

Diplomarbeit

**Evaluierung des prognostischen Stellenwertes von
zellulären Markern der systemischen inflammatorischen
Response beim lokalisierten Kolonkarzinom**

eingereicht von

Franziska Arminge

Geb.Dat.: 26.06.1989

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Abteilung für Klinische Onkologie

unter der Anleitung von

Mag. Dr. Martin Pichler

und der Zweitbetreuung von

Assoziierter Prof. PD Dr. Armin Gerger

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 18. Mai 2014

Franziska Armingier

Anmerkung zur geschlechtsneutralen Schreibweise

Um die Lesbarkeit dieser Diplomarbeit zu verbessern wurde bei personenbezogenen Bezeichnungen auf weibliche Endungen verzichtet und stets gebräuchliche maskuline Formen verwendet, die sinngemäß allerdings für beide Geschlechter gelten.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Mag. Dr. Martin Pichler für die ausgesprochen gute, kompetente Betreuung, die vielen Ermutigungen und seine Geduld. Das anhaltende Engagement, das er trotz starker Arbeitsbelastung aufbringen konnte, war eine maßgebliche Unterstützung für die Verfassung dieser Abschlussarbeit.

Desweiteren möchte ich meinen Dank an Ass. Prof. PD Dr. Armin Gerger aussprechen, da er mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas an der Abteilung für klinische Onkologie ermöglichte und grundlegende Daten bereitstellte.

Nicht zuletzt habe ich meinen Betreuern eine Co-Autorenschaft in drei wissenschaftlichen Publikationen zu verdanken.

Starker familiärer Rückhalt ist keine Selbstverständlichkeit. Deshalb möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern danken, dass sie mir so viel ermöglicht, mein Studium finanziert und mich sowohl in emotionaler als auch ideeller Hinsicht unterstützt und geprägt haben. Mein Dank gilt auch meinen drei Brüdern, die in allen Lebenslagen stets zu meiner Seite standen.

Nicht zu vergessen sind meine Freunde, mit denen ich sämtliche Phasen der Studienzeit durchlebt und eindruckliche Erfahrungen gemacht habe.

Zusammenfassung

HINTERGRUND Die Prognoseabschätzung beim Kolorektalkarzinom mittels klassischem TNM-Staging ist in vielen Fällen unzulänglich, besonders Patienten im Stadium II und III haben ein heterogenes klinisches Outcome. Daher wird die Evaluierung zusätzlicher prognostischer Marker als wichtig erachtet, nicht zuletzt auch um die individuelle Therapieanpassung in diesen Stadien zu verbessern. Es ist allgemein bekannt, dass das Immunsystem die Progression maligner Tumore auf verschiedene Weise beeinflussen kann. Die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (NLR) und die Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio (TLR) spiegeln die systemische inflammatorische Response wider und erlangten kürzlich aufgrund ihres prognostischen Wertes bei verschiedenen Krebsentitäten Aufmerksamkeit. Das Ziel dieser Studie war zu klären, ob sich die präoperative NLR und TLR als Prädiktoren für das klinische Outcome von Kolonkarzinompatienten im Stadium II und III eignen und welcher Marker diesbezüglich höheren prognostischen Wert besitzt.

METHODEN Diese retrospektive Studie inkludierte insgesamt 246 Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II und III. Zur Analyse der Häufigkeitsassoziationen mit den klinisch-pathologischen Variablen Alter, Geschlecht, histologisches Grading, klinisches Stadium und adjuvante Chemotherapie wurden Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Mittels Kaplan-Meier-Kurven, uni- und multivariater Cox-Regressionsanalysen wurden Unterschiede im krankheitsfreien Überleben ("disease free survival", DFS) und im Gesamtüberleben ("overall survival" OAS) berechnet.

ERGEBNISSE In der univariaten Analyse war eine erhöhte NLR signifikant mit verkürztem DFS (Hazard Ratio (HR) 2.02, 95% Konfidenzintervall (KI) 1.22-3.32, $p=0.006$) assoziiert und behielt in der multivariaten Analyse die statistische Signifikanz (HR 1.94, 95% KI 1.06-3.55, $p=0.032$). Zwischen NLR und OAS wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden. Erhöhte Werte der TLR betrafen weibliche Patienten signifikant häufiger als männliche Patienten ($\chi^2=6.754$, $p=0.034$), waren aber weder mit DFS noch mit OAS assoziiert.

KONKLUSION Diese Ergebnisse zeigen, dass die präoperative NLR einen unabhängigen prognostischen Marker für das Rezidivrisiko von Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II und III darstellt und weiter für die klinische Routineanwendung evaluiert werden sollte, jedoch die präoperative TLR in unserer Studienkohorte keinen Einfluss auf das klinische Outcome hatte.

Abstract

BACKGROUND Estimation of prognosis in CRC patients by classical TNM-Staging is in many cases insufficient, especially patients in stage II and III have heterogeneous clinical outcome. Therefore evaluation of additional prognostic markers is considered to be important, not least in view of improving individual therapy adjustment in these stages. The immune system is generally known to influence the progression of cancer in different ways. The neutrophil-lymphocyte-ratio (NLR) and the platelet-lymphocyte-ratio (PLR) are markers of the systemic inflammatory response. They have recently gained attraction for their prognostic value in various cancer entities. The aim of this study was to investigate, whether the preoperative NLR and PLR could be used as predictors for clinical outcome in stage II and III colon cancer patients and to evaluate which marker has superior prognostic value.

METHODS This retrospective study included a total of 246 patients with stage II and III colon cancer. Chi-square-tests were performed to analyze associations with the clinicopathological factors age, gender, histological grading, clinical stage and adjuvant chemotherapy. Kaplan-Meier-curves and uni- and multivariate Cox-regression analyses were performed to calculate differences in disease free survival (DFS) and overall survival (OAS).

RESULTS In univariate analysis, the elevated NLR was significantly associated with decreased DFS (hazard ratio (HR) 2.02, 95% confidence interval (CI) 1.22-3.32, $p=0.006$) and remained significant in multivariate analysis (HR 1.94, 95% CI 1.06-3.55, $p=0.032$). There was no association found between NLR and OAS. An elevated PLR was significantly more frequent in female than in male patients ($\chi^2=6.754$, $p=0.034$), but was neither associated with DFS nor with OAS.

CONCLUSION These results show, that the preoperative NLR might be an independent prognostic marker for DFS in stage II and III colon cancer patients and should be further evaluated for application in clinical routine. In contrast, preoperative PLR did not predict clinical outcome in our study cohort.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Zusammenfassung	IV
Abstract.....	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Glossar und Abkürzungen	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
1. HINTERGRUND	1
1.1 Das Kolorektalkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.2.1 Allgemeine Risikofaktoren	2
1.1.2.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.1.3 Pathogenese und Molekularbiologie	3
1.1.4 Einteilung	5
1.1.4.1 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung.....	5
1.1.4.2 Histologische Einteilung.....	6
1.1.4.3 Grading	6
1.1.4.4 Lokalisation	6
1.1.5 Klinische Symptomatik	7
1.1.6 Metastasierung und Dissemination.....	7
1.1.7 Diagnostik.....	8
1.1.8 Therapie	8
1.1.8.1 Chirurgische Resektion.....	8
1.1.8.2 Chemotherapie	9
1.1.9 Prognose	11
1.2 Die tumorassoziierte Immunreaktion und ihre prognostische Bedeutung beim Kolorektalkarzinom	13
1.2.1 Bedeutung der unspezifischen zellulären Immunreaktion.....	14
1.2.1.1 Natürliche Killerzellen.....	15
1.2.1.2 Neutrophile Granulozyten.....	16

1.2.2	Bedeutung der spezifischen zellulären Immunreaktion	17
1.2.2.1	T-Lymphozyten	18
1.2.2.1.1	Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8 ⁺)	18
1.2.2.1.2	T-Helferzellen (CD4 ⁺).....	19
1.2.2.1.3	Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO ⁺)	20
1.2.2.1.4	Regulatorische T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ⁺).....	20
1.2.2.2	B-Lymphozyten	21
1.2.3	Bedeutung der Thrombozytose.....	22
1.2.3.1	Thrombozytose als tumorassoziiertes inflammatorisches Marker	22
1.2.3.2	Einfluss auf lokale Progression und Metastasierung	23
1.2.3.3	Stellenwert als Prognosemarker.....	25
1.2.4	Die lokale Immunreaktion und ihr prognostischer Stellenwert.....	26
1.2.5	Die systemische Immunreaktion und ihr prognostischer Stellenwert	27
1.2.5.1	Die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio	28
1.2.5.2	Die Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio.....	30
1.2.5.3	Risikostratifizierung im Stadium II und III	31
2.	MATERIAL und METHODEN	32
2.1	Studienziel	32
2.2	Datenerhebung	32
2.2.1	Patientendaten.....	33
2.3	Statistische Auswertung.....	34
2.3.1	Klinische Endpunkte	34
2.3.2	Statistische Analyse.....	34
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	Klinisch-pathologische Variablen.....	36
3.2	Die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio	38
3.3	Die Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio.....	39
3.4	Häufigkeitsassoziationen klinisch-pathologischer Variablen mit NLR und TLR.....	40
3.5	Überlebenskurven	41
3.5.1	Überlebensunterschiede in Bezug auf die NLR	42
3.5.2	Überlebensunterschiede in Bezug auf die TLR.....	44

3.6	Klinisches Outcome in der Cox-Regressionsanalyse	46
3.6.1	Prognostischer Wert der klinisch-pathologischen Variablen	46
3.6.2	Prognostischer Wert der NLR und TLR.....	47
3.6.3	Unabhängige Prognoseparameter	48
4.	DISKUSSION	50
4.1	Konklusion.....	63
5.	LITERATURVERZEICHNIS	65

Glossar und Abkürzungen

µl	Mikroliter
5-FU	5-Fluorouracil
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatöses Polyposi Coli-Gen (Tumorsuppressorgen)
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BRAF	Protoonkogen der RAF-Familie
bzw.	beziehungsweise
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CC	engl.: colon cancer
CD	engl.: cluster determinant
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIMP	CpG Insel-Methylator-Phänotyp
CRC	engl.: colorectal carcinoma
CRP	C-reaktives Protein
CSS	engl.: cancer-specific survival
CTL	engl.: cytotoxic T-lymphocytes
CTX	Chemotherapie
DCC	engl.: "deleted in colorectal cancer" (Tumorsuppressorgen)
DFS	engl.: disease free survival
dNLR	engl. derived neutrophil-to-lymphocyte-ratio
EGF	engl.: epidermal growth factor
EGFR	engl.: epidermal growth factor receptor
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FOLFOX	Therapieschema mit Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin
FOXP3 ⁺	Forkhead-Box-P3-Transkriptionsfaktor
GCSF	engl.: granulocyte colony stimulating factor

HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolorektalkarzinom
HR	engl.: hazard ratio
IL	Interleukin
JÜR	Jahres-Überlebensrate
KI	Konfidenzintervall
K-RAS	Protoonkogen der RAS-Familie
LMR	Lymphozyten-Monozyten-Ratio
mGPS	engl.: modified Glasgow prognostic score
MHC	engl.: major histocompatibility
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NKZ	Natürliche Killerzellen
NLR	Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OAS	engl.: overall survival
PDGF	engl.: platelet-derived growth factor
PFS	engl.: progression free survival
PLR	engl.: platelet-lymphocyte-ratio
RC	engl.: rectal cancer
RFS	engl.: recurrence free survival
TGF- β	engl.: transforming growth factor-beta
TLR	Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
u.a.	unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
vs.	versus
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die Adenom-Karzinom-Sequenz;modifiziert nach Resch et al. (16) und Siegenthaler et al. (17).....	4
Abbildung 2	Aktuelles Therapieschema beim CC; modifiziert nach Kurz-zur Hausen et al. (25).....	10
Abbildung 3	Balance zwischen fördernden und inhibierenden Effekten der Immunzellen auf das Tumorwachstum; modifiziert nach Grizzi et al. (39).....	14
Abbildung 4	Schematisches Modell der spezifischen und unspezifischen Immunreaktion auf das Tumorwachstum; modifiziert nach Nagtegaal et al. (46).....	15
Abbildung 5	Interaktionen zwischen Thrombozyten und Tumorzellen in der Blutstrombahn; Schematische Darstellung modifiziert nach Gay et al. (79).	24
Abbildung 6	Rezidiv-und Todesfälle in den Gruppen mit unterschiedlicher NLR	38
Abbildung 7	Rezidiv-und Todesfälle in den Gruppen mit unterschiedlicher TLR.....	39
Abbildung 8	Kaplan-Meier-Kurven für das DFS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender NLR.....	42
Abbildung 9	Kaplan-Meier-Kurven für das OAS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender NLR.....	43
Abbildung 10	Kaplan-Meier-Kurven für das DFS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender TLR.....	44
Abbildung 11	Kaplan-Meier-Kurven für das OAS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender TLR.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Stadieneinteilung nach UICC (2010); modifiziert nach Fibbe et al. (6)	5
Tabelle 2	WHO-Grading des CRC (8)	6
Tabelle 3	Operative Standardverfahren beim CC, je nach Lokalisation des Primärtumors (6,9)	9
Tabelle 4	Verteilung klinisch-pathologischer Variablen und Häufigkeitsassoziationen mit NLR.....	40
Tabelle 5	Verteilung klinisch-pathologischer Variablen und Häufigkeitsassoziationen mit TLR	41
Tabelle 6	Verteilung der klinisch-pathologischen Variablen, NLR und TLR und ihre Assoziation mit DFS und OAS in der univariaten Analyse	47
Tabelle 7	Assoziationen klinisch-pathologischer Variablen, NLR und TLR mit DFS und OAS in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse	49
Tabelle 8	Wichtige potentielle Komorbiditäten, die die NLR beeinflussen können.....	60

1. HINTERGRUND

1.1 Das Kolorektalkarzinom

Zum besseren Verständnis dieser Arbeit wird dem Leser zunächst grundlegendes klinisch-pathologisches Wissen über das Kolorektalkarzinom vermittelt.

Dabei sei erwähnt, dass in der Literatur das Kolonkarzinom ("colon cancer", CC) und das Rektumkarzinom ("rectal cancer", RC) vorwiegend unter der Gesamtheit Kolorektalkarzinom ("colorectal cancer", CRC) zusammengefasst werden, da sie sich klinisch bis auf Lokalisation und Metastasierungsmuster nur wenig unterscheiden. Allerdings bestehen Differenzen in der Diagnostik und nicht zuletzt in der Behandlung. Da wir in unserer Studie nur Patienten mit CC inkludierten, wird in diesen Punkten nicht gesondert auf das RC eingegangen.

1.1.1 Epidemiologie

Das CRC ist in Europa bei Männern nach dem Lungen- und Prostatakarzinom die dritthäufigste und bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste maligne Tumorerkrankung (1-3). Im Jahr 2008 lag die geschätzte Inzidenz weltweit bei 1,2 Millionen, die 5-Jahres Prävalenz bei 3,26 Millionen und die Mortalität bei 608.000 Fällen (3,4). Die niedrigsten Inzidenzraten werden in Entwicklungsländern (Afrika, Süd- und Zentralasien), die höchsten in "westlichen Ländern" (Europa, Nordamerika, Australien, Neuseeland) verzeichnet (3). Im internationalen sowie regionalen Vergleich liegt die Inzidenz bei Männern etwas höher als bei Frauen (3,4).

2011 wurden in Österreich 4348 Neuerkrankungen gezählt, davon 1883 bei Frauen und 2465 bei Männern, die Anzahl der Todesfälle belief sich auf 2175 (5).

Von den 1960er- bis in die 1990er-Jahre stieg die Inzidenz deutlich, seither stagniert bzw. sinkt sie (6). Obwohl seit den 1980er-Jahren auch eine rückläufige Tendenz der Mortalität zu erkennen ist, steht das CRC nach dem Lungen- und Brustkrebs weiterhin an zweiter Stelle der Krebstodesfälle (1,5).

90% der CRC manifestieren sich nach dem 50. Lebensjahr. Die Inzidenz verdoppelt sich ab dem 40. Lebensjahr alle 10 Jahre (7). Das durchschnittliche Erkrankungsalter ist bei Männern das 69. Lebensjahr, bei Frauen das 75. Lebensjahr (8).

1.1.2 Ätiologie

Allgemein wird das Lebenszeitrisko an CRC zu erkranken auf 5-6% geschätzt (6,8,9).

5-10% der CRC entstehen im Zusammenhang mit hereditären Krebsyndromen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) oder dem hereditären nicht-polypösen Kolorektalkarzinom (HNPPC), bei 1-2% liegt eine chronisch entzündliche Darmerkrankung zu Grunde. Die meisten kolorektalen Karzinome (88-94%) entwickeln sich allerdings nicht auf dem Boden einer prädisponierenden Vorerkrankung (10). Erwähnenswert ist zudem, dass bei circa einem Viertel aller Patienten mit CRC zumindest eine familiäre Vorbelastung besteht, in den übrigen Fällen kommt es zu einer sporadischen Karzinogenese (6).

1.1.2.1 Allgemeine Risikofaktoren

Bei der großen Gruppe der sporadisch entstehenden CRC spielen neben dem Einfluss genetischer Faktoren vor allem Umwelteinflüsse, Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten eine signifikante Rolle. Eine fett- und cholesterinreiche Ernährung mit häufigem Fleischverzehr stellt einen signifikanten Risikofaktor dar, einem hohen Nahrungsanteil an pflanzlichen Nährstoffen (Ballaststoffen) wurde lange ein protektiver Effekt zugesprochen, der allerdings heute von einigen Autoren angezweifelt wird (9,10). Die karzinogene Wirkung von Nahrung mit hohem Anteil an Fett und Cholesterin beruht auf zwei Aspekten: Einerseits steigert sie die hepatische Produktion und Ausscheidung von Gallensäuren und andererseits folgt dem Abbau durch Darmbakterien eine Kumulation von toxischen sekundären Gallensäuren, welche als potentielle Karzinogene gelten (9).

Da Häm die Bildung von kanzerogenen Nitroverbindungen fördert, scheint besonders der Genuss von rotem Fleisch risikobehaftet zu sein (9,11). Ferner ist die Art der Fleischzubereitung von Bedeutung: Beim Braten und Grillen mit sehr hohen Temperaturen entstehen aus tierischem Eiweiß kanzerogene Verbindungen wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische Amine und Nitrosamine (9).

Wie bei vielen anderen Malignomen sind auch beim CRC klassische Risikofaktoren wie Adipositas, Bewegungsmangel und chronischer Nikotin- und Alkoholabusus von Bedeutung (9,12). Raucher haben ein erhöhtes Risiko sowohl für Kolonpolypen als auch für CRC und Alkoholkonsum steigert, abhängig von Menge, das Erkrankungsrisiko insbesondere für das RC (10,13).

Nach heutigem Wissenstand wirken Kalzium und Folsäure protektiv, Gallensäuren fördern die Karzinogenese (10). Bemerkenswerterweise führte die Einnahme von Acetylsalicylsäure oder anderen nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) in epidemiologischen Studien zu einer Inzidenzsenkung von ca. 50% (9).

1.1.2.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Das Risiko einer Karzinomentwicklung ist bei Colitis ulcerosa um das 20-fache erhöht und hängt u.a. von Dauer und Ausdehnung der Entzündung, sowie vom synchronen Vorliegen einer primär sklerosierenden Cholangitits ab. Bei Morbus Crohn mit Kolonbefall ist das Karzinomrisiko, je nach Erkrankungsdauer, vergleichbar hoch (6,9,10).

Man weiß, dass das CRC bei Patienten mit Colitis ulcerosa in seiner Karzinogenese häufig nicht dem klassischen Weg der Adenom-Karzinom-Sequenz folgt, sondern sich meist aus flachen Mukosadysplasien entwickelt, die sehr schwer endoskopisch detektierbar sind (12). Synchroner Zweit- bzw. Mehrfachkarzinome sind aufgrund des flächigen Dickdarmbefalls keine Seltenheit (10).

1.1.3 Pathogenese und Molekularbiologie

Der Großteil der CRC entwickelt sich aus Adenomen über den Prozess der Adenom-Karzinom-Sequenz, ein Begriff der 1951 von Jackman et al. (14) eingeführt wurde. Dieses Modell der Mehrschrittkarzinogenese erklärt die sukzessive Abfolge von Veränderungen von normaler Mukosa, über niedrig- und folglich höhergradige Dysplasien bis hin zum invasiven Karzinom, das vorliegt, sobald die Muscularis mucosae durchbrochen und die Submukosa infiltriert ist (10,15).

Vogelstein et al. (18) entwickelten 1988 ein genetisches Modell, das analog zur histologischen Adenom-Karzinom-Sequenz die mehrstufigen Häufungen genetischer Alterationen bei der Entstehung eines CRC beschreibt (vgl. Abbildung 1). Als Folge chromosomaler Instabilität kommt es u.a. sowohl zu einer Aktivierung von Onkogenen (u.a. K-RAS) als auch zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (u.a. "Adenomtöses Polyposi Coli" (APC), "deleted in colorectal cancer" (DCC), p53), wobei die Akkumulation dieser Mutationen und nicht die zeitliche Reihenfolge des Auftretens für die Malignität von Bedeutung ist. Als Schlüsselereignis gilt der Verlust des APC-Gens (8,10).

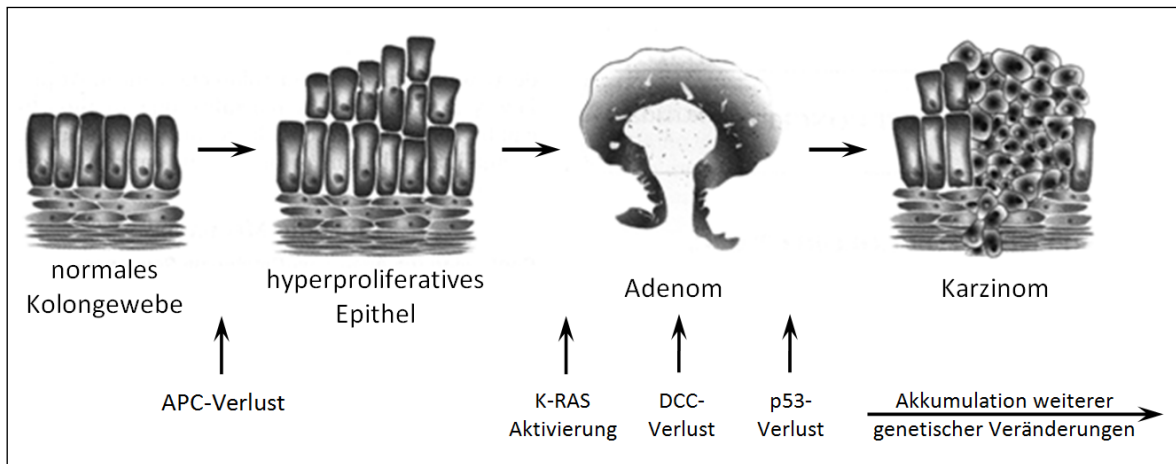


Abbildung 1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz; modifiziert nach Resch et al. (16) und Siegenthaler et al. (17)

Adenome ("Polypen") entstehen durch epitheliale Hyperproliferation und sind in 60% Vorläuferläsionen des CRC (6,8). Die allgemeine Prävalenz kolorektaler Adenome steigt mit zunehmenden Alter. Histologisch unterscheidet man zwischen tubulären (50%), villösen (15%) und tubulovillösen (35%) Adenomen. Villöse Adenome, Adenome > 1 cm und jene mit hochgradigen Epitheldysplasien tragen erhöhtes Entartungsrisiko. Die Transformation vom benignen Adenom zum Karzinom dauert 5 bis 10 Jahre (12).

Vor kurzem entdeckte die molekulargenetische Forschung neue Karzinogenesewege, in denen die sog. Mikrosatelliteninstabilität (MSI) von besonderer Bedeutung ist. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen in nicht-kodierenden Bereichen der DNA, die besonders anfällig für spontane Replikationsfehler ("Instabilität") sind (8,9).

Über den "alternativen serratierten Karzinogeneseweg" entwickelt sich aus einem sessilen serratierten Adenom ein CRC mit meist hoher Mikrosatelliteninstabilität. Die Mutation des BRAF-Protoonkogens spielt dabei eine Schlüsselrolle, sekundäre genetische Abberation ist die Hypermethylierung von CpG-Inseln der DNA (CpG Insel-Methylator-Phänotyp, "CIMP"), die eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgen zur Folge hat (8,19).

Beim CRC des Mischtyps treten molekulargenetische Läsionen beider Karzinogenesewege kombiniert auf, ausschlaggebend sind die Aktivierung des K-RAS-Protoonkogens und CpG-Hypermethylierungen. Als Vorläuferläsionen gelten villöse oder "traditionelle serratierte" Adenome, der Mikrosatellitenstatus kann sowohl niedrig instabil als auch stabil sein (8).

1.1.4 Einteilung

1.1.4.1 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung

Die TNM-Klassifikation ist für das klinische und pathologische Staging von großer Bedeutung und wird von der American Joint Committee on Cancer (AJCC) und der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) regelmäßig überarbeitet. Die aktuelle siebte Version aus dem Jahr 2010 wird in Tabelle 1 abgebildet. Die Variablen T (Tumor), N (Node) und M (Metastasis) beschreiben die Invasionstiefe des Primärtumors, die Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Vorliegen von Fernmetastasen. Die gängige klinische UICC-Stadieneinteilung basiert auf dieser TNM-Klassifikation (20,21).

Die Dukes-Klassifikation ist mittlerweile obsolet, zumal sie den Anforderungen für eine differenzierte Therapieplanung nicht gerecht wird. Da sie jedoch nach wie vor Anwendung in der Klinik und in Studien findet, wird sie ebenfalls in Tabelle 1 angeführt (12,22).

