

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle des Tumor Budding beim neoadjuvant
therapierten Rektumkarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Iryna Trotsyuk
aus Iwano-Frankiwnsk

Datum der Promotion: 04.06.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden am 01. November 2019 veröffentlicht in:
Trotskyuk I, Sparschuh H, Müller AJ, Neumann K, Kruschewski M, Horst D, Elezkurtaj S. Tumor budding outperforms ypT and ypN classification in predicting outcome of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. BMC Cancer 19, 1033 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6261-5>.

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit auf eine geschlechtsspezifische Differenzierung wie z.B. Patienten/Innen und Forscher/Innen verzichtet. Entsprechende Begriffe gelten im Sinne der Gleichbehandlung für beide Geschlechter.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abstract	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Kurzer anatomischer Überblick über das Rektum	2
1.2 Das Rektumkarzinom	3
1.2.1 Definition und histologische Einteilung	3
1.2.2 Epidemiologie.....	3
1.2.3 Klinik und Diagnostik.....	3
1.2.4 Klassifikation und Stadieneinteilung	4
1.2.5 Therapieprinzipien.....	6
1.2.6 Postoperative pathohistologische Diagnostik	8
1.2.7 Nachsorge	9
1.3 Morphologie des Rektumkarzinoms nach neoadjuvanter Therapie	10
1.3.1 Tumor-Regressionsgrading.....	10
1.3.2 ypTNM-Status	11
1.3.3 Tumor Budding.....	11
1.3.4 Weitere morphologische Kriterien	13
1.4 Der Anti-Gesamtzytokeratin-Antikörper AE1/AE3	13
1.5 Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Patienten	15
2.1.1 Ausschlusskriterien	15
2.1.2 Überlebensdaten	15
2.1.3 Ethikvotum.....	16
2.2 Resektate des Rektumkarzinoms	16
2.3 Morphologische Beurteilung der Fälle im H&E-Schnitt	17
2.3.1 TNM-Status	17
2.3.2 Auswertung des Tumor-Regressionsgrading.....	18
2.3.3 Weitere morphologische Marker	18
2.4 Beurteilung des Tumor Budding im H&E-Schnitt.....	19
2.4.1 Auswertung nach Hase	19
2.4.2 Auswertung nach Ueno.....	20
2.5 Beurteilung des Tumor Budding nach der Immunhistochemie	20

2.5.1	Färbevorgang der Immunhistochemie für AE1/AE3	21
2.5.2	DAB und die Meerrettich-Peroxidase.....	22
2.6	Statistische Auswertung	22
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Patientenkollektiv.....	24
3.2	Vollständige Remission	25
3.3	Überblick zur Auswertung des Tumor Budding	26
3.4	Auswertung nach Hase	26
3.4.1	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im H&E	26
3.4.2	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im AE1/AE3.....	29
3.4.3	Univariate und multivariate Cox-Regressionsmodelle	31
3.4.4	Kaplan-Meier-Kurven und die Methode nach Hase	34
3.5	Auswertung nach Ueno	36
3.5.1	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im H&E	36
3.5.2	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im AE1/AE3.....	38
3.5.3	Univariate und multivariate Cox-Regressionsmodelle	40
3.5.4	Kaplan-Meier-Kurven und die Methode nach Ueno.....	42
3.6	Vergleich der Methoden	43
4	Diskussion.....	45
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4.2	Vergleich zu anderen Arbeiten	48
4.3	Internationale Tumor Budding Konsensus Konferenz	54
4.4	Worin besteht die Schwierigkeit beim neoadjuvant therapierten Tumor?	57
4.5	Budding und die Vorteile der Immunhistochemie	58
4.6	Klinische Relevanz des Tumor Budding und die aktuelle deutsche S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom.....	59
4.7	Limitationen	60
4.8	Bezug zur Fragestellung.....	61
4.9	Fazit.....	63
	Literaturverzeichnis	64
	Eidesstattliche Versicherung	X
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	XI
	Lebenslauf.....	XII
	Publikationsliste.....	XII
	Danksagung.....	XV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Vereinfachte Stadieneinteilung der UICC für das kolorektale Karzinom; Quelle: In Anlehnung an <i>Wittekind et al. 2010</i> [9].	S.8
Tabelle 2	Nachsorgeempfehlungen für UICC-Stadium II und III Rektumkarzinome; Quelle: In Anlehnung an <i>DKG, Deutsche Krebshilfe und AWMF, 2019</i> [3].	S.11
Tabelle 3.1	Beschreibung der T-Klassifikation; Quelle: <i>Wittekind et al., 2010</i> [9].	S.19
Tabelle 3.2	Beschreibung der N-Klassifikation; Quelle: <i>Wittekind et al., 2010</i> [9].	S.20
Tabelle 4	Regressionsgrading nach Dworak für das neoadjuvant therapierte Rektumkarzinom; Quelle: <i>Dworak et al., 1997</i> [23].	S.20
Tabelle 5.1	Klinische Parameter des Patientenkollektivs; Quelle: Eigene Darstellung	S.26
Tabelle 5.2	Pathologische Parameter des Patientenkollektivs; Quelle: Eigene Darstellung	S.27
Tabelle 6	Methoden der Auswertung und Häufigkeiten des Tumor Budding; Quelle: Eigene Darstellung	S.28
Tabelle 7.1	Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.29
Tabelle 7.2	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.30
Tabelle 8.1	Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.31
Tabelle 8.2	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.32
Tabelle 9.1	Ergebnisse der Cox-Regression für das krankheitsfreie Überleben. Budding ausgewertet nach Hase im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.34
Tabelle 9.2	Ergebnisse der Cox-Regression für das krankheitsfreie Überleben. Budding ausgewertet nach Hase in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.34
Tabelle 10.1	Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Budding ausgewertet nach Hase im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.35
Tabelle 10.2	Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Budding ausgewertet nach Hase in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.35
Tabelle 11.1	Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.38
Tabelle 11.2	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.39
Tabelle 12.1	Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.40
Tabelle 12.2	Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.41
Tabelle 13.1	Ergebnisse der Cox-Regression für das krankheitsfreie Überleben. Budding ausgewertet nach Ueno im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.42
Tabelle 13.2	Ergebnisse der Cox-Regression für das krankheitsfreie Überleben. Budding ausgewertet nach Ueno in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.43
Tabelle 14.1	Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Budding ausgewertet nach Ueno im H&E; Quelle: Eigene Darstellung	S.43

Tabelle 14.2	Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Budding ausgewertet nach Hase in der AE1/AE3; Quelle: Eigene Darstellung	S.44
Tabelle 15	Zusammenstellung der Literatur zum Thema Budding beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom; Quelle: In Anlehnung an <i>Jäger et al., 2018</i> [65]	S.54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Veranschaulichung der zur Verfügung stehenden Fälle als Flussdiagramm; Quelle: Eigene Darstellung	S.18
Abbildung 2	Auswertung des Budding nach Hase; Quelle: Eigene Darstellung	S.21
Abbildung 3	Auswertung des Budding nach Ueno; Quelle: Eigene Darstellung	S.22
Abbildung 4	Beispielbild zur Veranschaulichung des Budding in der immunhistochemischen Färbung; Quelle: Eigene Darstellung	S.23
Abbildung 5	Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben. Budding wurde mit der Methode nach Hase ausgewertet; Quelle: Eigene Darstellung	S.36
Abbildung 6	Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben. Budding wurde mit der Methode nach Ueno ausgewertet; Quelle: Eigene Darstellung	S.45
Abbildung 7	Vergleich der angewandten Methoden in allen möglichen Kombinationen mit Hilfe von Vierfeldertafel, Kappa-Maß (κ) und McNemar-Test; Quelle: Eigene Darstellung	S.46
Abbildung 8	Überblick der Korrelationen von Budding (ausgewertet in den verschiedenen Methoden und Färbungen) zu klinisch-pathologischen Parametern; Quelle: Eigene Darstellung	S.48

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
5J	5-Jahre
95%-CI	95%-Konfidenzintervall
A.	Arteria
AE1/AE3	Färbung mit dem Anti-Gesamtzytokeratin-Antikörper-AE1/AE3
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BD-1	kein oder mildes Budding
BD-2	moderat bis schweres Budding
CBF	Campus Benjamin Franklin
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CT	Computertomografie
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DFS	Krankheitsfreies Überleben, Disease-free survival
Gy	Gray
H&E	Hämatoxylin&Eosin-Färbung
HR	Hazard-Ratio
IHC	Immunhistochemie
ITBCC	International Tumor Budding Consensus Conference
LK	Lymphknoten
MRT	Magnetresonanztomographie
OP	Operation
OS	Gesamtüberleben, Overall survival
p	P-Wert
pCR	Vollständige Remission, Pathologic complete response
PDC	Poorly Differentiated Clusters
TNM	tumor node metastasis
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
urspr.	ursprünglich
V.	Vena

Abstract

Deutsch

ZIEL: Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle des Tumor Budding nach neoadjuvanter Radiochemotherapie bei Patienten mit Rektumkarzinom zu klären. Um Rückschlüsse auf die Unterschiede zwischen der qualitativen Budding-Auswertung nach Hase und der quantitativen Budding-Auswertung nach Ueno zu ziehen, wurde ein und dieselbe Patientenkohorte auf beide Arten ausgewertet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Ferner sollte die Rolle der Immunhistochemie (IHC) beleuchtet werden.

METHODEN: Die Analyse umfasste die Daten von 124 Patienten mit neoadjuvant therapiertem Rektumkarzinom in den Stadien I bis IV, die zwischen 2002 und 2011 operiert worden waren. In den Resektaten wurden Budding und weitere klinisch-pathologische Parameter untersucht. Budding wurde je Auswertungsmethode sowohl in der Färbung mit Hämatoxylin&Eosin (H&E) als auch mit dem Anti-Zytokeratin-Antikörper AE1/AE3 ausgewertet.

ERGEBNISSE: Im H&E waren nach der Methode von Hase 38,8% (n = 40) der Patienten budding-positiv, nach der Methode von Ueno 36,9% (n = 38). Für die Auswertung des Budding nach der Färbung mit dem Antikörper AE1/AE3 zeigte sich für beide Methoden eine Budding-Rate von 55,6% (n = 55). Unabhängig von der Methode oder der Färbung korrelierte Budding mit einem höheren ypT- und ypN-Status, einer geringeren Response gemessen anhand des Regressionsgrades nach Dworak und mit einem schlechteren Outcome im Follow-up wie dem Rezidiv oder dem Tod ($p < 0,05$ jeweils). Im multivariaten Cox-Regressions-Modell blieb Budding als einziger Parameter für das Gesamtüberleben signifikant und übertraf damit sogar die ypT- und ypN-Klassifikation (Budding ausgewertet nach Hase im H&E: Hazard-Ratio (HR) 3,06 im 95%-Konfidenzintervall (95%-CI) 1,26–7,41, $p = 0,013$ und in der IHC: HR 4,08, 95%-CI 1,30–12,78, $p = 0,016$; Budding ausgewertet nach Ueno im H&E: HR 2,72, 95%-CI 1,15–6,44, $p = 0,023$ und in der IHC: HR 5,19, 95%-CI 1,62–16,61, $p = 0,006$).

SCHLUSSFOLGERUNG: Budding ist ein starker prognostischer Faktor für das Überleben von Rektumkarzinom-Patienten nach neoadjuvanter Therapie. Beide Methoden sind in etwa gleich gut geeignet, um Budding auszuwerten und Patienten in prognostisch relevante Gruppen einzuteilen. Um eine Standardisierung zu erreichen, ist es dennoch

empfehlenswert, zu einem Konsens bezüglich der besten Methode der Budding-Auswertung nach neoadjuvanter Therapie zu kommen. Die IHC trägt dazu bei, die prognostische Aussagekraft zu verbessern und sollte in komplizierten Fällen herangezogen werden.

Englisch

AIM: The aim of this study was to clarify the role of tumor budding in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. In order to draw conclusions about the differences between the qualitative budding evaluation according to Hase and the quantitative budding evaluation according to Ueno, the same patient cohort was evaluated in both ways and the results were compared. Furthermore, the role of immunohistochemistry (IHC) will be highlighted.

METHODS: A total of 124 patients with rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy between 2002 and 2011 followed by surgery were included. All surgical specimens were evaluated for budding and other clinic-pathological features. Budding was evaluated on both haematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemical (IHC) stained slides with an anti-human cytokeratin antibody AE1/AE3.

RESULTS: In the H&E-stained slides a budding rate of 38.8% ($n = 40$) for the Hase's method and of 36.9% ($n = 38$) for Ueno's method were observed. For IHC a budding rate of 55.6% ($n = 55$) was assessed for both methods. Irrespective of the method or staining used for the evaluation, budding was significantly associated with a higher ypT and ypN status, a lower response according to Dworak's tumor regression grading system and with a worse outcome in follow-up like recurrence or death ($p < 0.05$ each). In multivariate analyses, budding remained the only significant parameter for overall survival and was even superior to the ypT and ypN status (budding evaluated with Hase's method on H&E: hazard ratio (HR) 3.06, 95%-confidence interval (95%-CI) 1.26–7.41, $p = 0.013$; on IHC: HR 4.08, 95%-CI 1.30–12.78, $p = 0.016$; with Ueno's method on H&E: HR 2.72, 95%-CI 1.15–6.44, $p = 0.023$; on IHC: HR 5.19, 95%-CI 1.62–16.61, $p = 0.006$).

CONCLUSION: Budding is a strong prognostic factor of survival in rectal cancer patients after neoadjuvant therapy. Both methods are equally well suited to evaluate budding and to divide patients into prognostically relevant groups. In order to achieve a standardization, it is nevertheless recommended to reach a consensus on the best method for the evaluation of budding after neoadjuvant therapy. Immunostaining helps to improve the prognostic significance and can be used in difficult cases.

1 Einleitung

Seit der Einführung der präoperativen Radiotherapie und simultanen Chemotherapie konnte das lokale Rezidivrisiko des Rektumkarzinoms gesenkt und sphinktererhaltende Operationen begünstigt werden [1,2]. Deshalb wird in Deutschland nach Empfehlungen der S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom flächendeckend eine präoperative Radiochemo- oder Radiotherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom appliziert [3]. Folglich kam es nach dieser intensiven Therapie, die sich aus einer örtlichen Bestrahlung des Tumors und einer simultanen Chemotherapie zusammensetzte, zu einer veränderten Morphologie des ursprünglichen Tumors, was dessen Beurteilung in der Routinediagnostik erschwerte hatte. Goldstandard in der histologischen Diagnostik des Rektumkarzinoms ist bis heute das Tumor-Nodes-Metastasis-System (TNM), welches in der Lage ist, Patienten in Risikogruppen bezüglich der Prognose und zur weiteren Therapieplanung einzuteilen. Weiterhin ist das Regressionsgrading, also das Verhältnis des Tumors zum vernarbten Gewebe, ein wichtiger Bestandteil des pathologisch-anatomischen Protokolls zum vorbehandelten Tumor geworden und im Gegensatz dazu das Tumorigradung, also der Anteil des Tumors, der drüsenartige Strukturen ausbildet, aufgrund neuartiger Veränderungen der Tumor-Morphologie nach multi-modaler Therapie eher bezüglich der Prognoseabschätzung in den Hintergrund gerückt. Daneben gibt es immer noch eine Reihe weiterer morphologischer Faktoren, deren Rolle beim neoadjuvant therapierten Tumor geklärt werden müsste, da diese möglicherweise zur TNM-Klassifikation und zum Regressionsgrading eine gute Ergänzung bieten würden. Das Tumor Budding (*engl.* = *Knospung*) spielt hierbei eine besonders große Rolle. Bis vor kurzem gab es noch keine vereinheitlichte Definition des Budding für das unbehandelte Rektumkarzinom. Dennoch interessierten sich viele Forscher für das Thema und schlugen verschiedene Ideen vor, wie Budding ausgewertet werden sollte. Denn unabhängig von der Art der Auswertung konnte beim Vorhandensein von Tumor Budding eine für den Patienten eher ungünstige Prognose beobachtet werden. Da es nur wenige Arbeiten zum Budding nach neoadjuvanter Therapie gab, lag das Augenmerk dieser Arbeit auf dem Phänomen des Tumor Budding und der besonderen Morphologie des Rektumkarzinoms nach neoadjuvanter Therapie.

Aufgrund einer noch fehlenden etablierten Methode der Budding-Auswertung beim neoadjuvant therapierten Karzinom, werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden in jeweils zwei verschiedenen Färbungen betrachtet. Das Ziel der Arbeit soll es sein, die

Rolle des Tumor Budding zu klären mit der Frage, ob Budding in der Lage ist, auch nach neoadjuvanter Therapie einen möglichen Rückschluss zur Prognose der Patienten zu liefern.

1.1 Kurzer anatomischer Überblick über das Rektum

Das Rektum, auf Deutsch Mastdarm genannt, gehört zum letzten Abschnitt des Dickdarms und ist extraperitoneal gelegen. Es schließt sich dem Colon sigmoideum an und beginnt dort, wo die Arteria (A.) rectalis superior die Blutversorgung übernimmt, was ungefähr auf Höhe des zweiten Sakralwirbels geschieht [4]. Insgesamt ist es ca. 12-14 cm lang und erstreckt sich bis zur Linea dentata, ab der dann der Analkanal beginnt, welcher ca. 4cm lang ist und entwicklungsgeschichtlich nicht zum Rektum gehört. Obwohl so kurz, wird das Rektum über drei rektale Arterien versorgt, wobei das mittlere der drei Gefäße nur bei ca. 10% der Menschen angelegt ist [5]. Während das obere Rektumdrittel von der A. rectalis superior, dem Endast der A. mesenterica inferior, versorgt wird, erfolgt die Blutzufuhr zum mittleren Rektumdrittel über die A. rectalis media aus der A. iliaca interna und zum unteren Drittel aus der A. rectalis inferior, die einen Ast der A. pudenda interna darstellt [4]. Der venöse Abfluss wird über die gleichnamigen Rektalvenen sichergestellt und ist für den Metastasierungsweg von großer Bedeutung. Das venöse Blut aus der Vena (V.) rectalis superior, und damit der oberen Rektumanteile, fließt in den Pfortaderkreislauf, was im Falle eines Karzinoms zu Lebermetastasen führen kann. Die unteren Abschnitte des Rektums werden von der V. rectalis mediae und der V. rectalis inferior drainiert, die beide über die V. iliaca interna in die V. cava inferior münden. Von hier gelangt das venöse Blut in den Lungenkreislauf, was bei einem in diesen Bereichen ansässigen Tumor mit vergleichsweise erhöhter Wahrscheinlichkeit zu Lungenmetastasen führen kann.

Histologisch ähnelt die Rektumschleimhaut der übrigen Schleimhaut des Dickdarms, mit Ausnahme der etwas vermehrt vorkommenden lymphatischen Follikel [4]. Ein Schnitt durch das Rektum ergibt von innen nach außen betrachtet folgenden Wandaufbau: Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica adventitia. Die Mukosa besteht aus einem einschichtigen Zylinderepithel, in welchem nicht nur Enterozyten mit Mikrovillibesatz und schleimproduzierende Becherzellen zu finden sind, sondern auch einzelne verstreute endokrine Zellen und intraepitheliale Lymphozyten [6].

1.2 Das Rektumkarzinom

1.2.1 Definition und histologische Einteilung

Das Rektumkarzinom bildet sich im Rektum und wird unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms zusammengefasst. Mehr als 90% dieser Karzinome entwickeln sich aus den schleimbildenden Drüsen der Mukosa und werden daher als Adenokarzinome bezeichnet [7]. Zu den Varianten der kolorektalen Adenokarzinome gehören unter anderem die muzinösen Adenokarzinome, welche zu mehr als 50% aus Muzin bestehen, die Siegelringzellkarzinome und die medullären Karzinome. Äußerst selten kommen Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse Karzinome, undifferenzierte Karzinome sowie Karzinoide und maligne Lymphome im Rektum vor.

