erkennen, welche von einer adjuvanten Therapie profitieren würden.⁷

Das Tumormikromileau und die darin enthaltenen unterschiedlichen intratumoralen Entzündungszellen sind ein neues zu erforschendes Thema der Onkologie.³³

Neueste Studien haben gezeigt, dass die alleinige Bewertung des Lymphknotenstatus zur Unter- oder Überbehandlung führen kann.⁸ Zur besseren Klassifizierung der Patienten und der damit verbundenen Therapieentscheidung kann die Immunreaktion des Patienten als Marker verwendet werden, auch wenn dies im klinischen Alltag im Allgemeinen noch keine Anwendung findet. Dazu sollen die Analyse des Lymphozyten-zu-Neutrophilen-Scores, der Gesamt-Lymphozyten-Score und die Immunreaktion in situ unter Verwendung des Immunoscores (IM-Score) benutzt werden.⁸ Die Analyse des Neutrophilen-zu-Lymphozyten-Scores (NLR) zur Vorhersage eines Tumorrezidivs fand erstmals Anwendung in der Studie „*Präoperatives Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten >5 ist ein prognostischer Faktor für rezidivierenden Darmkrebs*“ von S.Mallappa. Dabei stellt eine erhöhte präoperative NLR einen unabhängigen Faktor bezüglich eines Rezidivs dar.³⁶ Der Gesamtlymphozyten-Score in Verbindung mit der Anzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten wurde hinsichtlich des Überlebens der betroffenen Patienten angewendet. Die Mortalitätsrate sinkt hierbei mit steigender lymphozytärer Reaktion. Wie schon oben beschrieben wirkt sich diese gesteigerte Reaktionsbereitschaft des Immunsystems auf die Größe der Lymphknoten aus, was sich wiederum positiv auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirkt.³⁷ Mit Hilfe des IM-Score soll das Risiko eines Rückfalls bei Darmkrebs im Frühstadium vorhergesagt werden. Dabei wird ein in-vitro-Diagnostiktest zur Messung der Immunreaktion des Patienten durchgeführt.³⁸ Der IM-Score beruht auf der Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen CD3/CD45R0, CD3/CD8 oder CD8/CD45R0 im TC als auch in der IF der Tumore. Hierbei erfolgt die Skalierung des IM-Scores von IM-Score 0 („I“ 0), wenn in den beiden untersuchten Regionen eine niedrige Dichte der Zelltypen nachgewiesen wird bis zu einem IM-Score 4 („I“ 4), wenn in beiden Regionen eine hohe Dichte nachgewiesen wird. In zwei unabhängigen Kohorten (n = 602) hatten 4,8 Prozent der „I“ 4 kategorisierten Patienten nach 5 Jahren

ein Rezidiv und 72 Prozent der „I“ 0 und „I“ 1 ein Tumorrezidiv und nur 27,5 Prozent erreichten die 5-Jahres Überlebensgrenze. Die als „I“ 0 und „I“ 1 bewerteten Patienten hätten potenziell von einer adjuvanten Therapie profitiert.²¹

Alle aufgestellten Scores konnten aufzeigen, dass die Beurteilung des Immunprofils prognostische Relevanz besitzt. Dabei konnte an einer kleinen Kohorte von 18 Patienten von Hagland et. al herausgearbeitet werden, dass die Zahl der CD3⁺-Lymphozyten im peripheren Blut mit der im Tumorgewebe positiv korreliert.⁸ Signifikant ist dabei die positive Korrelation der CD4⁺-Zellen im Blut mit der Anzahl der CD3⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen im Tumorgewebe, sowohl in der Invasionsfront und als auch im Tumorzentrum. Dieser Sachverhalt als Immunosscore bezeichnet geht mit einer positiven Gesamtüberlebensrate einher.⁸ Wird der Neutrophilen-zu-Lymphozyten-Score herangezogen, weist eine relative Lymphozytopenie und damit ein erhöhter NLR auf eine schlechte Prognose hin.³⁶ Zudem wirkt sich wie oben beschrieben eine gesteigerte lymphozytäre Reaktionsbereitschaft des Immunsystems und hier vor allem der Gesamtlymphozyten-Score positiv auf das Gesamtüberleben aus.³⁷ Auch Märkl et al. fand eine starke Korrelation zwischen den CD3⁺- und CD8⁺-Zellen im Tumorzentrum und der Invasionsfront. Zudem fanden sie eine starke Korrelation zwischen einer erhöhten Dichte an ITLs bei Patienten mit einer ausreichenden Anzahl an resezierten Lymphknoten. Dabei konnte herausgearbeitet werden, dass die Dichte der ITLs ein unabhängiger prognostischer Faktor ist. Die Anzahl der entnommen Lymphknoten hängt von der Lymphknotengröße ab. Dabei ist die Lymphknotengröße ein Surrogatmarker für die Immunreaktion des Patienten.³³

Nur wenige vorherige Studien haben sich mit dem Zusammenhang der Lymphknotengröße (LK-Größe) und der Funktion des adaptiven Immunsystems beschäftigt sowie mit der Korrelation der LK-Größe mit den Lymphozyten im peripheren Blut.

4. HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNGEN

Bei Krebserkrankungen spielt die lokale Immunantwort eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Tumorwachstums, der Rezidivwahrscheinlichkeit und des Gesamtüberlebens der Betroffenen.

Diese prospektive Studie soll prüfen, welchen Einfluss ein kolorektales Karzinom unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht auf das zelluläre Immunsystem hat und inwiefern der lymphozytäre Infiltrationsgrad im Primärtumor und Zeichen der Lymphknotenaktivierung mit dem zellulären Immunstatus im peripheren Blut korrelieren. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Unterscheiden sich die Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit KRK von gesunden Kontrollpersonen unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht?
2. Zeigen sich bei KRK-Patienten Unterschiede des zellulären Immunsystems zwischen folgenden Subgruppen
 - a. Patienten im Tumorstadium UICC I/II versus UICC III/IV?
 - b. Patienten mit linksseitiger versus rechtsseitiger Lokalisation?
3. Korrelieren die im peripheren Blut analysierten Lymphozytenwerte mit den gewebständigen Lymphozyten im Primärtumor bzw. lokalen Lymphknoten?

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive, monozentrische Beobachtungsstudie, mit rein wissenschaftlichem Nutzen.

Nach Studieneinschluss erfolgte im Rahmen der Routineblutabnahme vor der geplanten Tumoroperation eine genaue Bestimmung des Immunstatus der Patienten. Dazu wurden zusätzlich 2 x 9 mL Blut abgenommen.

Die Dauer des Beobachtungszeitraums belief sich nach Einschluss der Probanden auf zwei Jahre. Während dieser zwei Jahre wurde dieser diagnostische Vorgang alle drei Monate wiederholt. Das entfernte Tumorgewebe wurde im Rahmen der histologischen Untersuchungen auf tumortypische genetische Mutationen untersucht und mit den genetischen Informationen der Blutproben verglichen.

Die Studie wurde beider Ethik kommissionander Ludwig-Maximilian-Universität München eingereicht (Referenznummer 18-726) und ein positives Votum am 03.12.2018 erteilt.

5.2 Rekrutierung der Probandenkohorte - Ein- und Ausschlusskriterien

Die Patientenrekrutierung begann im Dezember 2018 und dauerte insgesamt 24 Monate. In die Studie wurden 47 Probanden eingeschlossen, zudem wurden 50 Kontrollpersonen rekrutiert.

Einschlusskriterien:

Eingeschlossen wurden konsekutiv gescreente Patienten über 18 Jahren mit einem neu-diagnostizierten Kolonkarzinom in einem Tumorstadium I-IV, die am Klinikum Augsburg/Universitätsklinikum Augsburg operativ behandelt wurden. Voraussetzung zum Einschluss waren der histologische Nachweis eines KRK, ein Leitlinien-konformes Staging mittels Computertomographie innerhalb der letzten 4 Wochen sowie das schriftliche Einverständnis des Patienten.

Ausschlusskriterien:

Ausgeschlossen waren Patienten mit chronischer Infektion (insbesondere durch HIV oder Hepatitis-Viren), bekannter Autoimmunerkrankung oder Immundefizienz, Patienten mit einem Zweitmalignom zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses oder in der Vorgeschichte, sowie Patienten, die unter einer immunsupprimierenden oder -modulierenden Therapie stehen.

Die Kontrollpersonen bestanden überwiegend aus Blutspendern aus der Blutbank des Universitätsklinikums Augsburg.

5.3 Histologische Beurteilung des Primarius und der regionalen Lymphknoten

Nach der Kolonresektion wurde das Präparat ohne Verzögerung in das Institut für Pathologie gebracht. Dort erfolgte eine Eröffnung und Reinigung des Präparates mit Gewebeentnahme zur Kryoasservierung. Danach wurde zur Verbesserung der Lymphknotenausbeute eine intraarterielle Methylenblauinjektion durchgeführt. Nach Fixierung über Nacht erfolgte die weitere Präparation mit Gewebeentnahme für die histologische und molekulare Untersuchung des Tumors. Der Lymphknotenpräparation kommt eine besondere Bedeutung zu. Eine Mindestzahl von 25 Lymphknoten pro Fall wurde angestrebt. Nach Entwässerung über Nacht erfolgten am Folgetag die Paraffineinbettung und die Anfertigung der histologischen Schnitte. Es wurde eine ausführliche histologische Untersuchung des Operationspräparates mit Erhebung aller Standardparameter bestehend aus histologischer Typisierung, Tumorbudding, MMR- bzw. MSI-Status, BRAF- und panRAS-Mutations-Status durchgeführt, fotodokumentiert und in Großflächenschnitte aufgearbeitet.

Die Bestimmung tumorinfiltrierender T-Lymphozyten erfolgte anhand von immunhistochemisch gefärbten Schnitten (CD3 und CD8). Die Auszählung erfolgte digital mithilfe der CD3/CD8 Quantifier-Software der Firma VMscope, Berlin. Für alle Fälle wurden zwei verschiedene Lokalisationen am Tumorzentrum (TC) und an der invasiven Front (IF), mit einer jeweils 20-fachen Vergrößerung, mit einer hohen und intermediären Infiltration von CD3⁺- oder CD8⁺-Zellen durchgeführt und dokumentiert. Die hohe und intermediäre Infiltrationsrate für jeden Zelltyp und jede Lokalisation wurden als ein Mittelwert zusammengefasst, so dass vier Kategorien von TILs für jeden Patienten analysiert wurden (siehe Abbildung 1).³⁹ Neben den Auszählungen wurde der Immunoscore (IM-Score) anhand der kürzlich ermittelten Schwellenwerte ermittelt.³³ Alle Lymphknoten wurden sorgfältig histologisch untersucht. Die Längsdiameter der Lymphknoten wurden mit Hilfe eines transparenten Kalibers mit einem 5-mm-Loch auf der Basis von H&E-gefärbten Objektträgern durchgeführt. Anschließend wurden die Lymphknoten kategorisiert in LN ≤ 5mm oder > 5 mm. Lymphknotenmetastasen wurden ebenfalls vermessen. Hier wurde anschließend das Verhältnis zwischen

Lymphknotenmetastase und Lymphknotengröße (MSR) nach der Formel $\frac{\sum_{i=1}^m x_i}{\sum_{k=1}^n y_k}$

berechnet. Dieser Wert spiegelt das Ausmaß der Erkrankung in den Lymphknoten wieder.⁴⁰

Variablen der Formel $\frac{\sum_{i=1}^m x_i}{\sum_{k=1}^n y_k}$

X_i	<i>maximaler Durchmesser des Tumordinfiltrates in mm</i>
M	<i>Gesamtzahl der metastasierten Lymphknoten pro Fall</i>
Y_k	<i>maximaler Durchmesser des Lymphknotens in mm</i>
N	<i>Gesamtzahl der Lymphknoten pro Fall</i>

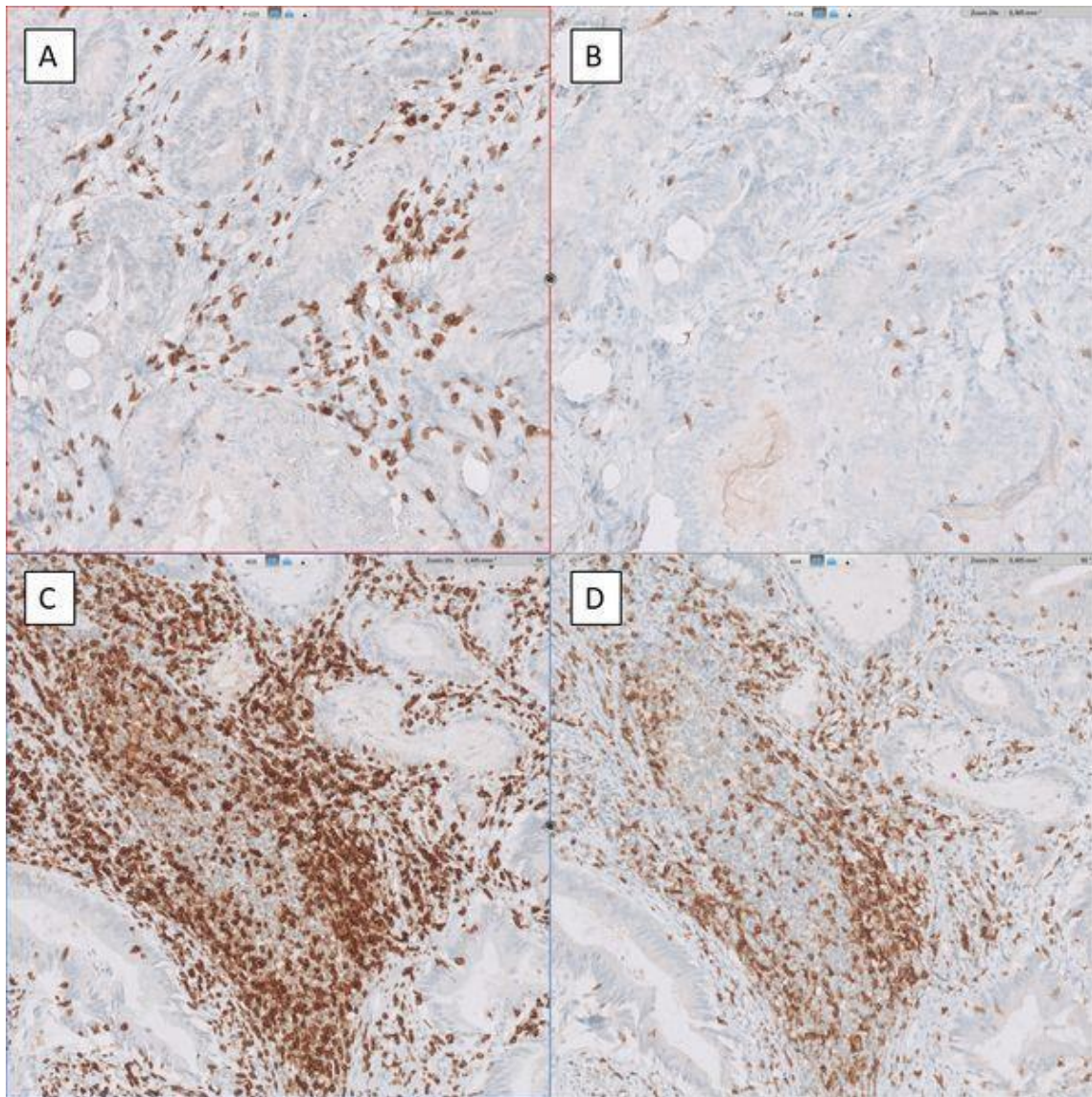


Abbildung 1: Zellzählung mit einer digitalen Quantifizierungssoftware (VMscope, Berlin, Deutschland)³⁹, Immunhistochemische Färbung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Tumorzentrum am Beispiel eines Patienten mit einem kolorektalem Karzinom. CD3-Lymphozyten (A) und CD8-Lymphozyten (B) bei einem Patienten mit geringer Lymphozyteninfiltration. CD3-Lymphozyten (C) und CD8-Lymphozyten (D) bei einer Patientin mit starker Lymphozyteninfiltration. Maßstabsbalken: 50 μm ³⁹

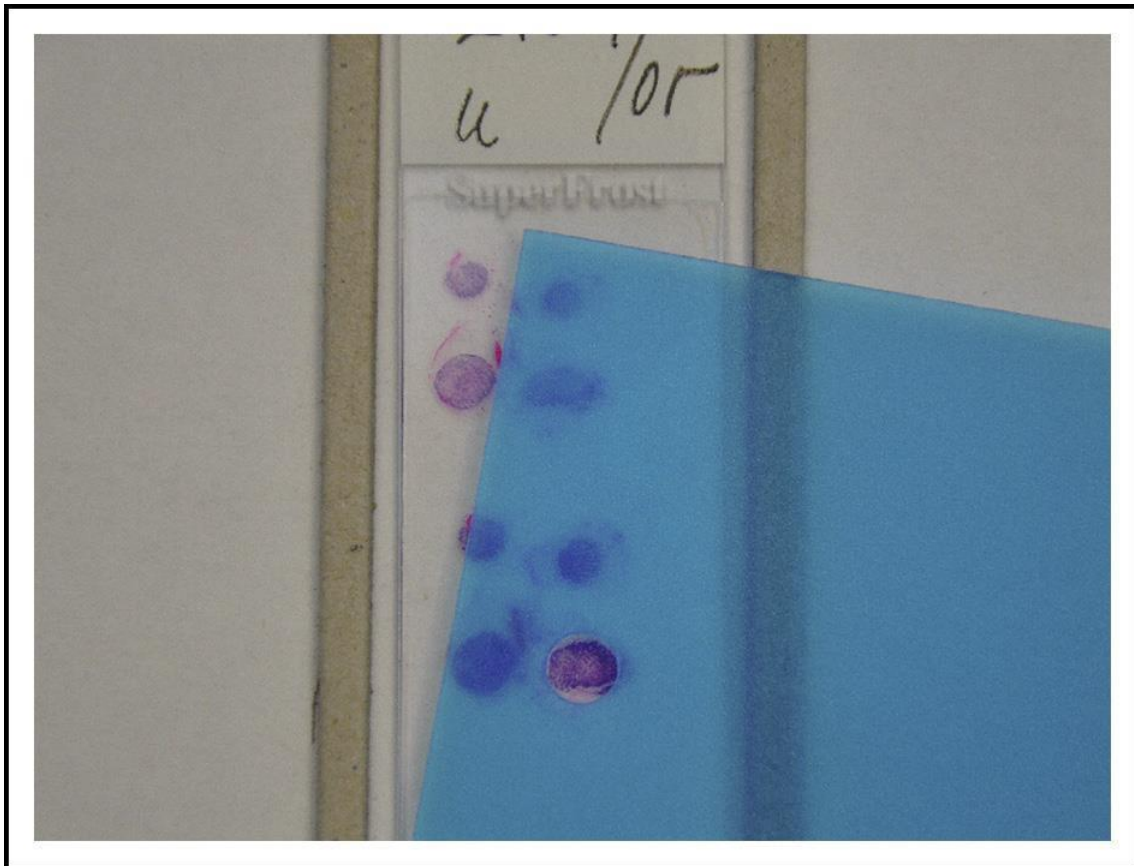


Bild: Messung des Längsdiameter der Lymphknoten mit Hilfe einer Schablone¹¹

5.4 Zellulärer Immunstatus im peripheren Blut

Aus dem peripheren Blut wurde präoperativ der zelluläre Immunstatus bestimmt. Hierzu wurde jeweils 1 ml Blut benötigt, der im Rahmen einer klinischen Routine- Blutabnahme mit abgenommen wurde. Folgenden Lymphozyten-Subpopulationen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FC500 von Beckmann Coulter) quantitativ bestimmt: B-Lymphozyten mit funktionellen Untergruppen: naive, transitorische, class-switch und memory B-Zellen; zytotoxische T-Zellen mit funktionellen Untergruppen: naive, aktivierte (früh, intermediate, late, exhausted, und terminal effector sowie $CD69^{+}$ und $HLA-DR^{+}$), regulatorische und memory (center memory sowie effector memory mit und ohne Koexpression von $CD45RA$) T-Zellen; T-Helferzellen mit funktionellen Untergruppen: Th_1 , Th_2 , Th_{17} , naive, aktivierte (früh, intermediate, late, exhausted, und terminal effector sowie $CD69^{+}$ und $HLA-DR^{+}$), regulatorische und memory (center memory sowie effector memory mit und ohne Koexpression von $CD45RA$) T-Zellen; NK-Zellen mit funktionellen Untergruppen ($CD56^{+}CD16^{+}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$, $CD56^{bright}CD16^{dim}$); NK-like-T-Zellen.