Tabelle 1 Stadieneinteilung nach UICC (2010); modifiziert nach Fibbe et al. (6)

UICC	T	N	M	Dukes	Anmerkung
0	Tis	N0	M0		
I	T1-2	N0	M0	A	Beschränkt sich auf Mucosa und Submucosa, maximal Infiltration der Muscularis mucosae
IIA	T3	N0	M0	B	Infiltration in Subserosa oder in perikolisches, perirektales Fettgewebe
IIB	T4a	N0	M0	B	Perforation des viszeralen Gewebes
IIC	T4b	N0	M0	B	Infiltration in angrenzende Organstrukturen
IIIA	T1 T1-2	N2a N1a	M0 M0	C	Lymphknotenmetastasen, unabhängig vom Primärtumor N1a: 1 LK N1b: 2-3 LK N1c: Satelliten im Fettgewebe N2a: 4-6 LK N2b: ≥7 LK
IIIB	T1-2 T2-3 T3-4a	N2b N2a N1	M0 M0 M0	C	
IIIC	T4a T4b T3-4b	N2a N1 N2b	M0 M0 M0	C	
IVA	Tx	Nx	M1a	D	Fernmetastase (1 Organ); unabhängig von T oder N
IVB	Tx	Nx	M1b	D	Fernmetastasen (≥2 Organe/Peritoneum); unabhängig von T oder N

1.1.4.2 Histologische Einteilung

Mit 85-90% ist das Adenokarzinom der weitaus häufigste histologische Typ, gefolgt vom muzinösem Adenokarzinom (5-10%) und Siegelringkarzinom (1%). Das Plattenepithelkarzinom und undifferenzierte, kleinzellige oder adenosquamöse Karzinome sind histologische Differenzierungen, die zusammen nur 1-2% der Fälle betreffen (10,12,22).

1.1.4.3 Grading

Je geringer die Differenzierung eines CRC, desto kleiner ist der Flächenanteil, der bei der histologischen Beurteilung glanduläre Strukturen aufweist (8). Tabelle 2 zeigt die gängige Einteilung der Differenzierungsgrade nach der World Health Organization (WHO).

Tabelle 2 WHO-Grading des CRC (8)

Grading	Differenzierung	Fläche mit glandulären Strukturen
G1	Gut	95%
G2	Mäßig	50-95%
G3	Gering	5-50%
G4	Undifferenziert	<5%

Oft werden G1- und G2-differenzierte Karzinome als "Low-Grade"-Karzinome und G3- und G4-differenzierte Karzinome als "High-Grade"-Karzinome zusammengefasst (8). Neben der Infiltrationstiefe (T-Stadium) gilt auch das Grading als histologischer Prognoseparameter: Je schlechter die Differenzierung, desto höher ist das Metastasierungspotential des primären CRC (10).

1.1.4.4 Lokalisation

15% der CRC entstehen im Colon ascendens, 8% im Colon transversum, 7% im Colon descendens und 20% im Colon sigmoideum. Etwa die Hälfte sind RC, deren aboraler Rand definitionsgemäß bis 16 cm proximal der Anokutanlinie liegt, gemessen mit einem starren Rektoskop (10).

1.1.5 Klinische Symptomatik

Das CRC wird meist erst im fortgeschrittenen Stadium durch ein unspezifisches Beschwerdebild symptomatisch. In circa der Hälfte der Fälle macht es sich durch perianalen Blutabgang (Hämatochezie oder Melaena) bzw. bei okkulten Blutverlusten durch eine mikrozytäre Anämie mit Symptomen wie Müdigkeit und Schwäche bemerkbar (6,8). Ein Viertel der Patienten zeigt veränderte Stuhlgewohnheiten im Sinne einer Obstipation oder Diarrhoe. Die Symptomatik ist zudem von der Lokalisation des Karzinoms abhängig: Während linksseitige Tumore häufig perianalen Blutabgang und krampfartige Bauchschmerzen verursachen, werden rechtsseitige Tumore meist erst sehr spät symptomatisch (8).

Selten stellen sich Patienten mit Ikterus bzw. Knochenschmerzen als Zeichen einer fortgeschrittenen Metastasierung vor, vereinzelt zeigt sich das klinische Bild eines kompletten Ileus als primäres Symptom (6). Zu den Spätsymptomen zählen Gewichtsverlust, reduzierter Ernährungszustand und Schmerzen (30-50%) (8).

In Einzelfällen treten Fieber unklarer Genese, Septikämien und Symptome im Rahmen einer Fistelbildung auf. Besteht bei Diagnosestellung bereits eine klinische Symptomatik, so spricht das für eine schlechte Prognose (6).

1.1.6 Metastasierung und Dissemination

Über die Hälfte der neu diagnostizierten CRC metastasieren im Krankheitsverlauf, bei circa jedem fünften Patienten liegen bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen vor (6).

Die lokale Ausbreitung erfolgt in das perirektale und perikolische Fettgewebe sowie über die Lymphbahnen und bei vaskulärer Invasion auf hämatogenem Weg. Der Lymphknotenbefall hat besondere prognostische Relevanz und ist beim CC ausschlaggebend für den Entscheid zur adjuvanten Chemotherapie. Fernmetastasen treten beim CC bevorzugt in Leber, Lunge und Peritoneum auf, in seltenen Fällen in ZNS und Knochen. Beim RC steht das lokoregionäre Rezidiv mit Peritonealkarzinose im Vordergrund, bei der Hälfte der Patienten finden sich pulmonale und hepatische Metastasen (9).

1.1.7 Diagnostik

Bei Verdacht auf CRC erfolgt im ersten Schritt eine klinisch-physikalische Untersuchung und eine Anamneseerhebung mit besonderem Augenmerk auf die Stuhlgewohnheiten. Zudem sollte die familiäre Anamnese in Hinblick auf genetische Dispositionen erhoben werden (6,12). Der Stellenwert der digital-rektalen Untersuchung ist nicht zu unterschätzen, etwa 20% aller CRC können auf diese Weise diagnostiziert werden (10).

Diagnostischer Goldstandard ist die komplette ("hohe") Koloskopie, die in Österreich als Screening-Untersuchung ab dem 50. Lebensjahr alle 7-10 Jahre empfohlen wird (23). Diese endoskopische Abklärung ist in jedem Verdachtsfall erforderlich, da sie die genaue Beurteilung der Lokalisation, eine histologische Diagnosesicherung mittels Probiopsien und die Detektion von seltenen synchronen Karzinomen ermöglicht (6,8). Abdomensonographie und Thorax-Röntgen in zwei Ebenen sind ebenfalls obligat und dienen zur Beurteilung der regionären Ausbreitung und Detektion von pulmonalen, hepatischen und peritonealen Metastasen (10).

Fakultativ können zum Staging auch CT bzw. MRT-Untersuchungen des Abdomens und Beckens durchgeführt werden, beim Sigmakarzinom wird zusätzlich das Urinsediment untersucht. Bei Verdacht auf Infiltration von Nachbarorganen ist eine zystoskopische und gynäkologische Abklärung indiziert (12).

In Abhängigkeit vom Stadium können die Tumormarker "Carcinoembryonales Antigen" (CEA) und/oder "Carbohydrate-Antigen 19-9" (CA 19-9) bei manchen Patienten erhöht sein. Aufgrund geringer Spezifität sind sie allerdings für die Früherkennung nicht geeignet, sondern dienen nur der postoperativen Verlaufskontrolle (7,24).

Anhand der Ergebnisse der genannten Untersuchungen erfolgt das Staging gemäß der TNM-Klassifikation (9).

1.1.8 Therapie

1.1.8.1 Chirurgische Resektion

Eine potenziell kurative Resektion ist bei 75% der CRC-Patienten möglich, bei 15-20% muss ein palliativer chirurgische Ansatz verfolgt werden. 5-10% der Patienten sind bei Diagnosestellung bereits lokal inoperabel und können bei obstruktiver Symptomatik nur mit der Anlage eines Stomas versorgt werden (10).

Therapie der Wahl beim CC ist das radikale chirurgische Vorgehen nach onkologischen Grundsätzen mit "en bloc"-Entfernung des tumortragenden Darmsegments und seiner Lymphabflussgebiete. Dabei ist das Ziel eine R0-Resektion in "No-Touch-Technik" mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 2 cm. Mit Lymphknotenbefall sollte in bis zu 10 cm Distanz zum Primärtumor gerechnet werden, der Nachweis von ≥ 12 resezierten Lymphknoten gilt als Qualitätsstandard (6,9).

Wie in Tabelle 3 veranschaulicht, wird bei unterschiedlichen Tumorlokalisationen, je nach erforderlicher Resektion des versorgenden Gefäßsystems und des Lymphabstromgebietes, das entsprechende Ausmaß der Darmresektion festgelegt (6).

Tabelle 3 Operative Standardverfahren beim CC, je nach Lokalisation des Primärtumors (6,9)

Tumorlokalisation	Operatives Standardverfahren
Zäkum und Colon ascendens	Hemikolektomie rechts
Rechte Kolonflexur und prox. Colon transversum	Erweiterte Hemikolektomie rechts bis nahe oder einschließlich der linken Flexur
Colon transversum	Transversumresektion
Linke Kolonflexur	Erweiterte Hemikolektomie links mit bzw. ohne Resektion der rechten Flexur
Colon descendens und proximales Sigma	Hemikolektomie links
Mittleres und distales Sigma	(radikale) Sigmaresektion

Erfahrene Chirurgen bieten heute neben den klassischen offenen Resektionsverfahren auch laparoskopische Operationen für selektionierten Patienten an (8). Bei fortgeschrittenem CRC kann eine kurative Resektion von Leber- und Lungenmetastasen in der gleichen Operation durchgeführt werden, sofern eine Entfernung im Gesunden erzielt wird und das verbleibende Organvolumen für die Funktionserhaltung ausreichend ist (25).

In manchen Fällen ermöglicht eine neoadjuvante Chemotherapie die Resektabilität durch präoperative Verkleinerung der Herde (10).

1.1.8.2 Chemotherapie

Die adjuvante Chemotherapie gilt beim CC als Standard im Stadium III, da sie das Rezidivrisiko um ca. 30% und die Mortalität um ca. 20-30% senkt. Die Durchführung wird unabhängig vom Alter des Patienten empfohlen, Voraussetzung ist allerdings eine R0-Resektion (6,12).

Im Stadium II (kein Lymphknotenbefall) wird die Anwendung der adjuvanten Chemotherapie hinsichtlich eines Überlebensvorteils kontrovers diskutiert und ist derzeit nur in bestimmten Risikosituationen indiziert (13,26,27). Patienten im Stadium I erhalten keine adjuvante Chemotherapie (8).

First-Line-Therapie im Stadium III ist eine Kombination aus Folinsäure, 5-Fluorouracil ("5-FU") und Oxaliplatin ("FOLFOX"-Schema) über 6 Monate (12 Zyklen). Bei Kontraindikationen im Stadium III und bei Risikofaktoren im Stadium II wird eine Monotherapie mit Fluoropyrimidinen (5-FU bzw. Folinsäure) durchgeführt (8,13).

Die Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie im Stadium II stellt eine große Herausforderung für die behandelnden Onkologen dar. Folgende klinisch-pathologische Kriterien, die für ein hohes Risiko sprechen, werden von der "American Society of Clinical Oncology" (ASCO) zur Entscheidungshilfe empfohlen: T4-Stadium, schlechte histologische Differenzierung, unvollständige Lymphadenektomie sowie Obstruktion, Perforation und klinische Präsentation (27).

Im Stadium IV kann eine neoadjuvante Chemotherapie mit dem Ziel der sekundären Resektabilität durchgeführt werden. Bleibt diese erfolglos, so ist zur Überlebensverlängerung eine palliative Chemotherapie indiziert. Die gängigsten palliativen Chemotherapeutika sind 5-FU, Oxaliplatin und Irinocetan in Kombination mit Antikörpern (Bevacizumab oder Cetuximab) (6,25).

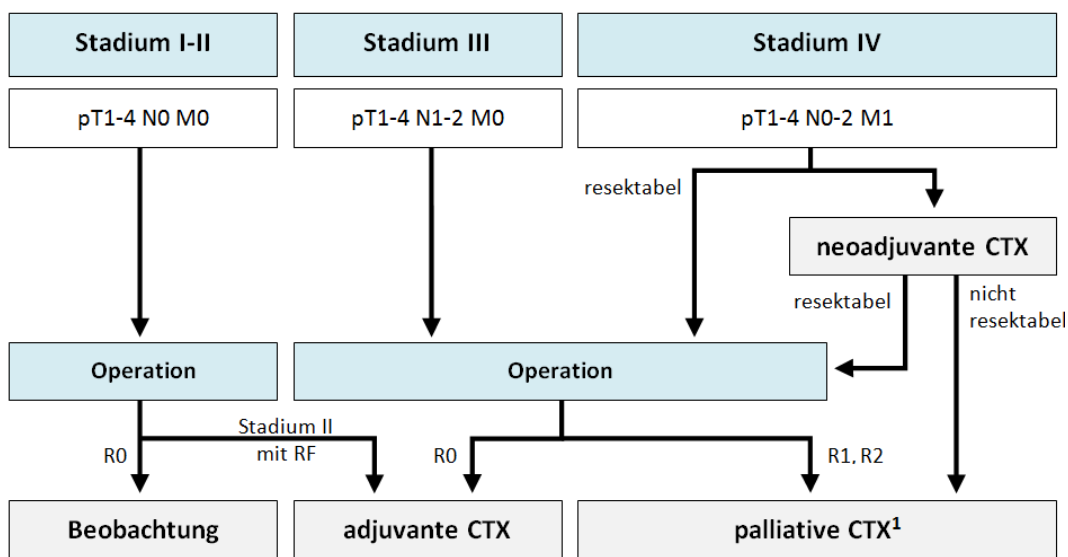


Abbildung 2 Aktuelles Therapieschema beim CC; modifiziert nach Kurz-zur Hausen et al. (25).
 CTX=Chemotherapie; R0=potentiell kurative Resektion, kein Residualtumor;
 R1=mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor; R2= makroskopisch nachgewiesener Residualtumor; RF=Risikofaktoren; ¹ggf. palliative Operation

1.1.9 Prognose

Trotz früher Diagnostik durch Einführung von flächendeckenden Screeningprogrammen und großer Fortschritte in der operativen und chemotherapeutischen Behandlung, ist das CRC europaweit noch immer die maligne Tumorentität mit der zweithöchsten Mortalität (1). Während die Prognose im Stadium I grundsätzlich sehr gut und im Stadium IV in vielen Fällen infaust ist, wird bei Patienten im Stadium II und III ein heterogenes Outcome beobachtet.

Unter standardisierter Therapie beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) im Stadium I 90-95%, im Stadium II 60-80% und Stadium III 30-50%. Mit dem Auftreten von Fernmetastasen sinkt die 5-JÜR bis auf unter 10% (25). Das Outcome des RC ist mit einer 5-JÜR von ca. 67% generell etwas günstiger als die des CC (ca. 64%) (28).

In unser Studienkollektiv wurden nur Patienten mit einem CC im Stadium II und III inkludiert. Nach derzeitigem Wissensstand sprechen bei diesen Patienten folgende klinisch-pathologische Faktoren für eine ungünstige Prognose (29):

- Hohes Tumorstadium
- Schlechte histologische Differenzierung ("High Grade")
- Venöse, lymphatische und perineurale Invasion
- Niedrige Anzahl resezierter Lymphknoten
- Inkomplette Tumorresektion (R1/R2)
- Notoperation (aufgrund von Obstruktion oder Perforation)
- Hoher präoperativer CEA-Wert (6,26,30-33)

In zahlreichen Studien wurde der prognostische Wert verschiedener molekularer Biomarker, wie z.B. MSI-Status, K-RAS, BRAF, "epidermal growth factor receptor" (EGFR), oder CIMP, belegt, allerdings blieb deren klinische Routineanwendung nicht zuletzt aufgrund begrenzter Verfügbarkeit, hoher Kosten und fehlender Standardisierung limitiert (19,29,34).

Mittlerweile stellt sich das herkömmliche UICC-TNM-Staging für die präzise Prognoseabschätzung und klinische Therapieentscheidung als unzureichend heraus, da Patienten im selben Stadium, wie bereits erwähnt, äußerst heterogenes klinisches Outcome zeigen (35,36).

Zur Identifizierung von Hochrisiko-Patienten und zur Optimierung der Therapiewahl bedarf es somit zusätzlicher Prognosemarker. Vermutlich werden in der derzeitigen Risikostratifizierung nicht alle Faktoren, die die Prognose von CRC Patienten beeinflussen können, berücksichtigt (35). Dazu zählen unspezifische und spezifische Immunzellen sowie Thrombozyten, die großen Einfluss auf die Progression von Malignomen nehmen können (37).

Das folgende Kapitel befasst sich mit den komplexen Interaktionen zwischen malignen Zellen, Leukozyten und Thrombozyten und erläutert den Stellenwert gewisser inflammatorischer Marker als potentielle prognostische Faktoren.

1.2 Die tumorassoziierte Immunreaktion und ihre prognostische Bedeutung beim Kolorektalkarzinom

Im Jahre 1863 entdeckte der deutsche Arzt Rudolf Virchow Leukozyten in Tumorgewebe und formulierte erstmals einen Zusammenhang zwischen Krebs und Entzündung. Studien der letzten zwei Jahrzehnte verstärkten Virchows Hypothese und somit gewinnen heute immunologische Aspekte zunehmenden Stellenwert in der Onkologie (38).

Schon vor langem erkannte man in histologischen Beobachtungen, dass sich das Immunsystem an Pathogenese, Überwachung und Progression von CRC aktiv beteiligt (39). Das höhere Karzinomrisiko bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung und die Erkenntnis aus epidemiologischen Studien, dass die längerfristige Einnahme von NSAR mit geringerer Inzidenz gewisser Tumorentitäten, mitunter CRC, korreliert, spiegelt die Bedeutung der chronischen Entzündung als Risikofaktor für die Karzinogenese wider (10,40).

Die Mikroumgebung eines Tumors beeinflusst dessen Wachstum, Invasion und Metastasierung und besteht aus Zellen unterschiedlicher Herkunft, die die Tumormatrix sowie vaskuläre, neurologische und lymphatische Netzwerke bilden. Diese Strukturen gewährleisten die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen, können aber zugleich die Dissemination von Tumorzellen erleichtern. Sobald Krebszellen über die Muscularis mucosae die Submucosa invadieren und CRC klinisch maligne wird, lösen lokal infiltrierende Immunzellen eine Entzündungsreaktion aus, die neben der leukozytären Infiltration auch ausgeprägte Zytokinaktivität, Gewebsmodifizierung und Angiogenese umfasst (15,40,41). Im Rahmen dieser tumorassoziierten Immunreaktion herrschen komplexe Interaktionen zwischen malignen Zellen und lokal infiltrierenden Leukozyten, welche sowohl tumorfördernde als auch -kontrollierende Effekte zur Folge haben können (15,41).

Die Immunreaktion auf ein Malignom bleibt allerdings selten lokal begrenzt. Aggressives lokales Wachstum geht mit Tumornekrose und Gewebszerstörung einher und triggert sekundär über einen Konzentrationsanstieg zirkulierender Entzündungsmediatoren eine systemische Entzündungsreaktion ("systemische inflammatorische Response"), die sich mitunter durch eine erhöhte Anzahl an Leukozyten und Thrombozyten und eine gesteigerte Konzentration an Akut-Phase-Proteinen im Blut auszeichnet. Diese systemische

Immunreaktion ist von Bedeutung, da sie zusätzlich zur lokalen Immunreaktion Einfluss auf die Tumorprogression nehmen kann und klinisch leichter messbar ist (42-44).

Das Zusammenspiel spezifischer und unspezifischer Immunzellen erlaubt eine effektive Bekämpfung maligner Zellen (45). Gewisse Leukozyten können allerdings auch Gegenteiliges bewirken. So stehen tumorfördernde und -hemmende Einflüsse der verschiedenen Immunzellen in einem Gleichgewicht, das sowohl zugunsten der Tumorprogression als auch der Tumorregression verschoben sein kann (vgl. Abbildung 1) (39).

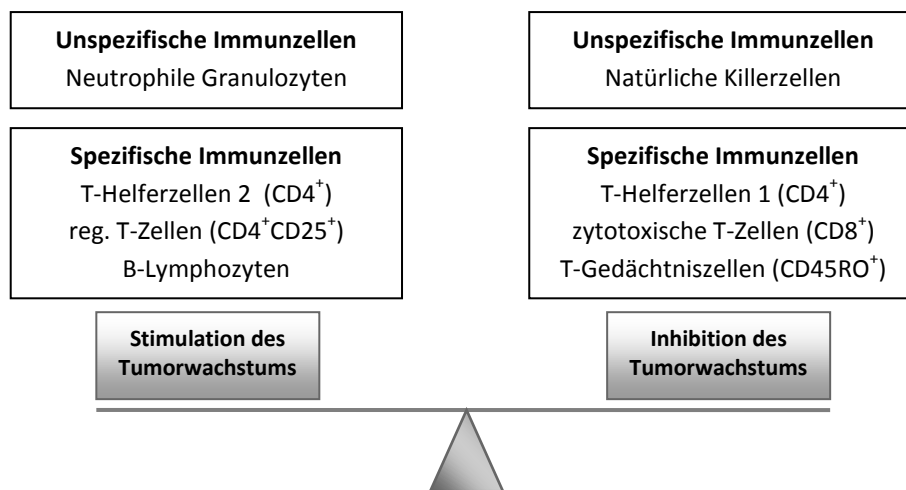


Abbildung 3 Balance zwischen fördernden und inhibierenden Effekten der Immunzellen auf das Tumorwachstum; modifiziert nach Grizzi et al. (39);
CD=cluster determinant (s. Kapitel 1.2.2.1)

Im Rahmen dieser Studie wurden ausschließlich neutrophile Granulozyten, Lymphozyten (vgl. Abbildung 3) und Thrombozyten in ihrem Einfluss auf Progression und Prognose des CRC untersucht. Zum besseren Verständnis dieser Arbeit erläutert das folgende Kapitel die Funktion dieser Zellen in der Tumormunität und ihre prognostische Bedeutung beim CRC.

1.2.1 Bedeutung der unspezifischen zellulären Immunreaktion

Die erste Reaktion auf maligne Zellverbände geschieht durch das angeborene (unspezifische) Immunsystem (39). Das invasive Wachstum des Tumors führt zu lokalen Gewebsschäden mit Hypoxie und Zellnekrose und löst auf diese Weise eine unspezifische Immunreaktion aus. Zusätzlich können von malignen Zellen produzierte Zytokine eine Reaktion des angeborenen Immunsystems hervorrufen (vgl. Abbildung 4) (46,47).

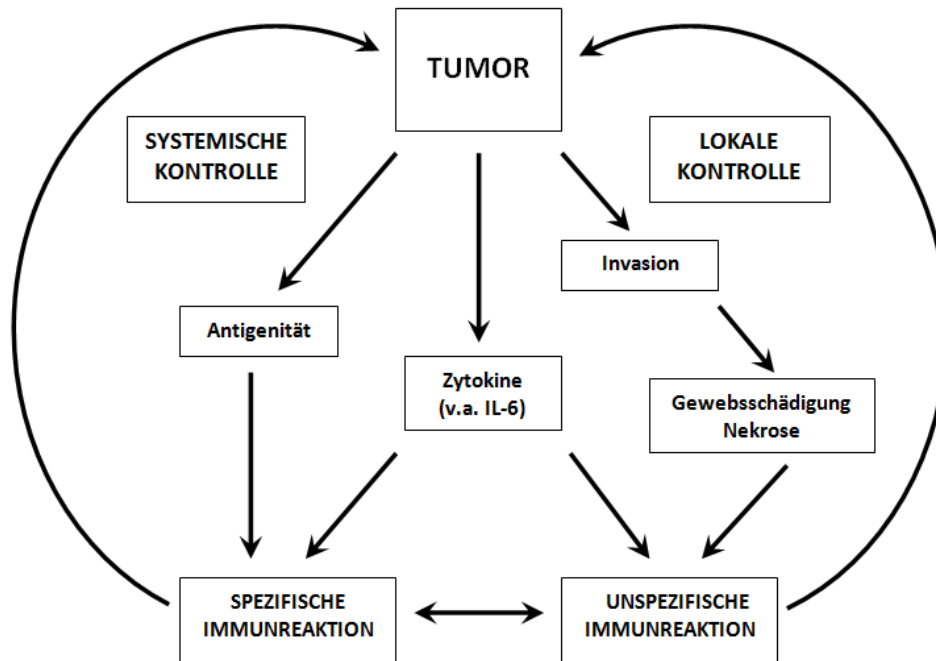


Abbildung 4 Schematisches Modell der spezifischen und unspezifischen Immunreaktion auf das Tumorwachstum; modifiziert nach Nagtegaal et al. (46)

Unspezifische Immunzellen besitzen die Fähigkeit abnorme Zellverbände sofort und unabhängig von vorhergehender Antigenpräsentation zu bekämpfen. Neben diesen tumoriziden Eigenschaften fördert das angeborene Immunsystem allerdings auch die Angiogenese zur Geweberekonstruktion, ein Mechanismus, der dem Tumorwachstum aufgrund vermehrter Nährstoffzufuhr wiederum zu Gute kommt (37).

1.2.1.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NKZ) sind granuläre Lymphozyten, denen eine bedeutende Rolle in der unspezifischen Tumorabwehr zugesprochen wird, da sie maligne Zellen schnell durch direkten Zellkontakt, ohne Antigenpräsentation und MHC-Restriktion (s. Kapitel 1.2.2), lysieren können (15,37,39). Außerdem fördern sie die Aktivierung spezifischer Immunzellen. Über bestimmte Liganden der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie können NKZ die Apoptose ihrer Zielzellen induzieren, welche dann von Monozyten phagozytiert und als Antigene T-Lymphozyten präsentiert werden (19).