1.2.2 Epidemiologie

In den deutschen Krebsregistern werden alle Karzinome von Dickdarm und Analregion gemeinsam ausgewertet. So erkrankten hierzulande jährlich ca. 58.000 Menschen am Darmkrebs [8]. Bei den Krebsneuerkrankungen steht das kolorektale Karzinom der Frau in Deutschland an zweiter Stelle (nach dem Mammakarzinom) mit insgesamt ca. 24.100 neu aufgetretenen Fällen für das Jahr 2020 [8]. Für den Mann werden ca. 31.300 neue Krankheitsfälle für das Jahr 2020 geschätzt, was das kolorektale Karzinom an die dritte Stelle (nach dem Prostata- und Lungenkarzinom) der Krebsneuerkrankungen des Mannes bringt [8]. Diese Zahlen beruhen noch auf Prognosen des Robert-Koch-Instituts und sind in der aktuellen Broschüre „Krebs in Deutschland 2015/2016“ veröffentlicht. Die Inzidenz und die Mortalität sind rückläufig. Trotz der abnehmenden Mortalität stellt es bei Männern und Frauen die dritthäufigste Krebstodesursache dar (Männer: nach dem Lungen- und Prostatakarzinom, Frauen: nach dem Mamma- und Lungenkarzinom) [8]. Das Erkrankungsrisiko steigt mit dem Alter an. Deshalb ist es typisch für das kolorektale Karzinom, dass mehr als die Hälfte der Betroffenen jenseits des 70. Lebensjahres erkranken. Nur etwa 10 % sind vor dem 55. Lebensjahr und damit also noch vor der zur Früherkennung angebotenen Darmspiegelung betroffen [8].

1.2.3 Klinik und Diagnostik

Kolorektale Karzinome entwickeln sich über einen sehr langen Zeitraum, sodass die Patienten keine auffälligen Frühsymptome bemerken. Gewichtsverlust, Leistungsabfall und eventuell auch Fieber treten häufig in den frühen Stadien auf, werden aber vom Betroffene-

nen meist wenig beachtet. Veränderung der Stuhlgewohnheiten wie Obstipation oder Diarrhoe, aber auch durch stenosierende Karzinome verursachter Ileus oder rektale Blutabgänge sind Zeichen eines bereits fortgeschrittenen Tumorleidens. Sobald die genannten Symptome auftreten, müssen sie klinisch und durch bildgebende Verfahren bestätigt werden. Zur Sicherung der Diagnose gehört nach der aktuellen S3-Leitlinie für kolorektale Karzinome eine digital-rektale Untersuchung und eine komplette Koloskopie mit Entnahme einer Biopsie. Ist eine vollständige Koloskopie aufgrund eines stenosierenden Tumors nicht möglich, muss diese ca. 3-6 Monate postoperativ nachgeholt werden. Bei gesicherter Diagnose erfolgt eine Ausbreitungsdiagnostik, ein sogenanntes Staging, zur Bestimmung des Tumorstadiums und der weiteren Therapieplanung. Bei Rektumkarzinomen muss deshalb eine starre Rektoskopie durchgeführt werden, um eine Höhenangabe des Tumorrandes anzugeben. Dabei gilt die Anokutanlinie als distaler Messpunkt. Entsprechend ihrem Abstand von dieser Linie werden Rektumkarzinome nach der Einteilung der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) in Karzinome des oberen Rektumdrittels (12 - 16 cm), des mittleren Rektumdrittels (6 - 12 cm) und des unteren Rektumdrittels (< 6 cm) unterteilt [3]. Diese Einteilung hat später Konsequenzen für die chirurgische Therapieplanung. Außerdem sollte eine Endosonographie des Rektums erfolgen, in welcher der Untersucher die Infiltrationstiefe des Tumors, also das klinische T-Stadium, bestimmt. Zur Therapieplanung und bei Verdacht auf einen lokal fortgeschrittenen Tumor wird eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Beckens angefertigt. Hieraus sollte der Abstand des Tumors zur mesorektalen Faszie entnommen werden und ein Überblick über eine mögliche Infiltration der Nachbarorgane erfolgen. Eventuell sollte dann beim Eintreffen dieses Falles ein gynäkologisches/urologisches Konsil veranlasst werden. Weitere für das Staging erforderliche Untersuchungen sind die Abdomensonographie und die konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax in 2 Ebenen. Falls es in diesen ökonomisch preiswerten Untersuchungsmethoden zu keinem klaren Befund kommt oder bei Verdacht auf Fernmetastasen, sollte eine Computertomografie (CT) des Abdomens bzw. im Falle des Verdachtes auf Lungenmetastasen eine CT des Thorax durchgeführt werden. Vor Therapiebeginn sollte das Carcinoembryonale Antigen (CEA) im Serum gemessen werden, da die Werte zur Kontrolle im Rahmen der Nachsorge dienen.

1.2.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

Nach dieser Reihe an Untersuchungen kann das klinische TNM-Stadium (auch cTNM für „c“ *engl.* = *clinical*) des Tumors bestimmt werden. Dabei steht „T“ für Tumorausdehnung,

„N“ für den Befall der regionären Lymphknoten (LK) und „M“ für synchrone Metastasen. Von der klinischen, prätherapeutischen Einteilung unterscheidet man die sogenannte postoperative, histopathologische Klassifikation (auch pTNM für „p“ *engl.* = *pathological*). Diese Klassifikation liefert zusätzliche Daten, die aus der pathologischen Untersuchung gewonnen wurden, um die Prognose des Patienten besser einschätzen zu können und beschreibt den Status nach der Therapie. Wurde der Operation (OP) des Tumors eine neoadjuvante Radio- und/oder Chemotherapie vorgeschaltet, wird der pTNM-Klassifikation das Präfix „y“ vorangestellt, um auf die morphologischen Veränderungen des vorbehandelten Tumors aufmerksam zu machen [9].

Für das Rektumkarzinom lautet die TNM-Klassifikation der 7.Auflage folgendermaßen[9]:

T – Primärtumor

TX - Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 - kein Anhalt für Primärtumor

Tis - Carcinoma in situ

T1 - Tumor infiltriert Submucosa

T2 - Tumor infiltriert die Muscularis propria

T3 - Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches/perirektales Gewebe

T4 - Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

T4a - Tumor perforiert viszerales Peritoneum

T4b - Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

N – regionäre Lymphknoten

NX - regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0 - keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 - Metastase(n) in 1 bis 3 regionären Lymphknoten

N1a - Metastase in 1 regionärem Lymphknoten

N1b - Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten

N1c - Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen

N2 - Metastasen in 4 und mehr regionären Lymphknoten

N2a - Metastasen in 4–6 regionären Lymphknoten

N2b - Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

M – Fernmetastasen

M0 - keine Fernmetastasen

M1 - Fernmetastasen

M1a auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)

M1b Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Die UICC fasst die erhobenen TNM-Merkmale in Stadien zusammen (vergleiche Tabelle 1 mit einer vereinfachten Stadieneinteilung). Der weitere Therapieablauf ist abhängig davon, in welchem Stadium sich der Patient befindet.

Tabelle 1: Vereinfachte Stadieneinteilung der UICC für das kolorektale Karzinom

UICC-Stadium	TNM-Beschreibung
0	Tis (Carcinoma in situ)
I	bis T2, N0, M0
II	bis T4, N0, M0
III	jedes T, N1/N2, M0
IV	jedes T, jedes N, M1

Abkürzungen: UICC = Union Internationale Contre le Cancer; TNM = tumor node metastasis.

Quelle: In Anlehnung an Wittekind et al. 2010 [9].

1.2.5 Therapieprinzipien

Beim Rektumkarzinom müssen die drei Behandlungssäulen OP, Radiotherapie und Chemotherapie gut ineinandergreifen, um das beste therapeutische Ergebnis für den Patienten zu erzielen. Je nach UICC-Stadium gibt es in der Leitlinie unterschiedliche Empfehlungen, welche Therapie wann indiziert sei.

Neoadjuvante Therapie

Die präoperative Radio- oder Radiochemotherapie ist in den UICC-Stadien II und III indiziert [3]. Radiatio und Chemotherapie ergänzen sich synergistisch, indem 5-Fluorouracil (5-FU) als Radiosensitizer fungiert [10] und nicht nur die lokale Wirkung der Radiatio verstärkt, sondern auch einzelne Tumorzellen, die sich als Mikrometastasen in der Peripherie absiedeln, durch toxische, molekulare Umbauprozesse an der Replikation hindert [11]. Mit Hilfe der Radiotherapie kann nicht nur der solide Tumor selbst, sondern auch sein Lymphabflussgebiet gezielt bestrahlt werden. Durch den kombinierten Einsatz konnte die Lokalrezidivrate gesenkt und eine höhere Sphinktererhaltungsrate im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie erreicht werden [12,13].

Es gibt unterschiedliche Therapieregime für die Strahlentherapie des Rektumkarzinoms: die Kurzzeitbestrahlung und die konventionell fraktionierte Bestrahlung. In der Kurzzeitbestrahlung beträgt die Gesamtdosis 25 Gray (Gy), die in Einzeldosen von 5 Gy an 5 aufeinander folgenden Tagen verabreicht wird und nach welcher sofort die OP folgt. Die

Gesamtdosis der konventionell fraktionierten Bestrahlung liegt bei 45 bis 50,4 Gy, die, in 25-28 Fraktionen aufgeteilt, fünf Wochen lang täglich mit Ausnahme der Wochenenden appliziert wird [3]. Vier bis sechs Wochen nach der letzten Bestrahlung erfolgt die chirurgische Therapie des Tumors. Durch diesen längeren Abstand zur OP haben die Krebszellen genug Zeit, um auf die Radiochemotherapie zu reagieren und zu Grunde zu gehen. Infolgedessen beobachtet man das Phänomen der Tumorschrumpfung, was man auch als Downsizing bezeichnet. Verkleinert sich dadurch die prätherapeutisch bestimmte T-Klassifikation, nennt man es sogar Downstaging. Aufgrund der kurzen Behandlungszeit und der unmittelbar anschließenden OP sieht man die letztbeschriebenen Effekte des Downsizing und Downstaging nicht bei einer Kurzzeitradiatio. Deshalb sollte zur Maximierung der Tumorschrumpfung die konventionell fraktionierte Radiochemotherapie der Kurzzeitbestrahlung vorgezogen werden [14].

In der Leitlinie zum nicht metastasierten Rektumkarzinom wird eine 5-FU-haltige Chemotherapie empfohlen. Diese soll simultan zur Radiatio beispielsweise als Dauerinfusion in der 1. und 5. Bestrahlungswoche appliziert werden. Je nach Zusammensetzung der Chemotherapie, gibt es unterschiedliche Empfehlungen für die Dosierung des 5-FU. Bei jüngeren Patienten (< 61 Jahre) kann im Einzelfall die Kombination der Fluoropyrimidine mit Oxaliplatin erwogen werden, da die CAO/ARO/AIO-04-Studie für diese Subgruppe ein verbessertes krankheitsfreies Überleben (*disease-free survival* [DFS]) und Gesamtüberleben (*overall survival* [OS]) zeigen konnte [15]. Für die Erstlinienchemotherapie des metastasierten Rektumkarzinoms werden bei gutem Allgemeinzustand des Patienten ebenfalls fluoropyrimidinbasierte Kombinationstherapien auch mit Oxaliplatin eingesetzt [3].

Chirurgie

Die kurative Therapie des Rektumkarzinoms erfordert eine radikale Resektion nicht nur des Primärtumors im Rektum, sondern auch eine partielle oder totale Entfernung des Mesorektums und damit des regionären Lymphabflussgebiets [3]. Die beiden OP-Verfahren der Rektumchirurgie sind die kontinenzerhaltende tiefe anteriore Rektumresektion oder die nicht schließmuskelerhaltende abdomino-perineale Rektumextirpation mit Anlage eines permanenten Kolostomas. Um qualitativ hochwertige OP-Ergebnisse zu erzielen und um die Lokalrezidivrate zu senken, müssen bestimmte onkologische Grundsätze beachtet werden. Zu diesen Standards gehört, dass bei Karzinomen des mittleren und unteren Rektumdrittels das komplette Mesorektum entfernt werden muss, was man

als totale mesorektale Exzision bezeichnet (TME). Bei Karzinomen des oberen Rektumdrittels sollte eine partielle Mesorektumexzision durchgeführt werden. Der Sinn einer TME besteht darin, mögliche Satellitenmetastasen, die das mesorektale Fettgewebe infiltrieren, zu eliminieren und die pararektalen LK und Lymphbahnen, die einen schnellen Metastasierungsweg darstellen, zu entfernen. Neben einem angemessenen Sicherheitsabstand zum gesunden Gewebe, sollte der Tumor en bloc reseziert werden. En bloc bedeutet, dass alle dem Tumor adhärennten Organe mit entfernt werden ohne das intraoperative Lösen der Verwachsungen, damit Zellverschleppung und Implantationsmetastasen vermieden werden [16]. Zur Erhaltung der Lebensqualität sollten intraoperativ die autonomen Nervenfasern des Plexus hypogastricus, die einer funktionierenden Blasen- und Sexualfunktion dienen, geschont werden [3].

Über die Wahl des OP-Verfahrens wird erst mehrere Wochen nach Beendigung der neoadjuvanten Therapie entschieden, da durch den Rückgang der Tumormasse sphinktererhaltende Resektionen unter Umständen realisierbar werden, die primär nicht in Betracht gezogen wurden [17].

In den seltensten Fällen, wenn nach einer neoadjuvanten Therapie durch bildgebende Verfahren in einer MRT oder in der Endosonografie eine komplette Remission festgestellt wurde, kann auf eine OP verzichtet werden. Diese Patienten müssen eine hohe Bereitschaft für eine gründliche, mindestens 5-jährige Nachsorge aufbringen [3].

Adjuvante Therapie

Nach der aktuellen S3-Leitlinie sei nach einer neoadjuvanten Radiochemotherapie eine adjuvante Chemotherapie unabhängig vom postoperativen Tumorstadium (also auch bei kompletter Remission oder UICC-Stadium I und II) indiziert. Dabei handelt es sich um eine 5-FU-haltige Chemotherapie, welche ca. 4-6 Wochen nach der OP begonnen werden sollte [3].

Wenn keine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde, kann ab dem UICC-Stadium II eine adjuvante Therapie appliziert werden. In der Regel wird diese als kombinierte Radio- und Chemotherapie empfohlen, es sei denn, es gibt Kontraindikation gegen eine der beiden Therapieformen. In diesem Fall besteht die Möglichkeit einer alleinigen adjuvanten Radiatio oder Chemotherapie.

1.2.6 Postoperative pathohistologische Diagnostik

Postoperativ wird das Resektat in der Pathologie untersucht. Dabei wird der Tumor nicht nur mikroskopisch, sondern auch makroskopisch beschrieben und die Qualität der TME

kategorisiert. Nach der S3-Leitlinie sollte der pathohistologische Bericht folgende Angaben enthalten: Tumortyp, Tumorinvasionstiefe (pT-Klassifikation), Status der regionären LK (pN-Klassifikation), Anzahl der untersuchten LK (dabei sollten mindestens 12 LK aufgearbeitet werden), Grading, Tumorabstand zu allen Resektionsrändern (oral, aboral, zirkumferentiell) und die R-Klassifikation (*engl. R = residual tumor after treatment*).

1.2.7 Nachsorge

Aufgrund der erhöhten Lokalrezidivrate und dem gestiegenen Risiko, innerhalb der nächsten 5 Jahre an Fernmetastasen oder einem metachronen Zweittumor zu erkranken, sollten alle Patienten ab UICC-Stadium II die strukturierte Nachsorge wahrnehmen [18-20]. Ziel ist es, die noch nicht symptomatischen Frührezidive zu erkennen, um diese kurativ zu reseziieren und so die Heilungschancen zu erhöhen. In dem UICC-Stadium I wird nach einer R0-Resektion - aufgrund der in diesem Stadium sehr günstigen Prognose und geringen Rezidivrate - keine regelmäßige Nachsorge empfohlen [21]. Da bei allen Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind, ein grundsätzlich erhöhtes Risiko eines Zweittumors im Kolon besteht, ist eine koloskopische Nachsorge auch bei UICC-Stadium-I-Patienten sehr sinnvoll und sollte alle 5 Jahre durchgeführt werden.

Nach der Tumorresektion erhalten alle Patienten unabhängig vom Stadium drei Monate später eine CT-Untersuchung, da diese sehr gut zum Nachweis von Lokalrezidiven, Leber- und Lungenmetastasen geeignet ist. Die weiteren Untersuchungen in der Nachsorge können der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: Nachsorgeempfehlungen für UICC-Stadium II und III Rektumkarzinome

Untersuchung	Monate								Jahre		
	6	9	12	15	18	21	24	3	4	5	
Anamnese, körperliche Untersuchung, CEA	X		X		X		X	X	X	X	
Koloskopie			X*							X*	
Abdomensonografie	X		X		X		X	X	X	X	
Rektoskopie**	X		X		X		X				
Röntgen Thorax			X				X	X	X	X	

* bei unauffälligem Befund nächste Koloskopie nach 5 Jahren

** nur beim Rektumkarzinom ohne neoadjuvante oder adjuvante Therapie

Abkürzungen: UICC = Union Internationale Contre le Cancer; CEA = Carcinoembryonales Antigen.

Quelle: In Anlehnung an *Deutsche Krebsgesellschaft [DKG], Deutsche Krebshilfe und Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften [AWMF], 2019 [3]*.

1.3 Morphologie des Rektumkarzinoms nach neoadjuvanter Therapie

Wie bei den Therapieprinzipien bereits erwähnt, zählt die neoadjuvante Radiochemotherapie zu einem Standard in der Behandlung des UICC-Stadium-II-und-III-Rektumkarzinoms. Beides, Bestrahlung und Chemotherapie, führt nicht direkt zum sofortigen Zelltod. Ionisierende Strahlen stören den Zellzyklus und führen zum Mitosestopp, während Chemotherapeutika die DNA-Synthese irreversibel hemmen und letztendlich beide Verfahren den Proliferationsstopp erzielen [22]. Die zellulären und histologischen Spuren, die diese Therapie hinterlässt, sind sowohl Veränderungen des Zellkerns und des Zytoplasmas, als auch fibrotische Umbauvorgänge der Gefäßwände, welche bis zur Stenose des vaskulären Lumens führen können [22]. Das letztere ist vor allem für die Spätschäden der Radiochemotherapie verantwortlich. Denn durch die Stenose der blutversorgenden Gefäße der Submukosa kommt es zu weiteren Gewebsschäden wie einem Ulkus, einer Schleimhautatrophie oder einer generellen Fibrose im gesamten Gebiet der Bestrahlung. Nicht nur das umliegende Gewebe, sondern auch der Tumor fibrosiert stellenweise narbig, wird an manchen Passagen nekrotisch und es kann sogar zur Bildung von azellulären Schleimseen kommen, selbst wenn der ursprüngliche, unbehandelte Tumor nicht schleimbildend war [22]. Diese therapiebedingten Veränderungen der Tumormorphologie sollten neben den gewohnten Merkmalen, wie dem Tumortyp oder dem pTNM-Status, im pathohistologischen Bericht dokumentiert werden. Möglicherweise können sie hilfreiche Rückschlüsse bezüglich der weiteren Prognose und folglich Therapie liefern. Nach der Leitlinie wird zur Erfassung der eingetretenen regressiven Veränderungen keine Methode ausdrücklich empfohlen [3]. Lediglich wird bei den Hintergrundinformationen die Klassifikation nach Dworak erwähnt und dass diese zunehmend verwendet werde [23].

1.3.1 Tumor-Regressionsgrading

Das allererste Tumor-Regressionsgrading beschrieb 1994 die französische Arbeitsgruppe von *Mandard et al.* am neoadjuvant behandelten Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [24]. Drei Jahre später skizzierte der deutsche Pathologe *Dworak et al.* ein ähnliches histomorphologisches Regressionsgrading nun aber für das neoadjuvant therapierte Rektumkarzinom [23]. Er teilte die Regression des Tumors folgendermaßen ein: Grad 0: keine Regression; Grad 1: dominante Tumormasse mit deutlicher Fibrose und/oder Vaskulopathie; Grad 2: dominante Fibrose mit wenigen Tumorzellen (diese sind

leicht zu finden); Grad 3: sehr wenige Tumorzellen mit ausgeprägter Fibrose (Tumorzellen sind schwer zu finden); und Grad 4: Keine Tumorzellen, nur Fibrose (komplette Regression oder Response). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der Regressionsgrad nach Dworak für neoadjuvant therapierte Tumore ein klinisch relevanter Prognosefaktor ist [25-27]. Denn Therapie-Responder, also Patienten mit einer ausgeprägten Fibrose und/oder mit einer kompletten Tumor-Remission, hatten eine deutlich bessere Prognose im Vergleich zu Patienten mit einer geringeren Regression [25-27].