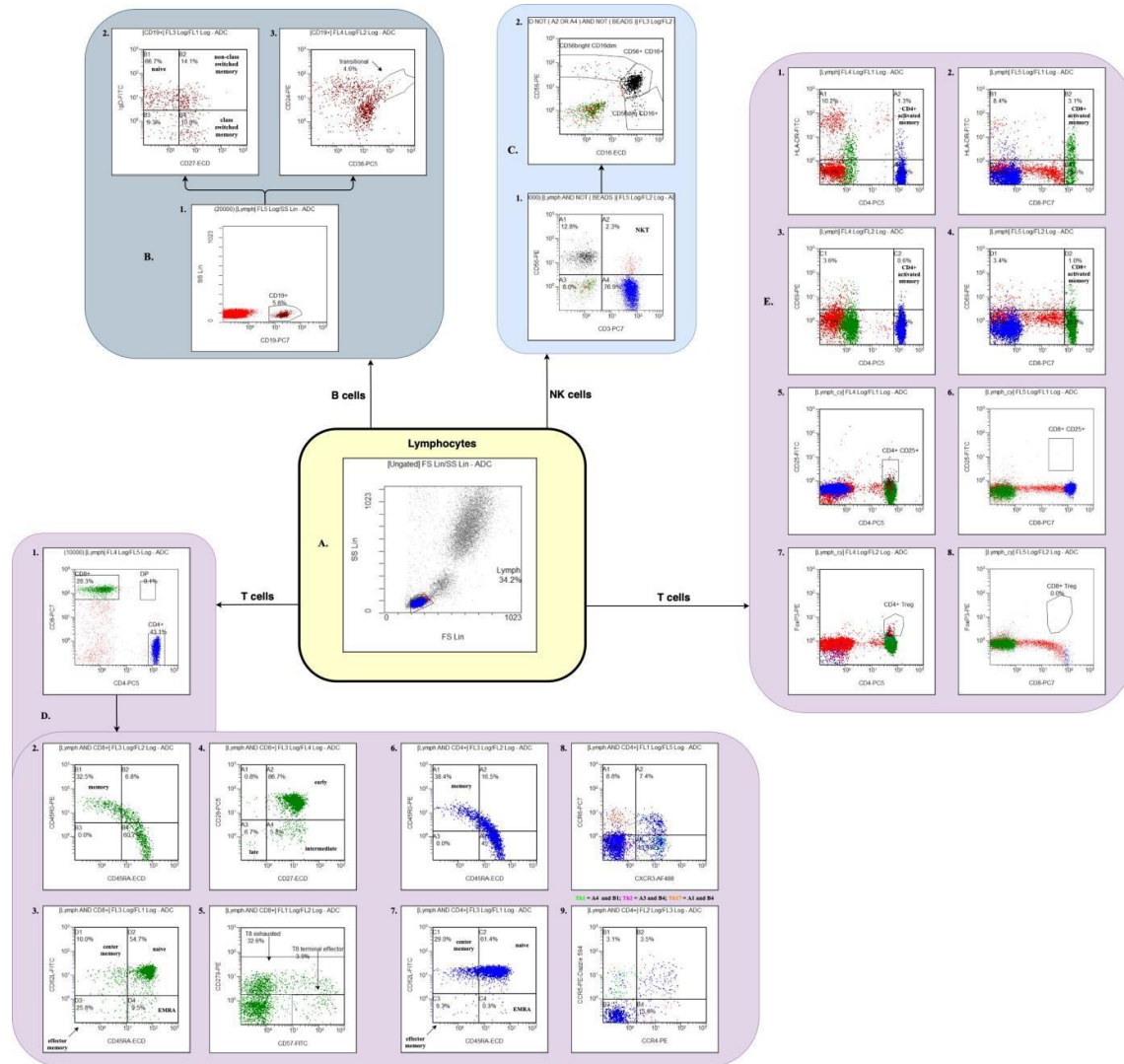


Abbildung 2: Gating-Strategie am Durchflusszytometer (FC500 von Beckmann Coulter)⁴¹

Tabelle 1: Fluorchrom-Antikörper-Konjugate⁴¹

Zellpopulation	Antigen	Fluorochrome	Clone	Isotype	Beckman Coulter/Biolegend item number
B	IgD	FITC	IA6-2	IgG2a	B30652
B	CD24	PE	ALB9	IgG1	IM1428U
B, exhausted T	CD27	ECD	1A4CD27	IgG1	B26603
B	CD38	PC5	LS198-4-3	IgG1	A07780

B	CD19	PC7	J3-119	IgG1 kappa	IM3628
Memory T	CD62L	FITC	DREG56	IgG1	IM1231U
Memory T	CD45R0	PE	UCHL1	IgG2a	A07787
Memory T, Treg	CD45RA	ECD	2H4LDH11LDB9	IgG1	IM2711U
Memory T, activated T, Treg, Th subsets	CD4	PC5	13B8.2	IgG1	A07752
Memory T, Treg, exhausted T, activated T	CD8	PC7	SFCI21Thy2D3	IgG1	737661
Exhausted CD8-T	CD57	FITC	NC1	IgM	B49188
Exhausted CD8-T	CD279	PE	PD1.3	IgG2b	B30634
Exhausted CD8-T	CD28	PC5	CD28.2	IgG1	6607108
Activated T	HLA-DR	FITC	Immu-357	IgG1	IM1638U
Activated T	CD69	PE	TP1.55.3	IgG2b	IM1943U
Treg	CD25	FITC	B1.49.9	IgG2a	IM0478U
Treg	FoxP3	PE	Ab259D	IgG1kappa	B46031
T/NK	CD56	PE	N901/NK-1	IgG1	A07788
T/NK	CD16	ECD	3G8	IgG1	A33098
T7NK	CD19	PC5	J3-119	IgG1	A07771

T/NK	CD3	PC7	UCHT1	IgG1	737657
Th subsets	CD183 (CXCR 3)	AF488	G025H7	IgG1	B68144
	CD194 (CCR4)	PE	L291H4	IgG1	359412
	CD195 (CCR5)	PE/Dazzle 594	J418F1	IgG2b	359126
	CD196 (CCR6)	PC7	B-R35	IgG2a	B68132

FITC fluorescein isothiocyanate, PE phycoerythrin, ECD phycoerythrin-Texas red, PC-5 phycoerythrin cyanin, PC7 phycoerythrin cyanin7, AF488 Alexa-Fluor 488

5.5 Statistische Analyse

Neben deskriptiven Auswertungen mit Angabe der Medianwerte und der Interquartilsbereiche aller im peripheren Blut gemessenen Lymphozytenwerte für die gesunde Kontrollgruppe und die KRK-Patienten bzw. deren Subgruppen (Tumorstadium I/II versus III/IV sowie links- versus rechtsseitige Tumorklassifikation), erfolgte eine univariate Analyse zum Vergleich der beiden Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests für unverbundene Stichproben.

Desweiteren wurden univariate Unterschiede aufgrund des Geschlechts sowie (nach logarithmischer Transformation) des Alters statistisch analysiert. Ergänzend wurden zwei multivariate lineare Regressionsanalyse durchgeführt: zum einen eine Analyse für die gesamte Studienkohorte (Patienten und gesunde Kontrollpersonen) unter Einbeziehung des Tumorstadiums, des Alters und des Geschlechtes, zum anderen eine Analyse – ausschließlich für die Patientengruppe – unter Einbeziehung der Mikrosatelliteninstabilität und der Seitigkeit (Colon ascendenz/Colon descendenz) des Tumors.

Ferner wurden Korrelationen nach Spearman zwischen den im peripheren Blut zirkulierenden und Tumorgewebe-infiltrierenden Lymphozyten durchgeführt.

Als signifikant wurden für alle genannten Tests p-Werte < 0,05 gewertet. Ausgewertet wurden die Daten mit dem Programm SPSS für Windows (IBM SPSS Statistics 24,

Armonk, New York, USA) und R 4.0.2. Die Auswahl der statistischen Tests und die entsprechende Durchführung wurden von Herr Tobias Arndt und Herr Stefan Schiele vom Institut für Mathematik an der Universität Augsburg unterstützt.

6. ERGEBNISSE

6.1 Patientencharakteristika

Insgesamt wurden 50 Patienten in die Studie eingeschlossen. Aufgrund revidierter Diagnosen postoperativ mussten 3 Patienten retrospektive ausgeschlossen werden, so dass final die Daten von 47 Patienten ausgewertet werden konnten. Trotz geplantem Einschluss von ausschließlich nicht-metastasierten Patienten, stellten sich postoperativ einige Patienten als Stadium IV heraus. Als Kontroll-Kohorte wurden 50 gesunden Personen aufgenommen, welche aus der Blutspende-Datei des Instituts für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Augsburg rekrutiert wurden. Das mittlere Alter der Patienten betrug 65 Jahre, dabei war der jüngste Patient 42 Jahre und der älteste 84 Jahre alt, darunter 18 Frauen und 29 Männern wie es aus der unten angefügten Tabelle entnommen werden kann. Des Weiteren sind in dieser Tabelle das Tumorstadium und die Tumorlokalisation der Patienten aufgeführt. Die Kontrollgruppe war insgesamt jünger mit einem Durchschnittsalter von 43 Jahren (18 Jahre bis 81 Jahre) davon 17 Frauen und 33 Männern.⁴¹

Tabelle 2: Charakteristika der Studienpatienten³⁹

Parameter	Patienten (n=47)	Kontrollgruppe (n=50)	p-value
Alter; Mittelwert (Alterspanne)	65 (42-84)	43 (18-81)	0.00
Geschlecht			
männlich; n (%)	29 (62)	33 (66)	0.661
weiblich; n (%)	18 (38)	17 (34)	
Tumorstadium			
UICC I; n (%)	11 (23)		
UICC II; n (%)	18 (38)		
UICC III; n (%)	13 (28)		
UICC IV; n (%)	5 (11)		
Lokalisation des Tumors			
rechts n (%)	32 (68)		
links n (%)	15 (32)		
Mikrosateliteninstabilität			

stabil n (%)	35 (74)		
instabil n (%)	11 (23)		
Anzahl der resezierten Lymphknoten: Mittelwert (Spannbreite)	35 (13-64)		
Lymphknoteninfiltration			
positiv n (%)	16 (34)		
negativ n(%)	31 (64)		

Es konnten Patienten zu allen vier UICC-Tumorstadien eingeschlossen werden. Patienten im UICC-Stadium IV wurden unabhängig ihres metastasierten Stadiums operativ versorgt. Bei 32 der eingeschlossenen Patienten war der Tumor rechtsseitig (Zökum, Colon ascendens und Colon transversum bis zur Milzflexur) und bei 15 Patienten linksseitig (Colon descendens und Sigma) lokalisiert.

Im Median wurden 35 Lymphknoten entnommen, dabei lagen bei 16 Patienten Lymphknotenmetastasen vor.³⁹

Die 31 nodal negativen Patienten wurden anhand der Lymphknotengröße weiter unterteilt in die Kategorie LN5 sehr niedrig (0 oder 1 Lymphknoten mit einem Durchmesser von ≥ 5 mm), LN5 niedrig (2-5 Lymphknoten ≥ 5 mm) und LN5 hoch (> 5 Lymphknoten ≥ 5 mm). Dabei wurden 7 Patienten der Gruppe LN5 sehr niedrig, 11 der Gruppe LN5 niedrig und 13 der Gruppe LN5 hoch zugeteilt.³⁹

6.2 Analyse der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten

6.2.1 Vergleich der KRK-Patienten mit der gesunden Kontrollkohorte (univariate Analyse)

In der univariaten Analyse der Lymphozytenpopulation konnte gezeigt werden, dass die Gesamtanzahl der Lymphozyten bei den Tumorpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ist (1878/ μ l zu 1320/ μ l; $p = 0,000$). Die Anzahl der gesamten B-Lymphozyten sowie mehrere B-Zell-Subpopulationen sind bei den Karzinompatienten ebenfalls niedriger (206/ μ l zu 122/ μ l; $p = 0,000$). Das Verhalten der T-Zellen gestaltet sich ähnlich, sowohl die CD8⁺-T-Zellen, als auch die CD4⁺-T-Zellen sind bei den Patienten reduziert (292/ μ l zu 229/ μ l; $p = 0,009$ und 765/ μ l zu 528/ μ l; $p = 0,001$). In den Subpopulationen wurden bei den Patienten niedrigere Zahlen für naive und Memory-CD8⁺-T-Zellen gemessen, sowie für early, intermediate und exhausted zytotoxische T-Zellen. Die Subpopulationen der CD4⁺-Zellen fielen auch mit

niedrigeren Zahlen auf vor allem die naiven, memory, central memory, regulatorischen und die HLA-DR positiven. Die Gesamtzahl der NK-Zellen und deren Subpopulationen liegen bei den Krebspatienten in geringerer Zahl vor (226/ μ l zu 122/ μ l; $p = 0,002$; $CD56^{+}CD16^{+}$: 193/ μ l zu 129/ μ l; $p = 0,002$; $CD56^{dim}CD16^{bright}$: 15/ μ l zu 9/ μ l; $p = 0,42$; $CD56^{bright}CD16^{dim}$: 15/ μ l zu 11/ μ l; $p = 0,002$). Abbildung 3, Tabelle 3.⁴¹

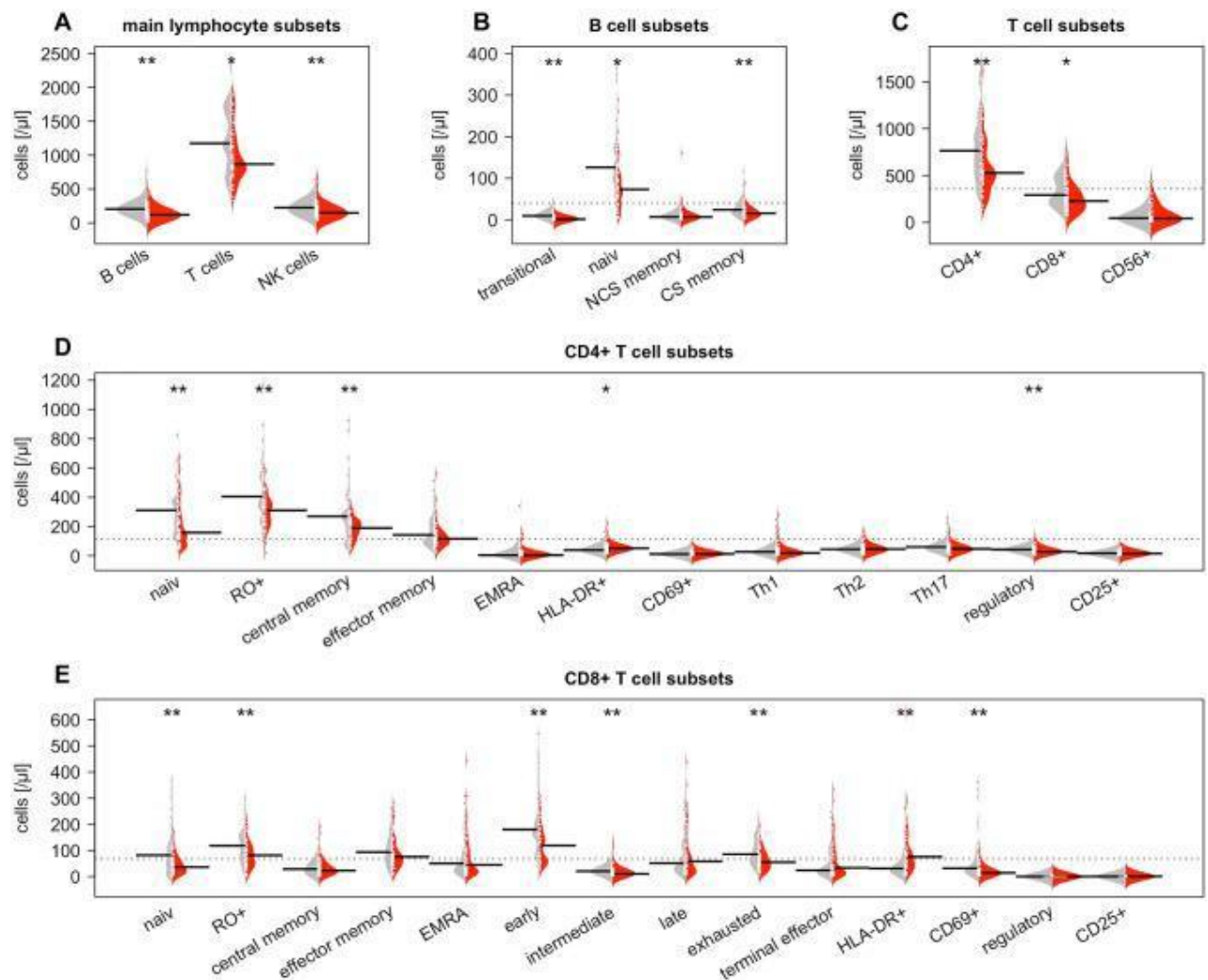


Abbildung 3: Vergleich der Lymphozyten-Untergruppen zwischen Kolonkarzinompatienten (rot) und gesunden Kontrollpersonen (grau). **A** Hauptlymphozyten-Untergruppen, **B** B-Zell-Untergruppen, **C** T-Zell-Untergruppen, **D** CD4 + T-Zell-Untergruppen, **E** CD8 + T-Zell-Untergruppen. Weiße Häkchen kennzeichnen die einzelnen Datenpunkte; Die gestrichelten Linien zeigen den Gesamtdurchschnitt der Teilmengen. Signifikante p -Werte werden mit * für $p < 0,05$ und ** für $p < 0,005$ angezeigt

Tabelle 3: Lymphozytenuntergruppen bei gesunden Kontrollen und Patienten. Die Zellzahlen sind als Medianwert/ μ l (Interquartilsbereich) angegeben. P-Werte sind für

die univariate Analyse zwischen der Gesamtgruppe der Krebspatienten und den gesunden Kontrollen angegeben⁴¹

	Gesunde Kontrollen Mediane Zellzahl (Interquartilbereich) (n = 50)	Patienten mit Kolonkarzinom Mediane Zellzahl (Interquartilbereich) (n = 47)	p-Wert univariate Analyse
<i>Lymphozyten insgesamt</i>	1878 (1282–2292)	1320 (1046–1666)	0.000
CD3 + cells	1175 (806–1678)	868 (714–1190)	0.011
CD8 + cells	292 (203–493)	229 (131–344)	0.009
Naive	82 (35–140)	36 (16–67)	0.004
Memory	118 (63–165)	82 (45–118)	0.008
CM	29 (13–55)	23 (13–50)	0.563
EM	94 (55–143)	76 (45–112)	0.196
EMRA	51 (22–128)	45 (17–114)	0.623
Early	180 (130–295)	119 (58–169)	0.000
Intermediate	21 (12–34)	11 (6–26)	0.006
Late	51 (26–124)	58 (19–150)	0.931
Exhausted	86 (54–136)	54 (29–89)	0.002
Terminal effector	24 (12–95)	34 (11–117)	0.697
Regulatory	0 (0–1)	0 (0–1)	0.277
IL2	1 (0–1)	1 (0–2)	0.328
HLA-DR	31 (17–61)	76 (37–141)	0.000
CD69	32 (17–89)	15 (8–25)	0.000
CD4 + cells	765 (525–1017)	528 (400–768)	0.001
Naive	311 (173–416)	159 (79–295)	0.002
Memory	404 (309–590)	311 (214–378)	0.000
CM	269 (157–402)	190 (124–238)	0.003
EM	143 (93–238)	116 (78–167)	0.097
EMRA	4 (1–32)	5 (2–19)	0.636
Th1	27 (14–58)	19 (10–40)	0.156
Th2	44 (30–67)	46 (32–62)	0.917
Th17	60 (35–82)	47 (33–67)	0.081
Regulatory	43 (29–60)	28 (19–43)	0.002
IL2R +	17 (8–21)	15 (8–25)	0.874
HLA-DR	39 (27–60)	52 (44–65)	0.015
CD69	12 (7–19)	13 (9–21)	0.274
CD3 + CD56 +	45 (18–81)	43 (19–108)	0.945
Cells			
<i>NK-Zellen</i>	226 (139–300)	150 (87–223)	0.002
CD56 + CD16 +	193 (111–274)	129 (65–203)	0.002
CD56dim CD16bright	15 (11–20)	9 (7–18)	0.042
CD56bright CD16dim	15 (10–19)	11 (8–14)	0.002
<i>B-Zellen</i>	206 (146–276)	122 (69–185)	0.000
Naive	126 (90–172)	73 (37–113)	0.000
Non-class-switched	7 (5–13)	7 (3–14)	0.328
Memory			
Class switched	24 (14–43)	16 (8–24)	0.001
Transitory	10 (5–18)	2 (1–4)	0.000

CD4/CD8 Ratio	2.4 (1.6–3.3)	2.2 (1.8–3.3)	0.997
---------------	---------------	---------------	-------

fettgedruckte Werte kennzeichnen Lymphozyten-Untergruppen mit signifikanten Unterschieden ($p < 0,005$)

6.2.1.1 Einfluss des Tumorstadiums (UICC I/II versus UICC III/IV)

Zur weiteren Analyse unterteilten wir die Patienten hinsichtlich des Stadiums ihrer Tumorerkrankung in zwei Gruppen. Eine Gruppe bildeten diejenigen Patienten, welche an einer ortsständigen Tumorerkrankung leiden (UICC I/II) im Vergleich zu denjenigen, welche an einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung leiden (UICC III/IV).