Beim CRC ist eine hohe Anzahl lokal infiltrierender NKZ mit einer besseren Prognose assoziiert, auch die Anzahl der NKZ im peripheren Blut gilt als wesentlicher Prognoseindikator für das OAS. Darüber hinaus wurde eine schwache präoperative NKZ-Aktivität bei Patienten, deren CRC kurativ reseziert wurde, mit einer erhöhten Rezidivrate

in Verbindung gebracht. Mit der Progression der Krankheit sinkt die Anzahl der zirkulierenden NKZ und kann durch eine 5-FU-basierte Chemotherapie wieder erhöht werden (37,39,48,49).

1.2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten, kurz "Neutrophile", stellen die größte leukozytäre Subpopulation dar und bilden etwa 15% des CRC-assoziierten Immuninfiltrates (37,39,50). Sie sind grundsätzlich an der primären unspezifischen Abwehr gegen infektiöse Mikroorganismen beteiligt. Neben dieser bakteriziden Funktion können sie neoplastische Zellen eliminieren, eine Entzündungskaskade auslösen und spezifische Immunzellen aktivieren (50-52). Neutrophile fördern die Tumorangiogenese durch Produktion von proangiogenetischen Faktoren (u.a. VEGF und Interleukin (IL)-8) und setzen bestimmte Proteasen, wie neutrophile Elastase und Metalloproteinase frei, die Tumordinvasion und Metastasierung steigern (51,53,54). Seit längerem ist bekannt, dass sie auch fähig sind, die Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten zu hemmen (55). Außerdem wurde im Tiermodell gezeigt, dass Neutrophile Einfluss auf die genetische Instabilität von Tumoren nehmen können (51) und in Gegenwart von Amin-bildenden Bakterien des Dickdarms kanzerogene N-Nitrosamine produzieren (50).

Aus diesen Erkenntnissen geht hervor, dass neutrophile Granulozyten sowohl protumorale als auch antitumorale Funktionen besitzen, dementsprechend wurden sie, je nach Tumorentität und Lokalisation, mit guter als auch mit schlechter Prognose assoziiert (56,57). Auch beim CRC finden sich widersprüchliche Studienergebnisse zum Einfluss neutrophiler Granulozyten auf das Outcome (51,57).

Erstaunlicherweise wurde in zwei Studien eine vermehrte peritumorale Ansammlung neutrophiler Granulozyten, in Kombination mit anderen Leukozyten, mit einem besserem Überleben von CRC-Patienten assoziiert (57-59).

Im Gegensatz dazu stehen die Resultate einer aktuellen Studie von Rao et al. (50): Eine immunhistochemisch gemessene, erhöhte Anzahl an Neutrophilen im Tumorgewebe wurde als ein ungünstiger prognostischer Faktor unabhängig von Charakteristika der TNM-Klassifikation und dem klinischen Stadium bezeichnet. In Zusammenschau mit den Ergebnissen vorheriger Studien, konkludierten Rao et al., dass die malignen Zellen eine Vielzahl diverser Immunzellen, u.a. Neutrophile, zur Tumordinfiltration rekrutieren, welche

insgesamt die Tumorprogression fördern, während außerhalb, im peritumoralen Stroma, Neutrophile das Tumorwachstum inhibieren (50).

Trotz dieser kontroversiellen Studienergebnisse und dem Wissen über die duale Rolle der Neutrophilen hat sich die Hypothese durchgesetzt, dass sie die Progression des CRC fördern (51,60), wobei dies vor allem auf die Sekretion von proangiogenetischen Faktoren zurückzuführen ist (35,61). Laut Kusumato et al. (62) ist bei Krebspatienten zirkulierender VEGF zu ca. 70% in neutrophilen Granulozyten enthalten.

Im Rahmen der systemischen Immunreaktion auf das Tumorwachstum steigt auch die Zahl der zirkulierenden Neutrophilen, welche durch die malignen Zellen selbst, u.a. durch die paraneoplastische Produktion von "granulocyte colony stimulating factor" (GCSF), oder durch Zytokine (IL-6 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)) getriggert werden kann (35,63). Die Neutrophilie signalisiert demzufolge ein fortgeschrittenes Tumorstadium und wurde bei verschiedenen Tumorentitäten, u.a. beim CRC, mit ungünstiger Prognose assoziiert (63,64).

1.2.2 Bedeutung der spezifischen zellulären Immunreaktion

Die veränderte Antigenität der Tumorzellen und ihre Zytokinproduktion triggern eine spezifische (erworbene) Immunreaktion, die sich, im Gegensatz zur unspezifischen Antwort, ganz gezielt gegen maligne Zellen richtet (vgl. Abbildung 4.) (44,46,65). Allerdings kommt diese spezifische Tumorabwehr verzögert zum Einsatz, da die spezifischen T- und B-Lymphozyten zuerst von Antigen-präsentierenden Zellen des unspezifischen Immunsystems geprägt und aktiviert werden müssen (45).

Von besonderer Bedeutung bei der Antigenerkennung sind die sog. "major histocompatibility complex" (MHC)-Proteine. Klasse I-MHC ermöglichen die Präsentation von intrazellulären Antigenen an der Zelloberfläche und werden von beinahe allen kernhaltigen humanen Zellen, zum Teil auch von malignen Zellen, exprimiert (37).

Da zytotoxische T-Zellen nur Tumorzellen mit MHC I-Proteinen erkennen und eliminieren können, ist ein Verlust dieser MHC I-Expression mit einem schlechteren Outcome assoziiert (37,66).

Klasse II MHC werden nur von Makrophagen, Antigen-präsentierenden Zellen und B-Lymphozyten zur Präsentation von extrazellulären Antigenen u.a. gegenüber T-Helferzellen exprimiert.

Im Gegensatz zu normalen Darmepithelzellen tragen vor allem gut differenzierte CC-Zellen viel häufiger MHC II an ihrer Zelloberfläche. Ist dies der Fall, so gelingt vermutlich eine effektivere Tumorabwehr durch spezifische Immunzellen (37).

Die erworbene Immunantwort beteiligt sich massiv an der Prävention von Rezidiven, ein Effekt, der auch im Laufe der Progression des CRC bestehen bleibt (67). Deshalb ist es nicht erstaunlich, dass neben der Dichte der lokalen lymphozytären Tumordinfiltration (37,68,69) auch die Anzahl zirkulierender Lymphozyten, insbesondere der T-Lymphozyten, mit besserem Überleben von Patienten mit CRC in Verbindung gebracht wurde (15,48,49).

1.2.2.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten reifen im Thymus und differenzieren durch Aktivierung in verschiedene Subtypen, die unterschiedliche Funktionen in der spezifischen Immunreaktion einnehmen. Diese T-Zell-Untergruppen werden durch bestimmte Oberflächenproteine charakterisiert, welche die standardisierte Bezeichnung CD ("cluster determinant") in Kombination mit einer Ziffer tragen. Das Glykoprotein $CD3^+$ wird an der Oberfläche aller T-Lymphozyten exprimiert (70).

1.2.2.1.1 Zytotoxische T-Lymphozyten ($CD8^+$)

$CD8^+$ -Zellen zählen zu den wichtigsten Effektoren in der Elimination von Tumorzellen. Nachdem sie über spezifische T-Zell-Rezeptoren intrazelluläre Tumorantigene in Verbindung mit MHC I-Proteinen an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen erkannt haben, werden sie zu zytotoxischen T-Lymphozyten ("cytotoxic T-lymphocytes" CTL). Ihre tumorspezifische zytotoxische Aktivität zeichnet sich durch eine gezielte Zerstörung von MHC I-tragenden Tumorzellen durch direkte Zell-Zell-Interaktion mit konsekutiver Freisetzung zytolytischer Proteine (Perforin) und enzymatischer Proteasen (Granzyme B) aus (39,45,71). Koch et al. (72) konnten 2006 das erste Mal demonstrieren, dass Aktivierung und zytotoxische Aktivität dieser Lymphozyten tumorselektiv ist und mit der Präsenz funktioneller Tumorantigen-reaktiver T-Zellen in Blut und Knochenmark einhergeht. Eine erhöhte Anzahl infiltrierender $CD8^+$ -T-Lymphozyten wurde mit dem Ausbleiben früher metastatischer Invasion, geringerer Rezidivrate und verbessertem Überleben von CRC-Patienten assoziiert (15,57,73). Mit fortschreitendem Tumorstadium sinkt ihr Anteil im entzündlichen Tumordinfiltrat (37,72).

Auch die präoperative Absolutzahl zirkulierender CD8⁺-T-Zellen wurde mit verbessertem OAS in Verbindung gebracht (49). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich einerseits folgern, dass die zytotoxischen T-Lymphozyten einer Krankheitsprogression entgegenwirken, andererseits wird vermutet, dass maligne Zellen, analog zur Steigerung ihres invasiven und metastatischen Potentials, zunehmend fähig sind die spezifischen Immunantwort, z.B. durch Verlust der MHC I-Expression, zu umgehen oder auch aktiv zu hemmen (37,71).

1.2.2.1.2 T-Helferzellen (CD4⁺)

CD4⁺-Lymphozyten werden zu T-Helferzellen, indem sie extrazelluläre, an MHC II Proteine gekoppelte Tumorantigene an der Oberfläche von APC und Makrophagen erkennen. T-Helferzellen spielen eine duale Rolle in der Interaktion mit Tumorzellen. Durch den Einfluss verschiedener Zytokine differenzieren sie in die Subtypen "Th1" und "Th2", welche in ihrer Funktion als Gegenspieler fungieren (37,39).

Von Makrophagen produziertes IL-12 ermöglicht eine Differenzierung zu CD4⁺-Zellen vom Th1-Subtyp, die Tumorzellen direkt lysieren können (37,65). Durch Ausschüttung bestimmter Zytokine (u.a. IL-2, INF- γ) fördern diese Th1-Zellen das Wachstum der CD8⁺-Zellpopulation sowie deren zytotoxische Aktivität gegen intrazelluläre Tumorantigene (37,39). Aus diesen Gründen geht eine ausgeprägte Th1-vermittelte Immunität beim CRC mit einem guten klinischen Outcome einher (37,67).

Die Differenzierung zum Th2-Subtyp wird durch IL-4 initiiert. Im Gegensatz zu den Th1-Zellen hemmen Th2-Zellen durch Zytokinsekretion die Proliferation und Aktivität der CTL (37,39) und fördern die humorale Immunität und die Rekrutierung unspezifischer Immunzellen (70). Allerdings wird, sobald eine Th1-Immunreaktion in Gang gesetzt ist, die Produktion von Th2-Lymphozyten aktiv durch Th1-spezifische Zytokine gehemmt (15).

Zusammengefasst überwiegen demnach die tumorkontrollierenden Effekte der CD4⁺-T-Zellaktivität und ihre positive Auswirkung auf die Prognose (37): Beim CRC wurde eine verringerte Anzahl infiltrierender CD4⁺-Zellen mit einem erhöhtem Risiko lokaler Rezidive und mit schlechtem krebsspezifischen Überleben assoziiert (46,74). Bemerkenswerterweise wurde sowohl eine erhöhte Anzahl zirkulierender CD4⁺-T-Lymphozyten als auch eine erhöhte periphere CD4⁺/CD8⁺-T-Zell-Ratio als unabhängige prognostische Parameter für Patienten mit CRC bezeichnet (48,49).

1.2.2.1.3 Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO⁺)

CD8⁺- und CD4⁺-T-Lymphozyten, denen Antigene präsentiert werden, können im Anschluss an eine spezifische Immunantwort zu langlebigen CD45RO⁺T-Zellen differenzieren. Diese sog. "Gedächtnis-T-Zellen" persistieren über Jahre und sind durch bestimmte Oberflächenmoleküle auf die Abwehr ganz bestimmter Antigene spezialisiert. Kommen sie erneut mit diesen in Kontakt, so werden sie ohne vorherige Antigenpräsentation zu Effektorzellen reaktiviert und setzen sofort eine massiv gesteigerte Immunreaktion in Gang. Die Persistenz von Gedächtniszellen erklärt das Phänomen der Immunüberwachung (37,57).

Auch in der Abwehr von Tumorantigenen sind Gedächtnis-T-Zellen effektiv. Ergebnisse zahlreicher Studien belegen den positiven Einfluss einer hohen Anzahl lokaler Gedächtnis-T-Zellen auf das Outcome bei CRC. (57,70,75) Tumore ohne venöse, lymphatische und perineurale Invasion wurden mit einer erhöhten Dichte an Gedächtniszellen in Verbindung gebracht (52,73). Dem könnte die lang anhaltende antitumorale Aktivität der Gedächtnis-T-Zellen als entscheidende Rezidivkontrolle zugrunde liegen (67). In einer großen Studie mit 967 Patienten wurden lokal infiltrierende CD45RO⁺-Zellen (und CD8⁺-Zellen) außerdem mit verbessertem Überleben von Patienten mit CRC im Stadium II oder III assoziiert (52). Laut Nosho et al. (75) ist die Dichte tumorinfiltrierender Gedächtnis-T-Zellen in allen Stadien mit einer besseren Prognose assoziiert, und zwar unabhängig von klinischen, pathologischen und molekularen Faktoren sowie der Infiltrationsdichte anderer T-Zell-Subtypen. Überdies können zirkulierende Gedächtnis-T-Zellen bereits in Frühstadien disseminierte Tumorzellen in Blut, Knochenmark und Lymphknoten erkennen und somit der systemischen Metastasierung entgegenwirken (76).

1.2.2.1.4 Regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺)

Ungefähr 6-10% aller peripheren CD4⁺-T-Zellen übernehmen regulatorische Funktionen der zellulären Immunität. Unter den distinkten Subpopulationen dieser regulatorischen T-Zellen, sind vor allem die "klassischen", im Thymus reifenden CD4⁺CD25⁺-Zellen, die den Forkhead-Box-P3-Transkriptionsfaktor (FOXP3⁺) exprimieren, von Bedeutung (45). Regulatorische T-Zellen sind für die Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen verantwortlich, da sie als funktionelle Suppressorzellen die Aktivität anderer Zelltypen unterdrücken können.

Sie sind für ihre wichtige Rolle in der Prävention von Autoimmunerkrankungen und in der Kontrolle von autoreaktiven T-Lymphozyten bekannt (15).

Interessanterweise wurde beim CRC und anderen Tumorentitäten ein erhöhte Anzahl $CD25^+FOXP3^+CD4^+$ -T-Zellen im peripheren Blut gemessen. Man nimmt an, dass diese ins Tumorgewebe rekrutierten regulatorischen T-Zellen durch Sekretion von IL-10 und "transforming growth factor-beta" (TGF- β) die Antitumor-Aktivität von $CD4^+$ -und $CD8^+$ -T-Zellen unterdrücken, so eine Immuntoleranz gegenüber tumorassoziierten Antigen bewirken und die krebsinduzierte Immunsuppression unterstützen (19,37,45). Eine Zahl von Studien bestätigte diese Vermutung durch eine Assoziation lokal infiltrierender regulatorischer T-Zellen mit einer ungünstigen Prognose bei verschiedenen Tumorarten, andere Untersuchungen ergaben jedoch auch Gegenteiliges (15,39,57). Inwieweit regulatorischer T-Zellen das klinische Outcome bei Patienten mit CRC tatsächlich beeinflussen können, ist nach wie vor unklar (15).

1.2.2.2 B-Lymphozyten

In ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen und Antikörperproduzenten sind B-Lymphozyten bedeutend für die humorale Immunantwort (57). Ihre Rolle in der Tumorummunität stand lang im Schatten der Erforschung T-Zell-vermittelter Tumorkontrolle (39).

Vor kurzem gelang es Zhang et al. (77) den derzeitigen Wissensstand in einer experimentellen Studie um neue Erkenntnisse zu erweitern. Bei Mäusen, deren Bildung von B-Zellen durch genetische Manipulation ausblieb und bei einer immunkompetenten Kontrollgruppe wurden die Immunreaktion auf eine Reihe genidentischer Tumore beobachtet. Im Vergleich zu den immunkompetenten Mäusen wurden in der Gruppe ohne B-Lymphozyten gewisse murine Tumore, u.a. "MC38-Kolonkarzinom" abgestoßen bzw. im Wachstum gehemmt. Man erkannte bei den Tieren mit fehlender B-Zell-Antwort eine erhöhte Infiltration der murinen Tumore durch T-Lymphozyten und NKZ sowie erhöhte zytolytische Aktivität und Th1-Zytokinantwort (77).

Diese Beobachtung bestätigt die bereits 1998 beschriebene Hypothese, dass B-Lymphozyten die T-Zell-Tumorummunität inhibieren, indem sie die Koordinations- und Hilfsfunktion der $CD4^+$ -Zellen gegenüber zytotoxischen $CD8^+$ -Zellen unterdrücken. Stattdessen induzieren die Antigen-präsentierenden B-Zellen eine humorale Immunantwort, die nicht protektiv gegenüber den Tumorzellen wirkt (78).

1.2.3 Bedeutung der Thrombozytose

Blutplättchen (Thrombozyten) sind anukleäre kleine Blutzellen, die aus Megakaryozyten im Knochenmark entstehen, 1 μ l Blut enthält ca. 150.000-350.000 Thrombozyten. Ihre Hauptfunktion liegt in der Hämostase nach Gewebs- und Gefäßverletzung (7,79).

Schon der französische Internist Trousseau brachte 1865 Blutplättchen und maligne Zellen in Zusammenhang. Er beschrieb krebsassoziierte Thrombose und vermutete, dass das hämostatische System die Tumorprogression unterstütze (79,80).

Tumorzellen exprimieren an ihrer Oberfläche Gewebefaktor ("tissue factor"), welcher mit den Gerinnungsfaktoren VII und X in Interaktion tritt (vgl. Abbildung 5). Folglich entsteht Thrombin, das die Thromboseentstehung durch Fibrinbildung und Aktivierung von Thrombozytenrezeptoren unterstützt. Es resultiert ein allgemein gesteigertes Thrombembolierisiko, welches bei verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich ausgeprägt ist und eine erhöhte Morbidität und Mortalität zur Folge hat. Thrombembolien treten zudem oft als klinische Erstsymptome auf und zeigen ihre stärkste Ausprägung in fortgeschrittenen Stadien mit Metastasierung (79). Des Weiteren spielen Thrombozyten eine zentrale Rolle in der Verlinkung von Hämostase, Entzündung und Geweberekonstruktion (81).

1.2.3.1 Thrombozytose als tumorassoziierter inflammatorischer Marker

Ab circa 400.000/ μ l zirkulierenden Blutplättchen spricht man grundsätzlich von einer Thrombozytose (82). Man unterscheidet eine primäre Thrombozytose (essentielle Thrombozythämie), die typischerweise im Rahmen myeloproliferativer Erkrankung auftritt, von einer sekundären (reaktiven) Thrombozytose bei chronischen Entzündungen, malignen Prozessen oder nach Operationen. Bis zu 57% aller Krebspatienten zeigen eine solche reaktive Erhöhung der Plättchenzahl (83) und ungefähr 40% aller Erwachsenen mit Thrombozytose haben eine bisher unentdeckte maligne Tumorerkrankung (84,85).

Die erhöhte Plättchenzahl entsteht bei malignen Erkrankungen aufgrund einer gesteigerten Thrombozytopoese im Knochenmark, da Entzündungsmediatoren der Tumorabwehr, IL-1, IL-3 und insbesondere IL-6, die Proliferation von Megakaryozyten stimulieren (82,85,86). Dies verdeutlicht den engen Zusammenhang zwischen Thrombozytose und tumorassoziierter Immunreaktion und erklärt, warum sich eine erhöhte Plättchenzahl auch als Indikator der systemischen Entzündungsreaktion eignet.

1.2.3.2 Einfluss auf lokale Progression und Metastasierung

Schon lange ist bekannt, dass Thrombozyten die Progression maligner Tumore beeinflussen können. Monreal et al. (87) führten 1998 die erste prospektive Studie durch, in der eine präoperative Thrombozytose beim CRC mit verkürztem Überleben assoziiert wurde. Infolgedessen erlangte die Plättchenzahl als potentieller prognostischer Marker beim CRC zunehmend Aufmerksamkeit.

In den α -Granula der Thrombozyten finden sich diverse biologisch aktive Proteine, die bei Plättchenaktivierung freigesetzt werden und das Wachstum maligner Zellverbände beeinflussen können. Dazu zählen angiogene und wachstumsfördernde Faktoren, wie Thrombospondin, "platelet-derived growth factor" (PDGF), "epidermal growth factor" (EGF) und "vascular endothelial growth factor" (VEGF), TGF- β und verschiedene Zytokine, die Proliferation und Migration der Tumorzellen unterstützen. Desweiteren beinhalten die thrombozytären α -Granula auch invasionsfördernde Proteasen, wie z.B. die Matrix-Metalloproteinase (80,82,85).

Der Mechanismus der Angiogenese ist eine wesentliche Voraussetzung für die Tumorprogression. VEGF zählt zu den potentesten angiogenen Mediatoren, befindet sich zum Großteil in Granulozyten (vgl. Kapitel 1.2.1.2) und Thrombozyten und wird bei Aktivierung dieser Zellen freigesetzt (62,79). Beim CRC wurden zirkulierender VEGF mit dem Krankheitsstadium assoziiert, hohe Konzentrationen wurden mit schneller Tumorprogression und schlechtem OAS in Verbindung gebracht (84,88). Neben der Gefäßneubildung bewirkt VEGF auch eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität, sodass Extravasation maligner Zellen und die metastatische Ansiedlung erleichtert werden (84).

Thrombozytäre Proteasen können die lokale Tumorprogression beeinflussen. Eine japanische Studie demonstrierte, dass Thrombozyten die Invasivität von pankreatischen Adenokarzinomzellen begünstigen, indem sie Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) sekretieren. Man erkannte außerdem, dass Thrombozytenaggregationshemmer durch Verminderung der MMP-9-Sekretion der Tumorzellinvasion und in Folge auch der Metastasierung entgegenwirken (54).

Desweiteren können Thrombozyten zirkulierende Krebszellen vor der Elimination durch das Immunsystem schützen, ihre Festsetzung am vaskulären Endothel begünstigen und auf diese Weise deren Überleben und die Entstehung sekundärer Herde unterstützen (79,82).

Nach der Intravasation der neoplastischen Zellen binden und aktivieren diese Leukozyten und Thrombozyten (Kohäsion). Dadurch steigern die Plättchen ihr Adhäsionsvermögen, schütten bioaktive Faktoren (Chemokine, Wachstumsfaktoren, etc.) aus und bilden Thrombozyten-Heteroaggregate an der Gefäßwand (Adhäsion), die neben neoplastischen Zellen mitunter Leukozyten beinhalten. Diese physikalische Barriere erlaubt eine Abschirmung der aggregierten Tumorzellen von der direkten lytischen Aktivität der zirkulierenden NKZ (Immunevasion) (79,80,89) und erleichtert die Extravasation der Tumorzellen in angrenzendes Gewebe mit konsekutiver Metastasenbildung (79).

Abbildung 5 fasst diese Interaktionen in einer schematischen Darstellung zusammen.

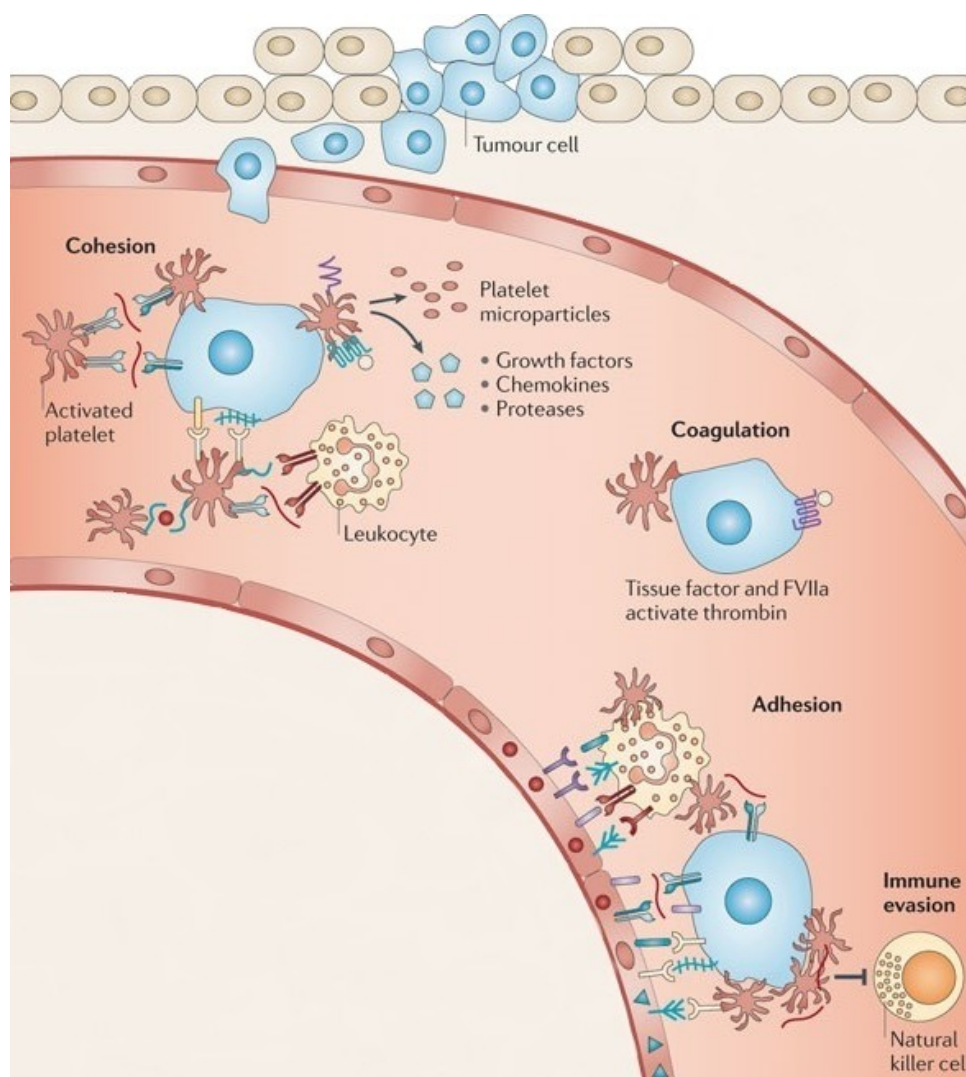


Abbildung 5 Interaktionen zwischen Thrombozyten und Tumorzellen in der Blutstrombahn; Schematische Darstellung modifiziert nach Gay et al. (79).