1.3.2 ypTNM-Status

Der TNM-Status wird verwendet, um stadienabhängige Überlebenszeiten der Tumorpatienten vorherzusagen und um therapeutische Entscheidungen zu treffen. Wie bereits erwähnt, kommt es durch die perioperative Therapie in den meisten Fällen zu dem positiven Effekt des Downsizing und Downstaging des Tumors [28]. Dies kann im kompletten Rückgang des Tumors resultieren, sodass nach neoadjuvanter Therapie keine vitalen Tumorzellen mehr im Gewebe nachweisbar sind, also ypT0. Dieser Zustand wird als „pathologic complete response“ (pCR) oder auch vollständige Remission bezeichnet. In der Literatur erstreckt sich die pCR von 4% bis 44%, was unter anderem abhängig vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose und der Zusammensetzung der perioperativen Therapie war [28-32]. Die Patienten, die eine pCR erreicht hatten, zeigten in der Literatur sowohl ein geringeres Risiko für LK-Metastasen als auch ein verbessertes OS [28,30,32]. Je höher die T-Klassifikation nach der neoadjuvanten Radiochemotherapie, desto höher war das Risiko, ebenfalls simultane LK-Metastasen und ein kürzeres DFS zu haben [28,29]. Genauso verhielt es sich mit dem LK-Status, der ebenfalls eine negative Assoziation mit dem DFS, jedoch nicht zum OS zeigte [29,30]. Alles in allem korreliert der posttherapeutisch erfasste TNM-Status signifikant sowohl mit dem DFS als auch mit der Rezidivrate beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Therapie [29,30].

1.3.3 Tumor Budding

Tumor Budding (*engl. budding = Knospung*) ist ein ungünstiger prognostischer Marker des nicht neoadjuvant therapierten kolorektalen Karzinoms [33-38]. Es beschreibt ein morphologisches Phänomen an der invasiven Front des Tumors, bei dem sich einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellcluster mit maximal vier Tumorzellen aus dem neoplastischen Epithel lösen und entlang der invasiven Front in die Tiefe wandern. Die For-

mierung von Budding ist assoziiert mit dem Prozess der Epithelial-Mesenchymalen-Transition, was den Verlust an Adhäsionsmolekülen in der Tumorzelle bedeutet und der Zelle dadurch eine erhöhte Migrationsbereitschaft ermöglicht [39]. Folglich unterscheiden sich Buds auch genetisch vom Zentrum des Tumors [3]. Es wird angenommen, dass diese Dedifferenzierung der Tumorzellen die Schlüsselkomponente des Metastasierungsprozesses sei [34,40].

Tumor Budding beim kolorektalen Karzinom korrelierte signifikant in Vorgängerstudien mit verschiedenen Faktoren, die auf einen aggressiveren Tumortyp hindeuteten. Tumore, die stark budden, sind häufiger schlecht differenziert [33,35,41], haben Lymphgefäße infiltriert [33,34,42,43], zeigen dementsprechend ein höheres Vorkommen befallener LK [33,35,41-43], ein höheres Auftreten von Fernmetastasen [43-45] und korrelieren mit einem höheren TNM-Status [41,43]. Daraus folgt, dass Tumor Budding beim Kolonkarzinom ein negativer Prädiktor für das DFS ist [33,34,41,43,46]. Überraschenderweise wird das Tumor Budding nicht in der Routinediagnostik beschrieben und wurde bis 2019 noch nicht einmal in der deutschen S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom erwähnt. Das könnte daran liegen, dass es immer noch Unsicherheiten gibt, wie Budding auszuwerten und was die effektivste Art der Budding-Auswertung sei [39].

Der japanische Forscher Kazuo Hase hat im Jahre 1993 das Tumor Budding nach seinem Augenmaß ausgewertet. Je nach dem vorherrschenden Muster an der invasiven Front teilte er Budding in „kein oder mildes Budding“, was er als BD-1 bezeichnete, oder in „moderat bis schweres Budding“, als BD-2 genannt, ein [33]. Der Leser erhält nicht einmal weitere Hinweise darüber, mit welcher Vergrößerung hier Budding ausgewertet wurde. Damit bleibt es dem Untersucher nach der Methode von Hase selbst überlassen, mit Hilfe welcher Vergrößerung er das Budding auswerten möchte. Die Studie von *Hase et al.* wurde an nicht neoadjuvant therapierten kolorektalen Karzinomen durchgeführt – unabhängig vom Tumorstadium [33].

Hideki Ueno, ebenfalls ein japanischer Wissenschaftler, beschäftigte sich sehr intensiv mit dem Thema Tumor Budding in kolorektalen Karzinomen und lieferte eine genauere Beschreibung der Methodik. Man solle erst einmal die invasive Front des Tumors unter einer geringen Vergrößerung scannen, um die dichteste Region des Budding zu identifizieren. Erst dann zähle man mit einem $\times 20$ er-Objektiv (Fläche = 0.785 mm^2) die Buds in diesem Feld aus [36,47]. Wenn in einem Feld fünf oder mehr Buds gesehen werden, betrachtet man die Fälle als budding-positiv. Wie Kazuo Hase praktizierte auch Hideki Ueno an nicht neoadjuvant therapierten kolorektalen Karzinomen aller Tumorstadien.

1.3.4 Weitere morphologische Kriterien

Das morphologische Bild des neoadjuvant behandelten Rektumkarzinoms wird in dieser Arbeit komplettiert durch die Auswertung weiterer Faktoren, die in Vorgängerstudien prognostische Hinweise auf das klinische Bild der Patienten zeigten. Zu den weiteren morphologischen Kriterien gehören regressiv veränderte LK [48], intratumorales Muzin [49], Verkalkungen [49] und das Vorhandensein einer Immunreaktion um die Tumorzellen herum [50].

1.4 Der Anti-Gesamtzytokeratin-Antikörper AE1/AE3

Aufgrund mehrerer Vorgängerstudien und der breiten Abdeckung an Zytokeratinen, wurde der Antikörper AE1/AE3 zur immunhistochemischen Färbung gewählt [36,51,52]. Der Anti-Gesamtzytokeratin-Antikörper AE1/AE3 ist ein klassischer immunhistochemischer Marker für Epithelzellen. Zytokeratine zählen zu der epithelialen Klasse der Intermediärfilamente und bilden den wichtigsten Teil des Zytoskeletts aus, welches der mechanischen Stabilität der Zelle dient. Es gibt bisher 20 bekannte Zytokeratin-Proteine. Jedes einzelne hat ein spezifisches Expressionsmuster und wird von verschiedenen Epithelzellen exprimiert. Man kann die Gesamtheit der Zytokeratine in zwei Gruppen einteilen, in die sauren vom Typ A, zu denen die Zytokeratine 9-20 zählen und in die neutral-basischen vom Typ B mit Zytokeratin 1-8 [53]. Ein Typ A Zytokeratin wird immer zusammen mit einem Typ B exprimiert, und diese bilden einen Komplex in der Zelle aus. Jede Epithelzelle enthält also mehrere Zytokeratine, die sich mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen nachweisen lassen. Der Anti-Gesamtzytokeratin-Antikörper AE1/AE3 ist ein Gemisch aus mehreren Antikörpern, die die Zytokeratine CK1-6, CK8, CK10, CK14-16 und CK19 anfärben und den Antikörper AE1/AE3 damit zu einem Panepithelmarker hervorheben [51]. Die Immunhistochemie (IHC) mit diesem Antikörper ergibt eine zytoplasmatische, manchmal auch eine fibrilläre Färbung [54].

1.5 Fragestellung

Da Budding beim unbehandelten Rektumkarzinom einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt, wird in dieser Arbeit dessen Rolle nach neoadjuvanter Therapie untersucht. Es soll geklärt werden, welche Methode, die qualitative nach Hase oder die quantitative nach Ueno, sich zur Budding-Auswertung besser eignet. Daneben spielt die besondere Morphologie des Tumors nach neoadjuvanter Therapie ebenfalls eine wichtige Rolle in dieser Arbeit. Deshalb werden nicht nur die bekannten prognostischen Faktoren wie die

ypT-, ypN-Klassifikation und das Regressionsgrading ausgewertet, sondern auch neuartige Auffälligkeiten wie Muzin, Kalzifikationen, regressive LK und starke Immunreaktion notiert und im nächsten Schritt statistisch daraufhin untersucht, ob signifikante Zusammenhänge zum Budding vorliegen.

Es ergeben sich folgende Teilfragestellungen:

1. Gibt es Unterschiede bei den Geschlechtern im Hinblick auf das Budding?
2. Liefert das Budding in den Resektaten Hinweise auf ein erhöhtes Rezidivrisiko oder auf einen früheren Tod?
3. Bringt die IHC einen Vorteil bei der Beurteilung von Budding?
4. Welche Methode ist zur Auswertung des Budding besser geeignet?
5. Können weitere Faktoren als prognostische Marker des neoadjuvant therapierten Rektumkarzinoms identifiziert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Das Patientenkollektiv umfasst insgesamt 128 Patienten, die im Zeitraum von 2002 bis 2011 in der Chirurgischen Klinik des Campus Benjamin Franklin (CBF) in Berlin operiert und mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie vorbehandelt wurden. Die neoadjuvante Radiochemotherapie bestand bei unserem Kollektiv aus einer fünfwöchigen Bestrahlung der Tumorregion, die in Einzeldosen von 1,8 Gy mit 18 MeV Photonen am Linearbeschleuniger bis zu einer Gesamtdosis von 50,4 Gy verabreicht wurde, und aus einer Chemotherapie mit 5-FU, die in der Dosierung von 225mg/cm² als Dauerinfusion über 24 Stunden in der 1. und 5. Bestrahlungswoche appliziert wurde. Ein Teil der Patienten erhielt eine geringfügig veränderte neoadjuvante Therapie. Toleriert wurden dabei kurze Therapieunterbrechungen wegen Infekten oder Unverträglichkeiten und geringfügige Abwandlungen der Radiatio oder der Chemotherapie. Vier bis sechs Wochen später erfolgte die Tumorresektion, welche als Totale Mesorektale Exzision (TME) durchgeführt wurde.

2.1.1 Ausschlusskriterien

Patienten, die eine Kurzzeitbestrahlung erhielten ($n = 3$), wurden ausgeschlossen. Ein fast tumorfreier Patientenfall ($n = 1$) wurde ebenfalls aus der Auswertung ausgeschlossen, da bei diesem Patienten mit nur noch drei losen Tumorzellen zu wenig Material für eine adäquate Auswertung zur Verfügung stand. Von vier Patienten ($n = 4$) waren keine Leerschnitte vorhanden, sodass bei den immunhistochemischen Färbungen vier Fälle weniger für die Auswertung zur Verfügung standen. Folglich war Patientenmaterial von 124 Probanden im Hämatoxylin/Eosin-(H&E)-Schnitt und von 120 Probanden in der immunhistochemischen Färbung für die Analysen verfügbar. Zur Veranschaulichung der Ausschlusskriterien dient das Flussdiagramm (Abbildung 1) auf der nächsten Seite.

2.1.2 Überlebensdaten

Die Information zum Follow-up wurde aus der elektronischen Patientenakte anonymisiert erfasst und fehlende Daten wurden mit Hilfe eines Fragebogens, der an die jeweiligen Hausärzte verschickt wurde, komplettiert.

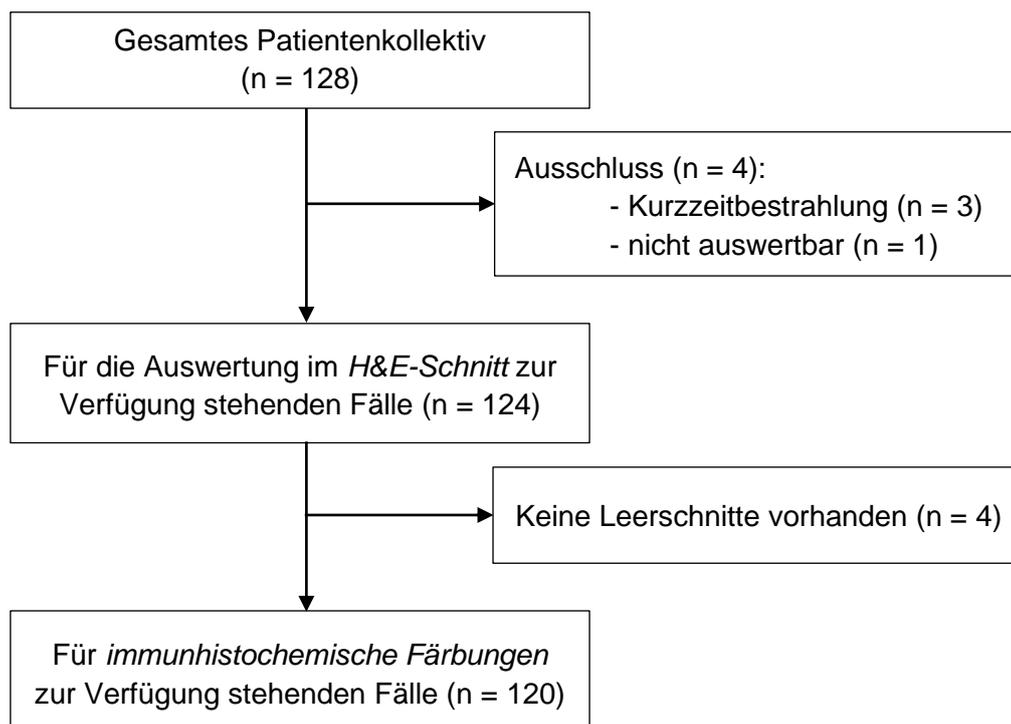


Abbildung 1: Veranschaulichung der zur Verfügung stehenden Fälle als Flussdiagramm.

2.1.3 Ethikvotum

Die Verwendung des Patientenmaterials wurde von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Die Antragsnummer lautet EA1/370/16.

2.2 Resektate des Rektumkarzinoms

Die Analyse erfolgte an Resektaten der oben beschriebenen Patienten, deren Rektumkarzinome in den Jahren 2002 bis 2011 in der Chirurgischen Klinik des CBF reseziert, anschließend in der Pathologie zugeschnitten und nach Standardprotokollen mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt wurden. Die archivierten, formalinfixierten, paraffin-eingebetteten Gewebe-Blöcke des Tumors wurden vom Institut für Pathologie des Campus Charité Mitte und des CBF zur weiteren Forschung bereitgestellt. Für die Herstellung der Leerschnitte wurden aus den Tumorblöcken 3-5 µm breite Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt, diese auf gläserne Objektträger appliziert und anschließend getrocknet. Ein Tumorblock pro Fall mit dem dichtesten Budding wurde für die Immunhistochemie ausgewählt und anschließend gefärbt (Details siehe *Kapitel 3.5.1. Färbeporgang der Immunhistochemie für AE1/AE3*). Im Nachhinein erfolgten die mikroskopische Beurteilung und zuletzt die statistische Datenauswertung.

2.3 Morphologische Beurteilung der Fälle im H&E-Schnitt

Die archivierten und bereitgestellten Fälle des oben beschriebenen Patientenkollektivs wurden erneut von zwei unabhängigen Untersuchern mikroskopiert und alle, zu jedem Fall gehörenden H&E-Schnitte, sorgfältig beurteilt. Die Auswertung aller Marker erfolgte ohne die Kenntnis des klinischen Verlaufs mit einem Mikroskop der Marke Nikon E-CLIPSE E200 und einem x10er-Okular.

2.3.1 TNM-Status

Der ypTNM-Status der Resektate wurde anhand der 7. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumore bewertet. Dabei unterscheidet sich diese Auflage zu den vorherigen in der Aufspaltung des T4-Status in T4a: „Tumor perforiert viszerales Peritoneum“ und T4b: „Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen“; sowie in der weiteren Aufteilung des N-Status in N1a, N1b, N2a und N2b. Eine weitere Besonderheit der 7. Auflage stellt die Aufnahme der Tumorknötchen, sogenannter Deposits, ins Staging System und deren Klassifikation als N1c dar [9]. Die Einzelheiten können den Tabellen 3.1. und 3.2. entnommen werden.

Tabelle 3.1: Beschreibung der T-Klassifikation

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ ¹
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in das nicht peritonealisierte perikolische oder perirektale Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen ^{2,3} und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
	T4a Tumor perforiert viszerales Peritoneum
	T4b Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen ²

Anmerkungen:

¹Tis liegt vor, wenn Tumorzellen innerhalb der Basalmembran der Drüsen (intraepithelial) oder in der Lamina propria (intramukös) nachweisbar sind, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mukosae in die Submukosa feststellbar ist.

²Direkte Ausbreitung in der Kategorie T4b schließt auch die mikroskopisch bestätigte Infiltration anderer Segmente des Kolorektums auf dem Weg über die Serosa ein, z.B. die Infiltration des Sigma durch ein Zäkalkarzinom und für Tumore in retroperitonealer Lokalisation die direkte Invasion anderer Organe oder Strukturen auf dem Wege der Ausbreitung jenseits der Muscularis propria.

³Ein Tumor, der makroskopisch an anderen Organen oder Strukturen adhärent ist, wird als T4 klassifiziert. Ist bei der histologischen Untersuchung in den Adhäsionen kein Tumorgewebe nachweisbar, soll der Tumor in Abhängigkeit von der Tiefe der Wandinfiltration als pT1-pT3 klassifiziert werden.

Quelle: Wittekind et al., 2010 [9].

Tabelle 3.2: Beschreibung der N-Klassifikation

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in 1-3 regionären Lymphknoten
	N1a Metastase in 1 regionären Lymphknoten
	N1b Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
	N1c Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolisichen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 und mehr regionären Lymphknoten
	N2a Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten
	N2b Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

Anmerkungen:

„Tumor deposits“ (Satelliten) sind makroskopische oder mikroskopische Nester oder Knötchen im perikolorektalen Fettgewebe des Lymphabflussgebietes des Primärtumors ohne histologisch erkennbare Residuen eines Lymphknotens. Sie können einer kontinuierlichen Ausbreitung, einer Veneninvasion (V1, V2) oder komplett metastatisch durchsetzten Lymphknoten entsprechen. Wenn solche Tumorknötchen bei Läsionen, die sonst als T1 oder T2 klassifiziert werden, nachgewiesen werden, ändert sich die T-Klassifikation nicht, aber die Knötchen werden als N1c/pN1c beurteilt.

pN1c

Wenn ein solches Tumorknötchen vom Pathologen als vollständig durch Tumor ersetzter Lymphknoten (im Allgemeinen mit glatter äußerer Kontur) angesehen wird, dann sollte es als Lymphknotenmetastase klassifiziert werden und jedes Tumorknötchen sollte einzeln als Lymphknotenmetastase gezählt und in der Klassifikation berücksichtigt werden.

Quelle: Wittekind et al., 2010 [9].

2.3.2 Auswertung des Tumor-Regressionsgrading

Die Tumorregression wurde nach dem Grading von Dworak beurteilt (siehe Tabelle 4).

Dabei wurden Grad 0-2 als „Non-Responder“ der neoadjuvanten Therapie und Grad 3-4 als „Responder“ bewertet.

Tabelle 4: Regressionsgrading nach Dworak für das neoadjuvant therapierte Rektumkarzinom

Grad 0	Keine Regression
Grad 1	Dominante Tumormasse mit deutlicher Fibrose und/oder Vaskulopathie
Grad 2	Dominante Fibrose mit wenigen Tumorzellen (Tumorzellen sind in der Übersicht <u>leicht</u> zu finden)
Grad 3	Sehr wenige Tumorzellen mit ausgeprägter Fibrose (Tumorzellen sind in der Übersicht <u>schwer</u> zu finden)
Grad 4	Keine Tumorzellen, nur Fibrose (komplette Regression oder Response)

Quelle: Dworak et al., 1997 [23].