Hier konnten bezüglich der Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut Unterschiede für die Gruppe der Patienten im Tumorstadium UICC I/II im Vergleich zur Kontrollgruppe herausgearbeitet werden. Es fanden sich eine höhere Anzahl an HLA-DR⁺-CD4⁺-Zellen bei den Patienten (55/ μ l vs. 39/ μ l; $p = 0,003$), die Gesamtzahl der CD8⁺-Zellen war niedriger (224/ μ l vs. 291/ μ l; $p = 0,010$), sowie die memory CD8⁺-Zellen (69/ μ l vs. 118/ μ l; $p = 0,004$), die effector memory CD8⁺-Zellen (67/ μ l vs. 93/ μ l; $p = 0,044$) und die exhausted CD8⁺-Zellen (55/ μ l vs. 86/ μ l; $p = 0,002$), als auch die NK-Zellen (147/ μ l vs. 226/ μ l; $p = 0,003$) und deren Untergruppen CD56^{dim}CD16^{bright} (9/ μ l vs. 15/ μ l; $p = 0,028$) und CD56^{bright}CD16^{dim} (11/ μ l vs. 15/ μ l; $p = 0,003$).

Im direkten Vergleich der Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung und der gesunden Kontrolle konnte für all die oben genannten Lymphozytenpopulationen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Für die anderen Lymphozytenpopulationen sind die signifikanten Unterschiede vergleichbar mit den Ergebnissen der gesamten Patientenkohorte im Vergleich zu den Gesunden.

6.2.1.2 Einfluss der Lokalisation des Kolonkarzinoms (Seitigkeit)

Weiter unterteilten wir die Patienten hinsichtlich der Tumorlokalisation bezogen auf das Hemicolon in links oder rechts. Hier zeigte die univariate Analyse eine höhere Anzahl der Gesamtlymphozytzahl für CD8⁺-Zellen (212/ μ l vs. 255/ μ l; $p = 0,040$), memory

(67/ μ l vs. 97/ μ l; $p = 0,040$), effector memory (59/ μ l vs. 96/ μ l; $p = 0,004$), late (39/ μ l vs. 94/ μ l; $p = 0,005$) und terminal effector CD8⁺-Zellen (17/ μ l vs. 89/ μ l; $p = 0,003$), sowie Th17- (39/ μ l vs. 58/ μ l; $p = 0,036$) und HLA-DR⁺-CD4⁺-Zellen (47/ μ l vs. 56/ μ l; $p = 0,045$) bei Patienten mit Tumorlokalisation im linken Hemicolon. Tabelle 4

Tabelle 4: Lymphozytenuntergruppen bei Patienten in Abhängigkeit der Tumorseitigkeit⁴¹

	Kolonkarzinom-Patienten mit rechtsseitigem Tumor Mediane Zellzahl (Interquartilsbereich) (n=32)	Kolonkarzinom-Patienten mit linksseitigem Tumor Mediane Zellzahl (Interquartilsbereich) (n=15)	p-Wert univariate Analyse
<i>Lymphozyten insgesamt</i>	1288 (993 – 1651)	1351 (1070 – 1952)	0.438
<i>CD3⁺-Zellen</i>	833 (713 – 1121)	952 (714 – 1484)	0.171
<i>CD8⁺-Zellen</i>	212 (118 – 316)	255 (181 – 441)	0.040
Naive	41 (16 – 66)	33 (16 – 73)	0.964
Memory	67 (37 – 107)	97 (55 – 137)	0.040
CM	23 (12 – 46)	22 (15 – 55)	0.553
EM	59 (37 – 68)	96 (74 – 216)	0.004
EMRA	30 (16 – 99)	83 (25 – 165)	0.077
Early	90 (56 – 168)	135 (58 – 198)	0.424
Intermediate	10 (6 – 24)	15 (8 – 27)	0.240
Late	39 (14 – 92)	94 (63 – 261)	0.005
Exhausted	51 (24 – 88)	64 (42 – 89)	0.326
Terminal effector	17 (8 – 72)	89 (43 – 207)	0.003
Regulatory	0 (0 – 1)	0 (0 – 0)	0.583

IL2R+	1 (0 – 2)	1 (0 – 1)	0.288
HLA-DR+	58 (30 – 109)	85 (59 – 117)	0.065
CD69+	13 (9 – 25)	15 (6 – 46)	0.802
<i>CD4⁺-Zellen</i>	499 (331 – 626)	590 (439 – 880)	0.096
Naive	145 (77 – 279)	231 (121 – 352)	0.157
Memory	272 (187 – 365)	335 (274 – 435)	0.047
CM	177 (109 – 234)	208 (162 – 250)	0.137
EM	116 (75 – 151)	137 (83 – 189)	0.329
EMRA	6 (1 – 21)	4 (2 – 15)	0.981
Th1	15 (10 – 38)	31 (17 – 42)	0.193
Th2	40 (21 – 58)	57 (39 – 70)	0.131
Th17	39 (29 – 59)	58 (41 – 82)	0.036
Regulatory	32 (23 – 40)	25 (13 – 54)	0.819
IL2R+	15 (8 – 27)	15 (8 – 23)	0.749
HLA-DR+	47 (35 – 63)	56 (52 – 67)	0.045
CD69+	13 (7 – 17)	13 (11 – 22)	0.349
CD3+ CD56+ cells	37 (15 – 67)	44 (21 – 195)	0.254
<i>NK-Zellen</i>	171 (87 – 236)	142 (104 – 210)	0.732
CD56+ CD16+	142 (57 – 214)	108 (75 – 168)	0.616
CD56dim CD16bright	9 (5 – 20)	15 (8 – 18)	0.338
CD56bright CD16dim	11 (9 – 15)	10 (7 – 12)	0.118
<i>B-Zellen</i>	125 (80 – 172)	111 (59 – 199)	0.819

Naive	73 (51– 113)	74 (27 – 150)	0.842
Non-class-switched Memory	7 (3 – 15)	6 (3 – 11)	0.767
Class switched	17 (8 – 28)	15 (7 – 20)	0.616
Transitory	2 (1 – 3)	3 (1 – 5)	0.294
CD4/CD8 Ratio	2.7 (1.7 – 3.9)	2.1 (1.8 – 3.2)	0.268

6.2.2 Einfluss des Geschlechts (univariate Analyse)

Ebenfalls untersuchten wir den Einfluss des Geschlechts auf die Lymphozytenpopulation. Hier betrachteten wir die gesamte Studienpopulation (Patienten und gesunde Kontrollkohorte). Wir stellten signifikante Unterschiede für die naiven CD4⁺-Zellen ($p = 0,026$), memory CD8⁺-Zellen ($p = 0,022$), CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen ($p = 0,034$) und für das Verhältnis von CD4⁺/CD8⁺-Zellen ($p = 0,000$) fest. Mit höheren Werten für das weibliche Geschlecht bei den naiven CD4⁺-Zellen, CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen und dem Verhältnis von CD4⁺/CD8⁺-Zellen und höhere Werten für das männliche Geschlecht bei den CD8⁺-Zellen.

6.2.3 Einfluss des Alters (univariate Analyse)

In der Betrachtung des Einflusses des Alters auf die Lymphozytenpopulationen, pro 10 Jahre, ergaben sich ebenfalls signifikante Veränderungen.

Insgesamt nimmt die Gesamtzahl der Lymphozyten ab ($p = 0,000$).

Prozentual gesehen bedeutet dies eine Abnahme der CD8⁺-Zellen um 13,3 Prozent ($p = 0,000$), bei Betrachtung der Subpopulationen fällt hier eine signifikante Abnahme um 33,4 Prozent ($p = 0,000$) bei den naiven Zellen, 12,4 Prozent ($p = 0,009$) bei den memory Zellen, 20,9 Prozent ($p = 0,000$) bei den early Zellen, 10,4 Prozent ($p = 0,028$) bei den intermediate Zellen, 7,9 Prozent ($p = 0,039$) bei den exhausted Zellen und 25,6 Prozent ($p = 0,000$) bei den CD69⁺-Zellen auf.

Die CD4⁺-Zellen nehmen um 8,4 Prozent ($p = 0,003$) ab, hier fällt die Anzahl der naiven Zellen um 14,8 Prozent ($p = 0,000$), die Anzahl der memory Zellen um 8,4 Prozent ($p = 0,006$), die Anzahl der CM-Zellen um 10,9 Prozent ($p = 0,001$).

Auch die Anzahl der NK-Zellen nimmt ab (6,7 Prozent; $p = 0,038$), in dieser Population sind vor allem die $CD56^+CD16^+$ -Zellen betroffen (6,8 Prozent; $p = 0,008$).

Die Gesamtzahl der B-Zellen sinkt um 16,7 Prozent ($p = 0,000$), dies bedeutet eine Abnahme der naiven Zellen um 19,4 Prozent ($p = 0,000$), der memory non-class switch um 14,8 Prozent ($p = 0,003$), der memory class switch um 12,0 Prozent ($p = 0,009$) und der transitionalen Zellen um 38,4 Prozent ($p = 0,000$).

Lediglich die Anzahl der $CD8^+IL2R^+$ -Zellen, die Anzahl der $CD4^+EMRA$ -Zellen und die Anzahl der $CD4^+HLADR^+$ -Zellen steigt altersabhängig (17,0 Prozent, $p = 0,035$; 22,3 Prozent, $p = 0,039$; und 8,2 Prozent, $p = 0,018$). Abbildung 4, Tabelle 5⁴¹

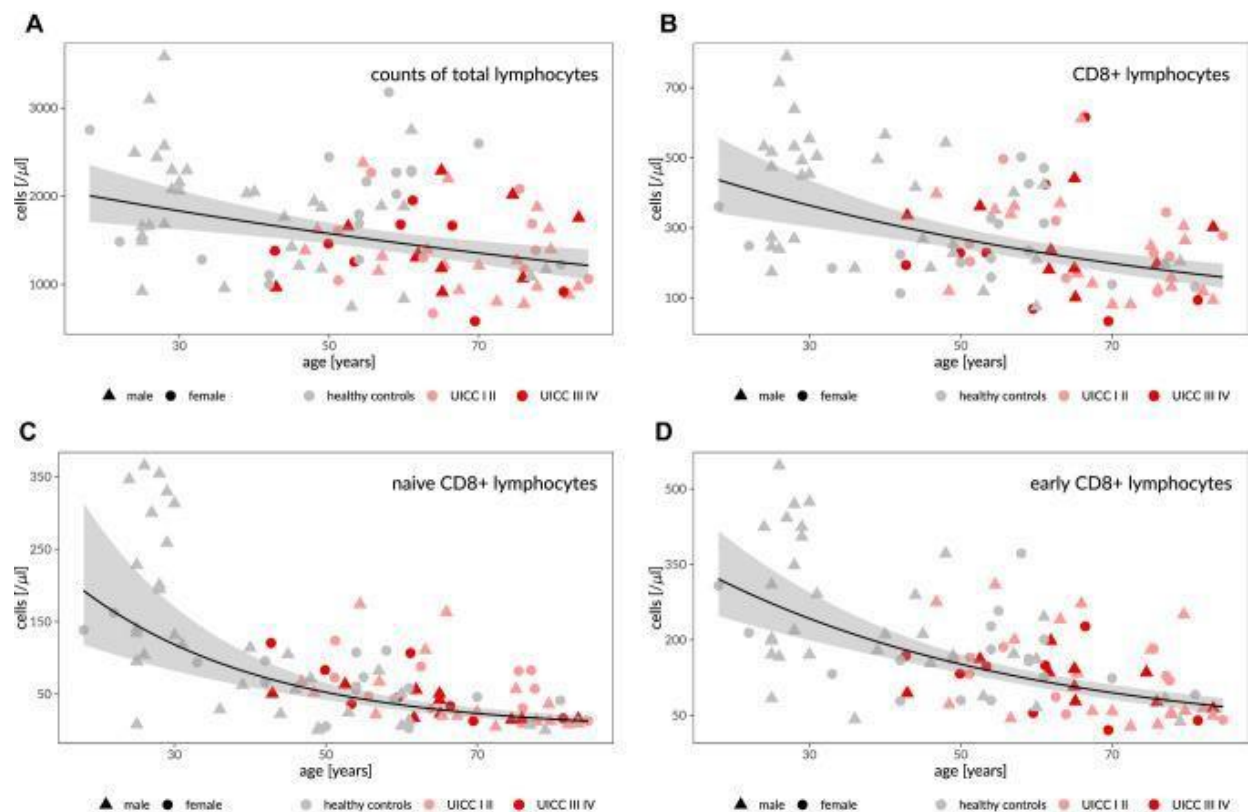


Abbildung 4: Altersabhängige Verteilung der Zellzahlen und mediane Abnahme im Laufe der Lebensdauer. Schwarze Linie = geglättete Mittelwerte log-transformierter Daten, 95%-Konfidenzintervall in Grau. **A** Gesamtlymphozyten, **B** $CD8^+$ -

Lymphozyten, C naive CD8⁺-Lymphozyten, D early CD8⁺-Lymphozyten in der gesamten Kohorte⁴¹

Tabelle 5: Univariate Analyse der altersabhängigen Lymphozytenveränderungen pro zehn Jahre für die gesamte Kohorte (n = 97). Die Zellzahl wird als Medianwert/μl (Interquartilsbereich) angegeben.⁴¹

	Mediane Zellzahl/μl (Interquartilsbereich)	Relative Zellzahlabweichung pro 10 Jahre	p-Wert
<i>Lymphozyten insgesamt</i>	1546.4 (1176.0–2055.7)	– 7,2	0.000
<i>CD3⁺-Zellen</i>	1047.5 (756.8–1497.3)	– 6,9%	0.003
<i>CD8⁺-Zellen</i>	252.3 (182.3–423.3)	– 13,3%	0.000
Naiv	56.1 (20.0–107.4)	– 33,4%	0.000
Memory	96.3 (51.2–143.9)	– 12,4%	0.009
CM	25.8 (13.6–52.7)	– 10,6%	0.069

EM	79.2 (48.5–135.0)	– 7,0%	0.110
EMRA	50.6 (18.2–115.6)	2.4%	0.714
Early	159.5 (79.1–216.3)	– 20,9%	0.000
Intermediate	15.0 (8.2–30.3)	– 10,4%	0.028
Late	54.1 (23.5–124.5)	– 3,6%	0.553
Exhausted	69.5 (41.8–113.8)	– 7,9%	0.039
Terminal effector	29.0 (11.6–97.6)	0.09%	0.990
HLADR +	43.2 (22.0–92.4)	11.2%	0.101
CD69 +	19.8 (11.4–53.6)	– 25,6%	0.000
Regulatory	0.3 (0.2–0.6)	– 4,8%	0.593
IL2R +	0.6 (0.3–1.5)	17.0%	0.035
<i>CD4⁺-Zellen</i>	624.1 (454.7–898.8)	– 8,4%	0.003
Naiv	226.8 (130.0–372.6)	– 14,8	0.000
Memory	340.1 (245.4–466.6)	– 8,4%	0.006
CM	220.2 (143.1–290.4)	– 10,9%	0.001
EM	123.9 (87.9–200.8)	– 1,3%	0.724
EMRA	3.8 (1.4–24.6)	22.3%	0.039
HLADR +	47.2 (32.4–63.0)	8.2%	0.018

CD69 +	12.6 (7.6–18.9)	3.3%	0.535
Th1	21.7 (12.4–48.1)	– 1,1%	0.838
Th2	44.8 (31.0–62.5)	4.2%	0.261
Th17	50.7 (34.2–75.1)	– 3,3%	0.387
Regulatory	35.6 (24.0–51.7)	– 6,8%	0.033
IL2R +	15.1 (8.4–21.7)	– 4,7%	0.225
CD3 + CD56 + cells	44.2 (19.0–83.2)	3.8%	0.548
<i>NK-Zellen</i>	182.8 (107.8–264.8)	– 6,7%	0.038
CD56 + CD16 +	152.9 (90.1–238.1)	– 6,8%	0.008
CD56dim CD16bright	13.1 (8.0–19.7)	– 5,1%	0.156
CD56bright CD16dim	12.2 (9.3–17.2)	– 6,6%	0.064
<i>B-Zellen</i>	162.2 (100.8–234.0)	– 16,7%	0.000
Naiv	99.1 (60.1–158.9)	– 19,4%	0.000
Memory non-class switch	7.2 (3.7–13.2)	– 14,8%	0.003
Memoryclass switch	19.1 (9.8–31.2)	– 12,0%	0.009
Transitional	4.5 (1.6–10.2)	– 38,4%	0.000

Fett geschriebene Werte weisen auf Lymphozyten-Untergruppen mit signifikanten Unterschieden hin ($p < 0,005$)

6.3 Gewichtung von Tumorstadium, Alter und Geschlecht in der multivariaten Analyse

Auf Grund der festgestellten Unterschiede in den univariaten Analysen, gingen die Parameter Alter, Geschlecht und das Kolonkarzinom eingeteilt in die Untergruppen UICC-Stadium I/II oder III/IV in die multivariate Analyse ein.