Ob eine Thrombozytose tatsächlich die Entstehung von Fernmetastasen beeinflusst, oder nur Einfluss auf die lokale Tumorprogression hat, bleibt allerdings umstritten.

Interessanterweise konnten Palumbo et al. (89) bei transgenen Mäusen keine Assoziation zwischen Plättchenaktivierung und Fibrin(ogen) und dem Wachstum primärer Tumore finden. Laut dieser amerikanischen Studie liegt die prognostische Relevanz der Hyperkoagulabilität ausschließlich im Einfluss auf das Überleben embolischer Tumorzellen und deren Fähigkeit zur Metastasenbildung.

Verschiedene Studien untersuchten dieses Phänomen beim CRC und erzielten unterschiedliche Resultate: In einer aktuellen, großen US-amerikanischen Studie von Wan et al. (90) mit 1500 CRC-Patienten ging eine präoperative Thrombozytose tatsächlich nicht mit lokaler Rezidivbildung sondern nur mit postoperativ vermehrtem Auftreten von Fernmetastasen einher. Zu einem anderen Ergebnis kam eine japanische Studie (83): Eine präoperative Thrombozytose wurde unabhängig von anderen Faktoren mit lokaler Tumorprogression (Tumordurchmesser und Invasionstiefe) assoziiert. Das Auftreten von Lymphknoteninvasion und Fernmetastasen wurde hingegen nur in der univariaten Analyse mit einer erhöhten Plättchenzahl in Verbindung gebracht.

1.2.3.3 Stellenwert als Prognosemarker

Obwohl man sich einig ist, dass die Thrombozytose bei CRC-Patienten prognostischen Wert besitzt, wird nach wie vor diskutiert, in welcher Hinsicht sie das Überleben von Patienten mit CRC beeinflussen kann.

Die genannte große US-amerikanische Studie (90) zeigte, dass eine präoperativ gemessene Thrombozytose unabhängig mit verkürztem OAS und erhöhter Rezidivrate assoziiert ist. Ferner scheint sie prognostische Aussagekraft hinsichtlich des OAS nach der Resektion von kolorektalen Lebermetastasen zu besitzen (64). Auch bei Patienten ohne Lymphknotenbefall (Stadium II) wurde eine präoperative Thrombozytose als unabhängiger prognostischer Marker für das DFS und OAS bezeichnet (84). Überdies demonstrierte die zuvor erwähnte japanische Studie (83) eine unabhängige Korrelation mit dem krebsspezifischen Überleben ("cancer specific survival", CSS), mit besonders hoher Signifikanz im Stadium III. Die einzigen widersprüchlichen Ergebnisse publizierten Nyasavajjala et al. (91): In einer großen Kohorte von 630 CRC-Patienten hatte eine erhöhte Thrombozytenzahl, unabhängig vom Stadium, keinen Einfluss auf das OAS. Allerdings sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass Nyasavajjala et al. auch metastasierte CRC inkludierten, den Grenzwert der Thrombozytose auf 450.000/ μ l erhöhten und mit einem P-Wert von 0.067 eine signifikante Assoziation nur knapp verfehlten (82).

1.2.4 Die lokale Immunreaktion und ihr prognostischer Stellenwert

Die lokale Immunreaktion auf CRC ist eng mit der systemischen Immunreaktion vernetzt, besonders wichtig für das Verständnis der Tumorimmunologie und im Fokus vieler aktueller Forschungsarbeiten. Dennoch bleibt sie nur kurz erwähnt, da sich diese Studie ausschließlich mit der systemischen Entzündungsreaktion beschäftigt.

Schon seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass eine intra- und peritumorale Ansammlung von Leukozyten die lokale Tumorprogression beeinflusst und mit einem verbesserten Outcome bei CRC assoziiert ist (57). Für eine effiziente lokale Immunabwehr ist vor allem die Präsenz von tumorinfiltrierenden Lymphozyten entscheidend. Mehrere Arbeiten belegten, dass eine ausgeprägte peri- und intratumorale lymphozytäre Infiltration die Prognose bei CRC verbessert (15,47,68,69). In einer großen Studie von Pages et al. (73) wurden tumorinfiltrierende Lymphozyten mit dem Ausbleiben von Zeichen früher metastatischer Invasion assoziiert. Galon et al. (67) erkannten in Folge, dass lokale T-Lymphozyten Tumor- und Tumorstromazellen modifizieren und so deren metastatisches Potential bereits in frühen Stadien herabsetzen können.

Im Übrigen stellt die Immunreaktion am invasiven Tumorrand eine dynamische Schnittstelle zwischen pro- und antitumoralen Faktoren dar, ist prognostisch relevanter als jene in den zentralen Tumorarealen und wurde beim CRC als unabhängiger Prädiktor für verbessertes Überleben bezeichnet (59,92).

In den 1980ern entwickelten Jass et al. (93) erstmals eine semiquantitative Beurteilungsmethode des peritumoralen Lymphozyteninfiltrates beim RC. Diese "Jass-Kriterien" wurden daraufhin als stadienunabhängiger Prädiktor für krebspezifisches Überleben beim CC und RC validiert (57,93).

2005 präsentierten Klintrup und Mäkinen et al. (59) eine simple 4-stufige Skala zur besseren quantitativen Evaluierung der zentralen bzw. peritumoralen Immunreaktion (Anzahl der Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten). Patienten die, laut diesen "Klintrup-(Mäkinen-)Kriterien", eine hochgradige Immunreaktion zeigen, haben grundsätzlich eine günstigere Prognose (59).

Aber auch die prognostische Aussagekraft qualitativer Kriterien des Immuninfiltrates sollte nicht unterschätzt werden. In einer bedeutenden Studie von Galon et al. (67) hatte die Konstitution des lokalen Immunfiltrates (Dichte, Phänotyp, Lokalisation der Zellen) einen höheren prognostischen Wert als die derzeitigen histopathologischen TNM-Stagingmethoden.

1.2.5 Die systemische Immunreaktion und ihr prognostischer Stellenwert

Die systemische Immunreaktion ist zum einen eine unspezifische inflammatorische Reaktion auf Tumornekrose, lokale Gewebszerstörung und Zytokinfreisetzung der Tumorzellen, zum anderen ein Indikator für das Metastasierungspotential des Tumors (42-44). Im Gegensatz zur lokalen Immunreaktion wurde sie bei einer Vielzahl an Tumorentitäten mit schlechtem klinischen Outcome assoziiert (42). In der Klinik haben sich zur Messung der systemischen inflammatorischen Response biochemische und hämatologische Marker durchgesetzt, allerdings ist nach wie vor unklar, welche sich am besten zur Prognoseabschätzung beim CRC eignen (36,94). Eine Möglichkeit, die systemische Immunreaktion zu bewerten, ist die Messung des Akut-Phase-Proteins CRP ("C-reaktives Protein") im Serum. In zahlreichen Studien zum CRC wurde erhöhtes präoperatives CRP mit schlechtem klinischen Outcome assoziiert und als unabhängiger prognostischer Faktor bezeichnet (42). Dies könnte sich zum einen dadurch erklären, dass CRP-Erhöhung mit einer Lymphozytopenie einhergeht und so eine schwache spezifische Immunität reflektiert. Zum anderen wurden hohe CRP-Werte auch mit erhöhter Anzahl zirkulierender Neutrophiler und Monozyten, als Zeichen einer ausgeprägten unspezifischen Immunität, assoziiert (74,94).

Eine weitere Möglichkeit, basierend auf Akut-Phase-Proteinen die systemische Entzündungsreaktion zu messen, ist der "modified Glasgow Prognostic Score" (mGPS). Dieser simple 3-stufige Immunscore stellt die systemische Immunreaktion als Kombination von Grenzwerten des CRP-Anstiegs ($>10 \text{ mg l}^{-1}$) und der Hypoalbuminämie ($<35 \text{ g l}^{-1}$) numerisch dar (94).

McMillan et al. (95) und Roxburgh et al. (96) demonstrierten bei Patienten, deren primäre CRC potentiell kurativ reseziert wurden, dass präoperativ erhöhter mGPS mit schlechtem krebsspezifischen Überleben assoziiert ist.

Außerdem wurde die "Lymphozyten-Monozyten-Ratio" (LMR) kürzlich als unabhängiger Prädiktor für das Rezidivrisiko beim CC im Stadium III bezeichnet (97).

Gleichermaßen erlangte die Hyperfibrinogenämie beim nichtmetastasiertem CC den Status eines unabhängigen Prognosemarkers (98).

1.2.5.1 Die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio

Die systemische inflammatorische Response führt nicht nur zur erhöhten Konzentration von Akut-Phase-Proteinen sondern auch zu Änderungen der relativen und absoluten Zahl zirkulierender weißer Blutzellen (36). Vor kurzem demonstrierte eine koreanische Studie zum CRC (99), dass die präoperative Leukozytenzahl mit dem Krankheitsstadium assoziiert ist und eine verzögerte postoperative Normalisierung der Leukozytose mit schlechterem Outcome einhergeht.

Auch die leukozytären Subtypen sind von prognostischem Wert. Hier hat sich vor allem die Bestimmung der Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio (NLR) durchgesetzt. Sie stellt das Verhältnis zirkulierender neutrophilen Granulozyten zu Lymphozyten dar und reflektiert im Gegensatz zu mGPS, als dynamische Variable, akute Veränderung der systemischen Immunreaktion (100).

Die NLR hat ihren Ursprung in der Intensivmedizin. Zahorec et al. (101) berichteten 2011, dass Neutrophilie und Lymphopenie bei kritisch kranken Patienten abhängig vom klinischen Zustandsbild auftreten. Man zog den Schluss, dass sie eine generelle unspezifische Immunantwort auf "Stress" verschiedenster Ursache, u.a. Tumorerkrankungen, darstellen (101,102).

Bei Krebserkrankungen entsteht eine erhöhte NLR durch verschiedene Interaktionen zwischen malignen und entzündlichen Zellen. Entscheidend ist die Auslösung einer unspezifischen systemischen Immunreaktion durch die Tumorzellen, in deren Rahmen die Anzahl der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten steigt. Damit resultiert eine relative Lymphozytopenie und eine erhöhte NLR (103). Der negative Einfluss einer Neutrophilie auf das klinische Outcome wurde bereits in zahlreichen Studien bestätigt (vgl. Kapitel 1.2.1.2) (64,104).

Gleichzeitig können neutrophile Granulozyten, regulatorische T-Zellen und auch die Tumorzellen selbst die wichtige lymphozytäre Aktivität, zum Teil durch Sekretion inhibitorischer Zytokine (IL-10 und TGF- β), unterdrücken und auf diese Weise die NLR erhöhen (15,37,55). Wie bereits erwähnt, ist nicht nur das Ausmaß der lokalen lymphozytären Infiltration, sondern auch eine erhöhte Gesamtzahl zirkulierender Lymphozyten mit einer Verbesserung des klinischen Outcome assoziiert. Insbesondere die zirkulierenden T-Lymphozyten und NKZ scheinen die Prognose positiv zu beeinflussen (vgl. Kapitel 1.2.1.1 und 1.2.2.) (15,48,49). Dementsprechend wurde eine Lymphopenie wiederum mit schlechtem Outcome assoziiert (63,105,106).

Zusammenfassend spiegelt sich in der NRL die Balance zwischen "Pro-Tumor"-Immunität der neutrophilen Granulozyten und "Anti-Tumor"-Immunität der Lymphozyten wider. Diese Balance ist bei erhöhter NRL zugunsten der tumorfördernden Konditionen verschoben (35,107).

Die NRL wurde bereits bei vielen Tumorentitäten, u.a. Nierenzell-, Lungen-, Cervix- und gastrointestinalen Karzinomen als unabhängiger prognostischer Parameter für das klinische Outcome bezeichnet (61,106,108-110).

Guthrie et al (111) zeigten 2013 in einer umfassendem Metaanalyse, dass in über 15 Studien mit mehr als 8500 Patienten die NRL im fortgeschrittenen Stadium oder bei aggressiven Krankheitsverläufen eindeutig erhöht war. Demnach eignet sich diese Ratio bei verschiedenen Tumorentitäten zur Identifizierung von Hoch-Risiko-Patienten.

2005 demonstrierten Walsh et al. (106) zum ersten Mal die prognostische Relevanz der präoperativen NRL beim CRC, allerdings in Abhängigkeit vom Dukes-Stadium. Drei Jahre später beschrieben Halazun et al. (112) eine unabhängige Assoziation zwischen erhöhter präoperativer NRL und dem Todes- und Rezidivrisiko bei Patienten, deren kolorektale Lebermetastasen reseziert wurden.

Die NRL hat sich mittlerweile als simpler Parameter für die systemische Entzündungsreaktion etabliert und wurde von einigen Autoren (36,106,112,113) kürzlich als starker prognostischer Marker für CRC bezeichnet.

Dennoch sind die bisherigen Studienergebnisse in Bezug auf die verschiedenen prognostischen Endpunkte beim CRC sehr widersprüchlich. So bezeichneten Studien von Hung et al. (114), Chua et al. (100) und He et al. (104) die NRL als unabhängigen prognostischer Indikator für das OAS, während Walsh et al. (106) und Kwon et al. (36) nur eine bivariate Assoziation bestätigten. Leitch et al. (94) konnten hingegen keinen Einfluss der NRL auf das OAS nachweisen. Des weiteren wurden Zusammenhänge mit dem DFS (Chiang et al. (102), Mallappa et al. (103)) und dem rezidivfreien Überleben ("recurrence free survival", RFS) (Ding et al. (113), Absenger et al. (2013a) (61)) belegt. Eine signifikante Assoziation zwischen NRL und CSS konnte bisweilen nur in wenigen Studien bestätigt werden (107,115).

Erwähnenswert ist zudem die "derived Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio" (dNLR), eine abgeleitete Version der NRL, die das Verhältnis von Neutrophilenzahl zur Gesamtleukozytenzahl abzüglich der Neutrophilenzahl darstellt. Die Ähnlichkeit zur NRL

erklärt sich dadurch, dass die Lymphozyten neben den neutrophilen Granulozyten die größte leukozytäre Subgruppe bilden. Der Vorteil der dNLR liegt in der noch besseren klinischen Verfügbarkeit, da vor Therapiebeginn Gesamtleukozyten- und Neutrophilenzahl häufiger als die Lymphozytenzahl dokumentiert werden (116).

Laut Proctor et al. (116) hat sie einen vergleichbaren, wenn auch etwas geringeren, prognostischen Wert als die NLR. In einer aktuellen Studie von Absenger et al. (2013a) (29) wurde eine erhöhte dNLR als unabhängiger Prädiktor für das postoperative rezidivfreie Intervall und das OAS von Patienten mit CC im Stadium II und III bezeichnet.

1.2.5.2 Die Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio

Die Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio (TLR), in der englischen Literatur meist als "platelet-lymphocyte-ratio" (PLR) bezeichnet, ist eine Kombination der zirkulierenden Plättchen- und Lymphozytenzahl und neben der NLR eine weiterer, jedoch weniger etablierter Indikator für die systemische inflammatorische Response (36).

Wie bereits erwähnt, reflektiert die Thrombozytenzahl die "Pro-Tumor-Immunität", die Lymphozytenzahl die "Anti-Tumor-Immunität". Bei einer erhöhten TLR ist das Verhältnis zu Gunsten der tumorfördernden Thrombozyten verschoben, daraus kann eine gesteigerte Tumorprogression und Metastasierung mit folglich ungünstiger Prognose resultieren.

Die TLR wurde bereits bei anderen Tumorentitäten, mitunter Ovarial-, Mamma-, Pankreas- und nicht kleinzelligem Lungenkarzinom, als prognostischer Faktor identifiziert (117-120).

Die Unabhängigkeit von klinisch-pathologischen Faktoren wurde allerdings nur bei gewissen Tumorentitäten bestätigt, was annehmen lässt, dass die TLR eine unterschiedliche Rolle bei verschiedenen Malignomtypen einnimmt (120).

Auch beim CRC finden sich divergente Resultate. Kwon et al (36) und Liu et al. (121) bezeichneten die TLR als unabhängigen prognostischen Marker für das 5-jährige OAS und kürzlich demonstrierten Szkandera et al. (86) bei CC-Patienten im Stadium II und III eine unabhängige Assoziation mit erhöhtem Rezidivrisiko. In zwei weiteren Arbeiten (85,104) wurde eine erhöhte TLR mit vermehrtem Auftreten von Rezidiven und erhöhter Mortalität beim CRC assoziiert, allerdings nur in Abhängigkeit anderer Faktoren. Eine große koreanische Studie (98) konnte keinen Zusammenhang der TLR mit dem klinischen Outcome von Patienten mit CC finden.

1.2.5.3 Risikostratifizierung im Stadium II und III

Die Rolle der NLR und TLR als Prädiktoren für das klinische Outcome beim CRC bzw. CC ist aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse bisheriger Studien nach wie vor kontrovers und bedarf weiterer wissenschaftlicher Abklärung.

Obwohl es für den klinischen Einsatz entscheidend und erforderlich ist, gibt es nur wenige Arbeiten, die den prognostischen Wert dieser Immunmarker stadienspezifisch untersuchten. Man weiß, dass die Prognoseabschätzung mittels histopathologischem TNM-Staging in vielen Fällen inadäquat ist (35,36). Vor allem Patienten im Stadium II und III zeigen ein sehr heterogenes Outcome (122) und profitieren oft nicht von der adjuvanten Chemotherapie, entweder weil bereits durch chirurgische Resektion eine Heilung erzielt wurde oder weil sie trotz adjuvanter Behandlung im postoperativen Verlauf Rezidive entwickeln (61). Insbesondere in diesen Stadien könnten prognostische und prädiktive Biomarker, wie die NLR und TLR, klinische Anwendung finden, um die Risikostratifizierung zu verbessern und die Therapie individuell anzupassen.

Im Schnitt werden über 30% aller Patienten mit CC im Stadium II eingeordnet (123).

Trotz generell guter Prognose mit einer 5-JÜR von bis zu 80% entwickelt circa jeder fünfte CC-Patient postoperativ ein Rezidiv (25,26). Den derzeitigen Therapierichtlinien entsprechend erhalten nur Hochrisikopatienten eine adjuvante 5-FU-basierte Chemotherapie. Während in den meisten Arbeiten eine maximale Verbesserung der 5-JÜR um lediglich 5% beschrieben wurde (26), kam eine gepoolte Analyse mehrerer randomisierter, kontrollierter Studien zu dem Ergebnis, dass eine adjuvante Chemotherapie im Stadium II das relative Risiko einer Rezidiventwicklung um 17% senken kann (31). Eine bemerkenswerte amerikanische Arbeit stellte fest, dass trotz dieser unklaren Datenlage zur Wirksamkeit mehr als ein Viertel der Patienten im Stadium II eine adjuvante Chemotherapie erhalten (124). Unter Umständen könnten NLR und TLR helfen, den Einsatz der adjuvanten Chemotherapie im Stadium II auf jene Hochrisikopatienten zu beschränken, die am ehesten davon profitieren.

Auch im Stadium III, das in durchschnittlich 25-30% der CC-Patienten vorliegt (123), ist in Anbetracht des heterogenen Outcomes die Anwendung zusätzlicher prognostischer Biomarker indiziert um jene Patienten zu selektionieren, die trotz adjuvanter Chemotherapie nach der potentiell kurativen Resektion mit hoher Wahrscheinlichkeit Rezidive entwickeln und deshalb ein aggressiveres Therapieregime benötigen.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Studienziel

Diese retrospektive Studie setzte sich zum Ziel, den prognostischen Stellenwert von ausgewählten zellulären Markern der systemischen inflammatorischen Response, NLR und TLR, hinsichtlich des DFS und OAS von Patienten mit CC im Stadium II und III zu klären.

Die zugrundeliegende Nullhypothese war, dass sich die präoperativen Marker NLR und TLR nicht als prognostischen Indikatoren für das klinische Outcome dieser Patienten eignen.

Demgegenüber definierte die Alternativhypothese, dass die besagten hämatologischen Biomarker, auch unabhängig von anderen Faktoren, Aufschluss über die Prognose dieser Patienten geben können.

2.2 Datenerhebung

Die retrospektive Erhebung umfasste insgesamt eine Datenbank mit 836 Patienten, die zwischen 2003 und 2011 im Rahmen eines Follow-Up-Programmes an der klinischen Abteilung für Onkologie des LKH-Universitätsklinikums Graz behandelt und/oder inkludiert wurden.

Bei allen Patienten wurde ein CC im UICC-Stadium II oder III histologisch bestätigt und keine Fernmetastasen radiologisch detektiert.

In die Kohorte dieser Diplomarbeit wurden allerdings nur jene 246 Patienten eingeschlossen, bei denen innerhalb einer Woche vor der Operation Laborwerte der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten elektronisch im "MEDOCS", dem EDV-Informationssystem der Universitätsklinik Graz, verfügbar waren.

Als weitere Ausschlusskriterien galten: Fälle mit Frühkarzinomen (Stadium I), mit metastasierten CC (Stad IV) oder mit RC. Patienten, die primär nicht operabel waren oder deren CC endoskopisch im Gesunden entfernt werden konnte, wurden ebenfalls nicht in die Kohorte inkludiert.

Regelmäßige Verlaufskontrollen nach Diagnosestellung wurden in den ersten 3 Jahren alle 3 Monate, im 4. und 5. Jahr alle 6 Monate und im 6.-10. Jahr alle 12 Monate durchgeführt. Sie umfassten eine klinische Untersuchung, eine Kontrolle der Basislaborparameter und der Tumormarker CEA und CA 19-9 sowie eine radiologische Abklärung: In den ersten 3 Jahren nach Diagnosestellung erfolgte halbjährlich eine computertomographische bzw. sonographische Untersuchung der Leber und ein Thorax-Röntgen. Eine Koloskopie wurde alle 2 Jahre durchgeführt.

Die Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz überprüfte und bewilligte diese Studie. (25-137 ex 12/13).

2.2.1 Patientendaten

Folgende klinisch-pathologische Variablen wurden retrospektiv erhoben:

- Geschlecht
- Alter
- Grading
- T-Stadium
- N-Stadium
- UICC-Stadium
- Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie.

Zur Evaluierung des prognostischen Stellenwertes wurde bei postoperativer Krankheitsprogression der Zeitpunkt der klinischen Detektion von Rezidiven und bei verstorbenen Patienten der Todeszeitpunkt erfasst. Für letzteres wurde zum Teil das Zentralregister der Statistik Austria herangezogen. Bei Patienten, die im Studienverlauf ausschieden, wurde das Datum des letzten Follow-up dokumentiert.

Wichtigster Teil der retrospektiven Datenerhebung waren die absoluten Blutwerte der Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, die einen Tag bis maximal eine Woche präoperativ gemessen worden waren. Die Quotienten der inflammatorischen Marker wurden wie folgt definiert:

Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio: $\frac{\text{Absolutzahl der Neutrophilen}}{\text{Absolutzahl der Lymphozyten}}$

Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio: $\frac{\text{Absolutzahl der Thrombozyten}}{\text{Absolutzahl der Lymphozyten}}$

2.3 Statistische Auswertung

2.3.1 Klinische Endpunkte

Folgende Endpunkte wurden zur Evaluierung der prognostischen Aussagekraft gewählt:

Krankheitsfreies Überleben ("disease-free-survival", DFS)

Das DFS steht für den Zeitraum zwischen Datum der Diagnosestellung und dem klinischem Nachweis lokoregionärer Rezidive und/oder Fernmetastasen bzw. dem Tod jeglicher Ursache.

Gesamtüberleben ("overall survival", OAS)

Zumal die Todesursache retrospektiv schwer feststellbar war, wählten wir das OAS als zweiten prognostischen Endpunkt. OAS bezeichnet den Zeitraum zwischen Datum der Diagnosestellung und dem Tod jeglicher Ursache.

Zensierte Daten

Ist bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes kein Ereignis eingetreten oder ein Patient dem Follow-up frühzeitig verloren gegangen, so spricht man von zensierten Beobachtungsintervallen. Bleiben diese zensierten Daten unberücksichtigt, kommt es zu einer Verzerrung der Ergebnisse. Deshalb wurden statistische Methoden gewählt, die zensierte Patienten in die Analyse der Überlebenszeit einfließen lassen (Kaplan-Meier-Methode und Cox-Regressionsanalyse).

2.3.2 Statistische Analyse

Die absoluten und relativen Häufigkeiten aller Variablen wurden in Kreuztabellen beschrieben und gegenübergestellt. Darauf basierend konnten die Häufigkeitsassoziationen zwischen den einzelnen Variablen mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson kalkuliert werden.

Um den Einfluss präoperativer NLR, TLR und klinisch-pathologischer Faktoren auf DFS und OAS zu berechnen, wurden verschiedene statistische Verfahren angewandt.

Die Überlebenszeiten von Gruppen mit unterschiedlich ausgeprägten Variablen wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven analysiert und graphisch dargestellt. Der Log-rank-Test, eine Form der Chi-Quadrat-Analyse, überprüfte diese Überlebenskurven auf Gleichheit.