2.3.3 Weitere morphologische Marker

Zusätzlich zu den aus den pathologischen Berichten entnommenen und nochmals ausgewerteten Parametern wie dem Differenzierungsgrad des Tumors, der Lymphgefäßinvasion oder der venösen Invasion wurden weitere morphologische Parameter erfasst.

Dazu gehören intratumorales Muzin und Kalk, regressiv veränderte LK und das Vorhandensein einer peritumoralen Immunreaktion. Die Auswertung dieser morphologischen Besonderheiten erfolgte mit Hilfe der Einteilung „0 = nicht vorhanden“ oder „1 = vorhanden“.

2.4 Beurteilung des Tumor Budding im H&E-Schnitt

Tumor Budding wird definiert als abgelöste einzelne Tumorzellen oder Tumorzellcluster mit maximal 4 Zellen entlang der, aber nicht ausschließlich invasiven Front des Tumors [33-36,39,44,55,56]. Dabei zählen einzelne, im Muzinsee schwimmende Tumorzellen nicht zum Budding. Diese Definition setzt voraus, dass überhaupt ein Tumor im Block vorhanden sein muss. Deshalb wurden alle Präparate mit kompletter pathologischer Remission, also alle tumorfreien Präparate, bei der Auswertung des Tumor Budding ausgeschlossen. Da es bisher, wie in der Einleitung erwähnt, keine einheitliche Methode zur Auswertung des Budding bei neoadjuvant therapierten Tumoren gab, wurde das Tumor Budding in dieser Arbeit mit Hilfe der zwei folgenden Methoden ausgewertet.

2.4.1 Auswertung nach Hase

Die Methode nach Hase kann zu den qualitativen Auswertungsmethoden gezählt werden. Es zählt lediglich der erste Eindruck. Je nach vorherrschendem Muster an der invasiven Tumorfront wurde Budding in „kein oder mildes Budding“ (BD-1) oder in „moderat bis schweres Budding“ (BD-2) eingeteilt (siehe Abbildung 2). Dabei wurde der Schnitt mit dem meisten Budding ausgewählt. Zur Auswertung wurde das $\times 40$ -Objektiv verwendet mit einem Objektfelddurchmesser von 5 mm und einer Fläche von 19.635 mm².

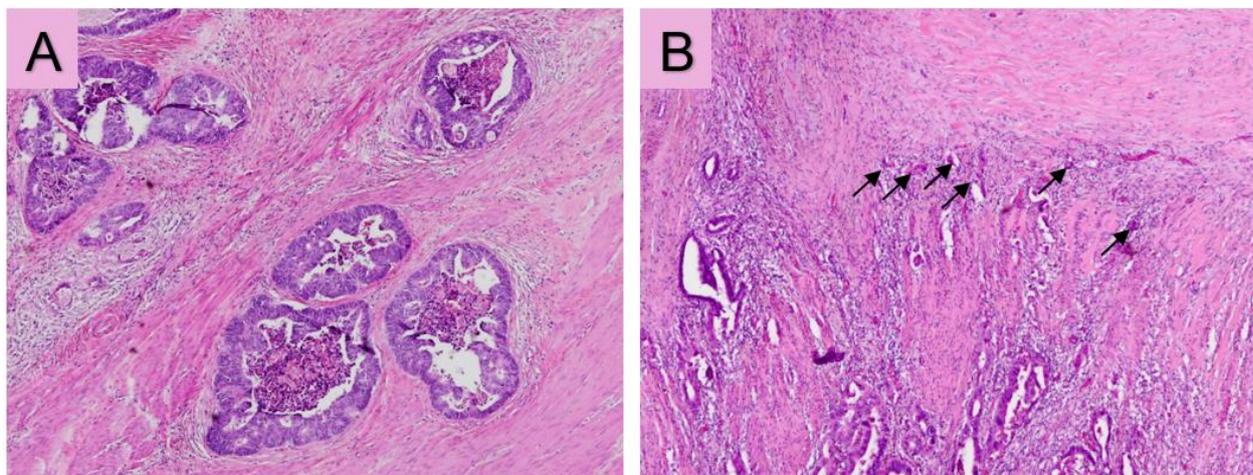


Abbildung 2: Auswertung des Budding nach Hase. Ist an der invasiven Front kein oder mildes Budding zu erkennen (A), wird der Fall als BD-1 bezeichnet. Moderat bis schweres Budding (B), hier durch Pfeile gekennzeichnet, wird als BD-2 notiert. (Urspr. Vergrößerung und Färbung (A) $\times 40$, H&E; (B) $\times 40$, H&E.)

2.4.2 Auswertung nach Ueno

Im Gegensatz zu der Methode nach Hase kann die Methode nach Ueno als quantitativ betrachtet werden. Quantitativ – da einzelne Buds ausgezählt und je nach einem bestimmten Cut-off die Fälle als budding-positiv oder -negativ betrachtet werden.

Als erstes wurde die invasive Tumorfront unter einer geringen Vergrößerung gescannt und die dichteste Region des Budding identifiziert. Auch bei dieser Auswertung wurde der Schnitt mit dem meisten Budding ausgewählt. Dann wurden die Buds in diesem Feld mit dem dichtesten Budding mit Hilfe eines $\times 20$ -Objektivs (Fläche = 0.785 mm^2 , Objektfelddurchmesser = 1 mm) ausgezählt. Fand man ein Feld mit fünf oder mehr Buds, wurde der Tumor als budding-positiv klassifiziert (siehe Abbildung 3). Fand man ein Feld mit vier oder weniger Buds, wurde der Tumor als budding-negativ klassifiziert.

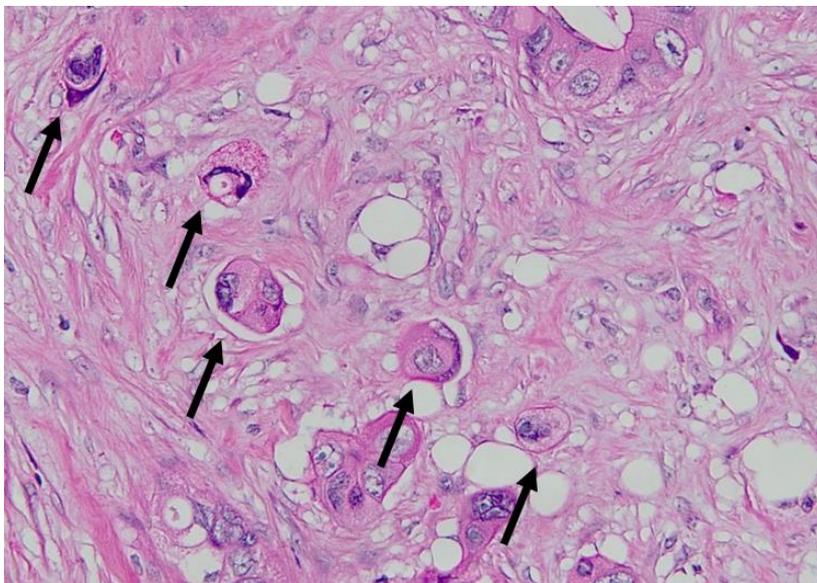


Abbildung 3: Auswertung des Budding nach Ueno. An der Stelle des dichtesten Budding werden mit einem $\times 20$ -Objektiv einzelne Buds gezählt; man erkennt mindestens fünf Buds (mit Pfeilen gekennzeichnet). Damit ist dieser Tumor budding-positiv. (Urspr. Vergrößerung und Färbung $\times 200$, H&E.)

2.5 Beurteilung des Tumor Budding nach der Immunhistochemie

Wie im Flussdiagramm (Abbildung 1) bereits dargestellt, waren insgesamt von den zur Verfügung stehenden 124 Rektumresektaten von vier Patienten keine Leerschnitte vorhanden. Damit standen 120 Leerschnitte für die Färbung zur Verfügung. Der Färbeprozess und die chemischen Vorgänge werden auf den nachfolgenden Seiten genauer beschrieben. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte auf die gleiche Art wie schon im *Kapitel 3.4 Beurteilung des Tumor Budding im H&E-Schnitt* beschrieben. Um Redundanzen zu vermeiden, werden die einzelnen Methoden nicht noch einmal in diesem Kapitel beschrieben.

Die nachfolgende Abbildung 4 zeigt ein Beispielbild für die Zytokeratinfärbung.

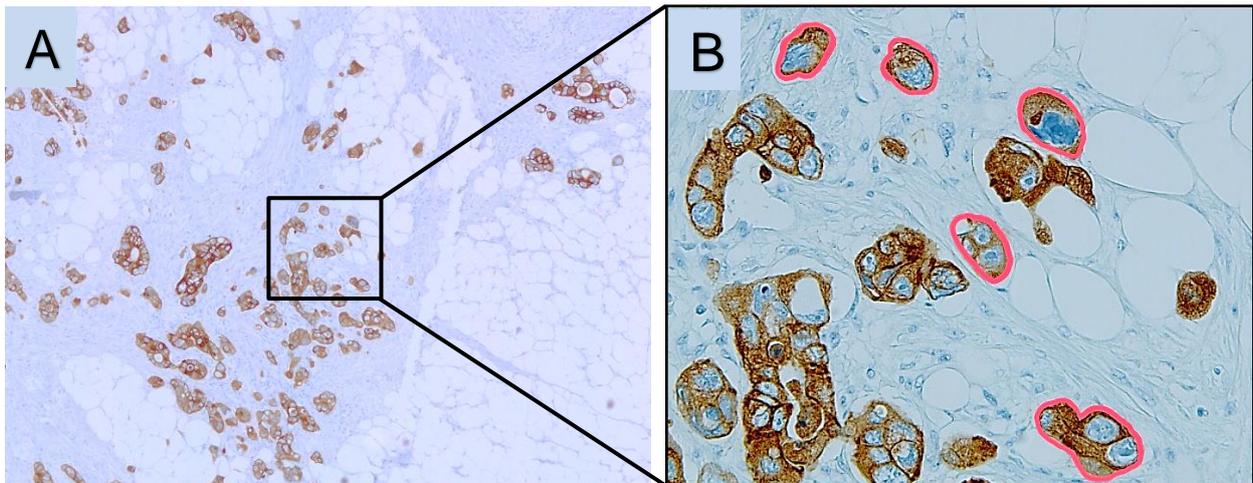


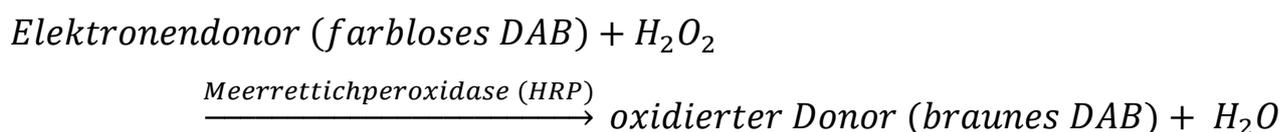
Abbildung 4: Beispielbild zur Veranschaulichung des Budding in der immunhistochemischen Färbung. Sowohl nach der Methode von Hase in der Übersicht (**A**) als auch nach Ueno mit dem 20er-Objektiv (**B**) kann dieser Fall als budding-positiv betrachtet werden. Einzelne Buds sind rot umrandet. (Urspr. Vergrößerung und Färbung (**A**) $\times 40$, AE1/AE3; (**B**) $\times 200$, AE1/AE3.)

2.5.1 Färbevorgang der Immunhistochemie für AE1/AE3

Ein Leerschnitt jedes Resektates wurde immunhistochemisch mit dem Antikörper AE1/AE3 gemäß der Standardprotokolle im vollautomatischen BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) gefärbt. Kurz gesagt, wurde das Gewebe zuerst entwacht und rehydriert. Nach der Epitop-Demarkierung durch Hitze (HIER = heat-induced epitope retrieval) wurde die endogene Peroxidase mit Wasserstoffperoxid blockiert, um die unerwünschte Hintergrundfärbung zu reduzieren. Diese Schritte und die danach folgenden wurden mit den von Ventana® Medical Systems vorgefertigten Reagenzien (DISCOVERY® DAB Map Kit [RUO]) durchgeführt. Im weiteren Vorgehen wurden die Objektträger mit dem primären monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes Zytokeratin (1:500, Clone AE1/AE3, DAKO, Code M3515) für 60 Minuten inkubiert und danach für 32 Minuten mit dem biotin-markierten Zweitantikörper behandelt (DISCOVERY® Universal Secondary Antibody [RUO]). Es folgte für 16 Minuten die Inkubation mit einem Streptavidin-HRP (Meerrettich-Peroxidase)-Enzymkonjugat, welches sich an das Biotin des Zweitantikörpers binden sollte. Anschließend wurde auf die Schnitte Wasserstoffperoxid und das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) aufgetragen und für 8 Minuten inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt.

2.5.2 DAB und die Meerrettich-Peroxidase

Die Meerrettich-Peroxidase bildet mit dem Wasserstoffperoxid einen Komplex aus, dabei fungiert DAB als Elektronendonator und wird folglich oxidiert [57]. Durch die Oxidationsreaktion des farblosen Chromogens DAB entsteht ein braunes, wasserunlösliches Endprodukt und Wasser. Dies wird in folgender Gleichung verdeutlicht:



Diese Färbänderung und das Unlöslich-Werden des DAB sind für die Immunhistochemie eine sehr hilfreiche Eigenschaft. Denn so können durch die indirekte Färbung von Antigen-Antikörper-Komplexen die spezifischen Antikörperbindungsstellen farbig dargestellt werden.

2.6 Statistische Auswertung

Alle erfassten Parameter wurden mit Hilfe deskriptiver Statistik und Häufigkeitstabellen ausgewertet. Hierfür sowie für alle weiteren Tests wurde das Programm SPSS Statistics 24.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) benutzt. Fehlende Werte wurden nicht ersetzt, sodass sich die Analysen auf vorhandene Angaben bezogen. Mit dem χ^2 -Test wurden Korrelationen zwischen den Gruppen untersucht. Gegebenenfalls wurde bei geringem Stichprobenumfang der exakte Fisher-Test verwendet. Für die drei Gruppen „budding-positiv“, „budding-negativ“ und „vollständige Remission“ wurde mit Hilfe von Varianzanalysen überprüft, ob ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Altersdurchschnitts existiert. Das Signifikanzniveau wurde bei allen Tests auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Die multivariate Analyse erfolgte mit Hilfe des Cox-Regressionsmodells. In die Berechnung sollten pro 10 Ereignisse nur ein zu untersuchender Parameter einfließen [58]. Deshalb wurden aufgrund der 32 Todesereignisse beziehungsweise 25 Rezidive drei Variablen in das Modell einbezogen, nämlich das Budding, die Tumortiefeninfiltration und der LK-Befall. Als Beobachtungsbeginn wurde das OP-Datum gewählt. Als Endpunkt wurde entweder der Todestag oder das Datum des letzten Kontaktes notiert, wenn vorhanden auch das Rezidivdatum. Die beschriebenen Zeitspannen wurden als *overall survival* (OS) und als *disease-free survival* (DFS) bezeichnet. Das Erstgenannte wurde definiert als die Zeit von der OP bis zum Tod, unabhängig von der Todesursache, das Letztgenannte als

die Zeit von der OP bis zum Rezidiv oder Tod, ebenfalls unabhängig von der Todesursache. Die Variablen der Tumortiefeninfiltration und des LK-Befalls wurden dichotomisiert, um ein Overfitting, zu Deutsch eine Überangepasstheit, des Modells zu vermeiden. Dazu wurden ypT0 + ypT1 + ypT2 zusammengefasst zu ypT0-2 und ypT3 + ypT4a + ypT4b zu ypT3-4. Der LK-Befall ging in das Modell als N0 = „kein LK-Befall“ und N+ = „LK-Befall“ ein. In den Überlebenszeitanalysen wurden die 21 Patienten mit vollständiger Remission aus den Berechnungen ausgeschlossen, da nur Patienten mit Resttumor in die Analysen eingingen. Das Kollektiv bestand danach aus 103 Fällen für die Auswertung im H&E und aus 99 Fällen für die Auswertung im AE1/AE3. Für die Rechnung der anderen zwei Parameter wurde dieselbe Patientenzahl verwendet, die bei der Auswertung des Budding zur Verfügung stand (H&E n = 103, AE1/AE3 n = 99). Mit Hilfe der Cox-Regression konnte die Hazard-Ratio (HR) der einzelnen Parameter für DFS und das OS berechnet werden. Das Hazard bezeichnet die momentane Sterberate für eine Patientengruppe [58]. Die Hazard-Ratio ist ein Maß zum Vergleich der Überlebenszeiten zweier Gruppen. Mit dem Kaplan-Meier-Verfahren wurden die Überlebenswahrscheinlichkeiten berechnet, als Kurven grafisch dargestellt und mit Hilfe des Logrank-Tests miteinander verglichen.

Das Kappa-Maß und der McNemar-Test wurden angewendet, um alle möglichen Kombinationen der Budding-Auswertung miteinander zu vergleichen (Methode nach Hase, nach Ueno, Färbung mit H&E und AE1/AE3). Das Kappa-Maß wurde verwendet, um den Grad der Übereinstimmung zu quantifizieren. Dabei entsprach $0,8 < \kappa \leq 1,0$ einer (fast) vollkommenen Übereinstimmung, $0,6 < \kappa \leq 0,8$ einer beachtlichen Übereinstimmung, $0,4 < \kappa \leq 0,6$ einer mittelgradigen Übereinstimmung, $0,2 < \kappa \leq 0,4$ einer ausreichenden Übereinstimmung, $0 < \kappa \leq 0,2$ einer geringen Übereinstimmung und $\kappa < 0$ einer schlechten Übereinstimmung [59]. Der McNemar-Test ist ein statistischer Test, der für verbundene Stichproben genutzt wird [60]. Verbundene Stichprobe bedeutet, dass am selben Objekt die Analysen durchgeführt wurden – in diesem Fall am selben Tumor. Ein signifikanter P-Wert beim McNemar-Test bedeutet, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Methoden besteht. In unserem Fall könnte das heißen, dass eine der Methoden eine Tendenz zu mehr budding-positiven Fällen hat. Im Gegensatz dazu bedeutet ein nicht signifikanter P-Wert, dass es keinen Unterschied innerhalb der Methoden gibt, sodass beide Methoden gleich viele budding-positive Fälle entdecken.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die zur Auswertung zur Verfügung stehende Patientenanzahl lag bei $n = 124$, davon waren 87 (70,2%) männliche und 37 (29,8%) weibliche Patienten. Der Altersdurchschnitt lag zum Zeitpunkt der OP bei ca. 64,7 Jahren (Range: 34 – 87 Jahre) und unterschied sich um etwa ein Jahr zum Altersmedian, der bei 65,5 Jahren lag. Die Standardtherapie mit einem Erreichen der Gesamtdosis von 50,4 Gy und einer 24-Stunden-Dauerinfusion von 225mg/cm²-5-FU in der 1. und 5. Bestrahlungswoche bekamen 80 Patienten (64,5%), 44 Patienten (35,5%) erhielten ein modifiziertes Therapieschema. 5-Jahres-Überlebensdaten konnten für 92 Patienten (74,2%) ermittelt werden, für 17 Patienten (13,7%) sind detaillierte Informationen nur für 2-4 Jahre vorhanden, 15 Patienten (12,1%) haben sich seit der OP nicht wieder vorgestellt. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 5,1 Jahre. In der Beobachtungszeit sind 32 Patienten verstorben (25,8%), 25 Patienten (20,2%) haben ein Rezidiv bekommen. Eine adjuvante Chemotherapie haben 71 Patienten (57,3%) erhalten, 32 Patienten (25,8%) haben diese nicht erhalten, bei 21 Patienten (16,9%) wurde es nicht dokumentiert. Das TNM-Stadium sowie weitere klinisch-pathologische Merkmale können den Tabellen 5.1 und 5.2 auf dieser und auf der nächsten Seite entnommen werden.