6.3.1 Alter als Parameter der multivariaten Analyse

Die Gesamtzahl der T-Zellen wird signifikant ($p = 0,0361$) durch das Alter beeinflusst, auch auf die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen ($p = 0,0018$), die Anzahl der naiven $CD8^+$ -Zellen ($p = 0,0000$), die Anzahl der CM- $CD8^+$ -Zellen ($p = 0,0085$), die Anzahl der frühen $CD8^+$ -Zellen ($p = 0,0000$), die Anzahl der $CD8^+CD69^+$ -Zellen ($p = 0,0147$), die Anzahl der naiven $CD4^+$ -Zellen ($p = 0,0085$), die Anzahl der CM- $CD4^+$ -Zellen ($p = 0,0222$) und die Anzahl der EMRA $CD4^+$ -Zellen ($p = 0,0346$) hat das Alter in der multivariaten Analyse einen signifikanten Einfluss. Betrachten wir die B-Zellen, so wirkt sich auch hier das Alter signifikant auf die Anzahl aus. Die Gesamtzahl der B-Zellen verändert sich signifikant mit einem p -Wert = $0,0126$. Die Anzahl einiger Untereinheiten der B-Zellen werden ebenfalls durch das Alter signifikant beeinflusst, die Anzahl der non-class switched memory B-Zellen ($p = 0,0041$), die transitionalen B-Zellen ($p = 0,0022$). Die NK-Zellen werden durch das Alter nicht signifikant beeinflusst.

6.3.2 Geschlecht als Parameter der multivariaten Analyse

Das Geschlecht übt einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der naiven $CD8^+$ -Zellen ($p = 0,0299$), auf die Anzahl der $CD4^+$ -T-Helferzellen ($p = 0,0499$), die Anzahl der naiven $CD4^+$ -Zellen ($p = 0,0036$) und auf die $CD56^{\text{bright}}CD16^{\text{dim}}$ -Zellen ($p = 0,0201$) aus.

Das Verhältnis von $CD4^+/CD8^+$ -Zellen wird zum einen signifikant durch das Alter ($p = 0,0389$) und das Geschlecht ($p = 0,0014$) beeinflusst.

6.3.3 Tumorstadium als Parameter der multivariaten Analyse

In der Betrachtung der Patienten beeinflusst das UICC Stadium I/II die Anzahl der naiven $CD8^+$ -Zellen ($p = 0,0021$), die Anzahl der CM- $CD8^+$ -Zellen ($p = 0,0303$), die Anzahl der $CD4^+$ -Gedächtniszellen ($p = 0,0162$), die Anzahl der $CD4^+$ -EM-Zellen ($p =$

0,0406), die Anzahl der Th₁₇-Zellen ($p = 0,0241$) und die Anzahl der CD56⁺CD16⁺-Zellen ($p = 0,0027$). Die Anzahl der exhausted CD8⁺-Zellen wird zum einem vom Tumorstadium UICC I/II ($p = 0,0116$), sowie dem Tumorstadium UICC III/IV ($p = 0,0478$) beeinflusst. Auch auf die Anzahl der HLADR⁺-CD8⁺-Zellen wirkt sich sowohl das Tumorstadium UICC I/II ($p = 0,0022$), sowie das Tumorstadium UICC III/IV ($p = 0,0108$) signifikant aus. Die transitionalen B-Zellen werden ebenfalls durch das Vorhandensein eines Kolonkarzinoms beeinflusst, im UICC-Stadium I/II mit einem p-Wert von 0,0009 und im Stadium UICC-III/IV mit einem p-Wert von 0,0100. Die CD4⁺-T-Helferzellen werden signifikant durch das Vorhandensein eines Tumorstadiums UICC III/IV ($p = 0,0431$) verändert, sowie die Anzahl der FoxP3⁺-CD4⁺-Zellen ($p = 0,0463$), die Gesamtanzahl der B-Zellen ($p = 0,0416$) und die Anzahl der class switched memory B-Zellen ($p = 0,0244$).

Tabelle 6: Multivariate Analyse der Lymphozytenuntergruppen in Bezug auf Alter, Geschlecht und Kolonkarzinom⁴¹

	Variablen	Coefficient B (95% CI)	p-Wert
<i>Lymphozyten insgesamt</i>	age (/10 years) gender UICC I/II UICC III/IV	0.9554 (0.9086-1.0045) 1.0595 (0.9133-1.2291) 0.8296 (0.6773-1.0160) 0.8312 (0.6720-1.0281)	0.0739 0.4413 0.0704 0.0874
<i>CD3⁺-Zellen</i> (T-Lymphozyten insgesamt)	age (/10 years) gender UICC I/II UICC III/IV	0.9381 (0.8837-0.9958) 1.1597 (0.9718-1.3838) 0.9463 (0.7434-1.2046) 0.8624 (0.6697-1.1107)	0.0361 0.0994 0.6507 0.2484
<i>CD8⁺-Zellen</i> Cytotoxic Tcells	age (/10 years) gender UICC I/II UICC III/IV	0.8772 (0.8091-0.9510) 0.8770 (0.6905-1.1140) 0.9731 (0.7020-1.3488) 0.9380 (0.6661-1.3210)	0.0018 0.2787 0.8684 0.7113
CD8 ⁺ naive	age (/10	0.5645 (0.4870-0.6542)	0.0000

	years) gender	1.6271 (1.0496-2.5224)	0.0299
	UICC I/II	2.6004 (1.4292-4.7314)	0.0021
	UICC III/IV	1.8705 (0.9993-3.5013)	0.0503
CD8+ memory	age (/10	0.9328 (0.8210-1.0597)	0.2814
	years) gender	0.6919 (0.4743-1.0093)	0.0558
	UICC I/II	0.7021 (0.4193-1.1758)	0.1764
	UICC III/IV	0.8956 (0.5216-1.5377)	0.6863
CD8+ CM	age (/10	0.8085 (0.6910-0.9459)	0.0085
	years) gender	0.8815 (0.5530-1.4052)	0.5924
	UICC I/II	2.0245 (1.0712-3.8261)	0.0303
	UICC III/IV	1.4537 (0.7463-2.8317)	0.2679
CD8+ EM	age (/10	0.9477 (0.8433-1.0651)	0.3636
	years) gender	0.7386 (0.5221-1.0448)	0.0861
	UICC I/II	0.8948 (0.5572-1.4367)	0.6420
	UICC III/IV	1.1393 (0.6938-1.8709)	0.6028
CD8+ EMRA	age (/10	1.0788 (0.9126-1.2752)	0.3704
	years) gender	0.9468 (0.5752-1.5584)	0.8280
	UICC I/II	0.7359 (0.3715-1.4578)	0.3752
	UICC III/IV	0.7667 (0.3767-1.5605)	0.4596
CD8+ early	age (/10	0.8095 (0.7442-0.8804)	0.0000
	years) gender	0.9709 (0.7571-1.2450)	0.8140
	UICC I/II	0.8952 (0.6375-1.2571)	0.5188
	UICC III/IV	0.8445 (0.5916-1.2056)	0.3483
CD8+ intermediate	age (/10	0.9463 (0.8332-1.0747)	0.3910
	years) gender	1.0435 (0.7161-1.5206)	0.8228
	UICC I/II	0.7543 (0.4511-1.2613)	0.2789
	UICC III/IV	0.6300 (0.3675-1.0800)	0.0920
CD8+ late	age (/10	0.9622 (0.8189-1.1306)	0.6364
	years) gender	0.6985 (0.4334-1.1257)	0.1387
	UICC I/II	1.1019 (0.5743-2.1142)	0.7680
	UICC III/IV	1.0810 (0.5459-2.1406)	0.8213
CD8+ exhausted	age (/10	1.0098 (0.9151-1.1142)	0.8450
	years) gender	0.8002 (0.5980-1.0709)	0.1322
	UICC I/II	0.5971 (0.4011-0.8888)	0.0116
	UICC III/IV	0.6562 (0.4324-0.9958)	0.0478

CD8+ TE	age (/10	0.9805 (0.8082-1.1895)	0.8402
	years) gender	0.7055 (0.3983-1.2498)	0.2288
	UICC I/II	1.2034 (0.5512-2.6273)	0.6387
	UICC III/IV	1.2751 (0.5624-2.8911)	0.5569
CD8+ CD69+	age (/10	0.8336 (0.7208-0.9640)	0.0147
	years) gender	0.6584 (0.4282-1.0125)	0.0568
	UICC I/II	0.5580 (0.3101-1.0041)	0.0516
	UICC III/IV	0.5809 (0.3137-1.0755)	0.0832
CD8+ HLADR	age (/10	0.9437 (0.8056-1.1056)	0.4693
	years) gender	0.9315 (0.5832-1.4880)	0.7643
	UICC I/II	2.7608 (1.4565-5.2330)	0.0022
	UICC III/IV	2.4073 (1.2313-4.7066)	0.0108
CD8+ IL2R+	age (/10	1.1865 (0.9794-1.4373)	0.0799
	years) gender	1.0340 (0.5862-1.8239)	0.9071
	UICC I/II	0.8395 (0.3868-1.8221)	0.6550
	UICC III/IV	1.1364 (0.5043-2.5607)	0.7553
CD8+ FoxP3+	age (/10	1.1005 (0.8705-1.3913)	0.4192
	years) gender	0.7087 (0.3541-1.4185)	0.3270
	UICC I/II	0.4188 (0.1624-1.0801)	0.0713
	UICC III/IV	0.6019 (0.2229-1.6252)	0.3127
<i>CD4⁺-Zellen</i> T helper cells	age (/10	0.9436 (0.8793-1.0126)	0.1055
	years) gender	1.2324 (1.0001-1.5186)	0.0499
	UICC I/II	0.8306 (0.6245-1.1047)	0.1994
	UICC III/IV	0.7343 (0.5446-0.9902)	0.0431
CD4+ naive	age (/10	0.8674 (0.7809-0.9635)	0.0085
	years) gender	1.5997 (1.1707-2.1858)	0.0036
	UICC I/II	0.8376 (0.5469-1.2827)	0.4109
	UICC III/IV	0.7372 (0.4717-1.1520)	0.1782
CD4+ memory	age (/10	0.9768 (0.9020-1.0578)	0.5602
	years) gender	0.9937 (0.7850-1.2578)	0.9576
	UICC I/II	0.6725 (0.4874-0.9278)	0.0162
	UICC III/IV	0.7226 (0.5157-1.0126)	0.0590
CD4+ CM	age (/10	0.8995 (0.8217-0.9846)	0.0222
	years) gender	1.1543 (0.8828-1.5092)	0.2905
	UICC I/II	0.9060 (0.6253-1.3128)	0.5983
	UICC III/IV	0.9341 (0.6369-1.3701)	0.7246

CD4+ EM	age (/10	1.0530 (0.9562-1.1596)	0.2901
	years) gender	0.9724 (0.7288-1.2973)	0.8473
	UICC I/II	0.6655 (0.4508-0.9824)	0.0406
	UICC III/IV	0.7543 (0.4968-1.1452)	0.1831
CD4+ EMRA	age (/10	1.3075 (1.0200-1.6760)	0.0346
	years) gender	1.0415 (0.4971-2.1820)	0.9132
	UICC I/II	0.8115 (0.2942-2.2382)	0.6835
	UICC III/IV	0.4089 (0.1424-1.1740)	0.0956
CD4+CD69+	age (/10	0.9547 (0.8454-1.0782)	0.4513
	years) gender	1.4116 (0.9848-2.0233)	0.0603
	UICC I/II	1.5689 (0.9597-2.5650)	0.0721
	UICC III/IV	1.1643 (0.6954-1.9494)	0.5591
CD4+HLADR	age (/10	1.0384 (0.9549-1.1293)	0.3739
	years) gender	1.0616 (0.8283-1.3605)	0.6335
	UICC I/II	1.3538 (0.9648-1.8997)	0.0791
	UICC III/IV	1.0269 (0.7199-1.4648)	0.8823
THC 1	age (/10	1.0460 (0.9056-1.2083)	0.5368
	years) gender	1.1521 (0.7519-1.7652)	0.5116
	UICC I/II	0.6887 (0.3820-1.2416)	0.2119
	UICC III/IV	0.7069 (0.3839-1.3019)	0.2622
THC 2	age (/10	1.0779 (0.9810-1.1843)	0.1170
	years) gender	1.1031 (0.8348-1.4575)	0.4861
	UICC I/II	0.7967 (0.5422-1.1706)	0.2437
	UICC III/IV	0.8038 (0.5395-1.1976)	0.2793
THC 17	age (/10	1.0321 (0.9353-1.1388)	0.5256
	years) gender	1.1551 (0.8633-1.5455)	0.3280
	UICC I/II	0.6285 (0.4204-0.9398)	0.0241
	UICC III/IV	0.7402 (0.4879-1.1229)	0.1550
CD4+ IL2R+	age (/10	0.9283 (0.8380-1.0283)	0.1519
	years) gender	0.8775 (0.6483-1.1878)	0.3936
	UICC I/II	1.2327 (0.8154-1.8637)	0.3174
	UICC III/IV	1.1301 (0.7327-1.7432)	0.5763
CD4+ FoxP3+	age (/10	0.9926 (0.9144-1.0776)	0.8586
	years) gender	0.8496 (0.6663-1.0833)	0.1861
	UICC I/II	0.7244 (0.5199-1.0095)	0.0568
	UICC III/IV	0.7020 (0.4957-0.9941)	0.0463

CD3+ CD56+	age (/10	1.0380 (0.8817-1.2220)	0.6511
	years) gender	1.1354 (0.7005-1.8404)	0.6027
	UICC I/II	0.9746 (0.5040-1.8846)	0.9384
	UICC III/IV	0.9660 (0.4838-1.9285)	0.9210
<i>B-Zellen</i> (CD19+)	age (/10	0.8821 (0.7997-0.9728)	0.0126
	years) gender	1.1042 (0.8264-1.4756)	0.4986
	UICC I/II	0.7166 (0.4823-1.0646)	0.0979
	UICC III/IV	0.6494 (0.4288-0.9834)	0.0416
Naive B cells	age (/10	0.8368 (0.7472-0.9372)	0.0024
	years) gender	1.1258 (0.8044-1.5755)	0.4856
	UICC I/II	0.7983 (0.5025-1.2682)	0.3362
	UICC III/IV	0.7333 (0.4559-1.1796)	0.1982
Non-class switched memory B cells	age (/10	0.8142 (0.7086-0.9354)	0.0041
	years) gender	1.0611 (0.7036-1.6002)	0.7749
	UICC I/II	1.3573 (0.7746-2.3784)	0.2823
	UICC III/IV	1.1106 (0.6168-1.9998)	0.7239
Class switched memory B cells	age (/10	0.9466 (0.8399-1.0669)	0.3645
	years) gender	1.3656 (0.9585-1.9455)	0.0837
	UICC I/II	0.6246 (0.3852-1.0127)	0.0562
	UICC III/IV	0.5577 (0.3360-0.9256)	0.0244
Transitional B cells	age (/10	0.7538 (0.6306-0.9012)	0.0022
	years) gender	0.9858 (0.5812-1.6721)	0.9573
	UICC I/II	0.2864 (0.1392-0.5892)	0.0009
	UICC III/IV	0.3673 (0.1724-0.7825)	0.0100
<i>NK-Zellen</i>	age (/10	1.0058 (0.9264-1.0920)	0.8897
	years) gender	0.8522 (0.6681-1.0871)	0.1953
	UICC I/II	0.6263 (0.4492-0.8732)	0.0063
	UICC III/IV	0.7935 (0.5600-1.1243)	0.1906
CD56+ CD16+	age (/10	1.0283 (0.9371-1.1284)	0.5526
	years) gender	0.7854 (0.5967-1.0339)	0.0843
	UICC I/II	0.5589 (0.3840-0.8134)	0.0027
	UICC III/IV	0.6955 (0.4692-1.0308)	0.0700
CD56brightCD16dim	age (/10	0.9538 (0.8958-1.0155)	0.1372
	years) gender	1.2473 (1.0360-1.5016)	0.0201
	UICC I/II	0.8271 (0.6420-1.0656)	0.1402
	UICC III/IV	0.8771 (0.6725-1.1440)	0.3295

CD56dim CD16bright	age (/10 years)	1.0058 (0.9076-1.1147)	0.9107
	gender	0.7646 (0.5641-1.0363)	0.0829
	UICC I/II	0.6849 (0.4522-1.0374)	0.0735
	UICC III/IV	0.8744 (0.5658-1.3513)	0.5417
CD4/CD8 ratio	age (/10 years)	1.0754 (1.0038-1.1521)	0.0389
	gender	1.4031 (1.1443-1.7204)	0.0014
	UICC I/II	0.8543 (0.6467-1.1286)	0.2644
	UICC III/IV	0.7838 (0.5854-1.0495)	0.1008

Fett geschriebene Werte weisen auf Lymphozyten-Untergruppen mit signifikanten Unterschieden hin ($p < 0,005$)

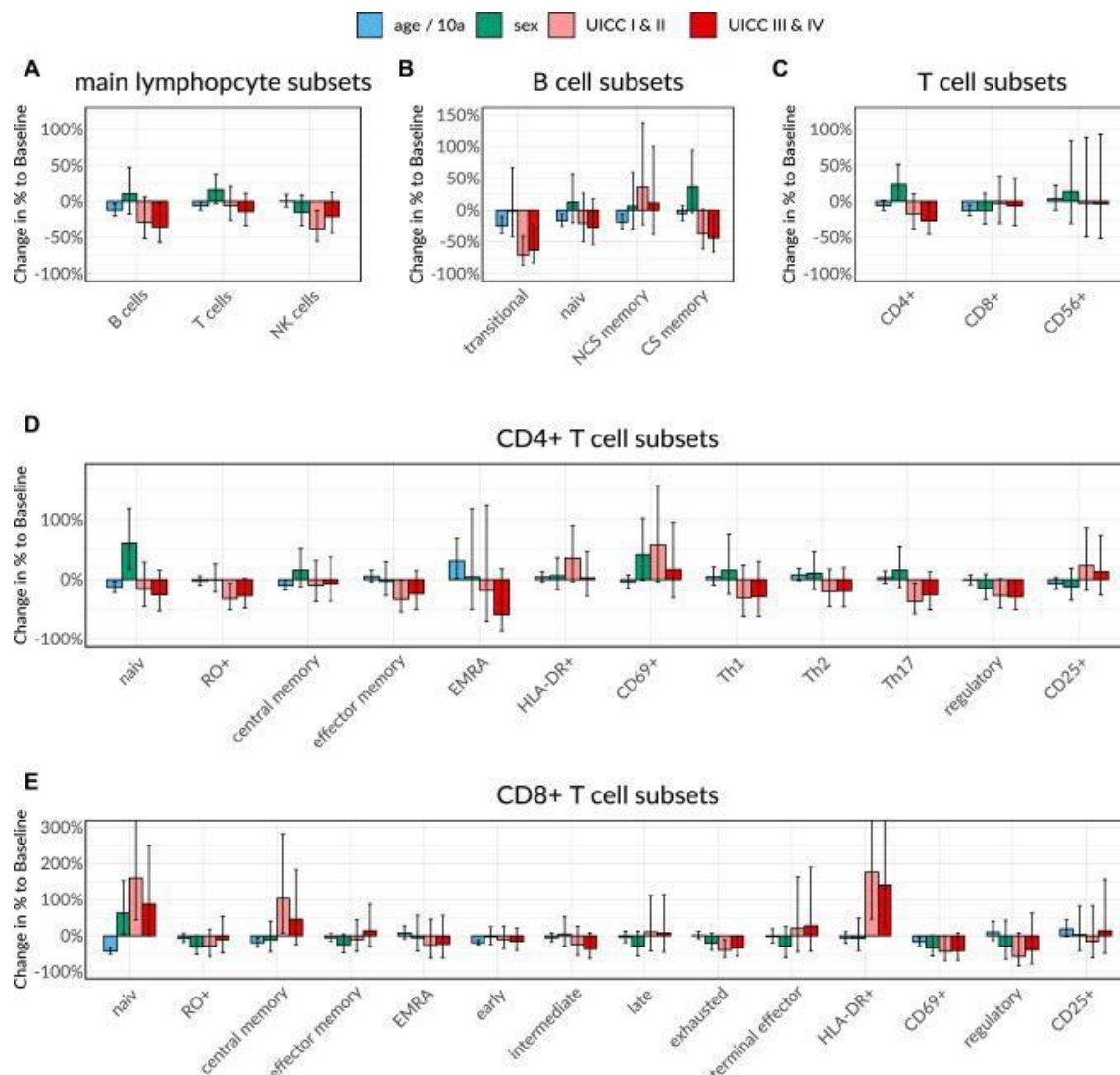


Abbildung 5: Einfluss von Alter, Geschlecht und Kolonkarzinom auf Lymphozyten-Untergruppen, berechnet in der multivariater Analyse. **A**-Haupt-Lymphozyten-Untergruppen, **B**-B-Zell-Untergruppen, **C**-T-Zell-Untergruppen, **D**-CD4⁺-T-Zell-Untergruppen, **E**-CD8⁺-T-Zell-Untergruppen⁴¹

6.4 Gewichtungen von Tumorlokalisation (Seitigkeit) und Mikrosateliten(in)stabilität in der multivariaten Analyse

Ergänzend erfolgte eine zweite multivariate Analyse unter Einbeziehung der Faktoren Seitigkeit und Mikrosateliten-Status.