Signifikante Unterschiede signalisierten einen Einfluss der jeweiligen Variable auf DFS und OAS. Um diesen Einfluss genauer zu definieren, wurden in der univariaten Cox-Regressionsanalyse die Assoziation klinisch-pathologischer Faktoren, der NLR und der TLR mit den prognostischen Endpunkten kalkuliert. Anschließend überprüfte man im multivariaten Cox-Regressionsmodell durch Adjustierung hinsichtlich potentieller Einflussfaktoren, ob diese Assoziationen unabhängig von anderen Variablen ihre Signifikanz behielten. Auf diese Weise konnten unabhängige Prognoseparameter identifiziert werden.

Die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse wurden zusätzlich in Form deskriptiver "hazard ratios" (HR) dargestellt. Das "Hazard" beschreibt das momentane Rezidiv- und Todesrisiko in einer definierten Gruppe. Vergleicht man dieses mit dem Hazard einer anderen Gruppe, so ergibt sich das HR, ein Quotient, der zeigt, welcher Risikounterschied zwischen den beiden definierten Gruppe besteht.

Die korrespondierenden Konfidenzintervalle (KI) geben mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit an, dass das tatsächliche HR der Gesamtpopulation im definierten Streubereich liegt.

In allen Analysen wurde ein P-Wert von <0.05 als statistisch signifikant erachtet.

Bei der Wahl der Cut-off-Werte für die NLR und TLR orientierte man sich an bereits publizierten Studien (vgl. Kapitel 3.2 und 3.3)

Sämtliche statistischen Analysen wurden mittels Statistical Package for Social Sciences, Version 20,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden klinisch-pathologische Faktoren und präoperative Marker der systemischen inflammatorischen Response bei 246 Patienten mit CC erhoben.

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug 63 Jahre. Die mediane Follow-up-Zeit lag bei 28.5 Monaten. Von allen 246 Patienten entwickelten 63 (25.6%) ein lokoregionäres Rezidiv oder Fernmetastasen und 33 (13.4%) starben innerhalb der Follow-up-Periode.

3.1 Klinisch-pathologische Variablen

Die Geschlechter waren in unserem Studienkollektiv mit 144 (58.5%) Männer und 102 (41.5%) Frauen etwas ungleich verteilt.

Anhand des Grenzwertes von 60 Jahren wurde die Kohorte in zwei Altersgruppen eingeteilt. 80 Patienten (32.5%) waren bei Diagnosestellung <60 Jahre, 166 Patienten (67.5%) \geq 60 Jahre alt.

Das T-Stadium, das in der TNM-Klassifikation die Invasionstiefe des Primärtumors beschreibt, war wie folgt verteilt:

Bei 7 Patienten (2.8%) wurde ein T1-Stadium, bei 13 Patienten (5.3%) ein T2-Stadium nachgewiesen. Der Großteil der Patienten zeigte präoperativ bereits ein fortgeschrittenes Tumorwachstum: 168 Patienten (68.3%) wurden im T3-Stadium, 58 Patienten (23.6%) im T4-Stadium eingestuft.

101 Patienten (41.1%) in unserem Kollektiv hatten bei Diagnosestellung keinen Lymphknotenbefall (N0). Bei 94 Patienten (38.2%) waren 1 bis maximal 3 Lymphknoten (N1), bei 50 Patienten (20.3%) \geq 4 Lymphknoten (N2) befallen. In einem Fall war keine Dokumentation des N-Stadiums vorliegend.

Da Tumorinvasionstiefe und Lymphknotenbefall im klinischen (UICC-)Stadium zusammengefasst werden, wurde nur letzteres in die statistische Analyse miteinbezogen.

Im histologischen Grading wurde bei 21 Patienten (8.5%) ein gut differenzierter Tumor, bei 157 Patienten (63.8%) ein mäßig differenzierter Tumor und bei 66 Patienten (26.8%) ein wenig differenzierter Tumor beschrieben. Bei 2 Patienten fehlten diesbezügliche Daten. Da in keinem einzigen Fall ein undifferenzierter Tumor (G4) histologisch dokumentiert wurde, blieb dieser Differenzierungsgrad unberücksichtigt.

Unser Patientenkollektiv umfasste ausschließlich Patienten, bei denen, auf der TNM-Klassifikation basierend, ein CC im Stadium II oder III diagnostiziert wurde. 99 Patienten (40.2%) befanden sich im Stadium II. Der mehrheitliche Anteil von 146 Patienten (59.3%), hatte bereits Lymphknotenmetastasen und wurde somit im Stadium III eingestuft. In einem Fall war keine Zuordnung zu einem klinischen Stadium möglich.

Insgesamt wurde bei 156 Patienten (63.4%) der Kohorte postoperativ eine 5-FU-basierte, adjuvante Chemotherapie durchgeführt.

Dabei erhielten 40.4% der Patienten im Stadium II und 79.5% der Patienten im Stadium III eine adjuvante Chemotherapie. Die Chi-Quadrat-Analyse bestätigte, dass Patienten im Stadium III signifikant häufiger mit Chemotherapeutika behandelt worden waren als Patienten im Stadium II ($\chi^2=38.890$, $p<0.001$).

In einem Fall waren keine diesbezügliche Daten verfügbar.

Zusätzlich lag bei 84 Patienten eine Dokumentation des durchgeführten Chemotherapie-Regimes vor.

Im Stadium II erhielten 9 Patienten eine Kombinationstherapie nach dem FOLFOX-Schema, nur 1 Patient wurde mit einer 5-FU-Monotherapie behandelt.

Im Stadium III erhielten 65 Patienten eine Kombinationstherapie nach dem FOLFOX-Schema und 9 Patienten wurden mit einer 5-FU-Monotherapie behandelt.

3.2 Die Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio

Der 2001 von Zahorec et al. (101) erstmals suggerierte Cut-off-Wert von $NLR \geq 5$, wurde in aktuellen Studien, u.a. von Absenger et al. (2013a) (29) Hung et al. (114), Kwon et al. (36) und Son et al. (98), übernommen und somit auch in dieser Studie verwendet.

Von 173 Patienten (70.3%) mit einer $NLR < 5$ kam es bei 36 Patienten (20.8%) zu lokoregionären Rezidiven oder Fernmetastasen, bei 19 Patienten (11.0%) trat der Tod während des Beobachtungszeitraumes ein. Dahingegen entwickelten in der Gruppe mit einer $NLR \geq 5$, die 73 Patienten (29.7%) umfasste, 27 Patienten (37.0%) ein Rezidiv und 14 Patienten (19.2%) verstarben.

In Abbildung 6 werden diese Proportionen graphisch dargestellt.

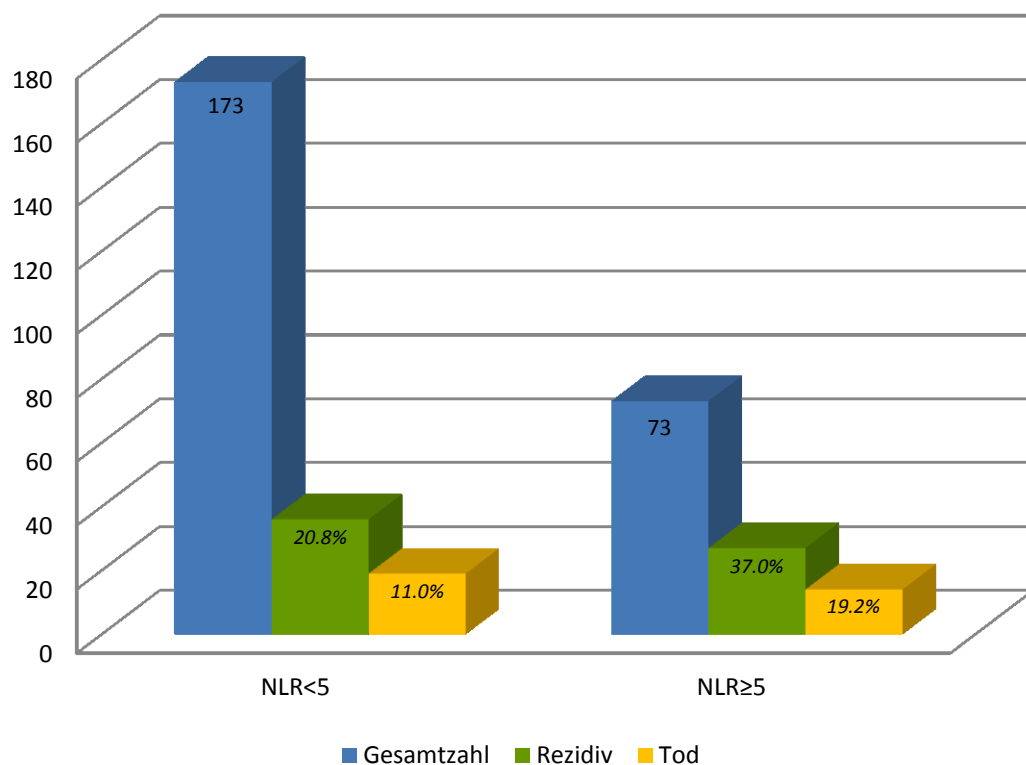


Abbildung 6 Rezidiv- und Todesfälle in den Gruppen mit unterschiedlicher NLR

3.3 Die Thrombozyten-Lymphozyten-Ratio

Wir orientierten uns bei der Wahl des Cut-off-Wertes für die TLR u.a. an den Studien von Kwon et al. (2012) (36) und He et. al. (2012) (104), welche die Gruppen <150, 150-300 und >300 verwendeten.

Von 62 Patienten (25.2%) mit TLR<150 entwickelten 10 Patienten (16.1%) ein Rezidiv und 7 Patienten (11.3%) verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums.

In der großen Gruppe von 129 Patienten (52.4%) mit einer TLR zwischen 150 und 300 zählte man 36 Patienten (27.9%) mit Rezidiven sowie 16 Todesfälle (12.4%).

Bei 55 Patienten (22.4%) wurde eine TLR>300 gemessen. In dieser Gruppe entwickelten 17 Patienten (30.9%) Rezidive, 10 Patienten (18.2%) verstarben.

In Abbildung 7 werden diese Proportionen graphisch dargestellt.

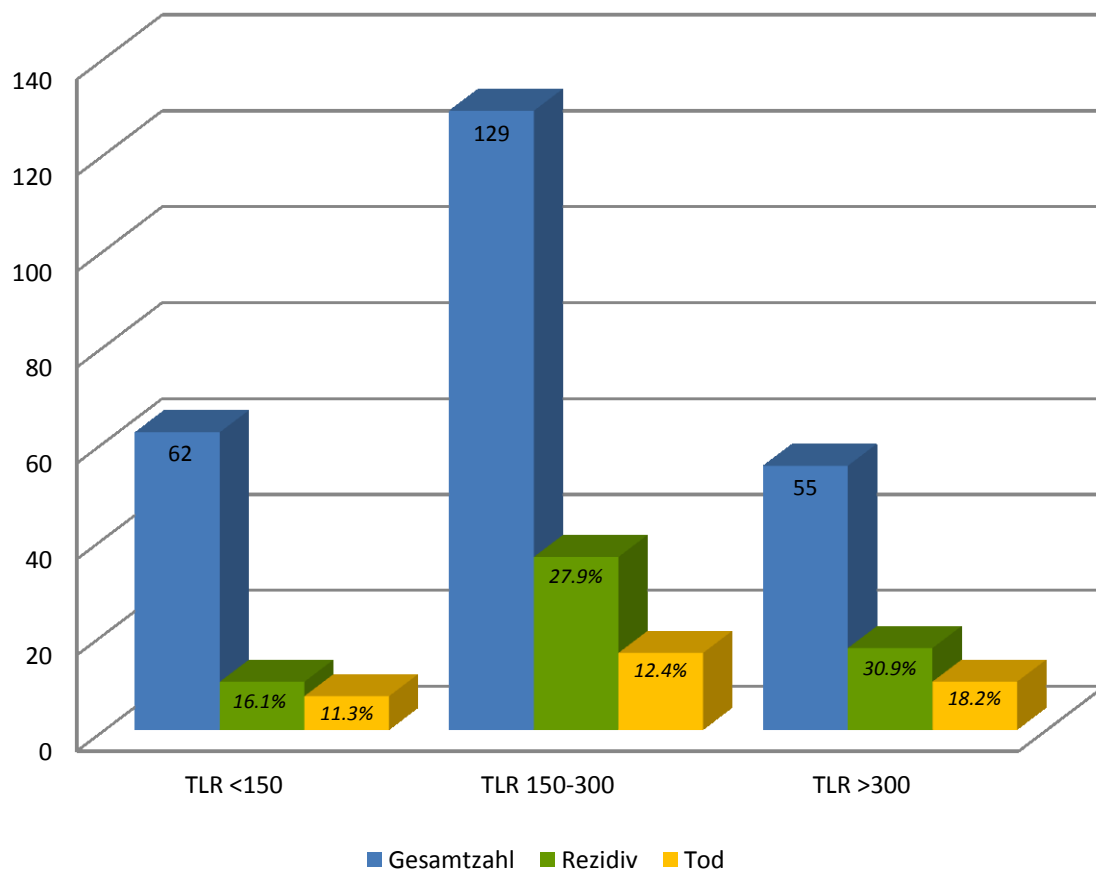


Abbildung 7 Rezidiv- und Todesfälle in den Gruppen mit unterschiedlicher TLR

3.4 Häufigkeitsassoziationen klinisch-pathologischer Variablen mit NLR und TLR

Um herauszufinden, ob die beiden inflammatorischen Parameter mit anderen klinisch-pathologischen Werten in Zusammenhang stehen, wurden Häufigkeitsassoziationen berechnet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 4 Verteilung klinisch-pathologischer Variablen und Häufigkeitsassoziationen mit NLR

Variable	NLR		P-Wert
	<5	≥5	
Alter			
<60 Jahre	56 (70.0%)	24 (30.0%)	0.938
≥60 Jahre	117 (70.5%)	49 (29.5%)	
Geschlecht			
männlich	103 (71.5%)	41 (28.5%)	0.624
weiblich	70 (68.6%)	32 (31.4%)	
Grading			
G1	12 (57.1%)	9 (42.9%)	0.399
G2	112 (71.3%)	45 (28.7%)	
G3	47 (71.2%)	19 (28.8%)	
Stadium			
II	74 (74.7%)	25 (25.3%)	0.200
III	98 (67.1%)	48 (32.9%)	
Adj. CTX			
Nein	68 (76.4%)	21 (23.6%)	0.109
Ja	104 (66.7%)	52 (33.3%)	

Im Chi-Quadrat-Test zeigte sich keine Häufigkeitsassoziation zwischen Geschlecht und NLR ($\chi^2=0.241$, $p=0.624$) allerdings war eine erhöhte TLR signifikant mit dem weiblichen Geschlecht ($\chi^2=6.754$, $p=0.034$) assoziiert. Frauen hatten häufiger eine TLR >150 (83.3%) als Männer (68.7%).

Patienten jünger und älter als 60 Jahre zeigte annähernd die gleiche Verteilung der NLR ($\chi^2=0.006$, $p=0.938$). Auch die Distribution der TLR-Werte war nicht mit dem Alter ($\chi^2=0.737$, $p=0.692$) assoziiert.

Überdies verteilten sich sowohl die NLR als auch die TLR unabhängig vom Stadium (NLR: $\chi^2=1.639$, $p=0.200$, TLR: $\chi^2=2.344$, $p=0.310$) und Grading (NLR: $\chi^2=1.835$, $p=0.399$, TLR: $\chi^2=1.374$, $p=0.849$).

Bei Patienten, die eine postoperative adjuvante Chemotherapie erhielten, waren NLR und TLR annähernd gleich verteilt (NLR: $\chi^2=2.569$, $p=0.109$, TLR: $\chi^2=3.413$, $p=0.182$) wie bei Patienten, die ausschließlich chirurgisch behandelt wurden.

Tabelle 5 Verteilung klinisch-pathologischer Variablen und Häufigkeitsassoziationen mit TLR

Variable	TLR			P-Wert
	<150	150-300	>300	
Alter				
<60 Jahre	18 (22.5%)	45 (56.3%)	17 (21.3%)	0.692
≥60 Jahre	44 (26.5%)	84 (50.6%)	38 (22.9%)	
Geschlecht				
männlich	45 (31.3%)	69 (47.9%)	30 (20.8%)	0.034
weiblich	17 (16.7%)	60 (58.8%)	25 (24.5%)	
Grading				
G1	7 (33.3%)	10 (47.6%)	4 (19.0%)	0.849
G2	41 (26.1%)	81 (51.6%)	35 (22.3%)	
G3	14 (21.2%)	36 (54.5%)	16 (24.2%)	
Stadium				
II	29 (29.3%)	46 (46.5%)	24 (24.2%)	0.310
III	33 (22.6%)	82 (56.2%)	31 (21.2%)	
Adj. CTX				
Nein	28 (31.5%)	45 (50.6%)	16 (18.0%)	0.182
Ja	34 (21.8%)	83 (53.2%)	39 (25.0%)	

3.5 Überlebenskurven

Die Überlebenszeiten der verschiedenen Gruppen der NLR und TLR wurden in Kaplan-Meier-Kurven optisch visualisiert. Die x-Achse beschreibt die Überlebensdauer in Monaten, die y-Achse die kumulative Wahrscheinlichkeit ein lokoregionäres Rezidiv und/oder Fernmetastasen zu entwickeln (DFS) bzw. zu versterben (OAS). Mittels Log-rank-Test wurden die Unterschiede zwischen den Überlebenskurven auf statistische Signifikanz geprüft.

3.5.1 Überlebensunterschiede in Bezug auf die NLR

Das DFS der Patienten mit $NLR < 5$ und mit $NLR \geq 5$ wurde durch Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 8 graphisch dargestellt und verglichen. Optisch erkennt man einen klaren Unterschied zwischen den anfangs divergierenden und dann nahezu parallel verlaufenden Überlebenskurven. Dieser Verlauf verdeutlicht ein kürzeres DFS bei Patienten mit erhöhter NLR. Der Vergleich im Log-rank-Test ergab einen signifikanten Unterschied von $p=0.005$.

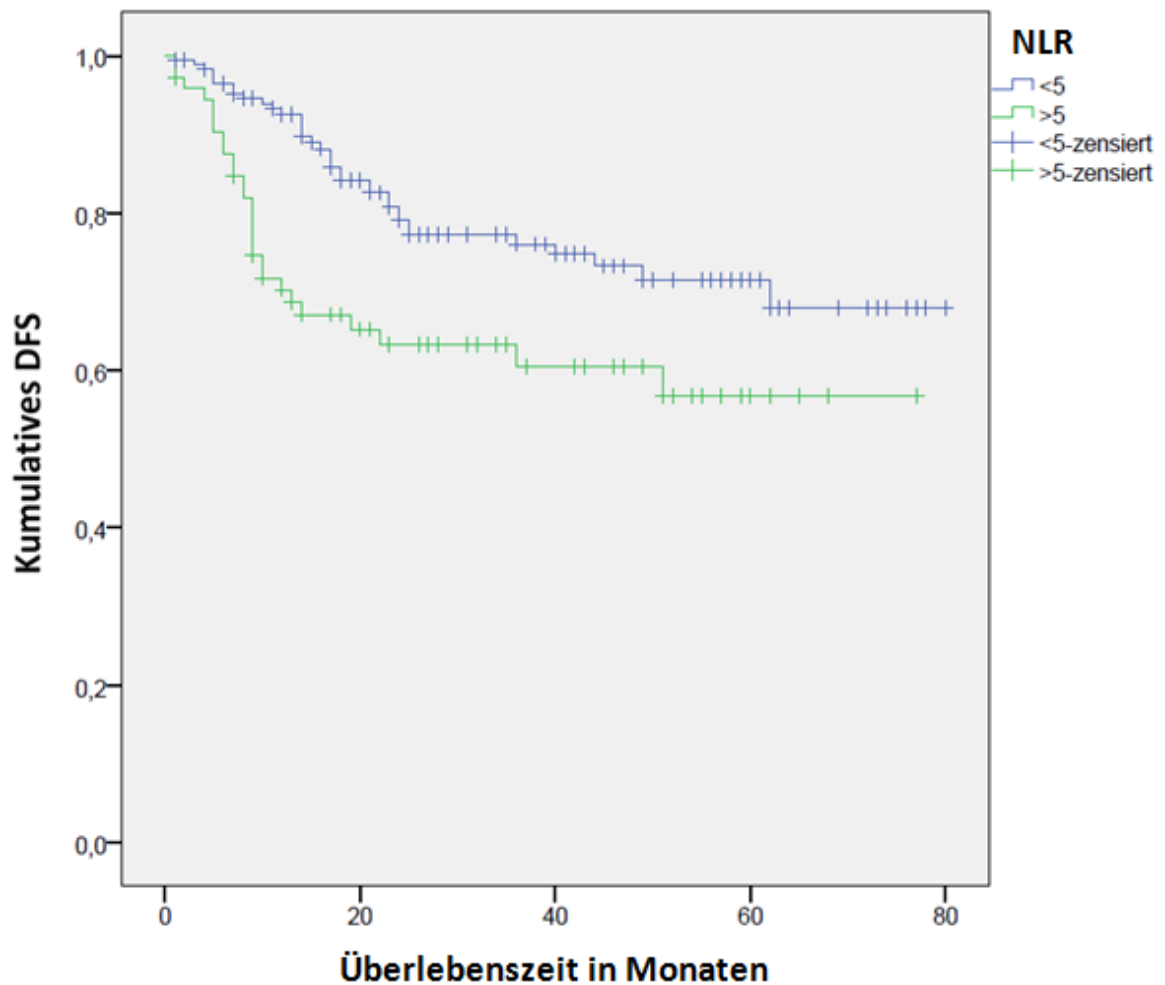


Abbildung 8 Kaplan-Meier-Kurven für das DFS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender NLR

Die Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 9 veranschaulichen das OAS der Patienten mit $NLR < 5$ und mit $NLR \geq 5$. Patienten mit einer $NLR \geq 5$ zeigten einen optischen Trend zu kürzerer Überlebenszeit. Der Unterschied der Kurvenverläufe war allerdings mit $p=0.118$ nicht statistisch signifikant.

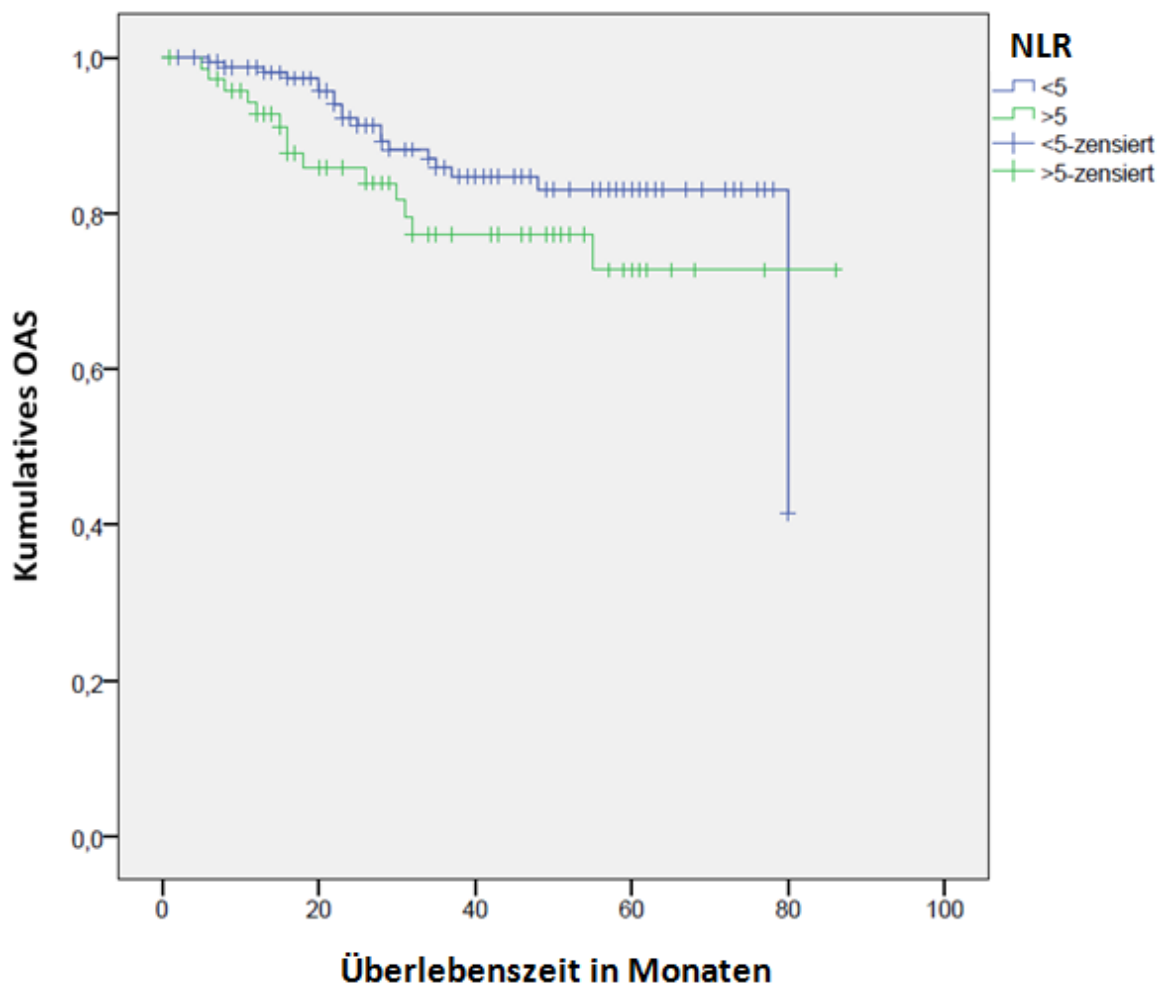


Abbildung 9 Kaplan-Meier-Kurven für das OAS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender NLR

3.5.2 Überlebensunterschiede in Bezug auf die TLR

Die Kurven für das DFS der Patientengruppen mit TLR<150, mit TLR 150-300 und mit TLR >300 werden in Abbildung 10 vergleichend dargestellt. In den ersten 10 Monaten zeigen die Überlebenskurven marginale optische Differenz. Anschließend verläuft die Kurve der Patienten mit TLR<150 parallel zur x-Achse, in dieser Gruppe treten nach ca. 25 Monaten keine neuen Rezidive mehr auf. Im Vergleich dazu zeigen Patienten mit einer TLR >150 einen visuellen Tendenz zu erhöhtem Rezidivrisiko, wobei Patienten mit einer TLR >300 den schlechtesten Verlauf hatten.