Tabelle 5.1: Klinische Parameter des Patientenkollektivs ($n = 124$)

Klinische Merkmale	n	(%)	Fortsetzung Tabelle 5.1	n	(%)
Gesamt	124	(100)	Gesamt	124	(100)
Alter (Jahre)			Adjuvante Chemotherapie		
< 65	53	(42,7)	erhalten	71	(57,3)
≥ 65	71	(57,3)	nicht erhalten	32	(25,8)
Geschlecht			unbekannt	21	(16,9)
m	87	(70,2)	Metastasen postoperativ		
w	37	(29,8)	(+)	25	(20,2)
Therapieschema			(-)	99	(79,8)
Standard	80	(64,5)			
modifiziert	44	(35,5)			
Verstorben im Follow-up					
(+)	32	(25,8)			
(-)	92	(74,2)			

Abkürzungen: n = Anzahl; m = männlich; w = weiblich.

Tabelle 5.2: Pathologische Parameter des Patientenkollektivs (n = 124)

Pathologische Merkmale	n	(%)	Fortsetzung Tabelle 5.2	n	(%)
Gesamt	124	(100)	Gesamt	124	(100)
TumorgroÙe (cm)			Dworak		
< 4	92	(74,2)	Grad 1	10	(8,1)
≥ 4	32	(25,8)	Grad 2	75	(60,5)
ypT-Klassifikation			Grad 3	18	(14,5)
ypT0	22	(17,7)	Grad 4	21	(16,9)
ypT1	9	(7,3)	Veneninvasion		
ypT2	32	(25,8)	V0	106	(85,5)
ypT3	51	(41,1)	V1	18	(14,5)
ypT4a	5	(4,0)	Lymphgefäßinvasion		
ypT4b	5	(4,0)	L0	113	(91,1)
ypN-Klassifikation			L1	11	(8,9)
ypN0	73	(58,9)	Muzin im Resektat		
ypN1a	15	(12,1)	(-)	87	(70,2)
ypN1b	13	(10,5)	(+)	37	(29,8)
ypN1c	9	(7,3)	Kalk im Resektat		
ypN2a	11	(8,9)	(-)	73	(58,9)
ypN2b	3	(2,4)	(+)	51	(41,1)
cM-Klassifikation			Regressive Lymphknoten		
cM0	111	(89,5)	(-)	110	(88,7)
cM1	13	(10,5)	(+)	14	(11,3)
Grading			Immunreaktion im Resektat		
GX	21	(16,9)	(-)	12	(9,7)
G1	3	(2,4)	(+)	112	(90,3)
G2	70	(56,5)			
G3	25	(20,2)			
G4	5	(4,0)			

Abkürzungen: n = Anzahl.

3.2 Vollständige Remission

Wie bereits erklärt, bedeutet vollständige Remission beziehungsweise pCR, dass nach neoadjuvanter Therapie keine vitalen Tumorzellen mehr im Gewebe nachweisbar sind. Diese Erscheinung kann dem Regressionsgrad 4 nach Dworak gleichgesetzt werden. In dem untersuchten Kollektiv gab es n = 21 solcher Fälle, was insgesamt 16,9% des gesamten Patientenkollektivs betrug. Davon waren 14 männliche und 7 weibliche Patienten. Bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs (n = 87, 100%), waren es 16,1% der Männer, die nach der neoadjuvanten Radiochemotherapie tumorfrei wurden. Unter allen weiblichen Patienten (n = 37, 100%) erzielten 18,9% der Frauen die Tumorfreiheit. Der Altersdurchschnitt für Patienten mit vollständiger Remission betrug 67,1 Jahre (siehe Tabelle 7.1).

3.3 Überblick zur Auswertung des Tumor Budding

Wie in dem Methodenteil bereits erklärt, ist Budding definiert im Vorhandensein von einzelnen Tumorzellen oder Tumorzellclustern. Da Budding demzufolge nur ausgewertet werden kann, wenn Tumorzellen vorhanden sind, wurden alle Fälle mit vollständiger Remission ($n = 21$) bei den statistischen Analysen ausgeschlossen, da ihre Auswertung nichts über das Budding aussagen kann. Insgesamt standen damit 103 H&E-Fälle und 99 AE1/AE3-Fälle zur Auswertung zur Verfügung. Die einzelnen Methoden, mit denen das Budding in dieser Arbeit ausgewertet wurde, und die dazugehörigen Häufigkeiten werden in der Tabelle 6 untereinander aufgelistet. Nach der Methode von Hase im H&E gab es 63 Fälle (61,2%) ohne Budding und 40 Fälle (38,8%) mit Budding, nach Ueno zeigte sich eine ähnliche Anzahl der Fälle und zwar 65 (63,1%) mit und 38 (36,9%) ohne Budding. In der Keratinfärbung zeigten sich für beide Methoden die gleichen Häufigkeiten, nämlich 44 Fälle (44,4%) ohne Budding versus 55 Fälle (55,6%) mit Budding. Die Auswertung des Budding nach der Keratinfärbung ergab somit 15 beziehungsweise 17 budding-positive Fälle mehr.

Tabelle 6: Methoden der Auswertung und Häufigkeiten des Tumor Budding. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: H&E: $n = 103$, AE1/AE3: $n = 99$

	H&E		AE1/AE3	
	n	(%)	n	(%)
Gesamt	103	(100)	99	(100)
Hase				
■ BD-1 (kein bis mildes Budding)	63	(61,2)	44	(44,4)
■ BD-2 (moderat bis schweres Budding)	40	(38,8)	55	(55,6)
Ueno				
■ budding-negativ (< 5 Buds)	65	(63,1)	44	(44,4)
■ budding-positiv (≥ 5 Buds)	38	(36,9)	55	(55,6)

Abkürzungen: n = Anzahl.

3.4 Auswertung nach Hase

3.4.1 Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im H&E

Tumor Budding, ausgewertet nach der Methode von Hase im H&E, sowie die vollständige Tumorremission zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zum Alter oder zum Geschlecht (Tabelle 7.1). Budding im Resektat wurde bei 27 beziehungsweise 31,0% der Männer (bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [$n = 87$]) und bei 13 beziehungsweise 35,1% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [$n = 37$]) beobachtet. Kein Budding wurde bei 46 beziehungsweise 52,9% der Männer

(bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [$n = 87$]) und bei 17 beziehungsweise 46,0% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [$n = 37$]) festgestellt. Der Altersdurchschnitt lag bei Patienten mit Budding bei 66 und ohne Budding bei 63 Jahren. Die Angaben zum Alter und Geschlecht können der untenstehenden Tabelle entnommen werden.

Signifikante Korrelationen zeigten sich zwischen Budding und der ypT-, ypN- und der cM-Klassifikation ($p = 0,001$; $p = 0,004$ und $p = 0,030$): Patienten mit Budding hatten eine größere Tumordinfiltrationstiefe, mehr befallene LK und synchrone Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose. Außerdem zeigte sich eine signifikante Korrelation zu den Non-Respondern ($p = 0,001$), also zu Patienten ohne bis wenig Tumorregression. Denn bei fast allen Dworak-Grad-1-Patienten konnte man Tumor Budding beobachten. Umgekehrt hatten Responder eher keine Buds. Weiterhin gab es eine signifikante Korrelation von Budding zur Lymphgefäßinvasion ($p = 0,002$), sodass Patienten mit Buds gleichzeitig mehr befallene Lymphgefäße hatten. Ferner fand sich eine signifikante Korrelation von Budding zur Immunreaktion ($p = 0,033$): Patienten mit einer stärkeren Immunreaktion hatten eher weniger Budding. Abschließend gab es signifikante Korrelationen sowohl zwischen Budding und einem postoperativen Rezidiv als auch dem Tod ($p = 0,017$ und $p = 0,003$). Keine Assoziation mit Budding zeigte sich bei der Tumorgröße ($p = 0,296$), bei der Veneninvasion ($p = 0,285$), bei Muzin und Kalk im Resektat ($p = 0,823$ und $p = 0,157$) und bei regressiven LK ($p = 0,399$). Die vollständigen Daten sind in der Tabelle 7.2 auf der nächsten Seite dargestellt, zur Veranschaulichung wurden die signifikanten P-Werte fett hervorgehoben.

Tabelle 7.1: Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase im H&E

	Gesamt			BD-1			BD-2			Vollständige Remission			
	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	<i>P</i>
Alter	124	64,7	9,8	63	63,0	8,8	40	66,0	11,5	21	67,1	8,4	0,145
	n	(%)		n	(%)		n	(%)		n	(%)		<i>P</i>
Geschlecht													
m	87	(100)		46	(52,9)		27	(31,0)		14	(16,1)		0,805
w	37	(100)		17	(46,0)		13	(35,1)		7	(18,9)		

Abkürzungen: BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding; n = Anzahl; MW = Mittelwert (Jahre); SD = Standardabweichung (Jahre); *P* = *P*-Wert; m = männlich; w = weiblich.

Tabelle 7.2: Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase im H&E. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: n = 103

	Gesamt	BD-1		BD-2		P
	n	n	(%)	n	(%)	
Gesamt	103	63	(61,2)	40	(38,8)	
Tumorgroße (cm)						
< 4	73	47	(64,4)	26	(35,6)	0,296
≥ 4	30	16	(53,3)	14	(46,7)	
ypT-Klassifikation						
ypT0-1	10	9	(90,0)	1	(10,0)	0,001
ypT2	32	26	(81,25)	6	(18,8)	
ypT3	51	25	(49,0)	26	(51,0)	
ypT4	10	3	(30,0)	7	(70,0)	
ypN-Klassifikation						
ypN0	52	40	(76,9)	12	(23,1)	0,004
ypN1	37	17	(45,9)	20	(54,1)	
ypN2	14	6	(42,9)	8	(57,1)	
cM-Klassifikation						
cM0	90	59	(65,6)	31	(34,4)	0,030
cM1	13	4	(30,8)	9	(69,2)	
Dworak						
Grad 1	10	2	(20,0)	8	(80,0)	0,001
Grad 2	75	45	(60,0)	30	(40,0)	
Grad 3	18	16	(88,9)	2	(11,1)	
Veneninvasion						
(-)	85	54	(63,5)	31	(36,5)	0,285
(+)	18	9	(50,0)	9	(50,0)	
Lymphgefäßinvasion						
(-)	92	61	(66,3)	31	(33,7)	0,002
(+)	11	2	(18,2)	9	(81,8)	
Muzin im Resektat						
(-)	76	46	(60,5)	30	(39,5)	0,823
(+)	27	17	(63,0)	10	(37,0)	
Kalk im Resektat						
(-)	58	32	(55,2)	26	(44,8)	0,157
(+)	45	31	(68,9)	14	(31,1)	
Regressive Lymphknoten						
(-)	91	57	(62,6)	34	(37,4)	0,399
(+)	12	6	(50,0)	6	(50,0)	
Immunreaktion im Resektat						
(-)	10	3	(30,0)	7	(70,0)	0,033
(+)	93	60	(64,5)	33	(35,5)	
Rezidiv						
(-)	80	54	(67,5)	26	(32,5)	0,017
(+)	23	9	(39,1)	14	(60,9)	
Tod						
(-)	76	53	(69,7)	23	(30,3)	0,003
(+)	27	10	(37,0)	17	(63,0)	

Abkürzungen: BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding; n = Anzahl; P = P-Wert.

3.4.2 Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im AE1/AE3

Patientenalter und -geschlecht korrelierten auch nach der Zytokeratinfärbung nicht mit dem Tumor Budding. Im Unterschied zur Auswertung im H&E waren Patienten ohne Budding in der AE1/AE3-Färbung im Durchschnitt 62 Jahre alt und damit 4 Jahre jünger als Patienten mit Budding, die im Durchschnitt 66 Jahre alt waren. Budding wurde bei 40 beziehungsweise 47,0% der Männer (bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [n = 85]) und bei 15 beziehungsweise 42,9% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [n = 35]) beobachtet. Kein Budding wurde bei 31 beziehungsweise 36,5% der Männer (bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [n = 85]) und bei 13 beziehungsweise 37,1% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [n = 35]) festgestellt. Insgesamt gab es nach der AE1/AE3-Färbung mehr budding-positive Männer und Frauen im Vergleich zur Auswertung im H&E (Tabelle 8.1). In den mit AE1/AE3 gefärbten Schnitten gab es ebenfalls signifikante Korrelationen zwischen Budding und einem hohen ypT- und ypN-Stadium ($p < 0,001$ und $p < 0,001$). Auch die Non-Response und die Lymphgefäßinvasion zeigten eine Assoziation zu Budding ($p = 0,001$ und $p = 0,012$). Ferner gab es signifikante Zusammenhänge zwischen Budding und postoperativem Rezidiv und dem Tod ($p = 0,001$ und $p = 0,009$). Anders als im H&E-Schnitt gab es in der Keratinfärbung keine Signifikanz bezüglich der distalen Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose ($p = 0,178$) und einer vorhandenen Immunreaktion ($P = 0,101$). Genau wie im H&E-Schnitt zeigte sich keine Assoziation zwischen Budding und der Tumorgröße ($p = 0,122$), der Veneninvasion ($p = 0,404$), Muzin und Kalk im Resektat ($p = 0,959$ und $p = 0,113$) und regressiven LK ($p = 0,063$). Die vollständigen Daten sind in der Tabelle 8.2 auf der nächsten Seite dargestellt.

Tabelle 8.1: Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase in der AE1/AE3-Färbung

	Gesamt			BD-1			BD-2			Vollständige Remission			
	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	P
Alter	120	64,5	9,7	44	62,0	9,6	55	65,6	10,1	21	67,1	8,4	0,081
	n	(%)		n	(%)		n	(%)		n	(%)		P
Geschlecht													
m	85	(100)		31	(36,5)		40	(47,0)		14	(16,5)		0,872
w	35	(100)		13	(37,1)		15	(42,9)		7	(20,0)		

Abkürzungen: BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding; n = Anzahl; MW = Mittelwert (Jahre); SD = Standardabweichung (Jahre); P = P-Wert; m = männlich; w = weiblich.

Tabelle 8.2: Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Hase in der AE1/AE3-Färbung. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: n = 99

	Gesamt		BD-1		BD-2		P
	n		n	(%)	n	(%)	
Gesamt	99		44	(44,4)	55	(55,6)	
Tumgröße (cm)							
< 4	71		35	(49,3)	36	(50,7)	0,122
≥ 4	28		9	(32,1)	19	(67,9)	
ypT-Klassifikation							
ypT0-1	10		10	(100)	0	(0)	< 0,001
ypT2	31		19	(61,3)	12	(38,7)	
ypT3	49		13	(26,5)	36	(73,5)	
ypT4	9		2	(22,2)	7	(77,8)	
ypN-Klassifikation							
ypN0	50		32	(64,0)	18	(36,0)	< 0,001
ypN1	37		9	(24,3)	28	(75,7)	
ypN2	12		3	(25,0)	9	(75,0)	
cM-Klassifikation							
cM0	89		42	(47,2)	47	(52,8)	0,178
cM1	10		2	(20,0)	8	(80,0)	
Dworak							
Grad 1	10		1	(10,0)	9	(90,0)	0,001
Grad 2	71		29	(40,8)	42	(59,2)	
Grad 3	18		14	(77,8)	4	(22,2)	
Veneninvasion							
(-)	82		38	(46,3)	44	(53,7)	0,404
(+)	17		6	(35,3)	11	(64,7)	
Lymphgefäßinvasion							
(-)	88		43	(48,9)	45	(51,1)	0,012
(+)	11		1	(9,1)	10	(90,9)	
Muzin im Resektat							
(-)	74		33	(44,6)	41	(55,4)	0,959
(+)	25		11	(44,0)	14	(56,0)	
Kalk im Resektat							
(-)	56		21	(37,5)	35	(62,5)	0,113
(+)	43		23	(53,5)	20	(46,5)	
Regressive Lymphknoten							
(-)	88		42	(47,7)	46	(52,3)	0,063
(+)	11		2	(18,2)	9	(81,8)	
Immunreaktion im Resektat							
(-)	10		2	(20,0)	8	(80,0)	0,101
(+)	89		42	(47,2)	47	(52,8)	
Rezidiv							
(-)	76		41	(53,9)	35	(46,1)	0,001
(+)	23		3	(13,0)	20	(87,0)	
Tod							
(-)	75		39	(52,0)	36	(48,0)	0,009
(+)	24		5	(20,8)	19	(79,2)	

Abkürzungen: BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding; n = Anzahl; P = P-Wert.

3.4.3 Univariate und multivariate Cox-Regressionsmodelle

Mit den univariaten und multivariaten Cox-Regressionsmodellen kann der Einfluss der erfassten Parameter auf das Überleben ermittelt werden. In der univariaten Regressionsanalyse wird jeder Faktor für sich einzeln betrachtet. Dabei ist es nicht ausgeschlossen, dass mehrere Parameter sich auch gegenseitig beeinflussen können und nicht völlig unabhängig sind. Deshalb wird, um den Einfluss aller im Modell genannten Faktoren zu berücksichtigen, die multivariate Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei zeigt das multivariate Cox-Regressionsmodell nicht nur, ob die Parameter einen unabhängigen Einfluss auf das Überleben haben, sondern auch, wie stark deren Einfluss ist. Wie in dem Methodenteil bei *Kapitel 3.6 Statistische Auswertung* bereits beschrieben, gingen nur Patienten mit Resttumor nach neoadjuvanter Therapie in die Analysen ein. Für die Rechnung der anderen zwei Parameter wurde dieselbe Patientenzahl verwendet, die bei der Auswertung des Budding zur Verfügung stand (H&E: $n = 103$, AE1/AE3: $n = 99$).

Krankheitsfreies Überleben und Budding nach der Methode von Hase

Sowohl in der Auswertung im H&E als auch in der AE1/AE3-Färbung hatte Tumor Budding in den univariaten Analysen einen signifikanten Einfluss auf das DFS (im H&E: HR 3,19; 95%-CI 1,64–6,20; $p = 0,001$ und im AE1/AE3: HR 5,10; 95%-CI 2,20–11,85; $p < 0,001$). Einen weiteren Einfluss auf das DFS hatte in den univariaten Analysen eine höhere ypT-Klassifikation. Aufgrund der unterschiedlichen Patientenzahl für die Auswertung des Budding im H&E beziehungsweise im AE1/AE3 errechneten sich bei $n = 103$ Patienten für ypT3-4 eine HR von 4,20 (95%-CI von 1,83–9,66; $p = 0,001$) und für $n = 99$ Patienten eine HR von 3,80 (95%-CI von 1,64–8,83; $p = 0,002$). Auch der dritte Parameter, die ypN-Klassifikation, hatte in den univariaten Analysen einen signifikanten Einfluss auf das DFS (für $n = 103$ Patienten eine HR von 2,34 im 95%-CI von 1,16–4,68; $p = 0,017$ und für $n = 99$ Patienten eine HR von 2,30 im 95%-CI von 1,11–4,76; $p = 0,025$).

In der multivariaten Analyse blieb Budding sowohl in der Auswertung im H&E als auch in der Auswertung mit der AE1/AE3-Färbung signifikant bezüglich des DFS (im H&E: HR 2,21; 95%-CI 1,03–4,32; $p = 0,042$ und im AE1/AE3: HR 3,63; 95%-CI 1,42–9,30; $p = 0,007$). Ebenfalls signifikant zeigte sich die ypT-Klassifikation mit einer HR von 3,01 im 95%-CI 1,24–7,33; $p = 0,015$, aber nur in derjenigen multivariaten Analyse, in welcher $n = 103$ Patienten eingeschlossen wurden (siehe Tabelle 9.1). In der multivariaten Analyse blieb das in der AE1/AE3-Färbung ausgewertete Budding als einziger Parameter signifikant (siehe Tabelle 9.2). Zusammengefasst heißt das: Patienten, bei denen Budding

nach Hase als moderat bis schwer (BD-2) diagnostiziert wurde, haben ein deutlich erhöhtes Risiko für Tod oder Rezidiv im Vergleich zu Patienten ohne Budding (BD-1).

Table 9.1: Ergebnisse der Cox-Regression für das krankheitsfreie Überleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 103$

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	P	HR	95%-CI	P
Budding H&E (nach Hase)						
BD-1	1,00			1,00		
BD-2	3,19	[1,64; 6,20]	0,001	2,11	[1,03; 4,32]	0,042
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	4,20	[1,83; 9,66]	0,001	3,01	[1,24; 7,33]	0,015
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	2,34	[1,16; 4,68]	0,017	1,32	[0,62; 2,82]	0,466

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; P = P-Wert; BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding.