Die Tumorlokalisation im linken Hemikolon führt zu höheren Werten der gesamten zytotoxischen T-Zellen, der effector memory CD8⁺-Zellen und der late CD8⁺-Zellen, sowie der HLADR⁺-T-Helferzellen.

In der Betrachtung des Mikrosateliten(in)stabilität ergab sich kein Einfluss auf die Anzahl der Lymphozyten und deren Subpopulationen, abgesehen von den effector memory CD8⁺-Zellen. Diese zeigten bei den Kolonkarzinompatienten höhere Werte.⁴¹

Tabelle 7 – Multivariate Analyse von Lymphozytenuntergruppen in Bezug auf MSI, Seitigkeit und Kolonkarzinom⁴¹

	Variablen	Coefficients B (95% CI)	p
<i>Lymphozyten insgesamt</i>	age (/10 years)	0.9414 (0.8503-1.0423)	0.2375
	gender (female)	1.0060 (0.8000-1.2651)	0.9579
	UICC III/IV	0.9694 (0.7581-1.2396)	0.7993
	Sidedness (left)	1.0704 (0.8374-1.3683)	0.5780
	MSI status (stable)	1.0810 (0.8101-1.4426)	0.5878
<i>CD3⁺-Zellen</i>	age (/10 years)	0.9384 (0.8308-1.0600)	0.2977
	gender (female)	1.1597 (0.8045-1.3922)	0.6781
	UICC III/IV	0.8989 (0.6698-1.2064)	0.4678
	Sidedness (left)	0.8624 (0.9084-1.6347)	0.1811
	MSI status (stable)	0.9928 (0.7030-1.4022)	0.9666
<i>CD8⁺-Zellen</i> Cytotoxic Tcells	age (/10 years)	0.8968 (0.7498-1.0727)	0.2258
	gender (female)	0.9257 (0.6187-1.3850)	0.7003
	UICC III/IV	0.9359 (0.6074-1.4420)	0.7580
	Sidedness (left)	1.5965 (1.0368-2.4582)	0.0344
	MSI status (stable)	0.7857 (0.4731-1.3048)	0.3419
<i>CD8⁺ naive</i>	age (/10 years)	0.6076 (0.4968-0.7430)	0.0000
	gender (female)	1.4957 (0.9510-2.3523)	0.0798
	UICC III/IV	0.7256 (0.4464-1.1795)	0.1893
	Sidedness (left)	0.9761 (0.6009-1.5854)	0.9200
	MSI status (stable)	1.2412 (0.7019-2.1949)	0.4476
<i>CD8⁺ memory</i>	age (/10 years)	0.9848 (0.7522-1.2894)	0.9090
	gender (female)	0.5059 (0.2759-0.9277)	0.0286
	UICC III/IV	1.4965 (0.7807-2.8683)	0.2174
	Sidedness (left)	1.7976 (0.9388-3.4419)	0.0755
	MSI status (stable)	0.5305 (0.2473-1.1381)	0.1009
<i>CD8⁺ CM</i>	age (/10 years)	0.9314 (0.7008-1.2378)	0.6157
	gender (female)	0.6767 (0.3568-1.2833)	0.2243
	UICC III/IV	0.7213 (0.3630-1.4332)	0.3415
	Sidedness (left)	1.1664 (0.5877-2.3153)	0.6520
	MSI status (stable)	1.1704 (0.5229-2.61959)	0.6949

CD8+ EM	age (/10 years)	1.0182 (0.8281-1.2518)	0.8610
	gender (female)	0.6698 (0.4208-1.0661)	0.0890
	UICC III/IV	1.4698 (0.8926-2.4204)	0.1263
	Sidedness (left)	2.1366 (1.2986-3.5156)	0.0038
	MSI status (stable)	0.4746 (0.2644-0.8521)	0.0139
CD8+ EMRA	age (/10 years)	0.9515 (0.6314-0.9201)	0.7720
	gender (female)	1.1220 (0.5156-2.4412)	0.7659
	UICC III/IV	0.8593 (0.3683-2.0049)	0.7189
	Sidedness (left)	2.0924 (0.8954-4.8895)	0.0862
	MSI status (stable)	0.8066 (0.3026-2.1498)	0.6595
CD8+ early	age (/10 years)	0.7622 (0.7442-0.8804)	0.0059
	gender (female)	0.9058 (0.5929-1.3836)	0.6390
	UICC III/IV	0.8726 (0.5539-1.3748)	0.5476
	Sidedness (left)	1.1060 (0.7025-1.7413)	0.6556
	MSI status (stable)	1.1106 (0.6515-1.8931)	0.6929
CD8+ intermediate	age (/10 years)	1.0437 (0.7835-1.3903)	0.7645
	gender (female)	0.9222 (0.4837-1.7582)	0.8008
	UICC III/IV	0.9351 (0.4679-1.8688)	0.8455
	Sidedness (left)	1.5683 (0.7856-3.1307)	0.1954
	MSI status (stable)	0.6500 (0.2885-1.4646)	0.2898
CD8+ late	age (/10 years)	1.0536 (0.7644-1.4523)	0.7435
	gender (female)	1.1601 (0.5634-2.3886)	0.6795
	UICC III/IV	0.9207 (0.4242-1.9982)	0.8302
	Sidedness (left)	2.9727 (1.3714-6.4438)	0.0070
	MSI status (stable)	0.6706 (0.2702-1.6646)	0.3792
CD8+ exhausted	age (/10 years)	1.0129 (0.8206-1.2504)	0.9023
	gender (female)	0.7850 (0.4887-1.2610)	0.3078
	UICC III/IV	1.2072 (0.7260-2.0073)	0.4582
	Sidedness (left)	1.1995 (0.7219-1.9929)	0.4728
	MSI status (stable)	0.8168 (0.4498-1.4833)	0.4965
CD8+ TE	age (/10 years)	1.0472 (0.7202-1.5227)	0.8044
	gender (female)	1.1200 (0.4823-2.6007)	0.7869
	UICC III/IV	0.9444 (0.3824-2.3320)	0.8987
	Sidedness (left)	4.1628 (1.6882-10.2645)	0.0028
	MSI status (stable)	0.5749 (0.1991-1.6603)	0.2973
CD8+ CD69+	age (/10 years)	0.8062 (0.6144-1.0578)	0.1167
	gender (female)	0.8807 (0.4779-1.6228)	0.6762
	UICC III/IV	1.1732 (0.6089-2.2604)	0.6248
	Sidedness (left)	0.9955 (0.5172-1.9161)	0.9890
	MSI status (stable)	0.9072 (0.4203-1.9584)	0.7993
CD8+ HLADR	age (/10 years)	1.1098 (0.8524-1.4450)	0.4290
	gender (female)	1.0059 (0.5554-1.8216)	0.9842
	UICC III/IV	1.0632 (0.5622-2.0105)	0.8468
	Sidedness (left)	2.2533 (1.1927-4.2569)	0.0137
	MSI status (stable)	0.4767 (0.2257-1.0067)	0.0520
CD8+ II2R+	age (/10 years)	1.2672 (0.8883-1.8076)	0.1851
	gender (female)	1.1697 (0.5260-2.6015)	0.6935
	UICC III/IV	1.3546 (0.5746-3.1935)	0.4781
	Sidedness (left)	0.6594 (0.2801-1.5525)	0.3311
	MSI status (stable)	0.9920 (0.3627-2.7134)	0.9872
CD8+ FoxP3+	age (/10 years)	1.3011 (0.8064-2.0995)	0.2724
	gender (female)	1.0433 (0.3555-3.0620)	0.9369
	UICC III/IV	1.7968 (0.5660-5.7045)	0.3110
	Sidedness (left)	0.8223 (0.2595-2.6060)	0.7333
	MSI status (stable)	0.6644 (0.1713-2.5769)	0.5451
CD4 ⁺ -Zellen	age (/10 years)	0.9118 (0.7833-1.0615)	0.2724

T helper cells	gender (female)	1.1138 (0.7912-1.5680)	0.9369
	UICC III/IV	0.8420 (0.5834-1.2153)	0.3110
	Sidedness (left)	1.3862 (0.9610-1.9995)	0.7333
	MSI status (stable)	0.9931 (0.6457-1.5274)	0.5451
CD4+ naive	age (/10 years)	0.8640 (0.6716-1.1115)	0.2475
	gender (female)	1.4557 (0.8258-2.5659)	0.1879
	UICC III/IV	0.8420 (0.4583-1.5469)	0.5704
	Sidedness (left)	1.6344 (0.8905-2.9996)	0.1097
	MSI status (stable)	0.9848 (0.4824-2.0102)	0.9655
CD4+ memory	age (/10 years)	0.9500 (0.8037-1.1229)	0.5384
	gender (female)	0.7861 (0.5395-1.1453)	0.2032
	UICC III/IV	1.0891 (0.7273-1.6309)	0.6711
	Sidedness (left)	1.4299 (0.9555-2.1398)	0.0805
	MSI status (stable)	0.8159 (0.5080-1.3103)	0.3900
CD4+ CM	age (/10 years)	0.9619 (0.8286-1.1167)	0.6013
	gender (female)	0.9236 (0.6594-1.2937)	0.6357
	UICC III/IV	1.0497 (0.7346-1.5000)	0.7845
	Sidedness (left)	1.2848 (0.8990-1.8361)	0.1634
	MSI status (stable)	1.0597 (0.6917-1.6234)	0.7847
CD4+ EM	age (/10 years)	0.9647 (0.7870-1.1825)	0.7223
	gender (female)	0.8444 (0.5323-1.3396)	0.4621
	UICC III/IV	1.2265 (0.7463-2.0158)	0.4101
	Sidedness (left)	1.1579 (0.7004-1.9145)	0.5579
	MSI status (stable)	0.6279 (0.3564-1.1062)	0.1043
CD4+ EMRA	age (/10 years)	0.9578 (0.5952-1.5411)	0.8552
	gender (female)	1.5371 (0.5263-4.4889)	0.4216
	UICC III/IV	0.3838 (0.1193-1.2340)	0.1051
	Sidedness (left)	1.2696 (0.3940-4.0911)	0.6818
	MSI status (stable)	0.9875 (0.2557-3.8146)	0.9851
CD4+CD69+	age (/10 years)	0.9056 (0.7438-1.1025)	0.3141
	gender (female)	1.3605 (0.8738-2.1185)	0.1674
	UICC III/IV	0.7307 (0.4543-1.1751)	0.1892
	Sidedness (left)	1.4130 (0.8792-2.2707)	0.1484
	MSI status (stable)	0.8155 (0.4670-1.4241)	0.4636
CD4+HLADR	age (/10 years)	1.0737 (0.9234-1.2486)	0.3458
	gender (female)	1.0263 (0.7309-1.4411)	0.8778
	UICC III/IV	0.7419 (0.5154-1.0680)	0.1054
	Sidedness (left)	1.5496 (1.0772-2.2292)	0.0195
	MSI status (stable)	0.8391 (0.5473-1.2865)	0.4111
THC 1	age (/10 years)	0.9737 (0.7107-1.3341)	0.8649
	gender (female)	1.2380 (0.6044-2.5358)	0.5499
	UICC III/IV	0.9451 (0.4419-2.0214)	0.8812
	Sidedness (left)	1.5492 (0.7245-3.3124)	0.2507
	MSI status (stable)	0.7784 (0.3114-1.9458)	0.5829
THC 2	age (/10 years)	0.9739 (0.7906-1.1998)	0.7990
	gender (female)	0.9466 (0.5888-1.5219)	0.8161
	UICC III/IV	0.8628 (0.5215-1.4275)	0.5562
	Sidedness (left)	1.3279 (0.8028-2.1966)	0.2609
	MSI status (stable)	1.4066 (0.7668-2.5804)	0.2619
THC 17	age (/10 years)	0.9266 (0.7408-1.1590)	0.4942
	gender (female)	1.1329 (0.6806-1.8857)	0.6228
	UICC III/IV	0.9407 (0.5481-1.6148)	0.8200
	Sidedness (left)	1.4598 (0.8506-2.5053)	0.1642
	MSI status (stable)	1.6395 (0.8549-3.1440)	0.1324
CD4+ II2R+	age (/10 years)	1.1919 (0.9512-1.4934)	0.1234
	gender (female)	0.9076 (0.5464-1.5077)	0.7013

	UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	1.0756 (0.6240-1.8541) 0.8848 (0.5137-1.5239) 0.9904 (0.5228-1.8761)	0.7880 0.6511 0.9757
CD4+ FoxP3+	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	0.9389 (0.7607-1.1589) 0.8338 (0.5192-1.3390) 0.9423 (0.5669-1.5665) 0.9692 (0.5835-1.6099) 1.0844 (0.5974-1.9687)	0.5482 0.4420 0.8142 0.9014 0.7846
CD3+ CD56+	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	0.8972 (0.6464-1.2453) 0.9553 (0.4568-1.9980) 0.9181 (0.4160-2.0264) 1.4822 (0.6724-3.2674) 0.8692 (0.3433-2.2006)	0.5069 0.9008 0.8282 0.3199 0.7617
<i>B-Zellen</i> (CD19+)	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	0.7130 (0.5696-0.8925) 0.8915 (0.5378-1.4777) 0.8170 (0.4751-1.4051) 0.9412 (0.5477-1.6173) 1.1092 (0.5871-2.0956)	0.0042 0.6480 0.4552 0.8220 0.7434
Naïve B cells	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	0.6781 (0.5171-0.8894) 0.8176 (0.4439-1.5060) 0.8721 (0.4562-1.6669) 0.9408 (0.4939-1.7921) 1.0251 (0.4766-2.2050)	0.0062 0.5084 0.6710 0.8488 0.9480
Non-class switched memory B cells	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	0.6394 (0.4566-0.8955) 0.7851 (0.3680-1.6753) 0.8550 (0.3791-1.9280) 0.8095 (0.3595-1.8231) 0.7641 (0.2943-1.9838)	0.0106 0.5221 0.6986 0.6013 0.5714
Class switched memory B cells	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	0.7252 (0.5764-0.9126) 1.3394 (0.7986-2.2463) 0.7316 (0.4201-1.2742) 0.9677 (0.5561-1.6838) 1.2185 (0.6355-2.3362)	0.0074 0.2597 0.2613 0.9051 0.5425
Transitional B cells	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	0.5680 (0.3969-0.8128) 0.5341 (0.2384-1.1966) 1.0360 (0.4360-2.4616) 1.0086 (0.4250-2.3932) 1.6438 (0.5955-4.5378)	0.0028 0.1238 0.9346 0.9842 0.3280
NK-Zellen	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	1.1433 (0.9565-1.3665) 0.8343 (0.5585-1.2463) 1.3358 (0.8684-2.0548) 0.8023 (0.5219-1.2333) 1.2580 (0.7590-2.0851)	0.1369 0.3665 0.1815 0.3063 0.363
CD56+ CD16+	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	1.1520 (0.9443-1.4054) 0.7951 (0.5083-1.2436) 1.3233 (0.8189-2.1385) 0.7645 (0.4735-1.2345) 1.3748 (0.7829-2.4144)	0.1577 0.3059 0.2447 0.2638 0.2596
CD56bright CD16dim	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV Sidedness (left) MSI status (stable)	1.0638 (0.9445-1.1981) 1.3113 (1.0035-1.7136) 1.1533 (0.8655-1.5367) 0.8383 (0.6294-1.1165) 1.0355 (0.7394-1.4502)	0.2991 0.0472 0.3210 0.2204 0.8350
CD56dim CD16bright	age (/10 years) gender (female) UICC III/IV	1.2356 (0.9985-1.5291) 0.8017 (0.4963-1.2950) 1.5735 (0.9405-2.6323)	0.0516 0.3566 0.0825

	Sidedness (left)	1.2124 (0.7253-2.0267)	0.4525
	MSI status (stable)	0.8274 (0.4524-1.5133)	0.5291
CD4/CD8 ratio	age (/10 years)	1.0166 (0.8659-1.1935)	0.8365
	gender (female)	1.2019 (0.8377-1.7245)	0.3090
	UICC III/IV	0.9003 (0.6112-1.3263)	0.5864
	Sidedness (left)	0.8683 (0.5898-1.2783)	0.4644
	MSI status (stable)	1.2624 (0.8013-1.9887)	0.3059

Fett geschriebene Werte weisen auf Lymphozyten-Untergruppen mit signifikanten Unterschieden hin ($p < 0,005$)

6.5 Korrelation von gewebsständigen und im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten

In unseren Untersuchungen konnten wir eine positive Korrelation zwischen tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) und den Lymphozyten im peripheren Blut (PB-Lymphozyten) und der Anzahl und Größe der den Tumor umgebenden Lymphknoten bei nodal-negativen und dem Verhältnis von Metastasen-zur- Lymphknotengröße bei nodal-positiven Patienten herausarbeiten.

Insgesamt wurde für die gesamten, sich im peripheren Blut befindenden, Lymphozyten, die CD8⁺-Zellen und für einige ihrer Untergruppen eine positive Korrelation mit den TILs gefunden.