Der Log-rank-Test ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede im paarweisen Vergleich von TLR<150 und TLR 150-300 ($p=0.114$) sowie TLR<150 und TLR >300 ($p=0.069$), wenn auch bei letzterem ein gewisser Trend ($p<0.1$) vermerkt werden konnte.

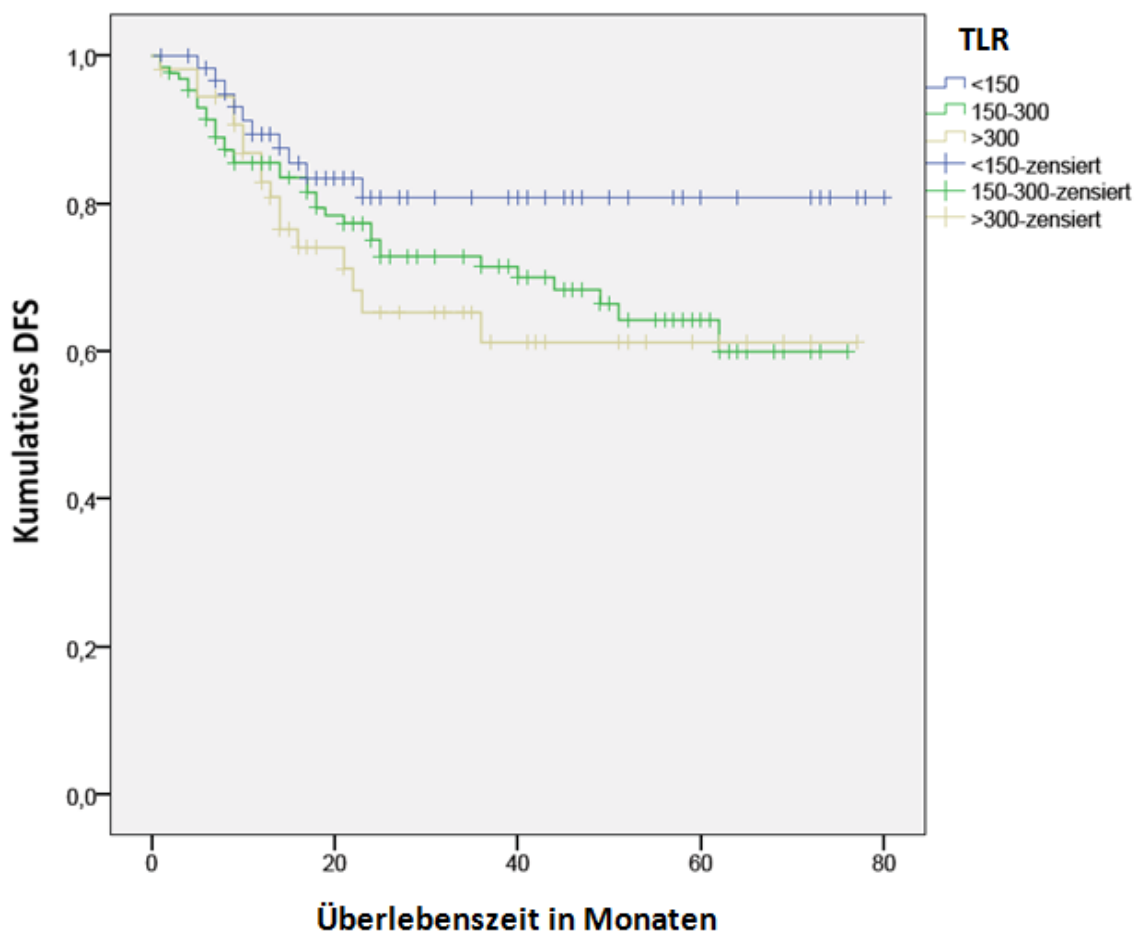


Abbildung 10 Kaplan-Meier-Kurven für das DFS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender TLR

In Abbildung 11 wird die optische Visualisierung des OAS der einzelnen Gruppe der TLR dargestellt. Die Kaplan-Meier-Kurven für TLR<150 und für TLR 150-300 überdecken sich nahezu, dementsprechend besteht kein signifikanter Unterschied.

Der Kurvenverlauf der Gruppe mit TLR>300 deutet auf eine kürzere Überlebenszeit bei diesen Patienten hin. Der Unterschied war allerdings mit $p=0.338$ zur Gruppe mit TLR<150 und mit $p=0.191$ zur Gruppe mit TLR 150-300 nicht signifikant.

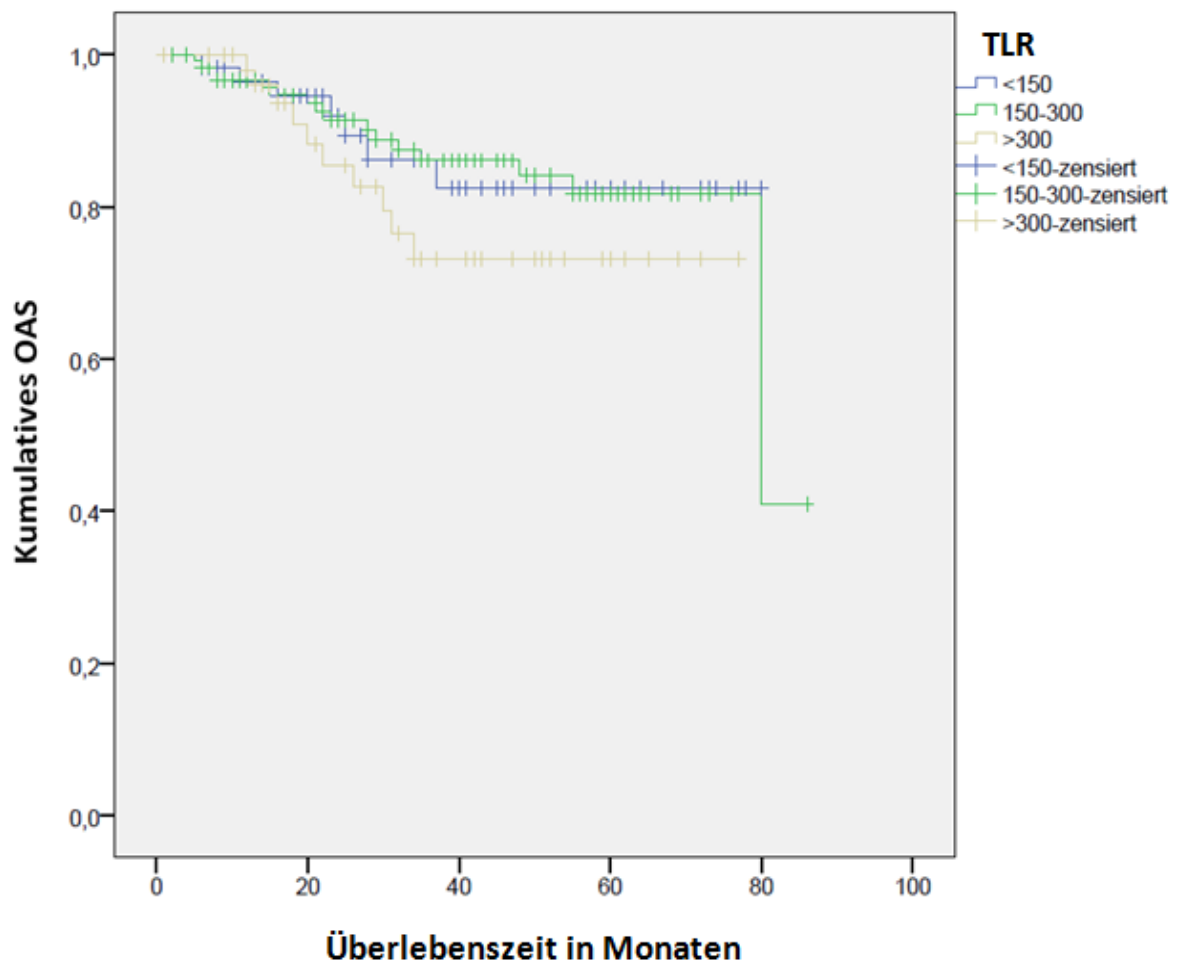


Abbildung 11 Kaplan-Meier-Kurven für das OAS der Patientengruppen, kategorisiert nach entsprechender TLR

3.6 Klinisches Outcome in der Cox-Regressionsanalyse

3.6.1 Prognostischer Wert der klinisch-pathologischen Variablen

In der univariaten Cox-Regressionsanalyse wurde der Einfluss klinisch-pathologischer Variablen auf das Outcome weiterführend untersucht. Die Ergebnisse und die Häufigkeitsverteilung der inkludierten Variablen fasst Tabelle 6 zusammen.

Die univariaten Cox-Analyse ergab eine signifikante Assoziation zwischen dem Alter und OAS. Patienten über 60 Jahren hatten im Vergleich zu jüngeren Patienten ein 2.7-fach höheres Risiko im Beobachtungszeitraum zu versterben (HR 2.66, 95% KI 1.03-6.89, $p=0.044$). Das Rezidivrisiko (DFS) war hingegen altersunabhängig.

Zwischen den Geschlechtern bestand im DFS kein signifikanter Unterschied und das OAS war bei männlichen und weiblichen Patienten sogar annähernd gleich.

Das Grading stand in der univariaten Cox-Analyse in keinem Zusammenhang mit dem DFS, wurde aber signifikant mit dem OAS assoziiert (G1 vs. G2: HR 0.45, 95% KI 0.15-1.39, G1 vs. G3: HR 1.37, 95% KI 0.45-4.12, $p=0.013$).

Unsere Resultate zeigten eine Verschlechterung der Prognose mit dem Befall regionärer Lymphknoten: Patienten im Stadium III zeigten eine mehr als 2-fach erhöhte Rezidiv- und Sterberate gegenüber Patienten im Stadium II (DFS: HR 2.26, 95% KI 1.28-3.96, $p=0.005$, OAS: HR 2.54, 95% KI 1.10-5.88, $p=0.029$). Das Stadium war die einzige-klinisch-pathologische Variable, die univariat sowohl mit DFS als auch mit OAS assoziiert wurde.

Die postoperative adjuvante Chemotherapie konnte weder das DFS noch das OAS der Patienten signifikant verlängern.

Tabelle 6 Verteilung der klinisch-pathologischen Variablen, NLR und TLR und ihre Assoziation mit DFS und OAS in der univariaten Analyse

Variable	n	%	DFS		OAS	
			HR (95% KI)	P-Wert	HR (95% KI)	P-Wert
Alter						
<60 Jahre	80	32.5	1	0.218	1	0.044
≥60 Jahre	166	67.5	1.43 (0.81-2.52)		2.66 (1.03-6.89)	
Geschlecht						
männlich	144	58.8	1	0.575	1	0.929
weiblich	102	41.5	1.15 (0.70-1.90)		1.03 (0.52-2.06)	
Grading						
G1	21	8.5	1	0.417	1	0.013
G2	157	63.8	1.29 (0.46-3.60)		0.45 (0.15-1.39)	
G3	66	26.8	1.75 (0.60-5.09)		1.37 (0.45-4.12)	
Fehlend	2	0.08				
Stadium						
II	99	40.2	1	0.005	1	0.029
III	146	59.3	2.26 (1.28-3.96)		2.54 (1.10-5.88)	
Fehlend	1	0.4				
Adj. CTX						
Nein	89	36.2	1	0.306	1	0.128
Ja	156	63.4	0.77 (0.46-1.28)		0.58 (0.29-1.17)	
Fehlend	1	0.4				
NLR						
<5	173	70.3	1	0.006	1	0.123
≥5	73	29.7	2.02 (1.22-3.32)		1.72 (0.86-3.44)	
TLR						
<150	62	25.2	1	0.180	1	0.411
150-300	129	52.4	1.75 (0.87-3.53)		1.02 (0.42-2.49)	
>300	55	22.4	2.05 (0.94-4.48)		1.69 (0.64-4.46)	

3.6.2 Prognostischer Wert der NLR und TLR

Der Log-rank-Test hatte bereits durch direkten Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven eine Assoziation zwischen NLR und DFS gezeigt, hingegen konnten bei den übrigen Überlebenskurven keine signifikanten Unterschiede berechnet werden. Um diese Ergebnisse zu verifizieren und die HR mit 95% KI zu berechnen, wurde zusätzlich eine univariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 6 dargestellt, die P-Werte weichen minimal von denen des Log-rank-Tests ab.

Im Vergleich zu Patienten mit einer $NLR < 5$, hatten jene mit einer $NLR \geq 5$ ein doppelt so hohes Risiko im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv zu entwickeln (HR 2.02, 95% KI 1.22-3.32, $p=0.006$). Dahingegen waren Unterschiede im OAS, dem Log-rank-Testergebnis entsprechend, ohne statistische Signifikanz. Ebenso stand die TLR als Gesamtvariable in keinem signifikanten Zusammenhang mit den prognostischen Endpunkten.

3.6.3 Unabhängige Prognoseparameter

Um die Prognoseparameter auf Unabhängigkeit zu prüfen wurde schließlich eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, in die neben Alter, Geschlecht und den inflammatorischen Markern, alle Variablen, die in der univariaten Analyse signifikant mit DFS oder OAS assoziiert waren, miteinbezogen wurden. Die Ergebnisse werden in Tabelle 7 aufgelistet.

Die prognostische Signifikanz des Stadiums (HR 2.11, 95% KI 1.19-3.75, $p=0.010$) und der NLR (HR 1.94, 95% KI 1.06-3.55, $p=0.032$) für das DFS blieb in der multivariaten Cox-Analyse bestehen. Alter, Geschlecht, Grading und TLR zeigten weder eine univariate noch eine multivariate signifikante Assoziation mit DFS.

Zumal NLR und TLR in der univariaten Analyse nicht mit dem OAS in Zusammenhang standen, konnte in Folge auch eine unabhängige Assoziation ausgeschlossen werden.

Das Stadium hatten in der univariaten Analyse eine signifikante Assoziation mit OAS erreicht, in der multivariaten Analyse wurde diese allerdings knapp verfehlt ($p=0.068$). Hingegen konnten Alter und Grading die statistische Signifikanz in Bezug auf die Korrelation mit OAS behalten (Alter: HR 2.74, 95% KI 1.05-7.15, $p=0.040$ und Grading: G1 vs. G2: HR 0.47, 95% KI 0.15-1.50, G1 vs. G3: HR 1.53, 95% KI 0.48-4.89, $p=0.009$).

Wie in der univariaten Analyse wurden beim Vergleich der Gradinggruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede im OAS gefunden: G1 vs. G2: $p=0.204$, G1 vs. G3: $p=0.471$ (nicht in Tabelle 7 angeführt).

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass ein Vergleich des OAS bei mäßig (G2) und wenig (G3) differenzierten Tumoren nicht durchgeführt wurde.

Tabelle 7 Assoziationen klinisch-pathologischer Variablen, NLR und TLR mit DFS und OAS in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse

Variable	DFS		OAS	
	HR (95% KI)	P-Wert	HR (95% KI)	P-Wert
Alter				
<60 Jahre	1	0.235	1	0.040
≥60 Jahre	1.42 (0.80-2.52)		2.74 (1.05-7.15)	
Geschlecht				
männlich	1	0.798	1	0.795
weiblich	1.07 (0.64-1.78)		1.10 (0.53-2.27)	
Grading				
G1	1	0.443	1	0.009
G2	1.32 (0.46-3.76)		0.47 (0.15-1.50)	
G3	1.77 (0.59-5.26)		1.53 (0.48-4.89)	
Stadium				
II	1	0.010	1	0.068
III	2.11 (1.19-3.75)		2.20 (0.94-5.12)	
NLR				
<5	1	0.032	1	0.288
≥5	1.94 (1.06-3.55)		1.63 (0.66-4.04)	
TLR				
<150	1	0.677	1	0.704
150-300	1.39 (0.66-2.92)		0.87 (0.33-2.30)	
>300	1.26 (0.49-3.24)		1.27 (0.36-4.47)	

4. DISKUSSION

Das CRC ist nach wie vor jene Krebsentität mit der zweithäufigsten Mortalität in den westlichen Industrienationen. Etwa die Hälfte der Betroffenen entwickelt im Krankheitsverlauf Fernmetastasen (6), die 5-JÜR liegt laut aktuellen Studien nur knapp über 60% (28).

Die Prognoseabschätzung mittels histopathologischem TNM-Staging ist in vielen Fällen inadäquat, besonders Patienten im Stadium II und III zeigen ein ausgesprochen heterogenes Überleben (35). Um die individuelle Risikostratifizierung als wichtigste Voraussetzung zur Therapieentscheidung zu verbessern, wurde in den letzten Jahren aktiv nach zusätzlichen prognostischen Biomarkern geforscht. Im Zuge aktueller Forschungsarbeiten zur Tumorimmunologie erlangten inflammatorische Prognosemarker zusehends Stellenwert in der Onkologie. Aus histopathologischen Arbeiten ist die prognostische Relevanz des lokalen Immuninfiltrates bei vielen Tumorentitäten schon seit langem bekannt, klinisch etablierten sich allerdings leichter messbare, systemische Immunmarker. Hier wurden neben CRP und mGPS nicht zuletzt die NLR und TLR vorgeschlagen, obgleich ihre prognostische Aussagekraft bis heute, speziell für einzelne Stadien, umstritten ist.

Diese retrospektive Studie setzte sich zum Ziel, die Rolle der präoperativen Parameter der systemischen inflammatorischen Response, NLR und TLR, als prognostische Biomarker für CC-Patienten im Stadium II und III zu klären.

Insgesamt versuchte man durch die definierten Ein- und Ausschlusskriterien ein paar methodische Schwächen hinsichtlich der großen Heterogenität der Kohorte zu vermeiden. Da zwei etablierte zelluläre Marker der systemischen inflammatorischen Response bezüglich ihres prognostischen Wertes in der gleichen Kohorte erhoben, analysiert und verglichen wurden, hatte diese Studie klare Vorteile gegenüber früheren Arbeiten, die sich nur mit einem Immunmarker beschäftigten.

Eine weitere Stärke war die Eingrenzung des Kollektivs auf Patienten mit CC im UICC-Stadium II und III. Auf diese Weise konnte der prognostische Wert der NLR und TLR ausschließlich für die Entität CC in bestimmten Stadien evaluiert werden. Auch Ding et al. (113), Hung et al. (114) und zwei Studien von Absenger et al. (29,61) hatten die NLR ausschließlich bei CC-Patienten im Stadium II und/oder III untersucht. Hingegen war unsere Studie die erste, die zusätzlich den prognostischen Wert der TLR evaluierte.

Nicht zuletzt hat eine retrospektive Studie den Vorteil, in der Regel ethisch unbedenklicher und mit weniger finanziellen Kosten verbunden zu sein als eine prospektive Studie.

Allerdings sollten auch die Limitationen dieser Studie diskutiert werden. Da die Patienten retrospektiv, je nach Vorliegen hämatologischer Laborbefunde ausgewählt wurden, kann ein "Selektionsbias" nicht ausgeschlossen werden. Demzufolge ist unsere Stichprobenkohorte möglicherweise nicht 100% repräsentativ für die Gesamtheit der CC-Patienten im Stadium II und III.

Eine weitere Schwäche unserer Studie ist die relativ geringe Fallzahl von nur 246 Patienten aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit inflammatorischer Parameter in der präoperativen Woche. Man sollte bedenken, dass eine statistische Signifikanz gewisser Assoziationen, die in größeren Kohorten bestätigt wurde, in kleineren Kohorten oft nicht erreicht werden kann, da die statistische Power fehlt.

Wie in allen retrospektiven Studien bestand die Gefahr der Fehlschlüsse durch nicht erhobene Einflussgrößen, die als "Confounder" (Störfaktoren) mit den erhobenen Variablen assoziiert waren und auf diese Weise Zusammenhänge manipulieren konnten. Hinsichtlich wichtiger möglicher Confounder, wie Alter, Geschlecht, Stadium oder Grading, wurden die Korrelationen in der multivariaten Regressionsanalyse durch Stratifizierung adjustiert. Allerdings wurden Komorbiditäten, Medikamente (insbesondere NSAR, Kortikoide, Thrombozytenaggregationshemmer) oder die Qualität der chirurgischen Resektion (insbesondere Anzahl der resezierten Lymphknoten) nicht berücksichtigt, obwohl diese Faktoren möglicherweise ungewollten Einfluss auf die hämatologischen Parameter und/oder das Outcome hatten. Angesichts dessen wäre auch eine Unterscheidung zwischen elektiven und notfallmäßigen Operationen durchaus sinnvoll gewesen, da gezeigt worden war, dass Patienten, die aufgrund von Obstruktion, Perforation, Blutung oder Ischämie notoperiert wurden, sich präoperativ mit erhöhten NLR- und TLR-Werten präsentierten (102,114). Diese Daten waren aber nicht verfügbar oder aus den vorhandenen Datenbanken retrospektiv nicht erhebbar.

An dieser Stelle sollen zunächst die erhobenen klinisch-pathologischen Variablen hinsichtlich ihrer Korrelation mit NLR und TLR und ihrer prognostische Aussagekraft besprochen werden, in Folge widmen wir uns der zentralen Frage nach der Anwendung der NLR und TLR als Prognosemarker beim potentiell kurativ resezierbaren CC.

In der untersuchten Kohorte waren etwa 68% der Patienten bei Diagnosestellung älter als 60 Jahre. In Bezug auf frühere Arbeiten spricht dies für eine gute Altersverteilung, welche sich auch mit epidemiologischen Daten (28) vergleichen lässt.

In der älteren Patientengruppe wurden außerdem keine signifikant erhöhten NLR- und TLR-Werte beobachtet. Vergleicht man dies mit der aktuellen Literatur, so stößt man auf widersprüchliche Ergebnisse. Obgleich sich unser Resultat mit dem zahlreicher anderer Arbeiten (36,104,121,125) deckt, präsentierten sich in Studien von Hung et al. (114), Shibutani et al (107) und Jankova et al. (122) ältere Patienten mit erhöhten NLR-Werten.

In unserer Studie hatte das Alter keinen Einfluss auf das DFS, erreichte aber den Status eines unabhängigen Prognoseparameters für verkürztes OAS. Patienten über 60 Jahren zeigten im Vergleich zu jüngeren Patienten eine 2.7-fach erhöhte Mortalität.

Gleichermaßen wurde in größeren Kohorten (114,122) ein Alter über 65 Jahren im Stadium II multivariat und ein Alter über 75 Jahren im Stadium III mit verkürztem OAS assoziiert.

Angesichts der fehlenden Assoziation mit dem DFS in dieser und in einigen vergleichbaren Studien (113,114,122), lässt sich die altersabhängige Mortalität vermutlich auf das vermehrte Auftreten von Komorbiditäten mit steigendem Lebensalter und weniger auf das CC per se zurückzuführen.

In unserer Studienkohorte waren die Geschlechter mit einem überwiegenden männlichen Anteil von circa 59% nicht gleichermaßen vertreten. Dies spiegelt die weltweit höhere Inzidenz des CRC bei Männern wider (3).

Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die NLR, allerdings zeigten Frauen signifikant häufiger eine erhöhte TLR. Die plausibelste Erklärung für diesen geschlechterspezifischen Unterschied ist die durchschnittlich höhere Thrombozytenzahl bei Frauen im Vergleich zu Männern. Zu dieser Erkenntnis gelangte man bereits in epidemiologischen Studien der 1970er-Jahre (126,127). Szkandera et al. (86) beschrieben ebenfalls eine Assoziation zwischen erhöhter TLR und weiblichen Geschlecht, wohingegen drei weitere Studien (36,104,121) keinen Zusammenhang nachweisen konnten. Wie in vergleichbaren Arbeiten (29,61,114), hatte das Geschlecht auch in unserer Studie keinen Einfluss auf das klinische Outcome.

Der histologische Differenzierungsgrad zeigte keine Häufigkeitskorrelation mit NLR und TLR. Während Kwon et al. (36) und He et al. (104) zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen, berichteten Li et al. in einer Metaanalyse (35), dass eine erhöhte NLR durchschnittlich mit schlechter histologischer Differenzierung assoziiert ist.

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung brachte die Analyse interessante Ergebnisse. Obwohl ein geringer histologischer Differenzierungsgrad bekanntlich mit gesteigertem Metastasierungspotential einhergeht und von der ASCO als Selektionskriterium für eine adjuvante Chemotherapie im Stadium II vorgeschlagen wurde (vgl. Kapitel 1.1.4.3) (27), bestand in unserer Studie kein Einfluss auf das DFS. Indessen wurde der Differenzierungsgrad als unabhängiger prognostischer Marker für das OAS identifiziert. Im Vergleich mit anderen Studien zur NLR und/oder TLR zeigte dieses Resultat wenig Übereinstimmung. Während Jankova et al. (122) bei CRC-Patienten im Stadium III eine Assoziation des histologischen Differenzierungsgrades mit dem OAS demonstrierten, konnten die meisten Studien (29,61,102) den Einfluss auf das OAS im Stadium II bzw. III nicht bestätigen.