Table 9.2: Ergebnisse der Cox-Regression für das krankheitsfreie Überleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 99$

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	P	HR	95%-CI	P
Budding AE1/AE3 (nach Hase)						
BD-1	1,00			1,00		
BD-2	5,10	[2,20; 11,85]	< 0,001	3,63	[1,42; 9,30]	0,007
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	3,80	[1,64; 8,83]	0,002	2,28	[0,92; 5,65]	0,074
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	2,30	[1,11; 4,76]	0,025	1,10	[0,50; 2,42]	0,819

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; P = P-Wert; BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding.

Gesamtüberleben und Budding nach der Methode von Hase

In der univariaten Analyse hatte Tumor Budding sowohl in der Auswertung im H&E als auch in der Auswertung im AE1/AE3-Präparat einen signifikanten Einfluss auf das OS (im H&E: HR 3,68; 95%-CI 1,66–8,17; $p = 0,001$ und im AE1/AE3: HR 4,31; 95%-CI 1,59–11,70; $p = 0,004$). Ebenfalls signifikant bezüglich des OS zeigte sich in der univariaten Analyse eine höhere ypT-Klassifikation. Aufgrund der unterschiedlichen Fallzahl fanden sich bei $n = 103$ Patienten für ypT3-4 eine HR von 3,01 (95%-CI von 1,20–7,55; $p = 0,019$) und für $n = 99$ Patienten eine HR von 2,59 (95%-CI von 1,01–6,62; $p = 0,047$). In der univariaten Analyse hatte die ypN-Klassifikation keinen signifikanten Einfluss auf das OS.

In der multivariaten Analyse blieb Budding als einziger Faktor im Modell signifikant, der sowohl bei der Auswertung im H&E als auch im AE1/AE3 unabhängigen Einfluss auf das OS zeigte (im H&E: HR 3,06; 95%-CI 1,26–7,41; $p = 0,013$ und im AE1/AE3: HR 4,08; 95%-CI 1,30–12,78; $p = 0,016$). Die ypT- und ypN-Klassifikation hatten beide in der multivariaten Analyse keinen Einfluss auf das OS. Zusammengefasst: Unabhängig von der Färbung haben die Patienten mit moderat bis schwerem Budding ein deutlich erhöhtes Risiko zu sterben im Vergleich zu Patienten ohne Budding.

Table 10.1: Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 103$

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	<i>P</i>	HR	95%-CI	<i>P</i>
Budding H&E (nach Hase)						
BD-1	1,00			1,00		
BD-2	3,68	[1,66; 8,17]	0,001	3,06	[1,26; 7,41]	0,013
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	3,01	[1,20; 7,55]	0,019	2,17	[0,79; 5,98]	0,135
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	1,64	[0,74; 3,63]	0,220	1,22	[0,50; 2,96]	0,668

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; *P* = *P*-Wert; BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding.

Table 10.2: Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 99$

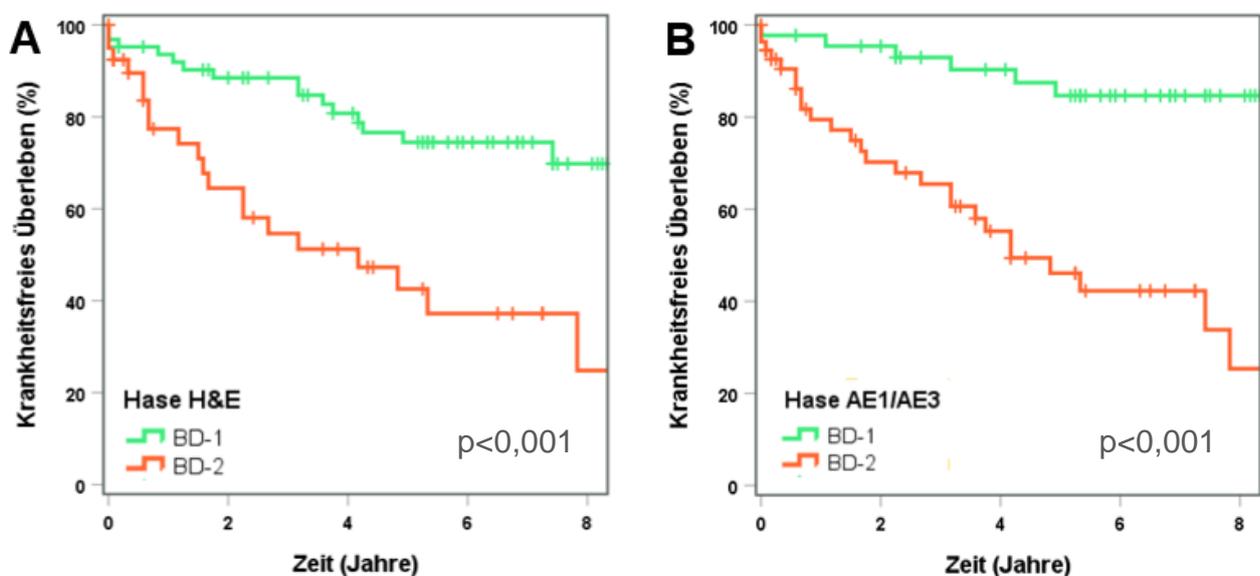
Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	<i>P</i>	HR	95%-CI	<i>P</i>
Budding AE1/AE3 (nach Hase)						
BD-1	1,00			1,00		
BD-2	4,31	[1,59; 11,70]	0,004	4,08	[1,30; 12,78]	0,016
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	2,59	[1,01; 6,62]	0,047	1,63	[0,57; 4,60]	0,361
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	1,57	[0,68; 3,65]	0,290	1,37	[0,54; 3,51]	0,511

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; *P* = *P*-Wert; BD-1 = kein oder mildes Budding; BD-2 = moderat bis schweres Budding.

3.4.4 Kaplan-Meier-Kurven und die Methode nach Hase

In Abbildung 5 sind die Kaplan-Meier-Kurven sowohl für das DFS als auch für das OS dargestellt. Nebeneinander sind die Kurven für die gleichen Überlebenszeitanalysen abgebildet. Auf der linken Seite wurde das Tumor Budding im H&E-Schnitt und auf der rechten Seite im AE1/AE3-gefärbten Schnitt ausgewertet. Es wurden die Überlebenszeiten von Patienten mit Budding mit denen ohne Budding verglichen. Um beurteilen zu können, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen gab, wurde der Logrank-Test angewendet. Das Ergebnis des Tests war für alle vier Überlebenszeitanalysen signifikant und kann der Abbildung 5 entnommen werden. Patienten ohne Budding hatten eine weiter oben liegende Überlebenszeitkurve und damit eine längere Überlebenszeit beziehungsweise eine längere Zeit zum Rezidiv oder Tod.

Die 5-Jahre(5J)-DFS-Rate betrug, ausgewertet im H&E, für Patienten ohne Budding 75,0% und für diejenigen mit Budding 43,0%. Bei der Auswertung im AE1/AE3-Schnitt betrug die 5J-DFS-Rate für Patienten ohne Budding 85,0% und für diejenigen mit Budding 46,0%. Die 5J-OS-Rate betrug, ausgewertet im H&E, für Patienten ohne Budding 86,0% und für diejenigen mit Budding 51,0%. Bei der Auswertung im AE1/AE3-Schnitt betrug die 5J-OS-Rate für Patienten ohne Budding 90,0% und für diejenigen mit Budding 62,0%. Unabhängig von der Färbemethode zeigten Patienten mit Budding (BD-2) ein deutlich geringeres DFS und OS.



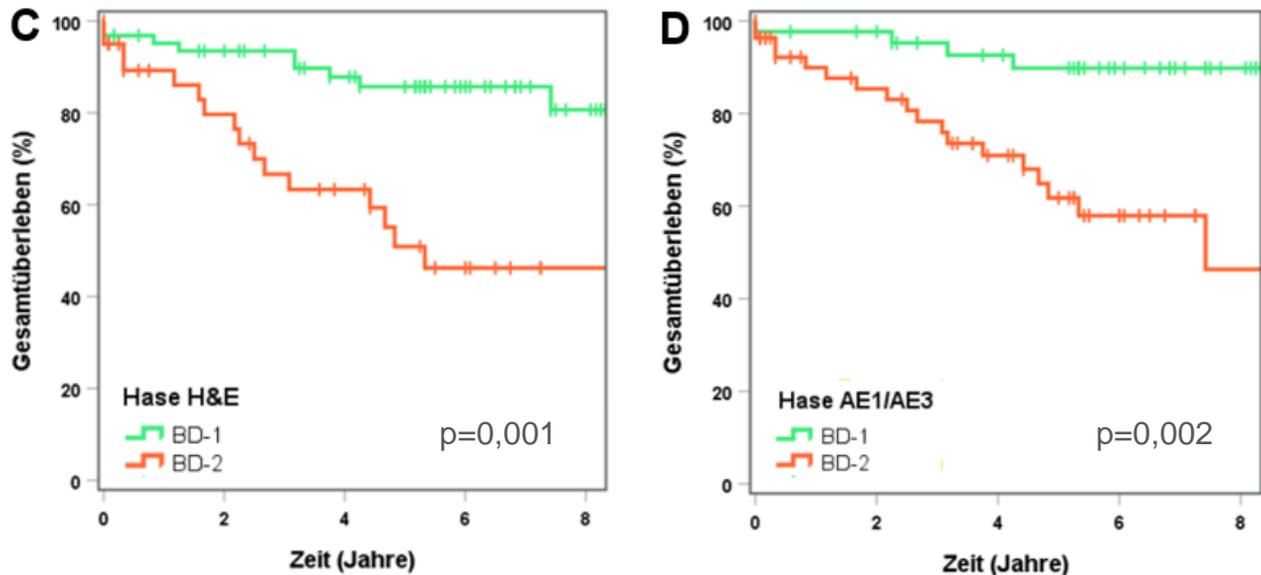


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS). Budding wurde mit der Methode nach Hase ausgewertet. Unabhängig von der Färbemethode zeigten Patienten mit Budding (BD-2) ein deutlich geringeres DFS und OS. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: H&E: n = 103, AE1/AE3: n = 99. Alle Kurven wurden bei acht Jahren abgeschnitten. Zu diesem Zeitpunkt standen noch 13 Patienten in der Analyse des DFS unter Risiko (*patients at risk*) und noch 15 in der Analyse des OS. Kreuze stellen zensierte Fälle dar. (A) DFS und Budding, ausgewertet im H&E (Logrank-Test $p < 0,001$). (B) DFS und Budding, ausgewertet im AE1/AE3 (Logrank-Test $p < 0,001$). (C) OS und Budding, ausgewertet im H&E (Logrank-Test $p = 0,001$). (D) OS und Budding, ausgewertet im AE1/AE3 (Logrank-Test $p = 0,002$).

Erst ab der folgenden Seite werden die Ergebnisse der Auswertung von der Methode von Ueno vorgestellt, um die Übersichtlichkeit der Untersuchungsergebnisse nicht zu schmälern.

3.5 Auswertung nach Ueno

3.5.1 Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im H&E

Tumor Budding, ausgewertet nach der Methode von Ueno im H&E, hatte eine signifikante Korrelation zum Patientenalter gezeigt ($p = 0,033$). Eher etwas ältere Patienten, durchschnittlich 67 Jahre alt, waren budding-positiv im Vergleich zu den budding-negativen Patienten, die im Durchschnitt 63 Jahre alt waren (Tabelle 11.1). Budding im Resektat wurde bei 25 beziehungsweise 28,7% der Männer (bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [$n = 87$]) und bei 13 beziehungsweise 35,1% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [$n = 37$]) beobachtet. Kein Budding wurde bei 48 beziehungsweise 55,2% der Männer (bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [$n = 87$]) und bei 17, beziehungsweise 46,0% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [$n = 37$]) festgestellt. Das Patientengeschlecht hatte keine signifikante Korrelation mit Budding ($p = 0,641$).

Tabelle 11.1: Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno im H&E

	Gesamt			Budding-negativ			Budding-positiv			Vollständige Remission			
	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	P
Alter	124	64,7	9,8	65	62,5	9,2	38	67,1	10,8	21	67,1	8,4	0,033
Geschlecht	n	(%)		n	(%)		n	(%)		n	(%)		P
m	87	(100)		48	(55,2)		25	(28,7)		14	(16,1)		0,641
w	37	(100)		17	(46,0)		13	(35,1)		7	(18,9)		

Abkürzungen: n = Anzahl; MW = Mittelwert (Jahre); SD = Standardabweichung (Jahre); P = P-Wert; m = männlich; w = weiblich.

Bei der Auswertung nach der Methode von Ueno war Tumor Budding assoziiert mit einer höheren ypT- und ypN-Klassifikation ($p = 0,001$ und $p = 0,006$), mit einem niedrigen Tumorregressionsgrad nach Dworak ($p = 0,001$) und mit Veneninvasion ($p = 0,019$). Ebenfalls gab es signifikante Korrelationen sowohl zwischen Budding und einem postoperativen Rezidiv als auch dem Tod ($p = 0,002$ und $p = 0,005$). Keine Assoziation mit Budding zeigte sich bei der Tumorgröße ($p = 0,188$), bei synchronen Metastasen zum Zeitpunkt der OP ($p = 0,066$), bei der Lymphgefäßinvasion ($p = 0,052$), bei Muzin und Kalk im Resektat ($p = 0,655$ und $p = 0,510$), bei regressiven LK ($p = 0,102$) und einer Immunreaktion im Resektat ($p = 0,366$). Diese Daten können in der Tabelle 11.2 auf der nächsten Seite nachgeschlagen werden.

Tabelle 11.2: Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno im H&E. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: n = 103

	Gesamt	Budding-negativ		Budding-positiv		P
	n	n	(%)	n	(%)	
Gesamt	103	65	(63,1)	38	(36,9)	
TumorgroÙe (cm)						
< 4	73	49	(67,1)	24	(32,9)	0,188
≥ 4	30	16	(53,3)	14	(46,7)	
ypT-Klassifikation						
ypT0-1	10	10	(100)	0	(0)	0,001
ypT2	32	26	(81,3)	6	(18,8)	
ypT3	51	25	(49,0)	26	(51,0)	
ypT4	10	4	(40,0)	6	(60,0)	
ypN-Klassifikation						
ypN0	52	40	(76,9)	12	(23,1)	0,006
ypN1	37	20	(54,1)	17	(45,9)	
ypN2	14	5	(35,7)	9	(64,3)	
cM-Klassifikation						
cM0	90	60	(66,7)	30	(33,3)	0,066
cM1	13	5	(38,5)	8	(61,5)	
Dworak						
Grad 1	10	2	(20,0)	8	(80,0)	0,001
Grad 2	75	47	(62,7)	28	(37,3)	
Grad 3	18	16	(88,9)	2	(11,1)	
Veneninvasion						
(-)	85	58	(68,2)	27	(31,8)	0,019
(+)	18	7	(38,9)	11	(61,1)	
Lymphgefäßinvasion						
(-)	92	61	(66,3)	31	(33,7)	0,052
(+)	11	4	(36,4)	7	(63,6)	
Muzin im Resektat						
(-)	76	47	(61,8)	29	(38,2)	0,655
(+)	27	18	(66,7)	9	(33,3)	
Kalk im Resektat						
(-)	58	35	(60,3)	23	(39,7)	0,510
(+)	45	30	(66,7)	15	(33,3)	
Regressive Lymphknoten						
(-)	91	60	(65,9)	31	(34,1)	0,102
(+)	12	5	(41,7)	7	(58,3)	
Immunreaktion im Resektat						
(-)	10	5	(50,0)	5	(50,0)	0,366
(+)	93	60	(64,5)	33	(35,5)	
Rezidiv						
(-)	80	57	(71,3)	23	(28,7)	0,002
(+)	23	8	(34,8)	15	(65,2)	
Tod						
(-)	76	54	(71,1)	22	(28,9)	0,005
(+)	27	11	(40,7)	16	(59,3)	

Abkürzungen: n = Anzahl; P = P-Wert.

3.5.2 Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern im AE1/AE3

Tumor Budding, ausgewertet in der AE1/AE3-Färbung, zeigte keine Korrelation zum Patientenalter oder -geschlecht (Tabelle 12.1). Patienten ohne Budding waren im Durchschnitt 62 Jahre alt, während diejenigen mit Budding durchschnittlich 66 Jahre alt waren. Budding wurde bei 37 beziehungsweise 43,5% der Männer (bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [n = 85]) und bei 18 beziehungsweise 51,4% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [n = 35]) beobachtet. Kein Budding wurde bei 34 beziehungsweise 40,0% der Männer (bezogen auf alle männlichen Patienten des Kollektivs [n = 85]) und bei 10 beziehungsweise 28,6% der Frauen (bezogen auf alle weiblichen Patienten des Kollektivs [n = 35]) festgestellt.

Tabelle 12.1: Budding in Korrelation zu klinischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno in der AE1/AE3-Färbung

	Gesamt			Budding-negativ			Budding-positiv			Vollständige Remission			
	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	P
Alter	120	64,5	9,7	44	61,8	9,6	55	65,7	9,8	21	67,1	8,4	0,061
	n	(%)		n	(%)		n	(%)		n	(%)		P
Geschlecht													
m	85	(100)		34	(40,0)		37	(43,5)		14	(16,5)		0,497
w	35	(100)		10	(28,6)		18	(51,4)		7	(20,0)		

Abkürzungen: n = Anzahl; MW = Mittelwert (Jahre); SD = Standardabweichung (Jahre); P = P-Wert; m = männlich; w = weiblich.

Nach der Auswertung des Budding in der AE1/AE3-Färbung gab es signifikante Korrelationen zwischen Budding und einem höheren ypT- und ypN-Stadium ($p < 0,001$ und $p = 0,021$) und zur Non-Response ($p = 0,001$). Ebenso gab es signifikante Zusammenhänge zwischen Budding und einem postoperativen Rezidiv und dem Tod ($p = 0,001$ und $p = 0,002$). Im Unterschied zum H&E gab es in der AE1/AE3-Auswertung signifikante Korrelationen zwischen Budding und der Tumorgröße ($p = 0,014$) sowie Budding und Kalzifikationen ($p = 0,046$): Ein Tumor ab 4 cm war eher budding-positiv und ein Tumor mit Kalzifikation eher budding-negativ. Ferner zeigte sich im Unterschied zum H&E eine signifikante Korrelation zwischen Budding und einer Lymphgefäßinvasion ($p = 0,002$): Alle Patienten mit einer Lymphgefäßinvasion waren auch budding-positiv. Im Unterschied zum H&E gab es bei Budding nach der AE1/AE3-Färbung keine Korrelation zur Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt ($p = 0,178$), zur Veneninvasion ($p = 0,404$) und zu einer Immunreaktion ($p = 0,101$). Wie im H&E zeigte sich keine Assoziation zwischen Budding und Muzin ($p = 0,679$) und zu regressiven LK ($p = 0,063$) (Tabelle 12.2).