6.5.1 Vergleich von nodal negativen und nodal positiven Patienten

Die Anzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten, CD3⁺- und CD8⁺-Lymphozyten fiel bei nodal negativen Patienten sowohl im TC als auch in der IF höher aus. Als signifikant zu betrachten sind hier die Unterschiede bei den CD8⁺-Zellen in der IF (621/mm² vs. 351/mm²; $p = 0,041$). Bei der Analyse der zirkulierenden Lymphozytengruppen ergab sich kein Unterschied für die B-Zellen, T-Zellen, NK- Zellen und alle ihre untersuchten Untergruppen.³⁹



Abbildung 6: Medianwerte tumorinfiltrierender Lymphozyten bei (A) nodal-negativen vs. nodal-positiven Patienten, (B) nach der LN5-Kategorie, (C) nach der MSR- Kategorie, (D) Patienten mit einer niedrigen (LN5 sehr niedrigen und MSR0) oder hohen (LN5 niedrig und hoch und MSR1) Lymphknotenimmunaktivierung und (E) bei Patienten mit oder ohne Mikrosatelliteninstabilität. TILs: tumorinfiltrierende Lymphozyten; TC: Tumorzentrum; IF: invasive Front. MSS: mikrosatellitenstabil; MSI: mikrosatelliteninstabil. Signifikante p-Werte sind für $p < 0,05$ mit * gekennzeichnet.³⁹

6.5.2 Vergleich der nodal negativen Patienten nach Einteilung hinsichtlich der Lymphknotengröße

Die 31 nodal negativen Patienten wurden in die vorher beschriebenen Kategorien LN5 eingeteilt. Sieben der Patienten wurden in die Kategorie LN5-sehr niedrig, das heißt 0-1 Lymphknoten mit einem Durchmesser von ≥ 5 mm, 11 der Patienten wurden der Kategorie LN5-niedrig (2-5 Lymphknoten ≥ 5 mm) und die restlichen Patienten wurden der Kategorie LN5-hoch (> 5 Lymphknoten ≥ 5 mm) zugeteilt. Im Vergleich der TILs zwischen diesen drei LN5-Gruppen ergaben sich für alle vier Kategorien höhere Werte für LN5-niedrige-Patienten im Vergleich zu LN5-sehr niedrige-Patienten, für $CD8^+$ -Zellen im TC und für $CD3^+$ - und $CD8^+$ -Zellen in der IF zwischen LN5-sehr niedrige und LN5-hoch-Patienten (Abbildung 6B). Allerdings ist lediglich der Unterschied zwischen den Kategorien LN5-sehr niedrig- und LN5-niedrigen- Patienten hinsichtlich der Anzahl der $CD8^+$ -Zellen im Tumorzentrum statistisch signifikant. Bei Betrachtung der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten wurde in der Gruppe der LN5-sehr niedrigen-Patienten im Vergleich zu den LN5-hohen-Patienten niedrigere Werte in der Gesamtzahl der B-Zellen (82/ μ l vs. 127/ μ l; $p = 0,037$) und ihrer Untergruppen der naiven- (51/ μ l vs. 92/ μ l-, $p=0,036$), der memory- (2/ μ l vs. 8/ μ l; $p=0,019$) und der class- switched B-Zellen (7/ μ l vs. 17/ μ l; $p=0,024$) festgestellt. Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied der inhibitorischen $CD4^+$ -Zellen, repräsentiert durch die regulatorischen IL2R- $CD4^+$ -Zellen (18/ μ l vs. 15/ μ l; $p=0,027$) zwischen den Gruppen der LN5-sehr niedrigen- und der LN5-niedrigen-Patienten gefunden werden. Patienten mit niedrigen LN5-Werten zeigten im Vergleich zu Patienten mit sehr niedrigen LN5- Werten höhere Werte bei den Effektor-Gedächtnis- $CD4^+$ -Zellen (145/ μ l vs. 95/ μ l; $p= 0,044$) und $CD69^+$ - $CD4^+$ -Zellen (15/ μ l vs. 11/ μ l; $p=0,008$).³⁹

6.5.3 Vergleich der nodal-positiven Patienten in Abhängigkeit des Verhältnisses aus Metastasengröße und Lymphknotengröße

Die 16 Patienten mit positivem Lymphknotenbefall wurden anhand ihres Verhältnisses von Metastasengröße zu Lymphknotengröße (MSR) in zwei Gruppen eingeteilt. Dabei wurden Fälle mit hohem Metastasenanteil im Vergleich zur gesamten Lymphknotengröße als MSR0 ($n=10$), Fälle mit einer geringeren relativen Metastasengröße als MSR1 ($n=6$) eingestuft. In der Betrachtung der TILs in der MSR1- Gruppe waren sowohl die Werte für $CD8^+$ -Zellen im TC (249/ mm^2 vs. 168/ mm^2 ; $p=0,147$), als auch die Werte für $CD3^+$ -Zellen in der IF (1259/ mm^2 vs. 867/ mm^2 ;

p=0,220) und die Werte für CD8⁺-Zellen in der IF (538/mm² vs. 302/mm²; p=0,428) höher (Abbildung 6C). Die Unterschiede sind allerdings nicht statistisch signifikant. Signifikante Unterschiede ergaben sich im Vergleich der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten. Dabei ergaben sich höhere Werte in der MSR1-Gruppe für die Gesamtzahl der Lymphozyten (1268/μl vs. 1711/ μl; p=0,031), CD3⁺-Zellen (768/μl vs. 1183/μl; p=0,022), HLADR⁺ CD4-Zellen (35/μl vs. 67/μl; p=0,005), CD8⁺- Zellen (195/μl vs. 402/μl; p=0,031) und deren Untergruppen der CD8⁺- Gedächtniszellen (63/μl vs. 158/μl; p=0. 003), zentralen Gedächtnis-CD8⁺-Zellen (18/μl vs. 45/μl, p=0,016), effektor-Gedächtnis-CD8⁺-Zellen (69/μl vs. 182/μl; p=0,031), EMRA-CD8⁺-Zellen (31/μl vs. 164/μl; p=0,031), intermediären CD8⁺-Zellen (5/μl vs. 38/μl; p=0,007), late CD8⁺-Zellen (34/μl vs. 220/μl; p=0,031), exhausted CD8⁺-Zellen (47/μl vs. 126/μl; p=0,022) und HLADR⁺-CD8⁺-Zellen (38/μl vs. 154/μl; p=0,042).³⁹

6.5.4 Kombinierte Betrachtung der LN5- und MSR-Kategorie zur Unterteilung der Patienten mit hoher und niedriger Immunantwort

Weiterhin versuchten wir Patienten mit einer schwächeren nodalen Immunantwort von denjenigen mit einer stärkeren nodalen Immunantwort zu unterscheiden. Hierfür erstellten wir zwei Gruppen der Patienten hinsichtlich der LN5- und MSR-Kategorie. Dabei werden die Patienten mit einer schwachen nodalen Immunantwort durch die Kategorie LN5-sehr niedrig und MSR0 (LN5/MSR0) repräsentiert und Patienten mit einer stärkeren nodalen Immunantwort entsprechend mit der Kategorie LN5-niedrig, LN5-hoch und MSR1 (LN5/MSR1). Patienten mit einer stärkeren nodalen Immunantwort weisen signifikant höhere Werte von TILs für CD8⁺-Zellen im TC (167/mm² vs. 328/mm²; p=0,002) und CD3⁺-Zellen in der IF (895/mm² vs. 1340/mm²; p=0,009) auf (Abbildung 6D). Darüber hinaus wurden signifikant höhere Werte der zirkulierenden Gesamtlmphozyten (1386/μl vs. 1070/μl; p=0,046), class switched B- Zellen (19/μl vs. 8/μl; p=0. 011), T-Lymphozyten insgesamt (955/μl vs. 718/μl; p=0,015), CD69⁺CD4⁺-Zellen (16/μl vs. 11/μl; p=0,010), CD8⁺-Zellen insgesamt (260/μl vs. 184/μl; p=0,027), EMRA-CD8⁺-Zellen (76/μl vs. 25/μl; p=0,030), intermediäre CD8⁺-Zellen (17/μl vs. 7/μl; p=0,002), exhausted CD8⁺-Zellen (71/μl vs. 46/μl; p=0,019) und HLADR⁺-CD8⁺-Zellen (85/μl vs. 39/μl; p=0,027) sowie NKT- Zellen (50/μl vs. 21/μl; p=0,049) und CD56^{bright}CD16^{dim}-NK-Zellen (12/μl vs. 9/μl; p=0,030) in der LN5/MSR1-Gruppe beobachtet. Abbildung 3³⁹

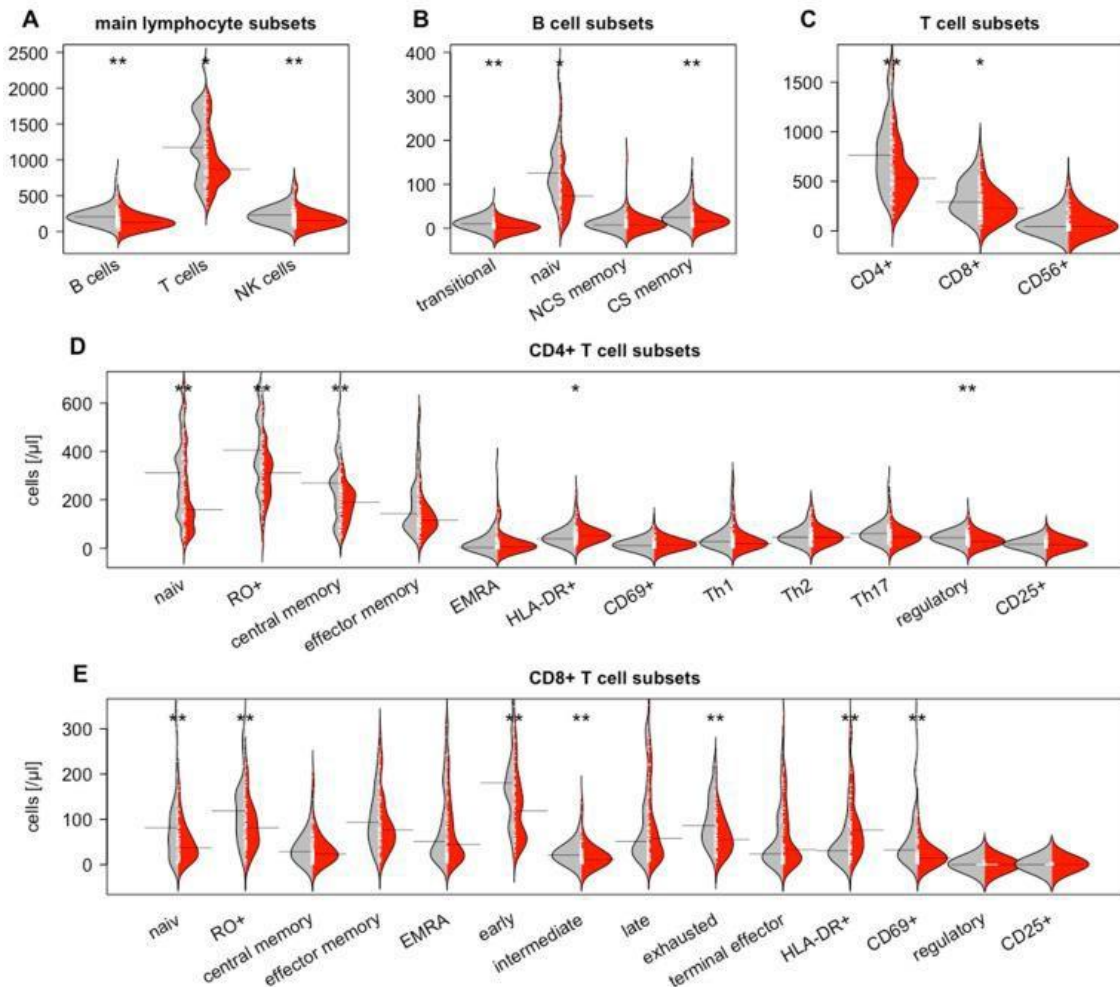


Abbildung 7: Vergleich der zirkulierenden Lymphozyten-Untergruppen zwischen Patienten mit einer niedrigen (LN5 sehr niedrig und MSR0; graue Punkte) oder hohen (LN5 niedrig und hoch und MSR1; rote Punkte) Lymphknotenimmunaktivierung. (A) Haupt-Lymphozyten-Untergruppen, (B) B-Zell-Untergruppen, (C) T-Zell- Untergruppen, (D) CD4⁺-T-Zell-Untergruppen und (E) CD8⁺- T-Zell- Untergruppen. Signifikante p-Werte sind mit * für $p < 0,05$ und ** für $p < 0,005$ gekennzeichnet³⁹

6.5.5 Lymphknotenresektion

In der Anzahl der entnommenen Lymphknoten zwischen den nodal-negativen und – positiven Patienten, der MSR0- und MSR1-Gruppen als auch zwischen den einzelnen LN5-Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Mit einer Ausnahme und zwar im Vergleich der LN5-niedrig- zu LN5-hohen-Gruppe mit 31 vs. 41 Lymphknoten ($p=0,018$).³⁹

6.5.6 Korrelationen zwischen den Tumor-infiltrierenden und im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten

Hinsichtlich der gewebsständigen bzw. tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) untersuchten wir zum einen CD3⁺-Zellen und CD8⁺-Zellen im Tumorzentrum, als auch in der Infiltrationszone. Somit ergeben sich für jeden Patienten bzw. für jede Untersuchung vier Kategorien.

In unserer Untersuchung der verschiedenen TILs-Untergruppen und der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten ergab sich eine positive Korrelation zwischen den CD8⁺-Zellen im TC und der Gesamtzahl der zirkulierenden Lymphozyten ($p=0,019$), den zirkulierenden CD8⁺-Zellen ($p=0,032$) und den EMRA-CD8⁺-Zellen ($p=0,026$). Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen den CD8⁺-Zellen in der IF und den intermediären CD8⁺-Zellen im peripheren Blut gefunden werden ($p=0,029$). Für CD8⁺-Zellen in der IF und den naiven B-Zellen zeigte sich eine negative Korrelation ($p=0,043$).

Abbildung 8³⁹

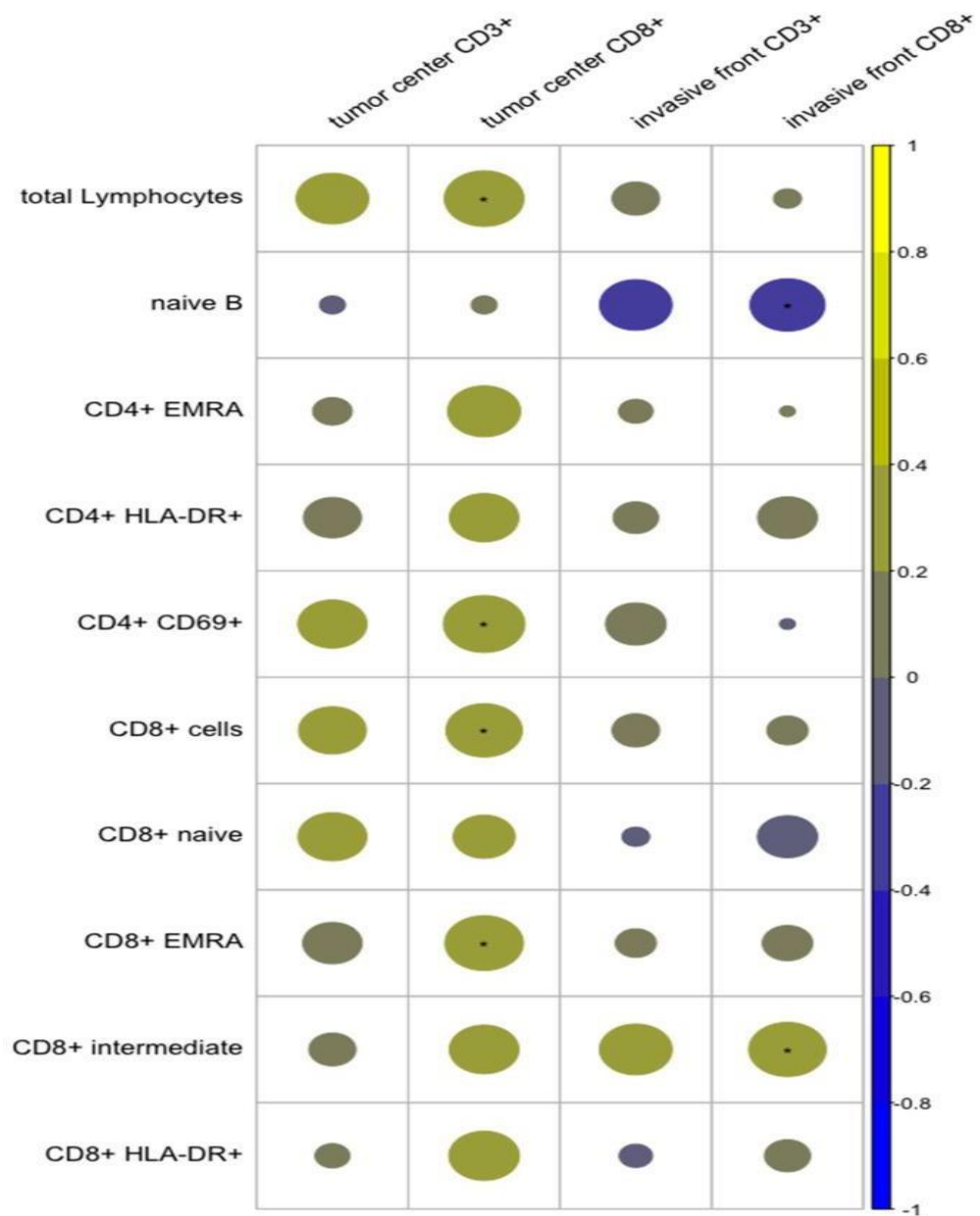


Abbildung 8: Korrelation von tumorinfiltrierenden und ausgewählten zirkulierenden Lymphozyten. Korrelationskoeffizient auf der rechten Seite. Positive Korrelationen werden gelb und negative Korrelationen blau dargestellt. Sternchen markieren signifikante Korrelationen.³⁹

7. DISKUSSION

In unserer prospektiven Studie konnten wir 47 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom und 50 gesunde Kontrollpersonen einschließen. Zunächst wurden Unterschiede zwischen diesen beiden Kohorten betrachtet. Die geschlechtliche Aufteilung der beiden Kohorten war nahezu identisch mit 18 weiblichen Patienten und 17 gesunden Frauen. Das mediane Alter der Patienten betrug 65 Jahre, das der gesunden Kontrollgruppe 43 Jahre. Dieser deutliche Altersunterschied führt zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit der erhobenen Daten in den univariaten Analysen. Deshalb führten wir ergänzend eine multivariate Analyse mit Berücksichtigung von Patientenalter und Geschlecht durch, um die Unabhängigkeit der Einflussgröße *kolorektales Karzinom* auf die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen beurteilen zu können.

In der univariaten Analyse konnten wir zeigen, dass die KRK-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant niedrigere Werte, weniger Gesamtlymphozyten (1878/ μ l zu 1320/ μ l; $p = 0,000$) und in der Gesamtzahl der zirkulierenden B-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und der NK-Zellen, einschließlich verschiedener Untergruppen aufweisen. In einer früher veröffentlichten Studie von Spacek et al., welche eine vergleichbare Fragestellung bearbeitet hat, konnte bei insgesamt 22 Patienten im Vergleich zu 22 gesunden Personen ebenfalls ein Rückgang der absoluten Anzahl der CD4⁺-, CD8⁺- und NK-Zellen aufgezeigt werden.⁴² Andere Studien, welche sich ebenfalls mit proportionalen Werten der Lymphozyten- Untergruppen beschäftigten, konnten geringe oder keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten und den gesunden Personen herausarbeiten.^{43,44} Diesen Studien ist einschränkend jedoch gemeinsam, dass die Fallzahlen noch geringer waren und zudem teils multivariate Analysen fehlen obwohl signifikante altersbedingte Unterschiede zwischen den Patienten und den gesunden Personen bestanden. Außerdem wurden teils nur relative Lymphozytenwerte betrachtet und die Anzahl der unterschiedenen Lymphozytensubgruppen war deutlich geringer.