Erstaunlich ist, dass wir beim Vergleich einzelner Gradinggruppen (G1 vs. G2 und G1 vs. G3) hinsichtlich des OAS keine signifikanten Unterschiede finden konnten. Da Patienten mit den Differenzierungsgraden G2 und G3 jedoch nicht hinsichtlich prognostischer Endpunkte verglichen worden waren und die HR der uni- und multivariaten Analyse darauf hindeuten, dass G2-Tumore mit einem besseren OAS und G3-Tumore mit einem schlechteren OAS als G1-Tumore einhergingen, wird hier der signifikante Unterschied vermutet. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die mäßig differenzierten (G2-) Tumore mit ca. 64% die größte Gruppe darstellten.

Es ist bekannt, dass die Beurteilung des histologischen Differenzierungsgrades von Pathologe zu Pathologe stark variieren kann, zumal diese Methode nur bis zu einem gewissen Grad objektivierbar ist (128,129). Da unsere Grading-Variable auf den Befunden der klinischen Routine beruht, ist hier sicherlich eine große Interobserver-Variabilität gegeben. Dies könnte zum Teil die Abweichung unserer Ergebnisse von denen bisheriger Studien und den Überlebensvorteil bei mäßig gegenüber gut differenzierten Tumoren erklären.

Aktuelle Therapierichtlinien empfehlen die adjuvante Chemotherapie im Stadium III als Routinebehandlung und im Stadium II nur bei Hochrisikopatienten (27). Analog zu vergleichbaren Studien (29,61) wurde sie in unserer Kohorte bei 63% der Patienten durchgeführt. Der Anteil der Patienten, die im Stadium II eine adjuvante Chemotherapie erhielten, war mit 40.4% höher als in der Literatur beschrieben (124).

Zudem konnte die adjuvante Chemotherapie in unserer Studienkohorte weder das DFS noch das OAS verlängern. Das könnte verschiedene Gründe haben. Eine mögliche Erklärung ist der marginale Therapieeffekt, der nur bei großer Fallzahl einen signifikanten Überlebensvorteil bringt.

Außerdem wurde demonstriert, dass Patienten mit einer präoperativen $NLR \geq 5$ ein erhöhtes Rezidivrisiko tragen und somit als Hochrisikofälle einzustufen sind. In der Chi-Quadrat-Analyse ließ sich allerdings erkennen, dass diese Hochrisikopatienten retrospektiv nicht signifikant häufiger einer adjuvanten Chemotherapie unterzogen worden waren als Patienten mit einer $NLR < 5$. Insofern könnte man den geringen Erfolg der Chemotherapie auch auf eine verbesserungswürdige Selektion zurückführen. Diese Annahme spricht für die Problematik, dass die bisherigen Entscheidungskriterien zur Durchführung einer Chemotherapie (vgl. Kapitel 1.1.8.2), insbesondere im Stadium II, unzulänglich sind (35). Zusätzliche prädiktive Parameter, wie die NLR oder TLR, werden benötigt, um jene Hochrisikopatienten zu identifizieren, die am ehesten von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren können.

Dass die Chemotherapie das Outcome von CC-Patienten im Stadium II und III nicht wesentlich verbessert, wurde in beiden Arbeiten von Absenger et al. (29,61) bestätigt.

Sie kann aber durchaus die postoperative NLR beeinflussen. In einer Studie von Chua et al. (100) zum metastasiertem CRC, normalisierte sich die NLR bei der Hälfte der Patienten bereits nach einem palliativen Chemotherapiezyklus. Demnach könnte die Frage nach der Anwendung der NLR als prädiktiver Marker für den adjuvanten Chemotherapieerfolg ein Thema weiterer Forschungsarbeiten darstellen.

Obwohl in der Literatur ein fortgeschrittenes TNM-Stadium mit einer ausgeprägten Thrombozytose (130) und mit erhöhten NLR (35) assoziiert wurde, ging in unserer, sowie in den Studien von Absenger et al. (2013b) (61) und Szkandera et al. (86), das Stadium III nicht signifikant häufiger mit erhöhter NLR oder TLR einher als Stadium II. Diese Resultate stärken die Vermutung, dass die systemische Immunreaktion auf das CC

stadienunabhängig ist und NLR und TLR zusätzliche prognostische Informationen liefern können.

Wie zu erwarten hatte das Stadium in unserer Studie unter allen erhobenen klinisch-pathologischen Parametern den höchsten prognostischen Wert, da es sowohl mit DFS, als auch mit OAS assoziiert war. Den Status eines unabhängigen Prognoseparameters erzielte es allerdings nur für DFS. Hinsichtlich des OAS wurde die statistische Signifikanz in der multivariaten Analyse, so wie beim Alter, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl nur knapp verfehlt. Patienten im Stadium III hatten ein mehr als doppelt so hohes Risiko lokoregionäre Rezidive und/oder Fernmetastasen zu entwickeln als Patienten im Stadium II. Unser Resultat verdeutlicht, dass die gängige Prognoseabschätzung anhand des UICC-Stadiums, insbesondere für das DFS, durchaus berechtigt ist.

Absenger et al. kamen in einer Studie (2013b) mit 504 CC-Patienten im Stadium II und III (61) zum selben Ergebnis, während sie in der zweiten Studie (2013a) mit vergleichbarer Kohorte (n=372) (29) zusätzlich eine unabhängige Assoziation mit dem OAS feststellten.

Die zentrale Fragestellung dieser Forschungsarbeit richtete sich nach der Anwendbarkeit der präoperativen NLR und TLR als Prädiktoren für das klinische Outcome beim CC in Stadium II und III, unabhängig von klinischen und pathologischen Faktoren wie Stadium, Grading, Alter und Geschlecht.

Folgendem Ergebnis ist dabei besondere Relevanz beizumessen: In unserer Studie manifestierte sich die NLR als unabhängiger Prognosemarker für DFS. Patienten mit einer präoperativen $NLR \geq 5$ hatten ein etwa doppelt so hohes Risiko lokoregionäre Rezidive oder Fernmetastasen zu entwickeln.

Dies lässt sich in erster Linie mit den Resultaten jener drei aktueller Studien (29,61,102) vergleichen, die CC-Patienten in denselben Stadien untersucht hatten: Absenger et al. konnten in zwei Arbeiten (29,61) den prognostischen Wert der NLR in Bezug auf das Rezidivrisiko für verschiedene Cut-off-Werte (3,7, 4, 5) bestätigen. In der dritten, sehr großen Studie von Chiang et al. (102) ging eine $NLR > 3$ in der multivariaten Analyse mit verkürztem 5-Jahres-DFS einher.

Ferner zeigten in einer Studie mit ausschließlich chirurgisch therapierten CC (Stadium IIa), Patienten mit normaler NLR ein 5-Jahres-RFS von über 90% und Patienten mit $NLR > 4$ ein 5-Jahres-RFS von 64% (113). Chua et al. (100) untersuchten zwei unabhängige Kohorten mit fortgeschrittenem CRC und erkannten, dass selbst eine Normalisierung der NLR nach palliativer Chemotherapie die Tumorprogression um 2 Monate verzögert.

Neben diesen einzelnen Studien findet sich eine bedeutende Fundierung unseres Ergebnisses in der aktuellen systematischen Übersichtsarbeit von Li et al. (35), in der die Ergebnisse aus 10 Kohorten analysiert und alle Endpunkte zur Beschreibung der Rezidivrate unter "progressionsfreiem Überleben" ("progression free survival", PFS) zusammengefasst wurden. Gepoolte Effektschätzer zeigten eine signifikante unabhängige Assoziation zwischen erhöhter NLR vor und verkürztem PFS nach der Behandlung (chirurgische Resektion oder Chemotherapie), allerdings mit beachtlicher Heterogenität. Mittels Meta-Regression konnten Li et al. diese Heterogenität zum Teil durch Unterschiede in der therapeutischen Intervention (chirurgisch vs. nicht-chirurgisch), der Fallzahl (≥ 200 vs. < 200) und dem hauptsächlichen Behandlungsziel (hepatische CRC-Metastasen vs. Primärtumor) erklären. Allerdings inkludierte diese Metaanalyse auch fortgeschrittene Stadien und Patienten mit RC (35).

Entgegen all diesen positiven multivariaten Assoziationen demonstrierten Hung et al. (114) anhand einer Kohorte von 1040 CC-Patienten im Stadium II, dass die präoperative NLR den Status eines unabhängigen Prädiktors für das 5-jährige DFS nicht erreicht. Allerdings wurden Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten, nicht in diese Studie inkludiert. Durch Ausschluss dieser Risikopatienten kann von einem durchschnittlich geringeren Metastasierungspotential ausgegangen werden, was die Vergleichbarkeit dieser Studie limitiert.

Son et al. (98) konnten neuerlich bei 624 Patienten mit CC im Stadium I-III weder uni- noch multivariate Assoziationen zwischen präoperativer $NLR \geq 5$ und DFS finden. Auch dieses Resultat sollte kritisch betrachtet werden, da die NLR nur bei 19 Patienten (3%) erhöht war, während in unserer Studie 73 Patienten (29.7%) gezählt wurden.

Ogleich die NLR in unserer Studie unabhängig mit dem DFS assoziiert war, stand sie mit dem OAS weder in einem univariaten noch multivariaten Zusammenhang. Interessanterweise steht dieses Resultat ganz im Widerspruch zu den Ergebnissen bisheriger Studien, in denen die NLR mehrheitlich als unabhängiger Prognosemarker für das OAS beim CC (29,114) bzw. beim CRC (100,104,112,122) bezeichnet wurde.

Die bereits genannte systematische Übersichtsarbeit von Li et al. (35) analysierte die Resultate aus 16 Studien und demonstrierte, dass trotz substantieller Heterogenität eine erhöhte NLR mit signifikant verkürztem OAS einhergeht. Da bis auf zwei Studien das Ergebnis aus multivariaten Analysen stammte, kann prinzipiell von einer stadienunabhängigen Assoziation ausgegangen werden.

Es lassen sich lediglich Vermutungen zur Abweichung unseres Resultats von jenem der Metaanalyse (35) äußern. Da die NLR sowohl bei frühem als auch bei fortgeschrittenem CRC als signifikanter Risikofaktor für schlechtes OAS beschrieben wurde, ist die Eingrenzung der Kohorte auf Stadium II und III wahrscheinlich nicht dafür verantwortlich. Wie bereits erwähnt, liegt die plausibelste Erklärung, auch hinsichtlich des OAS, in der zu geringen Fallzahl.

Dennoch erzielten auch andere Studien divergente Resultate. Ausschließlich das CC im Stadium II und III betreffend, zeigten Absenger et al. in ihrer zweiten Studie (2013b) (61) eine univariate, aber keine multivariate Assoziation erhöhter NLR mit schlechtem OAS. Gleichermaßen verlor die NLR in zwei weiteren Kohorten (36,106) mit CRC-Patienten aller Stadien ihre Signifikanz in der multivariaten Analyse. Vereinbar mit unserem Ergebnis stand in den Studien von Leitch et al. (94) und Son et al. (98) eine präoperative NLR >5 nicht einmal annähernd in Zusammenhang mit dem OAS von Patienten, die einer potentiell kurativen Resektion eines primären CRC unterzogen worden waren.

Demnach ist der prognostische Wert der NLR für das OAS trotz metaanalytischer Fundierung zu hinterfragen. Wesentliche Kritikpunkte werden später erläutert.

Es fällt auf, dass einige Studien alternative Cut-off-Werte (2, 3 oder 4) für die NLR wählten oder versuchten mittels ROC-Analysen den optimalen Wert zu berechnen. Die Metaanalyse von Li et al. (35) zeigte, dass die Wahl des Cut-off-Wertes die prognostische Aussagekraft der NLR nicht wesentlich ändert, sodass ein Cut-off-Wert von 5 auch für die klinische Routine festgelegt werden könnte.

Im Gegensatz zur NLR war die TLR in unserer Studie weder mit dem DFS noch mit dem OAS von CC-Patienten im Stadium II und III assoziiert.

Dieses Resultat deckt sich zum Gutteil mit dem von Son et al. (98). In einer Kohorte von 624 koreanischen Patienten, deren nichtmetastasierte CC (Stadium I-III) potentiell kurativ reseziert wurden, zeigte die präoperative TLR >300 weder in der univariaten noch in der multivariaten Cox-Analyse einen signifikanten Einfluss auf das 5-jährige DFS und OAS. Allerdings ist die Aussagekraft dieses Ergebnis in Frage zu stellen, da nur 16 Patienten (2.6%) eine TLR >300 hatten, während in unserer Studie 55 Patienten (22.4%) gezählt wurden.

Baranyai et al. (85) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. In einer Kohorte, die je nach Vorliegen von Lebermetastasen in zwei Gruppen eingeteilt wurde, konnte in der Gruppe ohne hepatische Filiae (n=336, Stadium I-IV) die TLR zwar eine univariate aber keine multivariate Signifikanz als Prognosemarker für DFS und OAS erlangen. Primäres Ziel dieser Studie war es, Thrombozytose und TLR als potentielle prognostische Marker beim CRC zu vergleichen. Hier konnte sich die Thrombozytenzahl ($>400.000/\mu\text{l}$) als unabhängiger prognostischer Marker durchsetzen.

Eine neue Studie von Szkandera et al. (86), die ausschließlich CC-Patienten (n=372) im Stadium II und III untersuchte und insofern einen direkten Vergleich zu unseren Resultaten liefert, konnte einen größeren prognostischen Wert der TLR nachweisen. Die erhöhte präoperative TLR zeigte zwar nur einen Trend zu verkürztem OAS, wurde aber als unabhängiger prognostischer Marker für das rezidivfreie Zeitintervall identifiziert. Patienten mit einer TLR ≤ 176 blieben im Mittel 16 Monate länger rezidivfrei als jene mit einer TLR >176 .

Bemerkenswert ist, dass in zwei kleineren Studien von Liu et al. (121) und Kwon et al. (36), eine präoperative TLR >250 , >150 und >300 unabhängig mit verkürztem OAS von CRC-Patienten (Stadium I-IV) assoziiert wurde.

Wie bei der NLR, wurden auch bei der TLR teilweise individuelle, auf ROC-Analysen basierende, Cut-off-Werte verwendet. Vermutlich trug dies neben Fallzahl und Stadium zur Heterogenität der bisherigen Studienergebnisse bei. Die in dieser Studie gewählten Intervalle von <150 , $150-300$ und >300 stellen die gängigste Einteilung der TLR-Werte dar (36,98,104).

Ohne Frage ist die derzeitige Datenlage zum prognostischen Wert der TLR beim CRC sehr widersprüchlich. Eine Evaluierung in weiteren klinischen Studien ist nötig, im Idealfall mit standardisierten Cut-off-Werten um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern.

So wie unsere Arbeit, setzten sich auch drei der bereits angeführten Studien zum Ziel, die NLR und die TLR hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft in derselben Kohorte zu vergleichen.

He et al. (104) erhoben bei 243 Patienten mit metastasiertem CRC mit vorwiegender Primärlokalisierung im Kolon (72%) die NLR, TLR und CEA vor Beginn der First-Line-Chemotherapie. Erhöhte Werte aller Biomarker gingen mit signifikanter Verschlechterung des PFS und des OAS einher, doch nur NLR und CEA wurden als unabhängige

Prognoseparameter identifiziert. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen, lässt sich behaupten dass die NLR das klinische Outcome sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen Stadien besser als die TLR vorhersagen kann.

Dahingegen kam die Arbeit von Kwon et al. (36), die angesichts des Krankheitsstadiums und der Cut-off-Werte etwas besser mit unserer Studie vergleichbar ist, zu konträren Ergebnissen. Bei 200 Patienten mit CRC (Stadium I-IV), die einer potentiell kurativen Resektion unterzogen worden waren, zeigten hohe Werte der NLR und der TLR sowohl eine Assoziation miteinander als auch mit verkürztem OAS. Hier konnte sich allerdings die TLR durchsetzen und erlangte neben Stadium, CEA-Konzentration und positiver Lymphknoten-Ratio den Status eines unabhängigen prognostischen Markers.

Die bereits erwähnte Studie von Son et al. (98) untersuchte bei 624 Patienten mit nichtmetastasiertem CC die präoperativ, zum Diagnosezeitpunkt gemessenen Werte von Fibrinogen, mGPS, NLR und TLR hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft. Das Ergebnis war erstaunlich. Fibrinogen konnte sich als unabhängiger inflammatorischer Prädiktor für das 5-jährige DFS und OAS durchsetzen, während mGPS, NLR und TLR in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem klinischen Outcome standen. Wie bereits angedeutet, ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses in Frage zu stellen: Der Kohortenanteil mit erhöhter NLR und TLR war sehr gering und zudem wurden die inflammatorischen Marker bis zu 2 Wochen präoperativ erhoben.

Diese Studienergebnisse sind sehr widersprüchlich und können unsere Resultate nicht bestätigen. Es besteht weiterer Forschungsbedarf: Neben dem stadien- und entitätsspezifischen prognostischen Wert der NLR und TLR sollte nicht zuletzt durch Vergleiche in denselben streng definierten Kohorten geklärt werden, ob die NLR im Stadium II und III tatsächlich aussagekräftiger und verlässlicher ist.

Obwohl sich die NLR als klinischer Prognosemarker für das CRC eignen könnte, sollte man bedenken, dass sie eine systemische Immunreaktion widerspiegelt, die nicht ausnahmslos mit dem CRC sondern durchaus auch mit Lebensstilfaktoren und Komorbiditäten assoziiert sein kann. So sind Ernährungsgewohnheiten und chronischer Nikotinabusus nicht nur Risikofaktoren für die Entstehung eines CRC, sie können auch an einer Erhöhung der NLR beteiligt sein (9,125,131).

Aktuelle Forschungsarbeiten identifizierten zahlreiche Krankheitsbilder, die die NLR beeinflussen und in Folge deren prognostische Aussagekraft für das CRC manipulieren können. Einige wichtige Confounder sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8 Wichtige potentielle Komorbiditäten, die die NLR beeinflussen können.
(¹Arbeiten, in denen NLR als prognostisch ungünstiger Marker identifiziert wurde)

Lokale und systemische Infektionen (132)
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (133)
Autoimmunerkrankungen (134)
Kardiovaskuläre Erkrankungen <ul style="list-style-type: none"> • arterieller Hypertonus (135) • koronare Herzkrankheit und akutes Koronarsyndrom (136)¹ • Herzklappenerkrankungen (137) • linksventrikuläre Funktionsstörung (138)
Metabolisches Syndrom (139)
Diabetes mellitus (135)
Schilddrüsenfunktionsstörungen (132)
Chronische Nierenerkrankung (140) ¹
Leberdysfunktion (141) ¹
Sekundäre maligne Prozesse (42) ¹

In den meisten Studien zur NLR, mitunter auch in dieser, wurden die genannten Komorbiditäten nicht bzw. nur teilweise berücksichtigt. Zum einen erklärt sich das dadurch, dass in retrospektiven Studien eine nachträgliche Datenerfassung hinsichtlich dieser Komorbiditäten nur schwer möglich ist. Selbst eine akute lokale und systemische Infektion lässt sich bei einer Erhebung der NLR eine Woche präoperativ nicht ausschließen, eine Verkürzung des präoperativen Zeitfensters zur Bestimmung der inflammatorischen Parameter könnte zumindest den Einfluss dieses Confounder minimieren.

Zum anderen würde bei Ausschluss dieser potentiellen Einflussfaktoren die NLR keine breite Anwendung mehr finden, da viele, der in Tabelle 8 dargestellten Confounder nicht zuletzt häufige Krankheitsbilder in der Altersgruppe mit erhöhtem Risiko für CRC darstellen.

Es sei in diesem Kontext auch erwähnt, dass die NLR bisher nur in den Studien von Shibutani et al. (107) und Guthrie et al. (115) unabhängig mit dem CSS bei primär operablem CRC assoziiert war. Walsh et al. (106) untersuchten 230 Patienten mit CRC und fanden eine bivariate aber keine univariate Assoziation zwischen NLR und CSS. Zwei weitere Studien (94,122) konnten keinen Zusammenhang feststellen.

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass das OAS von CC-Patienten, das in den meisten Studien mit erhöhter NLR assoziiert wurde, womöglich weniger auf krebspezifische, sondern hauptsächlich auf krebsunspezifische Todesursachen zurückzuführen ist.

Aktuelle Studien, die eine erhöhte NLR als prognostisch ungünstigen Indikator bei verschiedenen kardiovaskulären, nephrologischen und hepatologischen Erkrankungen (vgl. Tabelle 8) beschrieben, stärken diese Hypothese (108).

Bemerkenswerterweise gelang es Jankova et al. (122) vor kurzem diese Vermutung in einer Kohorte von 322 CRC-Patienten im Dukes-Stadium C statistisch zu bestätigen. Neben einer schwachen Korrelation mit dem OAS bestand tatsächlich eine unabhängige Assoziation zwischen NLR und CRC-unspezifischer Mortalität, während die NLR in Bezug auf CRC-spezifische Mortalität und Rezidivrate keine unabhängige Signifikanz erreichte.

Dieselbe Unspezifität könnte auch für die TLR angenommen werden, allerdings finden sich in der Literatur derzeit nicht genug Daten über potentielle Einflussfaktoren, um diese Vermutung wissenschaftlich zu untermauern.

In Folge all dieser Aspekte gilt es, wie bereits von anderen Autoren (132) betont, die NLR sowohl beim CC als auch beim RC aufgrund ihrer geringen Spezifität mit Vorbehalt als prognostischen Marker zu verwenden. Insbesondere die Assoziation zwischen NLR und OAS ist sehr anfällig für andere Einflussfaktoren und erreichte in unserer Studie entgegen den Resultaten der aktuellen Metaanalyse (35) keine statistische Signifikanz. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, unter Ausschluss von Komorbiditäten die NLR vielmehr als Prognosefaktor für das DFS anzuwenden, da dieser Endpunkt krebspezifischer ist und somit besser der Identifikation von onkologischen Hochrisikopatienten und der Therapieanpassung dient (122). Die unabhängige Assoziation mit erhöhter NLR im Stadium II und III konnten neben unserer Studie viele andere, aktuelle Arbeiten (29,61,102) bestätigen.

Wie bereits von Balta et al. (132) in einem Kommentar suggeriert, wird in Anbetracht der geringen Spezifität der NLR eine Zusammenschau mit anderen hämatologischen Markern der systemischen inflammatorischen Response empfohlen.

Kürzlich publizierte Studien (29,97,98) zeigten, dass der Plasma-Fibrinogenspiegel, die LMR und auch die dNLR unabhängigen prognostische Stellenwert beim nichtmetastasierten CC besitzen. CRP und mGPS wurden bereits in mehreren Studien als unabhängige Parameter für schlechtes Outcome von Patienten mit CRC beschrieben (42).

Leitch et al. (94) und Proctor et al. (142) postulierten, dass der mGPS in seinem prognostischen Wert beim CRC zellulären Immunparametern, wie der NLR, sogar eindeutig überlegen ist.

Allerdings ist zu bedenken, dass die präoperative Bestimmung von CRP, mGPS und auch von Fibrinogen mit Kosten aufgrund zusätzlicher Laboruntersuchungen verbunden ist, wohingegen sich NLR, dNLR und LMR leicht anhand des präoperativ routinemäßig durchgeführten Differentialblutbildes berechnen lassen (36,100).

Ob die NLR in Kombination mit den genannten inflammatorischen Biomarkern eine verlässlichere präoperative Stratifizierung der Prognose ermöglicht, muss in zukünftigen Studien überprüft werden.

Abschließend sollte noch betont werden, dass trotz der aktuell starken Fokussierung auf systemische Immunmarker, das prognostisch sehr aussagekräftige lokale Immuninfiltrat keineswegs außer Acht gelassen werden darf.

Die Wechselbeziehungen zwischen Komponenten der lokalen und systemischen Immunreaktion auf CRC wurden nur in wenigen Studien behandelt und sind bisweilen kaum verstanden, wenngleich bekannt ist, dass eindeutige Differenzen im Einfluss auf die Tumorprogression bestehen (47,96). So versuchten u.a. drei Arbeiten aus Glasgow diese Frage beim potentiell kurativ resezierten CRC zu klären. In der ersten Studie (74) war eine erhöhte CRP-Konzentration mit verminderter lymphozytärer CD4⁺-Infiltration assoziiert und beides ging in der multivariaten Analyse mit verkürztem CSS einher.

Dahingegen konnte die zweite, aktuellere Studie (47) keinen Zusammenhang zwischen systemischer (mGPS) und lokaler (Klintrup-Kriterien) Immunreaktion nachweisen, obwohl auch hier beide Faktoren unabhängig mit verkürztem CSS assoziiert wurden.

Interessanterweise wurde in der dritten Studie (96) eine geringgradige peritumorale Infiltration (Klintrup-Kriterien) mit einer erhöhten Zahl zirkulierender Leukozyten und neutrophiler Granulozyten sowie verkürztem CSS assoziiert.

Demzufolge lässt sich auch ein Zusammenhang zwischen systemischen, zellulären Immunmarker (wie NLR, TLR, LMR) und lokaler Immuninfiltration vermuten, allerdings finden sich in der Literatur, zumindest in Bezug auf CRC, keine validierenden Forschungsergebnisse.

Zukünftige Studien könnten systemische und lokale Immunzellmarker parallel in denselben Kohorten evaluieren, um zu klären, ob Parameter der lokalen Tumorabwehr, wie die Klintrup- oder Jass-Kriterien, gleichwertige oder tatsächlich additive prognostische Informationen liefern, die die immunologische Risikostratifizierung bei CRC-Patienten entscheidend verbessern würden.

Unsere Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Eine erhöhte TLR wurde mit dem weiblichen Geschlecht in Verbindung gebracht während die NLR mit keiner klinisch-pathologischen Variable assoziiert war. NLR und Stadium zeigten in der univariaten Analyse eine Assoziation mit erhöhter Rezidivrate und manifestierten sich in Folge als unabhängige prognostische Faktoren für das DFS.