Tabelle 12.2: Budding in Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern, ausgewertet nach der Methode von Ueno in der AE1/AE3-Färbung. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: n = 99

	Gesamt	Budding-negativ		Budding-positiv		P
	n	n	(%)	n	(%)	
Gesamt	99	44	(44,4)	55	(55,6)	
Tumorgroße (cm)						
< 4	71	37	(52,1)	34	(47,9)	0,014
≥ 4	28	7	(25,0)	21	(75,0)	
ypT-Klassifikation						
ypT0-1	10	9	(90,0)	1	(10,0)	< 0,001
ypT2	31	19	(61,3)	12	(38,7)	
ypT3	49	15	(30,6)	34	(69,4)	
ypT4	9	1	(11,1)	8	(88,9)	
ypN-Klassifikation						
ypN0	50	29	(58,0)	21	(42,0)	0,021
ypN1	37	12	(32,4)	25	(67,6)	
ypN2	12	3	(25,0)	9	(75,0)	
cM-Klassifikation						
cM0	89	42	(47,2)	47	(52,8)	0,178
cM1	10	2	(20,0)	8	(80,0)	
Dworak						
Grad 1	10	1	(10,0)	9	(90,0)	0,001
Grad 2	71	29	(40,8)	42	(59,2)	
Grad 3	18	14	(77,8)	4	(22,2)	
Veneninvasion						
(-)	82	38	(46,3)	44	(53,7)	0,404
(+)	17	6	(35,3)	11	(64,7)	
Lymphgefäßinvasion						
(-)	88	44	(50,0)	44	(50,0)	0,002
(+)	11	0	(0,0)	11	(100)	
Muzin im Resektat						
(-)	74	32	(43,2)	42	(56,8)	0,679
(+)	25	12	(48,0)	13	(52,0)	
Kalk im Resektat						
(-)	56	20	(35,7)	36	(64,3)	0,046
(+)	43	24	(55,8)	19	(44,2)	
Regressive Lymphknoten						
(-)	88	42	(47,7)	46	(52,3)	0,063
(+)	11	2	(18,2)	9	(81,8)	
Immunreaktion im Resektat						
(-)	10	2	(20,0)	8	(80,0)	0,101
(+)	89	42	(47,2)	47	(52,8)	
Rezidiv						
(-)	76	41	(53,9)	35	(46,1)	0,001
(+)	23	3	(13,0)	20	(87,0)	
Tod						
(-)	75	40	(53,3)	35	(46,7)	0,002
(+)	24	4	(16,7)	20	(83,3)	

Abkürzungen: n = Anzahl; P = P-Wert.

3.5.3 Univariate und multivariate Cox-Regressionsmodelle

Krankheitsfreies Überleben und Budding nach der Methode von Ueno

Auch nach der Methode von Ueno hatte Tumor Budding in der univariaten Analyse in beiden Fällen, also sowohl in der Auswertung im H&E als auch in der AE1/AE3-Färbung, einen signifikanten Einfluss auf das DFS (im H&E: HR 3,54; 95%-CI 1,82–6,89; $p < 0,001$ und im AE1/AE3: HR 6,23; 95%-CI 2,57–15,31; $p < 0,001$). Die Ergebnisse der Auswertung der ypT- und ypN-Klassifikation blieben unverändert zum *Kapitel 4.4.3 Univariate und multivariate Cox-Regressionsmodelle*. Um Redundanzen zu vermeiden, können die genauen Werte sowohl den Tabellen 13.1 und 13.2 als auch dem genannten Abschnitt entnommen werden.

In der multivariaten Analyse blieb Budding sowohl in der Auswertung im H&E als auch in der Auswertung im AE1/AE3 signifikant bezüglich des DFS (im H&E: HR 2,34; 95%-CI 1,14–4,79; $p = 0,020$ und im AE1/AE3: HR 4,59; 95%-CI 1,79–11,72; $p = 0,001$). Ebenfalls zeigte sich die ypT-Klassifikation mit einer HR von 2,85 im 95%-CI 1,16–7,02; $p = 0,023$ signifikant aber nur in derjenigen multivariaten Analyse, in welche $n = 103$ Patienten eingeschlossen wurden (siehe Tabelle 13.1). Ähnlich wie bei der Methode nach Hase, blieb in der multivariaten Analyse das in der AE1/AE3-Färbung ausgewertete Budding als einziger Parameter signifikant (siehe Tabelle 13.2) und dominierte über die restlichen Faktoren. Zusammenfassend: Tumor-budding-positive-Patienten haben ein deutlich erhöhtes Risiko für Tod oder Rezidiv, verglichen mit budding-negativen Patienten, unabhängig davon, mit welcher Färbemethode ausgewertet wurde.

Tabelle 13.1: Ergebnisse der Cox-Regression für das krankheitsfreie Überleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 103$

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	<i>P</i>	HR	95%-CI	<i>P</i>
Budding H&E (nach Ueno)						
Budding-negativ	1,00			1,00		
Budding-positiv	3,54	[1,82; 6,89]	< 0,001	2,34	[1,14; 4,79]	0,020
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	4,20	[1,83; 9,66]	0,001	2,85	[1,16; 7,02]	0,023
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	2,34	[1,16; 4,68]	0,017	1,34	[0,63; 2,83]	0,449

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; *P* = *P*-Wert.

Table 13.2: Ergebnisse der Cox-Regression für krankheitsfreies Überleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 99$

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	<i>P</i>	HR	95%-CI	<i>P</i>
Budding AE1/AE3 (nach Ueno)						
Budding-negativ	1,00			1,00		
Budding-positiv	6,23	[2,57; 15,31]	< 0,001	4,59	[1,79; 11,72]	0,001
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	3,80	[1,64; 8,83]	0,002	2,16	[0,87; 5,34]	0,095
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	2,30	[1,11; 4,76]	0,025	1,29	[0,60; 2,77]	0,516

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; *P* = *P*-Wert.

Gesamtüberleben und Budding nach der Methode von Ueno

Auch hier hatte Tumor Budding in der univariaten Analyse sowohl in der Auswertung im H&E als auch in der Auswertung im AE1/AE3 einen signifikanten Einfluss auf das OS (im H&E: HR 3,43; 95%-CI 1,57–7,52; $p = 0,002$ und im AE1/AE3: HR 5,76; 95%-CI 1,95–17,01; $p = 0,002$). Ebenfalls einen signifikanten Einfluss hatte in der univariaten Analyse eine höhere ypT-Klassifikation (Tabellen 14.1 und 14.2). Die ypN-Klassifikation hatte keinen signifikanten Einfluss auf das OS. In der multivariaten Analyse blieb Budding als einziger Faktor signifikant, der sowohl bei der Auswertung im H&E als auch in der Auswertung im AE1/AE3 unabhängigen Einfluss aufs OS zeigte (im H&E: HR 2,72; 95%-CI 1,15–6,44; $p = 0,023$ und im AE1/AE3: HR 5,19; 95%-CI 1,62–16,61; $p = 0,006$). Damit hatten budding-positive-Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko zu sterben im Vergleich zu Patienten ohne Budding, unabhängig von der Färbung.

Table 14.1: Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 103$.

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	<i>P</i>	HR	95%-CI	<i>P</i>
Budding H&E (nach Ueno)						
Budding-negativ	1,00			1,00		
Budding-positiv	3,43	[1,57; 7,52]	0,002	2,72	[1,15; 6,44]	0,023
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	3,01	[1,20; 7,55]	0,019	2,17	[0,78; 6,06]	0,140
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	1,64	[0,74; 3,63]	0,220	1,12	[0,46; 2,71]	0,803

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; *P* = *P*-Wert.

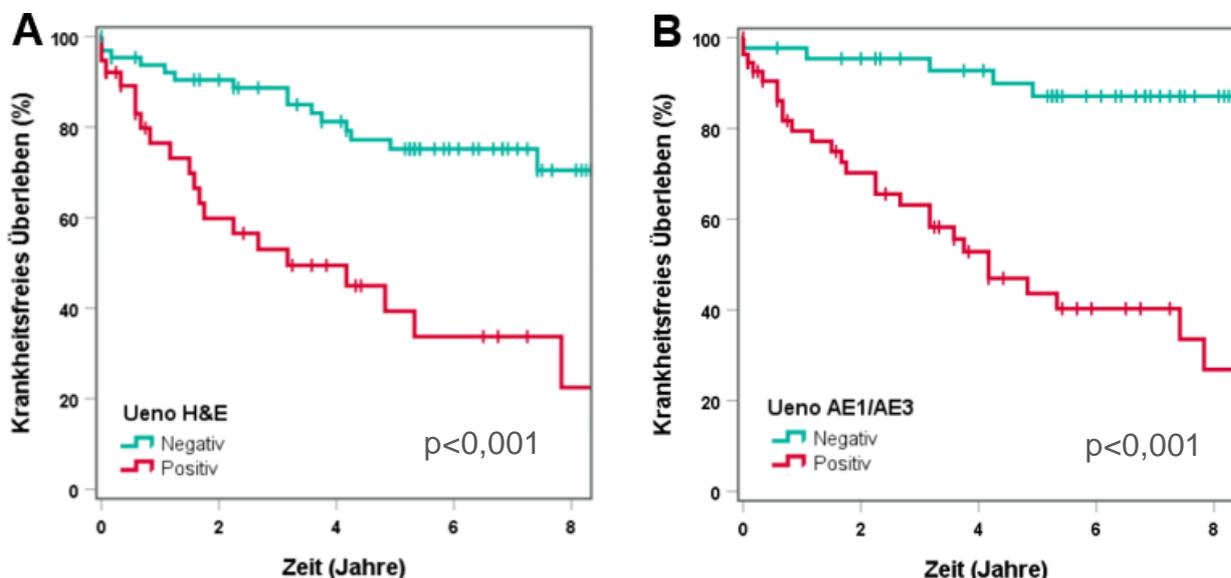
Tabelle 14.2: Ergebnisse der Cox-Regression für das Gesamtüberleben. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: $n = 99$

Parameter	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95%-CI	P	HR	95%-CI	P
Budding AE1/AE3 (nach Ueno)						
Budding-negativ	1,00			1,00		
Budding-positiv	5,76	[1,95; 17,01]	0,002	5,16	[1,62; 16,61]	0,006
ypT-Klassifikation						
ypT0-2	1,00			1,00		
ypT3-4	2,59	[1,01; 6,62]	0,047	1,50	[0,53; 4,26]	0,443
ypN-Klassifikation						
ypN0	1,00			1,00		
ypN+	1,57	[0,68; 3,65]	0,290	1,18	[0,47; 2,92]	0,727

Abkürzungen: HR = Hazard-Ratio; 95%-CI = 95%-Konfidenzintervall für die Hazard-Ratio; P = P-Wert.

3.5.4 Kaplan-Meier-Kurven und die Methode nach Ueno

In Abbildung 6 sind die Kaplan-Meier-Kurven sowohl für das DFS als auch für das OS abgebildet. Ferner kann der P-Wert des Logrank-Tests in den Boxen abgelesen werden. Für alle Gruppenvergleiche ließ sich ein signifikanter P-Wert errechnen. Die 5J-DFS-Rate betrug, ausgewertet im H&E, für Patienten ohne Budding 75,0% und für diejenigen mit Budding 39,0%. Bei der Auswertung im AE1/AE3-Schnitt betrug die 5J-DFS-Rate für Patienten ohne Budding 87,0% und für diejenigen mit Budding 44,0%. Die 5J-OS-Rate betrug, ausgewertet im H&E, für Patienten ohne Budding 84,0% und für diejenigen mit Budding 53,0%. Bei der Auswertung im AE1/AE3 betrug die 5J-OS-Rate für Patienten ohne Budding 92,0% und für diejenigen mit Budding 59,0%. Unabhängig von der Färbemethode zeigten nach der Methode von Ueno budding-positive-Patienten ein deutlich geringeres DFS und OS.



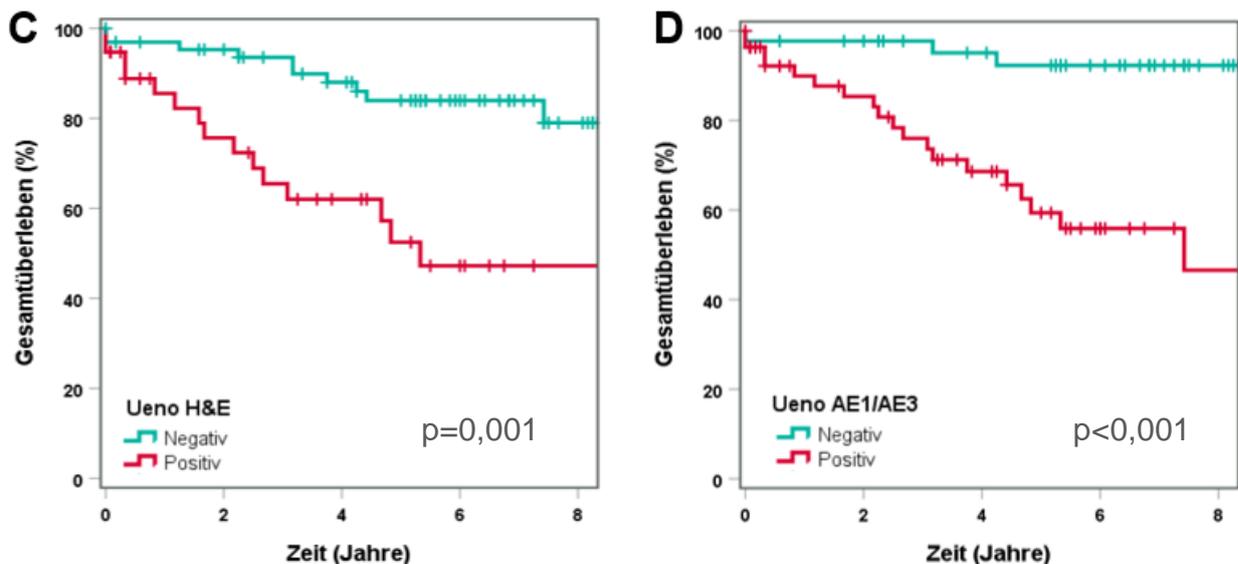


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsfreie Überleben (DFS) und Gesamtüberleben (OS). Budding wurde mit der Methode nach Ueno ausgewertet. Unabhängig von der Färbemethode zeigten budding-positive-Patienten ein deutlich geringeres DFS und OS. Nach Ausschluss der 21 Fälle mit vollständiger Remission: H&E: $n = 103$, AE1/AE3: $n = 99$. Alle Kurven wurden bei acht Jahren abgeschnitten. Zu diesem Zeitpunkt standen noch 13 Patienten in der Analyse des DFS unter Risiko (*patients at risk*) und noch 15 in der Analyse des OS. Kreuze stellen zensierte Fälle dar. **(A)** DFS und Budding, ausgewertet im H&E (Logrank-Test $p < 0,001$). **(B)** DFS und Budding, ausgewertet im AE1/AE3 (Logrank-Test $p < 0,001$). **(C)** OS und Budding, ausgewertet im H&E (Logrank-Test $p = 0,001$). **(D)** OS und Budding, ausgewertet im AE1/AE3 (Logrank-Test $p < 0,001$).

3.6 Vergleich der Methoden

Im Folgenden werden die Methoden nach Hase und nach Ueno sowohl im H&E- als auch in der AE1/AE3-Färbung mit Hilfe des McNemar-Testes und des Kappa-Maßes verglichen. Der McNemar-Test ist in der Lage, einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Auswertungsarten der gleichen Tumorprobe aufzudecken. Ein bei diesem Test signifikanter P-Wert sagt aus, dass es einen Unterschied gibt und dass eine Art der Auswertungen eine Tendenz zu beispielsweise mehr budding-positiven Fällen hat. Um welche Art der Auswertung es sich dabei handelt und um wie viele diskordante Fälle, kann aus einer entsprechenden Vierfeldertafel entnommen werden. Aus unseren Daten errechnete sich ein signifikanter P-Wert für den Vergleich – unabhängig der Methode – einer Auswertung von H&E mit einer Auswertung von AE1/AE3 (siehe Abbildung 7A-D). Aus den jeweiligen Vierfeldertafeln ließ sich ableiten, dass mit Hilfe der AE1/AE3-Färbung mehr budding-positive Fälle entdeckt werden konnten. Wurden die Methoden innerhalb derselben Färbung miteinander verglichen, beispielsweise Hase H&E zu Ueno H&E, lag kein signifikanter P-Wert vor (siehe Abbildung 7E-F). Das bedeutet, es gab keinen signifikanten Unterschied in der Budding-Auswertung innerhalb derselben Färbung. Ferner zeigte

das Kappa-Maß eine (fast) vollkommene Übereinstimmung der Fallzahlen bei der Auswertung des Budding innerhalb derselben Färbung (H&E zu H&E $\kappa = 0,835$; AE1 zu AE1 $\kappa = 0,836$). Mittelgradige Übereinstimmung fand sich bei Hase H&E zu Ueno AE1/AE3 ($\kappa = 0,568$). Eine höhere Übereinstimmung zeigte Hase H&E zu Hase im AE1/AE3 ($\kappa = 0,607$) und Ueno H&E sowohl zu Ueno im AE1/AE3 ($\kappa = 0,609$) als auch zu Hase im AE1/AE3 ($\kappa = 0,609$). Im Allgemeinen ließ sich feststellen, dass die Ergebnisse der beiden Methoden nach Hase und nach Ueno nur geringgradige Veränderungen bezüglich der budding-positiven Fälle innerhalb derselben Färbemethode aufzeigten. Anders verhielt es sich, wenn man H&E und AE1/AE3 miteinander verglichen hat. Nach der Färbung mit dem Zytokeratinmarker AE1/AE3 ließen sich bei beiden Methoden mehr Buds detektieren als nach der Färbung mit H&E.

		Budding Hase AE1/AE3		
		Negativ	Positiv	n
Budding	Negativ	43	19	62
Hase H&E	Positiv	1	36	37
	n	44	55	99

$\kappa = 0,607$
McNemar: $p < 0,001$

		Budding Ueno AE1/AE3		
		Negativ	Positiv	n
Budding	Negativ	42	20	62
Hase H&E	Positiv	2	28	37
	n	44	55	99

$\kappa = 0,568$
McNemar: $< 0,001$

		Budding Ueno AE1/AE3		
		Negativ	Positiv	n
Budding	Negativ	44	20	64
Ueno H&E	Positiv	0	35	35
	n	44	55	99

$\kappa = 0,609$
McNemar: $p < 0,001$

		Budding Hase AE1/AE3		
		Negativ	Positiv	n
Budding	Negativ	44	20	64
Ueno H&E	Positiv	0	35	35
	n	44	55	99

$\kappa = 0,609$
McNemar: $p < 0,001$

		Budding Ueno H&E		
		Negativ	Positiv	n
Budding	Negativ	60	3	63
Hase H&E	Positiv	5	35	40
	n	65	38	103

$\kappa = 0,835$
McNemar: $p = 0,727$

		Budding Ueno AE1/AE3		
		Negativ	Positiv	n
Budding	Negativ	40	4	44
Hase AE1/AE3	Positiv	4	51	55
	n	44	55	99

$\kappa = 0,836$
McNemar: $p = 1$

Abbildung 7: Vergleich der angewandten Methoden in allen möglichen Kombinationen mit Hilfe von Vierfeldertafel, Kappa-Maß (κ) und McNemar-Test. In Rot sind die diskordanten Fälle dargestellt und dienen zur Visualisierung der Unterschiede. Es zeigt sich ein signifikanter P-Wert beim McNemar-Test für die Auswertung des Budding im H&E, verglichen mit der Auswertung in der AE1/AE3-Färbung, unabhängig von der methodischen Auswertung (A-D). Das bedeutet, dass es einen Unterschied innerhalb der Methoden gibt. Anhand der Vierfeldertafeln wird deutlich, dass alle Auswertungen in der AE1/AE3 mehr budding-positive Fälle zeigen. Es zeigt sich kein signifikanter P-Wert für die Auswertung des Budding innerhalb derselben Färbung (E-F). Das zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Budding-Auswertung innerhalb derselben Färbung gibt und beide Methoden als gleichwertig in der Detektion des Budding angesehen werden können.