Bereits bekannt ist der Einfluss des Alters auf die unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen, was mit dem Begriff der Immunseneszenz beschrieben wird.³¹ Zudem beeinflusst das Inflamm-Aging die Lymphozytenpopulationen im Alter.³¹ Kverneland AH et al. und Li M et al. zeigten in separaten Veröffentlichungen,

dass es bei den T-Zellen zu einem Rückgang der naiven T-Zellen und zu einem Anstieg der Gedächtnis- und aktivierten T-Zellen kommt.^{32,33} Auch bei den B-Zellen kommt es im höheren Alter zur Abnahme der naiven B-Zellen.³⁰ In unserer Studie stellten wir eine Abnahme der Gesamtzahl der Lymphozyten fest. Bei den T-Lymphozyten beobachteten wir sowohl für die CD8⁺- als auch für die CD4⁺-Zellen eine Abnahme. Ebenfalls konnten wir eine Abnahme für die NK-Zellen herausarbeiten. Auch bei der Betrachtung der Gesamtzahl der B-Zellen können wir den bereits beschriebenen altersabhängigen Rückgang bestätigen. Ein altersabhängiger Anstieg war bei IL2R⁺-CD8⁺-Zellen, EMRA und HLADR⁺-CD4⁺-Zellen zu beobachten. Dabei zeigen die meisten Lymphozytenpopulationen einen logarithmischen Rückgang, dieser ist exemplarisch für ausgewählte Subpopulationen in Abbildung 4 dargestellt.⁴²

Als nächstes betrachteten wir den Einfluss des Geschlechts auf die Lymphozytenpopulationen. Hier ist bereits bekannt, dass Frauen in jedem Alter eine höhere Thymusfunktion als Männer aufweisen und damit einen höheren Anteil an naiven T-Zellen im peripheren Blut.³¹ Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass das weibliche Geschlecht höhere Werte bei den naiven CD4⁺-Zellen, den CD56^{bright}CD16^{dim} NK-Zellen ($p = 0,034$) und dem Verhältnis von CD4⁺/CD8⁺-Zellen ($p = 0,000$) aufweist. Das männliche Geschlecht zeigt höhere Werte bei den CD8⁺-Zellen.⁴²

Weiter führten wir eine multivariate Analyse zu den erhobenen Daten unserer Studienpopulation durch, um die Gewichtung der Einflussfaktoren Patientenalter, Geschlecht und Tumorerkrankung beurteilen zu können.

Das Patientenalter hat eine entscheidende Bedeutung für die Lymphozytenevolution. In unserer multivariaten Analyse konnte ein signifikanter altersabhängiger Rückgang der gesamten CD3⁺- und CD8⁺-Zellen, der naiven, der central memory-, der early und CD69⁺-zytotoxischen T-Zellen, als auch der naiven und central memory-T-Helferzellen, wie er in der univariaten Analyse gesehen wurde, bestätigt werden. Die Gesamtzahl der B-Zellen und einige der Subpopulationen (naive, NCS-memory, CS memory) nahmen ebenfalls altersbedingt ab. Eine altersabhängige Zunahme wurde bei den EMRA-CD4⁺-Zellen und dem Verhältnis von CD4⁺/CD8⁺ beobachtet. (Abbildung 5⁴¹, Tabelle 6⁴¹).

Unsere multivariate Analyse hat den Einfluss des Geschlechts auf bestimmte Populationen als unabhängigen Faktoren bestätigt. So wird die Anzahl der naiven CD8⁺-Zellen, der naiven CD4⁺-Zellen, der CD56^{bright}CD16^{dim}-Zellen und das Verhältnis aus CD4⁺/CD8⁺-Zellen durch das Geschlecht beeinflusst. (Abbildung 5⁴¹, Tabelle 6⁴¹).

Zudem ergab sich für eine große Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten-Subpopulationen ein signifikanter Rückgang im Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines Kolonkarzinoms. Für manche Populationen zeigte sich die Tumorerkrankung als alleiniger Einflussfaktor. Allerdings ergab sich in einigen Untergruppen das Alter oder Geschlecht als Confounder (Abbildung 5⁴¹, Tabelle 6⁴¹). Hier spielt die Immunseneszenz wie oben beschrieben eine wichtige Rolle, dies führt zu einem Rückgang der naiven T-Zellen und einem Anstieg der Gedächtnis- und aktivierten T-Zellen.^{32,33} Das Tumorgeschehen selbst war ein unabhängiger Einflussfaktor auf die B-Lymphozyten, die CD4⁺-Zellen und die NK-Zellen. Dabei beeinflusst das Vorhandensein eines KKR vor allem die transitorischen und class-switched B-Zellen, die CD4⁺-Gedächtniszellen, effector memory, regulatorischen CD4⁺- und Th₁₇-Zellen, wie auch die CD56⁺CD16⁺-NK-Zellen. Die Gesamtzahl der CD8⁺-Zellen wurde nicht beeinflusst. Im Gegensatz zu den Subpopulationen der zytotoxischen T-Zellen wie die naiven, die central memory, die exhausted und HLADR⁺-Zellen. Vergleichbare Vorarbeiten fehlen hier weitestgehend. Bei anderen Tumorarten konnten jedoch teils ähnliche Ergebnisse gesehen werden.^{45,46}

Um die quantitative Einflussstärke eines KKR auf die verschiedenen Lymphozytenpopulationen genauer zu untersuchen, unterteilten wir die Tumorpatienten für die multivariate Analyse in zwei Gruppen (UICC I/II versus UICC III/IV). Hier konnten wir im Vergleich der Patienten im Tumorstadium UICC I/II und der Kontrollgruppe Unterschiede bei den HLADR⁺-CD4⁺-Zellen, der Gesamtzahl der CD8⁺-Zellen, sowie bei den Untergruppen der memory CD8⁺-Zellen, der effector memory CD8⁺-Zellen und der exhausted CD8⁺-Zellen, als auch der NK-Zellen feststellen. Im direkten Vergleich der Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung und der gesunden Kontrolle konnten für die oben genannten Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede der Lymphozytenpopulationen festgestellt werden. Die übrigen Lymphozytenpopulationen unterscheiden sich im Vergleich der gesamten Patientenkohorte zu den Gesunden signifikant. Weshalb sich für die früheren Tumorstadien im Gegensatz zu den fortgeschritteneren Tumoren deutlichere

Unterschiede im Vergleich zu der gesunden Kohorte zeigten, lässt sich an Hand der vorliegenden Daten nicht beantworten.

Da sich rechtsseitige und linksseitige kolorektale Karzinome hinsichtlich ihrer genetischen Veränderung und klinischen Präsentation relevant unterscheiden und auch ein immunologischer Unterschied vermutet^{47,48} wird, betrachteten wir als nächstes den Einfluss der Lokalisation des KRK auf den zellulären Immunstatus. Hier führt die Lage im linken Hemikolon in der univariaten und multivariaten Analyse zu signifikant höheren Werten in verschiedenen T-Zell-Subgruppen im Vergleich zur Lage im rechten Hemikolon, was für eine höhere Immunogenität der linksseitigen Tumore spricht, wenn man von einer positiven Korrelation der lokalen und systemischen Immunantwort ausgeht, wie sie im zweiten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde. Passend hierzu werden diese Tumore meist auch erst später entdeckt und haben eine etwas schlechtere Prognose.^{49,50}

Diese Unterschiede waren entweder in beiden Gruppen, UICC I/II und UICC III/IV, oder nur in der Gruppe mit dem niedrigeren Tumorstadium signifikant. Auch hier bleibt unklar wieso die lokalisierten Tumorstadien einen größeren Einfluss zu haben scheinen als die fortgeschrittenen.

Abschließend wurde der Einfluss einer Mikrosatelliteninstabilität auf die Lymphozyten im peripheren Blut betrachtet. Eine Mikrosatelliteninstabilität ist mit einer höheren Rate an genetischen Mutationen in Tumoren und mit einer höheren Immunogenität assoziiert.⁵¹ In Mikrosatelliten-instabilen Tumoren zeigte sich in Vorarbeiten eine höhere Anzahl an tumorinfiltrierenden CD8⁺-Zellen⁵², inwiefern es hier einen Zusammenhang zur zellulären Immunantwort im peripheren Blut gibt ist noch nicht untersucht. Unsere Daten ergaben in der univariaten Analyse keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Lymphozyten bei Patienten mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Mikrosatellitenstabilität (MSS). Auf Grund des vorbeschriebenen Einflusses des Mikrosatellitenstatus auf die Immunantwort, nahmen wir diesen Faktor dennoch mit in die zweite multivariate Analyse auf. Es ergaben sich signifikant höhere Werte lediglich für memory effector CD8⁺-Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit hoher MSI, dies könnte auf eine stärkere Reaktion des zellulären Immunsystems hinweisen. Für alle anderen Subpopulationen ergaben sich keine

signifikanten Unterschiede. Dies könnte auch bedingt sein durch die geringe Anzahl von 11 MSI-Patienten.

Der zweite große Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Korrelation der lokalen und systemischen Anti-Tumor-Immunantwort.

Hier konnten wir zunächst in unserer prospektiven Studie frühere Ergebnisse aus retrospektiv gewonnenen Daten, welche einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der TILs und der Lymphknotengröße bei nodal-negativen KRK-Patienten zeigten, bestätigen.³⁶ Bei nodal negativen Patienten fiel die Anzahl der TILs im TC und in der IF höher aus, wenn eine höhere Anzahl an größeren Lymphknoten (LN5 Kategorie) vorhanden waren. Zudem konnten wir einen vergleichbaren Effekt bei nodal positiven Patienten herausarbeiten und somit ebenfalls retrospektive Vorarbeiten bestätigen. Hier weist ein niedriger MSR-Wert (Verhältnis von Metastasen zu Lymphknotengröße) auf eine stärkere lokale Immunantwort hin und es zeigte sich eine höhere Anzahl von TILs.

Da sich hier für die meisten Vergleiche nur Trends und keine signifikante Unterschiede zeigten, was wir auf die niedrige Fallzahl schoben, fassten wir die Untergruppen sowohl für die nodal-positiven als auch –negativen Patienten in eine Gruppe mit höherer (LN5 niedrig/hoch und MSR1) und eine Gruppe mit niedriger lokaler Immunantwort (LN5 sehr niedrig und MSR0) zusammen. In diesen kombinierten Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede in der Anzahl der TILs mit Vorteil für die Patienten mit einer höheren nodalen Immunreaktion.⁴¹ Vorangegangene Studien zeigten, dass Patienten mit positiven Lymphknotenbefall einen niedrigeren Wert an TILs aufweisen,⁵³ dies konnten wir ebenfalls aufzeigen.

Bereits bekannt ist, dass die lokale Immunantwort auf den Tumor eine entscheidende Rolle in Hinblick auf die Prognose bei Patienten mit KRK spielt. Dabei wurden bereits die TILs von einer Arbeitsgruppe von Galon et al. als besserer Prädiktor für das Gesamtüberleben der Patienten nachgewiesen als die bisherigen klassischen histopathologischen Merkmale.^{8, 54} Ob die in unserer Arbeit detektierten Unterschiede in der Immunreaktion einen Einfluss auf die Prognose haben, kann nicht beantwortet werden, da keine Auswertung hinsichtlich des Überleben erfolgte. Dies wäre ein ergänzender Punkt für weitere Arbeiten.⁴¹

Lange Zeit wurde ein vermeintliches „under-staging“ durch eine zu geringe Lymphknoten-Ausbeute als Ursache für die schlechtere Prognose bei Patienten mit weniger als 12 untersuchten Lymphknoten gesehen. Dieses Phänomen wurde mit dem Begriff „Will-Rogers-Phänomen“ oder „Stage Migration Theory“ benannt. Bereits in den retrospektiven Arbeiten von Bruno Märkl konnten deutliche Hinweise gegen diese Theorie aufgezeigt werden. Die Ergebnisse unserer Arbeit geben einen weiteren Hinweis in Richtung eines in sich kongruenten Immunsystems mit gleichsinnigen Veränderungen der TILs, Immunaktivität der Lymphknoten und Steigerung der Lymphozyten im peripheren Blut.

Betrachtet man Patienten mit diesen Faktoren gemeinsam mit einer besseren MSR-Kategorie und einer höheren LN5-Kategorie im Hinblick darauf, dass dies mit einer besseren Prognose einhergeht, so ergibt sich ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Theorie der Stadienmigration nicht die Ursache für ein besseres Ergebnis bei Patienten mit einer höheren Lymphknotenausbeute ist. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die lokale Immunreaktion auf den Tumor sich entweder in Form von größeren Lymphknoten als Ausdruck einer starken Immunreaktion und einer hohen Anzahl von TILs oder in Form von kleineren Lymphknoten mit einem höheren Anteil an Tumorzellen in positiven Lymphknoten und einer niedrigen Anzahl von TILs widerspiegelt. Dabei weist die Lymphknotenentnahme in unserer Studie keinen Unterschied zwischen der MRS0- und MRS1-Gruppe sowie zwischen den nodal- positiven und –negativen Patienten auf. Erklärend hierfür ist am ehesten die angewendete Technik der Resektion von mit Methylenblau angefärbten Lymphknoten, die unabhängig von der Lymphknotengröße zu einer hohen Anzahl von resezierten Lymphknoten führt.^{55,56} (Vergleiche Abbildung 8: Will-Rogers-Phänomen³⁹)

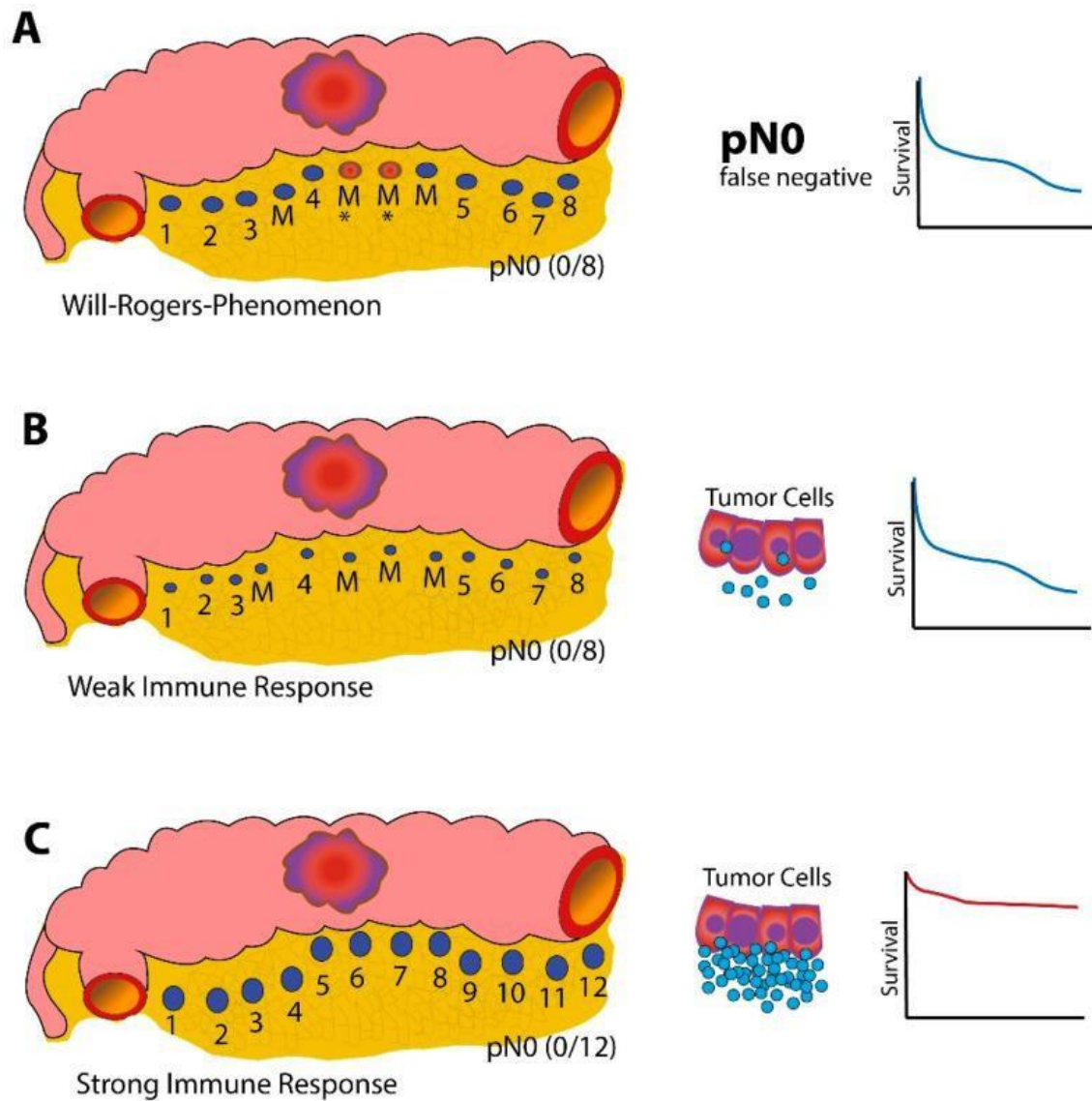


Abbildung 8: Hypothesen zur prognostischen Wirkung des Lymphknotenertrags bei Darmkrebs. (A) Stufenmigrationseffekt (Will-Rogers-Phänomen). Nach dieser These resultiert der nachteilige prognostische Effekt einer niedrigen LN-Ausbeute aus fehlenden Lymphknotenmetastasen aufgrund unzureichender Dissektion. (b) Alternative These. Kleine hypoplastische Lymphknoten sind schwer zu identifizieren und führen zu einer geringen Lymphknotenausbeute. Eine kleine Lymphknotengröße korreliert mit einer geringen Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) und weist auf eine schwache Immunantwort hin, die die Immunflucht von Tumoren ermöglicht. (C) Große Lymphknoten sind in hoher Zahl leicht zu identifizieren und weisen auf eine starke Immunantwort hin. Sie sind mit einer hohen Dichte an TILs und einer günstigen Prognose verbunden. Zahlen zeigen erkannte lokale Lymphknoten an. M = verpasste Lymphknoten, * metastasierte LNs und blaue Kreise = tumorinfiltrierende Immunzellen.³⁹

Die Anzahl der resezierten Lymphknoten in unserer Studie liegt mit einem Median von 35 deutlich höher als die nach Leitlinien geforderte Anzahl von 12 Lymphknoten. Jedoch besteht ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der resezierten Lymphknoten in den Untergruppen niedrige LN5 und hohe LN5 (31 bzw. 41 Lymphknoten), was wiederum darauf hinweisen könnte, dass trotz der Färbung der Lymphknoten mit Methylenblau die Größe der Lymphknoten die Rate der Entnahme beeinflusst.⁴¹

Hier entsteht bereits bei der Datensammlung eine Limitation unserer Studie, genau genommen in der Gewinnung und Aufbereitung der operativ resezierten Lymphknoten. Zunächst war unser Anspruch, dass bei jedem Patientenfall eine Anzahl von mindestens 25 Lymphknoten reseziert werden sollte. Bei der Anfertigung der Paraffinschnitte sind die Lymphknoten nicht in allen Fällen mittig angeschnitten und sauber auf einem Objektträger aufgebracht worden, somit kann es bei der Messung des Längsdiameters zu Abweichungen der eigentlichen Lymphknotengröße kommen. Dies führt zu einem Bias bei der Kategorisierung der Lymphknoten in die unterschiedlichen LN-Gruppen. Zudem ist das Vermessen der Lymphknotenmetastasen von der Aufbereitung der Präparate abhängig. Hierdurch wird wiederum unser MSR maßgeblich beeinflusst, was Auswirkung auf unsere Einschätzung des Ausmaßes der Erkrankung in den Lymphknoten hat. Insgesamt gehen wir aber davon aus, dass sich über- und unterschätzte Werte ausgleichen und die Gesamteinstufung des einzelnen Patienten als valide angesehen werden kann.

Der Zusammenhang zwischen dem immunologischen Tumor-Mikromilieu und den Lymphozyten im peripheren Blut wurde bisher nur in wenigen Studien analysiert. Hagland et al zeigte an 18 Patienten mit kolorektalem Karzinom eine positive Korrelation zwischen tumorinfiltrierenden $CD3^{+}$ - und $CD8^{+}$ -Lymphozyten im TC und in der IF mit den im peripheren Blut zirkulierenden $CD3^{+}$ -Zellen, insbesondere den $CD4^{+}$ -Zellen. Eine Korrelation der $CD8^{+}$ -Zellen mit den TILs konnte dahingehend nicht gezeigt werden.⁹ Unsere Ergebnisse zeigen eine positive Korrelation zwischen den zirkulierenden und den tumorinfiltrierenden Lymphozyten, insbesondere bei den $CD8^{+}$ -Lymphozyten. Höhere Werte zirkulierender Lymphozyten sind mit höheren Werten von TILs assoziiert und Patienten mit einer stärkeren immunologischen Lymphknotenaktivierung weisen höhere Werte der Gesamtzahl der im peripheren Blut zirkulierenden T-Lymphozyten, $CD8^{+}$ -Zellen und verschiedener ihrer Untergruppen auf. Dies unterstreicht die These einer synergistischen Reaktion der verschiedenen immunologischen Kompartimente und macht eine Rekrutierung von Lymphozyten in

den Tumor und das umgebende Gewebe, die zu einer verminderten Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten führt, eher unwahrscheinlich.