Alter, Stadium und Grading standen mit dem OAS in einem univariaten Zusammenhang, allerdings erreichten nur Alter und Grading den Status eines unabhängigen Prognosefaktors für OAS. Die TLR war mit keinem der prognostischen Endpunkte assoziiert.

4.1 Konklusion

Diese retrospektive Studie demonstrierte, dass die präoperative NLR der TLR in ihrem prognostischen Wert beim CC im Stadium II und III eindeutig überlegen ist und unabhängig von Stadium, Grading, Alter und Geschlecht einen prognostischen Biomarker für das DFS dieser Patienten darstellt. Hinsichtlich des OAS erlangte einzig Alter und histologischer Differenzierungsgrad unabhängige prognostische Signifikanz, der in der Literatur mehrfach beschriebene Zusammenhang von präoperativer NLR und OAS wurde nicht bestätigt. Die TLR konnte die Voraussetzungen eines prognostischen Markers in keiner Weise erfüllen. Angesichts unserer Ergebnisse sowie der spärlichen und widersprüchlichen Datenlage, kann der klinische Einsatz der TLR nicht empfohlen werden.

Letztendlich kann die Alternativhypothese dieser Studie nur bedingt für die NLR angenommen werden.

Aufgrund geringer Kosten und universeller Verfügbarkeit ist die NLR als Prädiktor für das Rezidivrisiko klinisch leicht anwendbar, in Anbetracht der geringen Spezifität wird allerdings die Zusammenschau mit anderen inflammatorischen Prognosemarkern empfohlen. Ob der Beitrag der NLR zur Verbesserung der Prognosestratifizierung beim CC im Stadium II und III künftig nicht nur die Identifikation von Hochrisikopatienten zur konsekutiven Therapieintensivierung erleichtern könnte sondern auch einen restriktiveren Einsatz der adjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit niedrigem Rezidivrisiko unterstützt, muss erst in prospektiven Studien bewiesen werden.

Die Divergenz zwischen unseren und den Ergebnissen bisheriger Studien lässt sich zum Gutteil durch die unterschiedlichen Fallzahlen und definierte Kohortenmerkmale wie Tumorentität oder Stadium erklären. Vermeintlicher Selektionsbias und zahlreiche unbeachtete Confounder erfordern die Validierung unseres Resultats in größeren prospektiven Arbeiten.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16(3):481-488.
- (2) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127(12):2893-2917.
- (3) Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90.
- (4) International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan 2008: Colorectal Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, Summary [Internet]. [zitiert 2013 Jun 16]. Verfügbar unter: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- (5) Statistik Austria. Österreichisches Krebsregister [Internet]. [aktualisiert 2013 Okt 31; zitiert 2013 Jun 12]. Verfügbar unter: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/index.html.
- (6) Fibbe C, Rosien U, Layer P, Groß V. 6.7 Kolorektales Karzinom. In: Layer P, Rosien U, Hrsg. *Praktische Gastroenterologie*. 4. Aufl. München: Elsevier; 2011. p.182-193.
- (7) Herold G. Kolorektales Karzinom. In: Herold G, Hrsg. *Innere Medizin*. Köln; 2010. p.473-478.
- (8) Messmann H. Kolorektales Karzinom. In: Messmann H, Hrsg. *Klinische Gastroenterologie*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. p.417-455.
- (9) Dempke W. 2.4.4 Kolorektales Karzinom. In: Dempke W, Hrsg. *Lehrbuch Hämatologie-Onkologie: Hämatologie-Onkologie-Hämostaseologie*. 1. Aufl. Bern: Hans Huber; 2006. p.218-243.
- (10) Weitz J, Schalhorn A, Kadmon M, Krempien R, Büchler MW. Kapitel 43 Kolon- und Rektumkarzinom. In: Hiddemann W, Bartram C, Hrsg. *Die Onkologie: Teil 2: Solide Tumoren-Lymphome-Leukämien*. 2. Aufl. Heidelberg: Springer; 2010. p.848-897.
- (11) Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 2013;4(4):409-423.
- (12) Dörfer J, Hohenberger W, Schmiegel W, Schulmann K, Andre N. 6.19 Kolorektales Karzinom. In: Riemann J, Fischbach W, Galle P, Mössner J, Hrsg. *Gastroenterologie: Das Referenzbuch für Klinik und Praxis, Band 1: Intestinum*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008. p.846-883.

- (13) Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL. [Internet]. [aktualisiert 2013 Jun; zitiert 2013 Jul 27]. Verfügbar unter: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> ©.
- (14) Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 1951;93(3):327-330.
- (15) Deschoolmeester V, Baay M, Lardon F, Pauwels P, Peeters M. Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI. *Cancer Microenviron* 2011;4(3):377-392.
- (16) Resch GM. Das Kolorektalkarzinom – Diagnostik und adjuvante Therapie | Die Punkte | MedMedia [Internet]. [aktualisiert 2012 Jan 6; zitiert 2014 Mar 16]. Verfügbar unter: <http://www.medmedia.at/die-punkte/das-kolorektalkarzinom-diagnostik-und-adjuvante-therapie/>.
- (17) Siegenthaler W, Blum HE, Hrsg. *Klinische Pathophysiologie*. 9th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006. p.848.
- (18) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-532.
- (19) Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermorken JB. A Review of the Most Promising Biomarkers in Colorectal Cancer: One Step Closer to Targeted Therapy. *Oncologist* 2010;15(7):699-731.
- (20) Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17(6):1471-1474.
- (21) Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Rom J Morphol Embryol* 2011;52(2):537-544.
- (22) Schmoll HJ, Arnold D. 93 Kolorektales Karzinom. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K, Hrsg. *Kompendium Internistische Onkologie: Teil 3:Standards in Diagnostik und Therapie-Indikationen- Therapiekonzepte und spezielle Therapiemodalitäten*. 4.Aufl. Heidelberg: Springer; 2006. p.354-386.
- (23) Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie (ÖGGH). Leitlinie: Qualitätsgesicherte Vorsorgekoloskopie [Internet]. [aktualisiert 2010 Sept 29; zitiert 2013 Jun 6]. Verfügbar unter: http://www.oeggh.at/zertifikat/pdf/2010/Leitlinie_29_09_2010_Version_1.5.pdf.

- (24) Polat E, Duman U, Duman M, Atici AE, Reyhan E, Dalgic T, et al. Diagnostic value of preoperative serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in colorectal cancer. *Curr Oncol* 2014;21(1):e1-7.
- (25) Kurz-zur Hausen AK, Deschler-Baier B, Otto F, Illerhaus G. 8.3.4 Kolorektales Karzinom. In: Berger D, Engelhardt R, Mertelsmann R, Hrsg. *Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie*. 4.Aufl. Landberg: Ecomed MEDIZIN; 2010. p.770-778.
- (26) Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2008;51(5):503-507.
- (27) Benson AB, 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(16):3408-3419.
- (28) Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, et al., Hrsg. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [Internet]. [aktualisiert 2013 Jun 14; zitiert 2013 Apr 10]. Verfügbar unter: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/.
- (29) Absenger G, Szkandera J, Pichler M, Stotz M, Armingier F, Weissmueller M, et al. A derived neutrophil to lymphocyte ratio predicts clinical outcome in stage II and III colon cancer patients. *Br J Cancer* 2013;109(2):395-400.
- (30) Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol* 2003;21(15):2912-2919.
- (31) Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thome SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004;22(10):1797-1806.
- (32) O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(19):1420-1425.
- (33) Morris M, Platell C, de Boer B, McCaul K, Iacopetta B. Population-based study of prognostic factors in stage II colonic cancer. *Br J Surg* 2006;93(7):866-871.
- (34) Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic Role of KRAS and BRAF in Stage II and III Resected Colon Cancer: Results of the Translational Study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial. *J Clin Oncol* 2010;28(3):466-474.
- (35) Li M, Liu X, Zhang X, Zhang J, Wang W, Zhu Y, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2014;134(10):2403-2413.

- (36) Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Lee JH, Choi HJ, et al. Clinical significance of preoperative neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio in patients with operable colorectal cancer. *Biomarkers* 2012;17(3):216-222.
- (37) Salama P, Platell C. Host response to colorectal cancer. *ANZ J Surg* 2008;78(9):745-753.
- (38) Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357(9255):539-545.
- (39) Grizzi F, Bianchi P, Malesci A, Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2013;19(2):174-184.
- (40) Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1073-1081.
- (41) Pages F, Galon J, Fridman WH. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J Leukoc Biol* 2008;84(4):981-987.
- (42) Roxburgh CS, McMillan DC. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncology* 2010;6(1):149-163.
- (43) McMillan DC, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003;90(2):215-219.
- (44) Guthrie GJK, Roxburgh CSD, Richards CH, Horgan PG, McMillan DC. Circulating IL-6 concentrations link tumour necrosis and systemic and local inflammatory responses in patients undergoing resection for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013;109(1):131-137.
- (45) Renner C, Zippelius A, Riethmüller G, Knuth A. Kapitel 16 Tumorimmunologie. In: Hiddemann W BC, Hrsg. *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie-Pathogenese-Grundprinzipien der Therapie*. 2.Aufl. Heidelberg: Springer; 2010. p.325-345.
- (46) Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ, et al. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study. *BMC Cancer* 2001;1:7.
- (47) Richards CH, Flegg KM, Roxburgh CS, Going JJ, Mohammed Z, Horgan PG, et al. The relationships between cellular components of the peritumoural inflammatory response, clinicopathological characteristics and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012;106(12):2010-2015.
- (48) Qiu H, Xiao-Jun W, Zhi-Wei Z, Gong C, Guo-Qiang W, Li-Yi Z, et al. The prognostic significance of peripheral T-lymphocyte subsets and natural killer cells in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2009;56(94-95):1310-1315.
- (49) Milasiene V, Stratilatovas E, Norkiene V, Jonusauskaite R. Lymphocyte subsets in peripheral blood as prognostic factors in colorectal cancer. *J BUON* 2005;10(2):261-264.

- (50) Rao HL, Chen JW, Li M, Xiao YB, Fu J, Zeng YX, et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One* 2012;7(1):e30806.
- (51) Lin EY, Pollard JW. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 2004;90(11):2053-2058.
- (52) Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal. *Cancer J Clin Oncol* 2009;27(2):186-192.
- (53) Ho AS, Chen CH, Cheng CC, Wang CC, Lin HC, Luo TY, et al. Neutrophil elastase as a diagnostic marker and therapeutic target in colorectal cancers. *Oncotarget* 2013;5(2):473-480.
- (54) Suzuki K, Aiura K, Ueda M, Kitajima M. The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents. *Pancreas* 2004;29(2):132-140.
- (55) Petrie HT, Klassen LW, Kay HD. Inhibition of human cytotoxic T lymphocyte activity in vitro by autologous peripheral blood granulocytes. *J Immunol* 1985;134(1):230-234.
- (56) Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 2013;218(11):1402-1410.
- (57) Roxburgh CS, McMillan DC. The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2012;38(5):451-466.
- (58) Nielsen HJ, Hansen U, Christensen IJ, Reimert CM, Brunner N, Moesgaard F. Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol* 1999;189(4):487-495.
- (59) Klintrup K, Makinen JM, Kauppila S, Vare PO, Melkko J, Tuominen H, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(17):2645-2654.
- (60) de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 2006;6(1):24-37.
- (61) Absenger G, Szkandera J, Stotz M, Postlmayr U, Pichler M, Röss AL, et al. Preoperative Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Clinical Outcome in Patients with Stage II and III Colon Cancer. *Anticancer Res* 2013;33(10):4591-4594.
- (62) Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2003;6(4):283-287.

- (63) He JR, Shen GP, Ren ZF, Qin H, Cui C, Zhang Y, et al. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and lymphocytes as independent prognostic factors in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2012;34(12):1769-1776.
- (64) Dajani K, O'Reilly DA, De Liguori Carino N, Ghaneh P, Poston G, Wu A. The Prognostic Significance of the Preoperative Full Blood Count after Resection of Colorectal Liver Metastases. *HPB Surgery* 2009:1-8.
- (65) Goedegebuure PS, Eberlein TJ. The role of CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Res* 1995;14(2):119-131.
- (66) Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, et al. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 2006;118(1):6-10.
- (67) Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313(5795):1960-1964.
- (68) Svennevig JL, Lunde OC, Holter J, Bjorgsvik D. Lymphoid infiltration and prognosis in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1984;49(3):375-377.
- (69) Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 1997;182(3):318-324.
- (70) Curtis NJ, Primrose JN, Thomas GJ, Mirnezami AH, Ottensmeier CH. The adaptive immune response to colorectal cancer: From the laboratory to clinical practice. *Eur J Surg Oncol* 2012;38(10):889-896.
- (71) Titu LV, Monson JR, Greenman J. The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51(5):235-247.
- (72) Koch M, Beckhove P, Op den Winkel J, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D, et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Ann Surg* 2006;244(6):986-993.
- (73) Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353(25):2654-2666.
- (74) Canna K, McArdle PA, McMillan DC, McNicol AM, Smith GW, McKee RF, et al. The relationship between tumour T-lymphocyte infiltration, the systemic inflammatory response and survival in patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2005;92(4):651-654.
- (75) Noshu K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 2010;222(4):350-366.

- (76) Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T Cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27(35):5944-5951.
- (77) Zhang Y, Morgan R, Podack ER, Rosenblatt J. B cell regulation of anti-tumor immune response. *Immunol Res* 2013;57(1-3):115-124.
- (78) Qin Z, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 1998;4(5):627-630.
- (79) Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011;11(2):123-134.
- (80) Kawai K, Watanabe T. Colorectal cancer and hypercoagulability. *Surg Today* 2014;44(5):797-803.
- (81) Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(9):913-922.
- (82) Voutsadakis IA. Thrombocytosis as a prognostic marker in gastrointestinal cancers. *World J Gastrointest Oncol* 2014;6(2):34-40.
- (83) Sasaki K, Kawai K, Tsuno NH, Sunami E, Kitayama J. Impact of Preoperative Thrombocytosis on the Survival of Patients with Primary Colorectal Cancer. *World J Surg* 2012;36(1):192-200.
- (84) Kandemir EG, Mayadagli A, Karagoz B, Bilgi O, Turken O, Yaylaci M. Prognostic significance of thrombocytosis in node-negative colon cancer. *J Int Med Res* 2005;33(2):228-235.
- (85) Baranyai Z, Krzystanek M, Josa V, Dede K, Agoston E, Szasz AM, et al. The comparison of thrombocytosis and platelet-lymphocyte ratio as potential prognostic markers in colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2013;111(3):483-490.
- (86) Szkandera J, Pichler M, Absenger G, Stotz M, Armingner F, Weissmueller M, et al. The elevated preoperative platelet to lymphocyte ratio predicts decreased time to recurrence in colon cancer patients. *Am.J.Surg* [Internet]. 2014 Jan [zitiert 2014 Feb 3]. Verfügbar unter: <http://www.americanjournalofsurgery.com/>.
- (87) Monreal M, Fernandez-Llamazares J, Pinol M, Julian JF, Broggi M, Escola D, et al. Platelet count and survival in patients with colorectal cancer--a preliminary study. *Thromb Haemost* 1998;79(5):916-918.
- (88) Kwon KA, Kim SH, Oh SY, Lee S, Han JY, Kim KH, et al. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor, interleukin-6, and C-reactive protein level in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010;10:203.
- (89) Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005;105(1):178-185.

- (90) Wan S, Lai Y, Myers RE, Li B, Hyslop T, London J, et al. Preoperative platelet count associates with survival and distant metastasis in surgically resected colorectal cancer patients. *J Gastrointest Cancer* 2013;44(3):293-304.
- (91) Nyasavajjala SM, Runau F, Datta S, Annette H, Shaw AG, Lund JN. Is there a role for pre-operative thrombocytosis in the management of colorectal cancer? *International Journal of Surgery* 2010;8(6):436-438.
- (92) Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol* 2009;15(47):5898-5906.
- (93) Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986;39(6):585-589.
- (94) Leitch EF, Chakrabarti M, Crozier JE, McKee RF, Anderson JH, Horgan PG, et al. Comparison of the prognostic value of selected markers of the systemic inflammatory response in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007;97(9):1266-1270.
- (95) McMillan DC, Crozier JE, Canna K, Angerson WJ, McArdle CS. Evaluation of an inflammation-based prognostic score (GPS) in patients undergoing resection for colon and rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007;22(8):881-886.
- (96) Roxburgh CSD, Salmond JM, Horgan PG, Oien KA, McMillan DC. Comparison of the Prognostic Value of Inflammation-Based Pathologic and Biochemical Criteria in Patients Undergoing Potentially Curative Resection for Colorectal. *Cancer Ann Surg* 2009;249(5):788-793.
- (97) Stotz M, Pichler M, Absenger G, Szkandera J, Armingier F, Schaberl-Moser R, et al. The preoperative lymphocyte to monocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer* 2014;110(2):435-440.
- (98) Son HJ, Park JW, Chang HJ, Kim DY, Kim BC, Kim SY, et al. Preoperative plasma hyperfibrinogenemia is predictive of poor prognosis in patients with nonmetastatic colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2013;20(9):2908-2913.
- (99) Paik KY, Lee IK, Lee YS, Sung NY, Kwon TS. Clinical implications of systemic inflammatory response markers as independent prognostic factors in colorectal cancer patients. *Cancer Res Treat* 2014;46(1):65-73.
- (100) Chua W, Charles KA, Baracos VE, Clarke SJ. Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011;104(8):1288-1295.
- (101) Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy* 2001;102(1):5-14.
- (102) Chiang SF, Hung HY, Tang R, Changchien CR, Chen JS, You YT, et al. Can neutrophil-to-lymphocyte ratio predict the survival of colorectal cancer patients who have received curative surgery electively? *Int J Colorectal Dis* 2012;27(10):1347-1357.

- (103) Mallappa S, Sinha A, Gupta S, Chadwick SJ. Preoperative neutrophil to lymphocyte ratio >5 is a prognostic factor for recurrent colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2013;15(3):323-328.
- (104) He W, Yin C, Guo G, Jiang C, Wang F, Qiu H, et al. Initial neutrophil lymphocyte ratio is superior to platelet lymphocyte ratio as an adverse prognostic and predictive factor in metastatic colorectal cancer. *Medical Oncology* 2013;30(1):439.
- (105) Ceze N, Thibault G, Goujon G, Viguier J, Watier H, Dorval E, et al. Pre-treatment lymphopenia as a prognostic biomarker in colorectal cancer patients receiving chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68(5):1305-1313.
- (106) Walsh SR, Cook EJ, Goulder F, Justin TA, Keeling NJ. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2005;91(3):181-184.
- (107) Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Noda E, Ohtani H, Nishiguchi Y, et al. A High Preoperative Neutrophil-to-lymphocyte Ratio Is Associated with Poor Survival in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2013;33(8):3291-3294.
- (108) Pichler M, Hutterer GC, Stoeckigt C, Chromecki TF, Stojakovic T, Golbeck S, et al. Validation of the pre-treatment neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in a large European cohort of renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer* 2013;108(4):901-907.
- (109) Lee YY, Choi CH, Kim HJ, Kim TJ, Lee JW, Lee JH, et al. Pretreatment neutrophil:lymphocyte ratio as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Anticancer Res* 2012;32(4):1555-1561.
- (110) Sarraf KM, Belcher E, Raevsky E, Nicholson AG, Goldstraw P, Lim E. Neutrophil/lymphocyte ratio and its association with survival after complete resection in non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137(2):425-428.
- (111) Guthrie GJK, Charles KA, Roxburgh CSD, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: Experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol* 2013;88(1):218-230.
- (112) Halazun KJ, Aldoori A, Malik HZ, Al-Mukhtar A, Prasad KR, Toogood GJ, et al. Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival following hepatic resection for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2008;34(1):55-60.
- (113) Ding P, An X, Zhang R, Fang Y, Li L, Chen G, et al. Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts risk of recurrence following curative resection for stage IIA colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010;25(12):1427-1433.
- (114) Hung HY, Chen JS, Yeh CY, Changchien CR, Tang R, Hsieh PS, et al. Effect of preoperative neutrophil-lymphocyte ratio on the surgical outcomes of stage II colon cancer patients who do not receive adjuvant chemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2011;26(8):1059-1065.
- (115) Guthrie GJK, Roxburgh CSD, Farhan-Alanie OM, Horgan PG, McMillan DC. Comparison of the prognostic value of longitudinal measurements of systemic

inflammation in patients undergoing curative resection of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013;109(1):24-28.

(116) Proctor MJ, McMillan DC, Morrison DS, Fletcher CD, Horgan PG, Clarke SJ. A derived neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival in patients with cancer. *Br J Cancer* 2012;107(4):695-699.

(117) Asher V, Lee J, Innamaa A, Bali A. Preoperative platelet lymphocyte ratio as an independent prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2011;13(7):499-503.

(118) Azab B, Shah N, Radbel J, Tan P, Bhatt V, Vonfrolio S, et al. Pretreatment neutrophil/lymphocyte ratio is superior to platelet/lymphocyte ratio as a predictor of long-term mortality in breast cancer patients. *Med Oncol* 2013;30(1):432. Epub 2013 Jan 3.

(119) Smith RA, Bosonnet L, Raraty M, Sutton R, Neoptolemos JP, Campbell F, et al. Preoperative platelet-lymphocyte ratio is an independent significant prognostic marker in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg* 2009;197(4):466-472.

(120) Liu H, Wu Y, Wang Z, Yao Y, Chen F, Zhang H, et al. Pretreatment platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) as a predictor of response to first-line platinum-based chemotherapy and prognosis for patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 2013;5(6):783-789.

(121) Liu H, DU X, Sun P, Xiao C, Xu Y, Li R. Preoperative platelet-lymphocyte ratio is an independent prognostic factor for resectable colorectal cancer. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2013;33(1):70-73.

(122) Jankova L, Dent OF, Chan C, Chapuis P, Clarke SJ. Preoperative neutrophil/lymphocyte ratio predicts overall survival but does not predict recurrence or cancer-specific survival after curative resection of node-positive colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013;13:442.

(123) Kube R, Gastinger I, Mroczkowski P, Ptok H, Wolff S, Lippert H. The care of patients with colon cancer: current treatment, and evaluation of new surgical approaches. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108(4):41-46.

(124) Schrag D, Rifas-Shiman S, Saltz L, Bach PB, Begg CB. Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(19):3999-4005.

(125) Hong C, Wei Y, Jiang J, Zhao C, Liang G, Wang G, et al. Associations between lifestyles and neutrophil-lymphocyte and platelet-lymphocyte ratios in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* [Internet]. 2013 May [zitiert 2013 Okt 10]. Verfügbar unter: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ajco.12080/pdf>.

(126) Stevens RF, Alexander MK. A sex difference in the platelet count. *Br J Haematol* 1977;37(2):295-300.

- (127) Buckley MF, James JW, Brown DE, Whyte GS, Dean MG, Chesterman CN, et al. A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count. *Thromb Haemost* 2000;83(3):480-484.
- (128) Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003;16(4):376-388.
- (129) Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):979-994.
- (130) Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, Iwasaki Y, Kubota K. Preoperative thrombocytosis is associated with survival after surgery for colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2012;106(7):887-891.
- (131) Weir AB, Lewis JB, Jr, Arteta-Bulos R. Chronic idiopathic neutrophilia: experience and recommendations. *South Med J* 2011;104(7):499-504.
- (132) Balta S, Demirkol S, Unlu M, Arslan Z, Celik T. Neutrophil to lymphocyte ratio may be predict of mortality in all conditions. *Br J Cancer* 2013;109(12):3125-3126.
- (133) Torun S, Tunc BD, Suvak B, Yildiz H, Tas A, Sayilir A, et al. Assessment of neutrophil-lymphocyte ratio in ulcerative colitis: a promising marker in predicting disease severity. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36(5):491-497.
- (134) Aksu O, Aydin B, Oroglu BK, Tamer NM. An elevation of the neurophil/lymphocyte ratio in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Acta Medica Mediterranea* 2014;30:457-460.
- (135) Imtiaz F, Shafique K, Mirza S, Ayoob Z, Vart P, Rao S. Neutrophil lymphocyte ratio as a measure of systemic inflammation in prevalent chronic diseases in Asian population. *International Archives of Medicine* 2012;5(1):2.
- (136) Bhat T, Teli S, Rijal J, Bhat H, Raza M, Khoueiry G, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2013;11(1):55-59.
- (137) Varol E, Aksoy F, Ozaydin M, Erdogan D, Dogan A. Association between neutrophil-lymphocyte ratio and mitral annular calcification. *Blood Coagul Fibrinolysis* [Internet]. 2014 Feb [zitiert 2014 Apr 5]. 2014. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Association+between+neutrophil-lymphocyte+ratio+and+mitral+annular+calcification>.
- (138) Dogdu O, Akpek M, Yarlioglues M, Kalay N, Ardic I, Elcik D, et al. Relationship between hematologic parameters and left ventricular systolic dysfunction in stable patients with multi-vessel coronary artery disease. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2012;40(8):706-713.
- (139) Buyukkaya E, Karakas MF, Karakas E, Akcay AB, Tanboga IH, Kurt M, et al. Correlation of Neutrophil to Lymphocyte Ratio With the Presence and Severity of Metabolic Syndrome. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2014;20(2):159-163.

(140) Kocyigit I, Eroglu E, Unal A, Sipahioglu MH, Tokgoz B, Oymak O, et al. Role of neutrophil/lymphocyte ratio in prediction of disease progression in patients with stage-4 chronic kidney disease. *J Nephrol* 2013;26(2):358-365.

(141) Biyik M, Ucar R, Solak Y, Gungor G, Polat I, Gaipov A, et al. Blood neutrophil-to-lymphocyte ratio independently predicts survival in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25(4):435-441.

(142) Proctor MJ, Morrison DS, Talwar D, Balmer SM, Fletcher CD, O'Reilly DSJ, et al. A comparison of inflammation-based prognostic scores in patients with cancer. A Glasgow Inflammation Outcome Study. *Eur J Cancer* 2011;47(17):2633-2641.