Unsere Forschungsgruppe konnte aufzeigen, dass Patienten mit KKR im Vergleich zu gesunden Probanden niedrigere Werte der zirkulierenden Lymphozyten aufweisen.

Wir beobachtenden Veränderungen der PB-Lymphozyten-Subgruppen bei Patienten mit Kolonkarzinom im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe welche mit der lokalen Immunantwort auf den Tumor korrelieren, bestehend aus tumorinfiltrierender Lymphozyten und lokaler Lymphknotenaktivierung. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine stärkere Tumorimmunogenität zu einer erhöhten Anzahl an PB-Lymphozyten führt.

Dies führt zu der offenen Frage, ob Patienten als Folge eines Kolorektalen Karzinoms eine reduzierte Anzahl von im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten entwickeln oder ob die Krebserkrankung durch eine bereits bestehende Lymphopenie begünstigt wird. Verschiedene Studien postulierten eine Beeinträchtigung des Immunsystems aufgrund immunsuppressiver Eigenschaften des Karzinoms. Hier wurde eine reduzierte absolute Lymphozytenanzahl sowie veränderte Lymphozyten-Subsets bei Patienten mit hämatologischen oder soliden Tumoren nachgewiesen.^{42,57,58,59,60,61} In unserer Studie konnte eine bereits vorher bestehende Immunsuppression der Patienten weitestgehend ausgeschlossen werden, da Patienten mit chronischen Infektionen, angeborener oder erworbener Immunschwäche oder immunsuppressiver Therapie im Rahmen von Autoimmunerkrankungen als Ausschlusskriterium definiert wurden.

Limitationen unserer Studie sind zum einen die relativ kleine Zahl eingeschlossener Patienten, die letztendlich zu noch kleineren Untergruppen führt. Dennoch konnten signifikante Ergebnisse erhoben werden.

Eine weitere Limitation stellt die automatische Zählung der immunhistochemisch gefärbten CD3⁺- und CD8⁺-Zellen mit Hilfe der CD3/CD8 Quantifier-Software der Firma VMscope, Berlin dar, da diese nicht immer einleuchtend war, sodass in manchen Fällen die markierten Zellen herkömmlich manuell nachgezählt wurden. Eine weitere Limitation entsteht durch einen persönlichen Bias bei der Auswertung der Durchflusszytometrie mit Hilfe des Gerätes FC500 von Beckmann Coulter. Die Durchflusszytometrie wurde zwar nur von einer Person durchgeführt, allerdings ist die Vergleichbarkeit mit anderen Studiengruppe nur bedingt gegeben. Um einen weiteren

Einflussfaktor zu vermeiden führten wir die Durchflusszytometrie der Kohorte und der Kontrollgruppe an ein und demselben Gerät durch.

Vorteile unserer Studie sind zum einen, dass alle Daten prospektiv erfasst wurden. Zum anderen wurden in unsere Studie nur elektiv geplante Patienten eingeschlossen auch die mit UICC-Stadium IV. Notfallresektionen aufgrund einer Obstruktion oder Perforation wurden ausgeschlossen, da dies die Lymphozytenpopulationen beeinflussen könnte. Auch Patienten mit chronischen Infektionen, bekannter Autoimmunerkrankung oder Immundefizienz, sowie Patienten mit einem Zweitmalignom zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses oder in der Vorgeschichte wurde ebenfalls ausgeschlossen, da diese Faktoren ebenfalls die im peripheren Blut gemessenen Lymphozytenpopulationen beeinflussen können.

Unsere Forschungsgruppe schreibt der Immunantwort eine wesentliche Rolle im Ausmaß der Darmkrebserkrankung unabhängig vom Stadium zu. Auch im Falle eines Lymphknotenbefalls kann eine stärkere Immunreaktion hierauf, die eigentlich schlechtere Prognose relativieren.

Zusammenfassend konnte unsere Studie prospektiv bereits vorhandene Ergebnisse von höheren Werten von TILs in Relation zur lokalen Lymphknotenaktivierung bei nodal-positiven und –negativen Patienten mit KRK bestätigen. Zudem konnten wir signifikante Veränderungen der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten- Subgruppen aufzeigen im Vergleich zu gesunden Probanden. Diese sind zumindest teilweise auf das Vorhandensein eines Kolonkarzinoms zurückzuführen, wobei sowohl das Alter als auch das Geschlecht als wichtige Einflussfaktoren bei der Betrachtung der Lymphozytenuntergruppen berücksichtigt werden müssen. In Anbetracht des aus retrospektiven Analysen bekannten, prognostischen Vorteils von Patienten mit höheren TILs und größeren den Tumor umgebenden Lymphknoten, könnte den im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten-Untergruppen eine prognostische Relevanz zugesprochen werden. Inwieweit diese Veränderungen wirklich prognostisch relevant sind, so wie es für die tumorinfiltrierenden Lymphozyten berichtet wurde^{7,62} und ob die Veränderungen Ursache oder Folge der Krebserkrankung sind, muss in weiteren Studien untersucht werden.

8. EIGENE PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit konnten bereits in zwei Publikationen veröffentlicht werden.

Alterations of circulating lymphocyte subsets in patients with colorectal carcinoma

Johanna Waidhauser, Pia Nerlinger, Tim Tobias Arndt, Stefan Schiele, Florian Sommer, Sebastian Wolf, Phillip Löhr, Stefan Eser, Gernot Müller, Rainer Claus, Bruno Märkl, Andreas Rank

Circulating Lymphocytes Reflect the Local Immune Response in Patients with Colorectal Carcinoma

Johanna Waidhauser, Pia Nerlinger, Florian Sommer, Sebastian Wolf, Stefan Eser, Phillip Löhr, Andreas Rank, Bruno Märkl

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Almeshmadi M, Flanagan BF, Khan N, Alomar S, Christmas SE. Increased numbers and functional activity of CD56+ T cells in healthy cytomegalovirus positive subjects. *Immunology*. 2014;142(2):258-268. doi:10.1111/imm.12250
2. Lymphozytentypisierung D. Lymphozytentypisierung – Erkennung von Störungen im Immunsystem. 2009;(August):53-55.
3. Zelluläre Komponenten des Immunsystems - Immunologie, Allergien - MSD Manual Profi-Ausgabe. <https://www.msdmanuals.com/de-de/profi/immunologie,-allergien/biologie-des-immunsystems/zelluläre-komponenten-des-immunsystems>
4. n, Eunsung Mouradian MM, Michael R. Bronsert, William G. Henderson, Robert Valuck, Patrick Hosokawa and KH. 基因的改变NIH Public Access. *Bone*. 2008;23(1):1-7.
5. Onkologie L 2019. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Published online 2019:1-328.
6. RKI Kolorektales Karzinom 2013.
7. Jérôme Galon, 1*† Anne Costes, 1 Fatima Sanchez-Cabo, 2 Amos Kirilovsky, 1 Bernhard Mlecnik, 2 Christine Lagorce-Page's, 3 Marie Tosolini, 1 Matthieu Camus, 1 Anne Berger, 4 Philippe Wind, 4 Franck Zinzindohoue', 5 Patrick Bruneval, 6 Paul-Henri Cugnen 7†. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Some Early Tools Am Sci*. 2014;313(September):177-190. doi:10.4159/harvard.9780674368446.c10
8. HAGLAND HR, LEA D, WATSON MM, SØREIDE K. Correlation of Blood T-Cells to Intratumoural Density and Location of CD3+ and CD8+ T-Cells in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. Published online 2017. doi:10.21873/anticancer.11363
9. Märkl B. Stage migration vs immunology: The lymph node count story in colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12218-12233. doi:10.3748/wjg.v21.i43.12218
10. Märkl B, Röle J, Arnholdt HM, et al. The clinical significance of lymph node

- size in colon cancer. *Mod Pathol*. 2012;25(10):1413-1422. doi:10.1038/modpathol.2012.92
11. Märkl B, Schaller T, Kokot Y, et al. Lymph node size as a simple prognostic factor in node negative colon cancer and an alternative thesis to stage migration. *Am J Surg*. 2016;212(4):775-780. doi:10.1016/j.amjsurg.2015.05.026
 12. <https://www.gelbe-liste.de/krankheiten/darmkrebs>. Darmkrebs Gelbe Liste. In: *Servier Deutschland GmbH: Gelbe Liste Online - Darmkrebs. Stand: 2019, Aufgerufen Am 21.06.2021*.
 13. Virchow R. Die krankhaften Geschwülste. Published online 1863.
 14. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1909;5:273-290.
 15. Klein G, Sjögren HO, Klein E, Hellstrom KE. Demonstration of Resistance against Methylcholanthrene-induced Sarcomas in the Primary Autochthonous Host. *Cancer Res*. 1960;20(11):1561-1572. doi:10.1097/00006534-196201000-00064
 16. Rammensee HG, Löffler MW. Individualized immunotherapy for malignant tumors using peptide vaccines—maybe it does work after all? *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. 2020;63(11):1380-1387. doi:10.1007/s00103-020-03227-3
 17. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306. doi:10.1038/nrc3245
 18. Nicholson BD, Shinkins B, Pathiraja I, Roberts NW, James TJ, Mallett S, Perera R PJ, D M. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer (Review). Published online 2015. doi:10.1002/14651858.CD011134.pub2. www.cochranelibrary.com
 19. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015 / 2016. *Robert Koch Inst*. 2019;(12. Ausgabe):160.
 20. onkopedia leitlinien Kolonkarzinom.
 21. Galon J, Pagès F, Marincola FM, et al. Cancer classification using the Immunoscore: A worldwide task force. *J Transl Med*. 2012;10(1). doi:10.1186/1479-5876-10-205
 22. Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G. Entstehung kolorektaler Karzinome. 2010;107:760-766. doi:10.3238/arztebl.2010.0760
 23. Kolorektale D, Teil K, Sekundärprävention P-. www.kup.at/gastroenterologie. Published online 2004.
 24. Pape / Kurtz / Silbernagl Physiologie Lehrbuch/Studienliteratur Buch inkl. Online-Nutzung. Hardcover 10., vollständig überarbeitete Auflage. 2023 1128 S. Inkl. Online-Version in via medici. Thieme. ISBN 978-3-13-244608-3.
 25. Dresbach M. *Allegemeine Sinnesphysiologie*. Vol 21.; 1924. doi:10.1037/h0064457
 26. Brümmendorf RFPS und T. *Manual Zum Mikroskopiekurs Hämatologie*. 2017.
 27. Lee GR. The balance of th17 versus treg cells in autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):1-14. doi:10.3390/ijms19030730
 28. Peters T. Immunseneszenz: Bestandsaufnahme und molekulare Grundlagen. *Hautarzt*. 2011;62(8):598-606. doi:10.1007/s00105-011-2134-9
 29. Márquez EJ, Chung C han, Marches R, et al. Sexual-dimorphism in human immune system aging. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-14396-9
 30. Kverneland AH, Streit M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boës D et al. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A*. 2016;89(6):543-64,

- doi:10.1002/cyto.a.22855.
31. Li M, Yao D, Zeng X, Kasakovski D, Zhang Y, Chen S et al. Age related human T cell subset evolution and senescence. *Immun Ageing*. 2019;16:24, doi:10.1186/s12979-019-0165-8.
 32. L.H. Sobin MKG, And, Wittekind C, Edition S, 2009, A John Wiley & Sons, Ltd. P. *UICC International Union Against Cancer TNM Classification of Malignant Tumours*.
 33. Märkl B, Wieberneit J, Kretsinger H, et al. Number of intratumoral T lymphocytes is associated with lymph node size, lymph node harvest, and outcome in node-negative colon cancer. *Am J Clin Pathol*. Published online 2016. doi:10.1093/AJCP/AQW074
 34. Märkl B, Paul B, Schaller T, Kretsinger H, Kriening B, Schenkirsch G. The role of lymph node size and FOXP3+ regulatory T cells in node-negative colon cancer. *J Clin Pathol*. 2017;70(5):443-447. doi:10.1136/jclinpath-2016-203978
 35. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707-723. doi:10.1016/j.cell.2017.01.017
 36. Mallappa S, Sinha A, Gupta S, Chadwick SJD. Preoperative neutrophil to lymphocyte ratio >5 is a prognostic factor for recurrent colorectal cancer. *Color Dis*. 2013;15(3):323-328. doi:10.1111/codi.12008
 37. Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al. Lymphocytic Reaction to Colorectal Cancer is Associated with Longer Survival, Independent of Lymph Node Count, MSI and CpG Island Methylator Phenotype. 2010;15(20):6412-6420. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1438.Lymphocytic
 38. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014;232(2):199-209. doi:10.1002/path.4287
 39. Waidhauser J, Nerlinger P, Sommer F, et al. Circulating Lymphocytes Reflect the Local Immune Response in Patients with Colorectal Carcinoma. *Diagnostics*. 2022;12(6). doi:10.3390/diagnostics12061408
 40. Schrembs P, Martin B, Anthuber M, Schenkirsch G, Märkl B. The prognostic significance of lymph node size in node-positive colon cancer. *PLoS One*. 2018;13(8):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0201072
 41. Johanna Waidhauser, Pia Nerlinger, Tobias Arndt, Stefan Schiele, Florian Sommer, Sebastian Wolf, Philipp Löhr, Stefan Eser, Rainer Claus, Bruno Märkl Alterations of Circulating Lymphocyte Subsets in Patients with Colorectal Carcinoma.
 42. Spacek J, Vocka M, Netikova I, Skalova H, Dundr P, Konopasek B et al. Immunological examination of peripheral blood in patients with colorectal cancer compared to healthy controls. *Immunological investigations*. 2018;47(7):643-53, doi:10.1080/08820139.2018.1480030.
 43. Choi J, Maeng HG, Lee SJ, Kim YJ, Kim DW, Lee HN et al. Diagnostic value of peripheral blood immune profiling in colorectal cancer. *Annals of surgical treatment and research*. 2018;94(6):312-21, doi:10.4174/astr.2018.94.6.312.
 44. Krijgsman D, de Vries NL, Skovbo A, Andersen MN, Swets M, Bastiaannet E et al. Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(6):1011-24, doi:10.1007/s00262-019-02343-7.
 45. Waidhauser J, Gantner AK, Schifano P, et al. Influence of cryoablation versus operation on circulating lymphocyte subsets in patients with early-stage renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2024;24(1):1-11. doi:10.1186/s12885-024-12596-w
 46. Schmälder AK, Löhr P, Konrad M, et al. Alterations in Peripheral Lymphocyte

- Subsets under Immunochemotherapy in Stage IV SCLC Patients: Th17 Cells as Potential Early Predictive Biomarker for Response. *Int J Mol Sci.* 2024;25(10). doi:10.3390/ijms25105056
47. Yang SY, Cho MS KN. Difference between right-sided and left-sided colorectal cancers: from embryology to molecular subtype. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(4):351-8, doi:10.1080/14737140.2018.1442217.
 48. Brungs D, Aghmesheh M, de Souza P, Ng W, Chua W, Carolan M et al. Sidedness is prognostic in locoregional colon cancer: an analysis of 9509 Australian patients. *BMC Cancer.* 2017;17(1):251, doi:10.1186/s12885-017-3255-z.
 49. Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med.* 1990;113:779–788. doi: 10.7326/0003-4819-113-10-779.
 50. Guo JN, Chen D, Deng SH, et al. Identification and quantification of immune infiltration landscape on therapy and prognosis in left- and right-sided colon cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2022;71(6):1313-1330. doi:10.1007/s00262-021-03076-2
 51. Gebert J, Kienle P, Doeberitz MVK, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. Published online 2005:1746-1753. doi:10.1038/sj.bjc.6602534
 52. Chirica M, Bourhis L Le, Lehmann-che J, et al. Phenotypic analysis of T cells in infiltrating colon cancers : Correlations with oncogenetic status. 2015;(August):1-12.
 53. Vycital O, Dubova M, Palek R, Hosek P, Branzovsky J, Treska V, Daum O L V. The Impact of Immune Interaction on the Metastatic Infiltration of Colorectal Carcinoma to Lymph Nodes. *Anticancer Res.* 2018;38(7):4159-67, doi:10.21873/anticancer.12709.
 54. Galon J LA. Immunoscore and its introduction in clinical practice. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2020;64(2):152-61, doi:10.23736/s1824-4785.20.03249-5.
 55. Märkl B, Schaller T, Krammer I, Cacchi C, Arnholdt HM, Schenkirsch G, Kretsinger H, Anthuber M SH. Methylene blue-assisted lymph node dissection technique is not associated with an increased detection of lymph node metastases in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2013;26(9):1246-54, doi:10.1038/modpathol.2013.61.
 56. Märkl B, Kerwel TG, Jähnig HG, Oruzio D, Arnholdt HM, Schöler C, Anthuber M SH. Methylene blue-assisted lymph node dissection in colon specimens: a prospective, randomized study. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(6):913-9, doi:10.1309/ajcpvapb5apabjnx.
 57. Wang WJ, Tao Z, Gu W SL. Variation of blood T lymphocyte subgroups in patients with non- small cell lung cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP.* 2013;14(8):4671-3.
 58. Fernandez SV, MacFarlane AWt, Jillab M, Arisi MF, Yearley J, Annamalai L et al. Fernandez SV, MacFarlane AWt, Jillab M, Arisi MF, Yearley J, Annamalai L, et al. Immune phenotype of patients with stage IV metastatic inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):134, doi:10.1186/s13058-020-01371-x.
 59. CS L. Lee CS. Lymphocytes and their subsets in the peripheral blood of hepatocellular carcinoma patients. *J Formos Med Assoc.* 1991;90(7):626-30.
 60. Ménétrier-Caux C, Ray-Coquard I, Blay JY, Caux C. Lymphopenia in Cancer Patients and its Effects on Response to Immunotherapy: An opportunity for combination with Cytokines? *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):1-15. doi:10.1186/s40425-019-0549-5
 61. Cézé N, Thibault G, Goujon G, Viguier J, Watier H, Dorval E LT. Pre-treatment

- lymphopenia as a prognostic biomarker in colorectal cancer patients receiving chemotherapy. *Krebs Chemandere Pharmacol.* 2011; 68(5):1305–1313. doi: 10.1007/s00280-011-1610-3.
62. van der Leun AM, Thommen DS ST. CD8(+) T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(4):218-32, doi:10.1038/s41568-019-0235-4.

10. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Dr. Andreas Rank danken, der es mir ermöglichte die Arbeit unter seiner Anleitung durchzuführen und mir stets mit hilfreichen Ratschlägen in kameradschaftlicher Art zur Seite stand.

Weiterhin danke ich seiner Frau Svenja Rank, welche mir über einfache Wege den Kontakt zu ihrem Mann herstellte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bruno Märkl unter dessen Anleitung ich meine Arbeiten in der Pathologie durchführen konnte.

Und natürlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe im Labor und der Pathologie für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft bedanken und zu allerletzt natürlich bei Frau Dr. Johanna Waidhauser durch welche ich mich in allen Fragen und Anliegen sehr gut betreut gefühlt habe.



Eidesstattliche Versicherung

Nerlinger, Pia

Name, Vorname

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

Korrelation des zellulären Immunstatus im peripheren Blut mit Gewebe-infiltrierenden Lymphozyten im Primärtumor und regionalen Lymphknoten bei Patienten mit Kolonkarzinom

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

München, 24.10.2024

Ort, Datum

Pia Nerlinger

Unterschrift Pia Nerlinger