4 Diskussion

Die TNM-Klassifikation ist bisher die weitverbreitetste Methode, um das Tumorstadium zu beurteilen, um Therapieentscheidungen zu treffen und um eine Prognose bezüglich des Überlebens zu erstellen. Obwohl die Klassifikation über die Jahre aktualisiert wird, gibt es trotzdem Unterschiede innerhalb desselben Stadiums im klinischen Outcome der Patienten [61,62]. Da die Prognose nach der neoadjuvanten Radiochemotherapie innerhalb eines Stadiums unzureichend vorhersagbar ist, müssen neue prognostische Marker die TNM-Klassifikation komplettieren, um die Patienten in unterschiedliche Risikogruppen einzuordnen. Denn vor allem beim Rektumkarzinom ergeben sich in den verschiedenen Stadien der Erkrankung unterschiedliche Strategien bezüglich der Therapie, sei es die endoskopische vs. chirurgische Resektion, neoadjuvante Therapie vs. sofortige OP oder die Frage bezüglich der adjuvanten Therapie. Die verschiedenen Therapien könnten mit Hilfe weiterer prognostischer Marker individueller auf den Patienten zugeschnitten werden. Die vorliegende Arbeit setzt an dieser Stelle an und bewertet das Tumor Budding hinsichtlich seiner prognostischen Aussagekraft als zusätzlichen morphologischen Marker des neoadjuvant therapierten Rektumkarzinoms. Da es bis 2016 keinen Konsens zur Auswertung des Tumor Budding gab, wurde das Tumor Budding hier mit zwei verschiedenen Methoden ausgewertet.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Beide Methoden haben in der H&E-Auswertung ähnlich viele Fälle als budding-positiv bewertet. Die Range der budding-positiven Fälle nach der Auswertung im H&E betrug 36,9-38,8%. Der Anteil der budding-positiven Fälle nach der AE1/AE3-Färbung war für beide Methoden 55,5%. Tumor Budding, ausgewertet in den unterschiedlichen Vorgehensweisen, zeigte verschiedene Assoziationen zu den einzelnen klinisch-pathologischen Merkmalen. Zusammenfassend für alle Methoden lässt sich sagen, dass Budding mit einer tieferen Tumordinfiltration, einem höheren Nodalstatus, einem niedrigeren Regressionsgrad nach Dworak und dem Auftreten eines postoperativen Rezidivs und dem Tod assoziiert war. Es fanden sich keine Assoziationen zwischen Budding und dem Patientengeschlecht, der Tumorgröße und dem intratumoralen Muzin. Abbildung 8 auf der nächsten Seite zeigt eine Zusammenstellung der einzelnen Methoden der Budding-Auswertung und der jeweiligen Korrelation von Budding mit den klinisch-pathologischen Faktoren.

Budding	Alter	Geschlecht	Tu.-Größe	ypT	ypN	cM	Dworak	V
Hase im H&E	n. s.	n. s.	n. s.	s.	s.	s.	s.	n. s.
Hase im AE1	n. s.	n. s.	n. s.	s.	s.	n. s.	s.	n. s.
Ueno im H&E	s.	n. s.	n. s.	s.	s.	p = 0,066	s.	s.
Ueno im AE1	n. s.	n. s.	n. s.	s.	s.	n. s.	s.	n. s.

Budding	L	Muzin	Kalk	Regress. LK	Immun.	Rezidiv	Tod
Hase im H&E	s.	n. s.	n. s.	n. s.	s.	s.	s.
Hase im AE1	s.	n. s.	p = 0,113	p = 0,063	p = 0,101	s.	s.
Ueno im H&E	p = 0,052	n. s.	n. s.	p = 0,102	n. s.	s.	s.
Ueno im AE1	s.	n. s.	s.	p = 0,063	p = 0,101	s.	s.

Abbildung 8: Überblick der Korrelationen von Budding (ausgewertet in den verschiedenen Methoden und Färbungen) zu klinisch-pathologischen Parametern. Grüne Kästchen zeigen signifikante, graue Kästchen zeigen nicht signifikante P-Werte. Die hellblauen Kästchen zeigen P-Werte mit einer starken signifikanten Tendenz, die gelben Kästchen zeigen P-Werte mit einer eher schwachen signifikanten Tendenz. **Abkürzungen:** AE1 = Färbung mit dem Antikörper AE1/AE3; s. = signifikant; n. s. = nicht signifikant; Tu. = Tumor; V = Veneninvasion; L = Lymphgefäßinvasion; Regress. = regressiv; LK = Lymphknoten; Immun. = Immunreaktion; p = P-Wert.

Unabhängig von der untersuchten Methode und Färbung hatten Patienten mit Budding eine signifikant schlechtere Prognose beim DFS und beim OS. In der multivariaten Analyse blieb Budding im AE1/AE3-Präparat sowohl beim DFS als auch beim OS als einziger Faktor signifikant. Damit zeigte Budding bei Patienten mit Rektumkarzinom eine höhere prognostische Signifikanz als die bisher in der Routine verwendeten Parameter wie der ypT- und ypN-Status. Die (von der Untersuchungsmethode abhängige) Spannweite der Hazard-Ratio für Patienten mit Budding, ein Rezidiv zu bekommen oder zu sterben, lag bei 2,11-4,59. Mit anderen Worten, haben diese Patienten ein bis 4,6-fach so großes Risiko zu sterben oder ein Rezidiv zu bekommen als diejenigen ohne Budding. Die Range für die Hazard-Ratio für Patienten mit Budding, kürzer zu leben, lag bei 2,72-5,19. Anders gesagt, haben diese Patienten ein bis 5,2-fach so großes Risiko zu sterben als diejenigen ohne Budding.

Die 5J-Überlebens-Raten unterschieden sich deutlich bei Patienten ohne Budding im Vergleich zu Patienten mit Budding. Ferner zeigten sich Unterschiede, ob das Budding im H&E oder in der Immunhistochemie ausgewertet wurde. Wurde Budding mit Hilfe der AE1/AE3-Färbung detektiert, gab es weniger budding-negative Fälle. Dafür zeigten diese bessere 5J-Überlebens-Raten. Die 5J-DFS-Rate betrug für Patienten ohne Budding, ausgewertet in der AE1/AE3-Färbung, 85-87% (je nach Methode) und für Patienten mit Budding 44-46%. Für die Auswertung im H&E betrug die 5J-DFS-Rate für Patienten ohne Budding 75% und für Patienten mit Budding 39-43%. Die 5J-OS-Rate betrug für Patienten ohne Budding, ausgewertet in der AE1/AE3-Färbung, 90-92% und für Patienten mit Budding 59-62%. Für die Auswertung im H&E betrug die 5J-OS-Rate für Patienten ohne

Budding 84-86% und für Patienten mit Budding 51-53%. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Immunhistochemie sensitiver für das Auffinden der Buds ist. Zum besseren Verständnis heißt das, dass theoretisch alle Fälle mit Buds schneller erkannt werden und ein budding-negativer Fall tatsächlich als budding-negativ betrachtet werden kann. Das erklärt, warum Patienten ohne Budding, ausgewertet in der AE1/AE3-Färbung, eine längere Überlebenszeit haben als die Patienten ohne Budding im H&E. Im Gegensatz dazu ist die Auswertung im H&E spezifischer. Denn werden die Fälle schon in der H&E-Färbung als budding-positiv erkannt, handelt es sich tatsächlich um Fälle mit eindeutigem Budding und nicht um mögliche immunhistochemische Artefakte. Deshalb sind die Überlebenszeiten der Patienten mit im H&E-gesehenem-Budding schlechter, als die der Patienten mit im AE1/AE3-gesehenem-Budding.

Trotz unterschiedlicher Herangehensweise an die Auswertung des Budding haben sich die beiden Methoden, namentlich die nach Hase und nach Ueno, im Vergleich als sehr ähnlich herausgestellt. Vor allem die Auswertung innerhalb derselben Färbung ergab hohe Kappa-Werte (H&E zu H&E: $\kappa = 0,835$; AE1 zu AE1: $\kappa = 0,836$), was auf eine beachtliche Übereinstimmung in der Anzahl der budding-positiven und budding-negativen Fälle in der jeweiligen Methode hindeutete. Auch die Anzahl der diskordanten Fälle war innerhalb des Vergleiches von H&E zu H&E beziehungsweise von AE1 zu AE1 eher gering, was durch den nicht signifikanten McNemar-Test jeweils auch statistisch gezeigt werden konnte. Die Relation der Fallzahlen innerhalb der Auswertungsmethoden blieb also unabhängig von der Färbung im Wesentlichen konstant, gleichzeitig stiegen die absoluten Fallzahlen bei beiden Auswertungsmethoden unter der AE1/AE3-Färbung im Vergleich zur H&E-Färbung an. Folglich gab es im Methodenvergleich von H&E zu AE1 weniger hohe Kappa-Werte und einen signifikanten P-Wert des McNemar-Testes. Ein signifikanter McNemar-Test deutete darauf hin, dass eine Methode im Vergleich zu der anderen unterschiedlich ist, und, wie im vorliegenden Fall, mehr budding-positive Fälle findet. Dies war beim Vergleich von einer Auswertung im H&E zu einer Auswertung im AE1 der Fall.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der beiden Methoden innerhalb derselben Färbemethode nur geringgradige Veränderungen bezüglich der budding-positiven Fälle aufzeigten. Demzufolge eignen sich beide Methoden gleichrangig zur Budding-Auswertung.

Letztendlich, unabhängig der Methode oder Färbung, konnte Budding als negativer prognostischer Marker des neoadjuvant therapierten Rektumkarzinoms identifiziert werden.

4.2 Vergleich zu anderen Arbeiten

Die Anzahl der budding-positiven Fälle in der vorliegenden Arbeit ist vergleichbar mit der Anzahl der budding-positiven Fälle in der Meta-Analyse von *Rogers et al.* zum Thema Budding [63]. In diesem Review wird von einer mittleren Budding-Rate von $36,8 \pm 16,5\%$ berichtet. Allerdings bezieht sich diese Meta-Analyse auf das kolorektale Karzinom ohne neoadjuvante Therapie. Nach der Immunhistochemie zeigten die Auswertungen beider Methoden den gleichen Anteil an budding-positiven Fällen, nämlich 55,5%. Diese Budding-Rate liegt nach dem Review von *van Wyk et al.* innerhalb der publizierten Range von 13-69% für immunhistochemisch ausgewertetes Budding des ebenfalls nicht neoadjuvant vorbehandelten kolorektalen Karzinoms [64].

Bisher gibt es acht Arbeiten, die Tumor Budding beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom untersucht haben (siehe Tabelle 15). Bei all diesen Arbeiten handelt es sich um retrospektive Kohortenstudien. In der jüngsten Studie zum Thema Budding untersuchten *Jäger et al.* das Budding bei 128 Patienten mit fortgeschrittenem Rektumkarzinom [65]. Die Definition des Budding bei *Jäger et al.* ähnelte der vorliegenden Arbeit und die Buds wurden nicht nur an der invasiven Front, sondern auch innerhalb des Tumors untersucht. Die im Vergleich zu unseren Ergebnissen hohe Budding-Rate von 63,2% ließ sich dadurch erklären, dass Buds innerhalb von zehn Feldern ausgezählt wurden und schon ab zwei Buds der Tumor als budding-positiv betrachtet wurde. Im Gegensatz dazu wurde das Budding in unserem Kollektiv innerhalb eines Feldes ausgewertet und ein Fall erst ab fünf Buds als budding-positiv bezeichnet. *Jäger et al.* zeigten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Budding und einer niedrigeren Ansprechrate auf die neoadjuvante Therapie. Dieses Phänomen äußerte sich sowohl in einer geringeren Tumorregression als auch in einem geringeren T-Level-Downstaging [65]. Bei *Jäger et al.* konnte Tumor Budding nicht nur in der univariaten, sondern auch in der multivariaten Analyse als negativer prognostischer Faktor für das Rezidivfreie Überleben identifiziert werden, das bedeutet, Patienten ohne Budding hatten ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben im Vergleich zu denen mit Budding. Allerdings konnte dies nicht für das OS geltend gemacht werden [65]. Dies lag möglicherweise daran, dass in die Überlebenszeitanalyse – anders als in der vorliegenden Arbeit – Patienten mit vollständiger Remission eingeschlossen wurden. Das Einbeziehen von tumorfreien Patienten in die Auswertung schien die prognostische Aussagekraft von Budding abzuschwächen. Unserer Meinung nach ist es zweifelsohne so, dass Budding bei Patienten mit vollständiger Remission nicht ausgewertet

werden kann. Daher haben wir uns in der vorliegenden Arbeit nur auf Patienten mit Resttumor-Last und die Stratifizierung von deren Prognosen konzentriert.

Huebner et al. zeigten als erste im Jahre 2012 an 237 neoadjuvant radiochemo-therapierten Rektumkarzinom-Patienten, dass Tumor Budding ein ungünstiger prognostischer Faktor ist [66]. Budding spielte in der Arbeit von *Huebner et al.* eher eine nebensächliche Rolle. Bei der Definition des Budding wurden Cluster bis fünf Zellen als Buds gezählt, was einen Unterschied zur vorliegenden Arbeit darstellt, da hier Buds als Cluster bis vier Zellen definiert wurden. Ein Fall galt als budding-positiv, wenn in einem Feld bei einer x200-Vergrößerung zehn Buds oder mehr gesichtet wurden, wobei die Fläche des Gesichtsfeldes nicht näher beschrieben wurde. Die Definition der Buds (Cluster bis zu fünf Zellen) und der höhere Budding-Cut-off (dass ein Fall erst ab zehn Buds als budding-positiv bezeichnet wird) ist eine Erklärung für die Diskrepanz der Budding-Häufigkeit. Denn bei *Huebner et al.* waren nur 10% der Patienten budding-positiv im Gegensatz zu unserem Kollektiv, in welchem fast 40% der Patienten Budding zeigten. Budding hatte bei *Huebner et al.* in den univariaten Analysen einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie und das krebspezifische-Überleben [66]; multivariate Analysen mit Budding als Parameter wurden nicht durchgeführt, denn das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Tumorregression. Diese wurde evaluiert nach der leicht modifizierten Methode von *Dworak et al.*, bei welcher der Regressionsanteil des Tumors in Prozenten erfasst wird. *Huebner et al.* zählten zu den Therapie-Respondern nicht nur Regressions-Grad-3-und-4-Patienten (>50% Regression und komplette Regression), sondern auch Grad 2 (≥25–50% Regression). Demzufolge wurde schon bei einer Regression von ≥25% von einer Tumorresponse gesprochen. Die entsprechenden Patienten zeigten eine ähnlich gute Prognose wie solche mit einer vollständigen Remission [66].

Du et al. untersuchten an 96 Patienten die Morphologie und den prognostischen Wert des Tumor Budding nach alleiniger neoadjuvanter Radiotherapie und anschließender Resektion [67]. Die Budding-Rate von 37,5% entsprach ungefähr der unserer Patienten, obwohl eine unterschiedliche Methode angewandt wurde. In drei Feldern wurden Buds mit einem x20er-Objektiv auf einer Fläche von 0,94985 mm² ausgezählt. Danach wurden die Fälle mit einem Cut-off von 0-9 Buds zu low- und ab 10 Buds zu high-budding eingeteilt. Ferner haben *Du et al.* die immunhistochemische Färbung zur H&E-Färbung als zusätzliche Hilfeleistung bei starker therapiebedingter Inflammationsreaktion empfohlen. Tumor Budding erwies sich in den multivariaten Analysen bei *Du et al.* – ähnlich zu un-

seren Ergebnissen – als unabhängiger prognostischer Parameter für das DFS. Eine interessante Hypothese deren Arbeit war, dass Tumor Budding nicht bei starker Tumor-Regression ausgewertet werden könnte [67]. Denn zum Teil handelte es sich bei solchen Tumoren nicht um „echtes“ Budding, sondern um einzelne Zellen ohne soliden Rest-Tumor mit überwiegendem Anteil von Fibrose. Dieses Phänomen könnte als Konsequenz einer guten Tumor-Response auf die Therapie betrachtet werden und habe keinen prognostischen Wert [67]. In unserem Kollektiv fand sich ein solcher Fall, bei welchem der Tumor nur noch aus drei losen Tumorzellen bestand und wir diesen Fall deshalb aus der Auswertung ausgeschlossen haben.

Bei der Publikation von *Bhangu et al.* stand Budding nicht im Vordergrund. Anders zu Vorgängerstudien wurde in dieser Arbeit die Methodik der Auswertung sehr ungenau geschildert. Erstens wurden Buds nur definiert als eine Ansammlung loser einzelner Zellen oder Zellcluster (ohne einen genauen Cut-off zu nennen, bis wann ein Zellcluster noch als Bud zähle), und zweitens wurde keine Methode beschrieben, wie Budding ausgewertet wurde. Ebenfalls, abweichend zu bisherigen Publikationen, wurde bei *Bhangu et al.* Tumor Budding nur in der Immunhistochemie mit β -Catenin erfasst. Dies könnte die ähnlich hohe Budding-Rate von 54,4% im Vergleich zu der immunhistochemisch ausgewerteten Budding-Rate von 55,6% unserer Arbeit erklären. Die Publikation von *Bhangu et al.* konzentrierte sich bei 69 Rektumkarzinompatienten hauptsächlich auf die Rolle der Epithelial-Mesenchymalen-Transition und der damit einhergehenden Non-Response zur neoadjuvanten Therapie [68]. Neben anderen Biomarkern wurde das Budding hier als ein morphologisches Korrelat der Epithelial-Mesenchymalen-Transition betrachtet und war signifikant mit der Non-Response assoziiert. Dadurch, dass Non-Responder ein kürzeres OS und krebsspezifisches Überleben zeigten, wurde indirekt darauf geschlossen, dass auch Budding mit einer schlechteren Prognose assoziiert sei. Separate Überlebenszeitanalysen für Budding wurden nicht durchgeführt. Die Korrelation des Budding mit der Non-Response ist vergleichbar mit den Daten der vorliegenden Arbeit, da in unserem Kollektiv Tumor Budding, unabhängig von der Methode und Färbung, mit einem niedrigen Regressionsgrad und der damit verbundenen Non-Response korrelierte.

Sannier et al. untersuchten mehrere prognostische Faktoren des neoadjuvant therapierten Rektumkarzinoms bei 113 Patienten, erstmalig innerhalb aller Stadien (I-IV) [49]. In der Definition des Budding lag die erste Gemeinsamkeit beider Arbeiten, da Buds, sowohl an der invasiven Front als auch intratumoral, erfasst wurden. Begründet wurde dies, analog zu unseren Beobachtungen, mit der veränderten Morphologie nach neoadjuvanter

Therapie. Obwohl bei *Sannier et al.* schon ab einem Bud pro Tumor der Fall als budding-positiv bezeichnet wurde, war die Rate an budding-positiven Fällen, nämlich 22,1%, im Vergleich zu unseren Daten, nämlich fast 40%, deutlich geringer ausgefallen. *Sannier et al.* konnten in univariaten Analysen zeigen, dass Tumor Budding ein höheres Risiko für Lokalrezidive darstellte und damit ein negativer prognostischer Faktor fürs Überleben war. Überraschenderweise zeigte sich in den multivariaten Analysen nicht Budding, sondern ein befallener zirkumferentieller Resektionsrand und das Vorhandensein von Kalzifikationen als unabhängige prognostische Marker für ein kürzeres DFS. In unseren Analysen fand sich im Hinblick auf die Kalzifikationen jedoch das Gegenteil, nämlich dass diese eher bei Patienten ohne Budding (ausgewertet nach der Methode von Ueno in der AE1/AE3-Färbung) zu finden waren. Das würde wiederum bedeuten, dass intratumorales Kalk positiv für die Prognose ist. In den univariaten Analysen der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch kein signifikanter Einfluss von Kalzifikationen auf das Überleben und es wurde, aufgrund dieser Tatsache, im Ergebnisteil nicht näher darauf eingegangen. Des Weiteren untersuchten *Sannier et al.* das Vorhandensein einer Kolloid-Response nach neoadjuvanter Therapie, was in der vorliegenden Arbeit als Muzin bezeichnet wurde. Verglichen mit unseren Daten konnten auch die Resultate von *Sannier et al.* keine signifikanten Zusammenhänge dazu aufdecken.

Yang et al. fokussierten sich bei 72 Rektumkarzinompatienten im Stadium I-IV neben dem Budding auf Poorly Differentiated Clusters (PDC) [69]. Ähnlich zu *Jäger et al.*, *Sannier et al.* als auch zu dem Vorgehen in der vorliegenden Arbeit, wurden bei *Yang et al.* Buds nicht nur an der invasiven Front, sondern auch intratumoral erfasst. Dabei wurde in einem Feld mit einem x20er-Objektiv die maximale Anzahl an Buds ausgezählt und ab 6 Buds der Tumor als budding-positiv bewertet. Trotz des höheren Cut-offs waren über die Hälfte der Fälle budding-positiv (54%). Obwohl Budding hier nur im H&E erfasst wurde, sind diese Ergebnisse vergleichbar mit der Budding-Rate unserer Fälle in der Immunhistochemie. Ferner behaupteten *Yang et al.*, dass sich Tumor Budding und PDC, sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrer biologischen Wichtigkeit, ähneln würden [69]. PDC wurden definiert als Zellcluster *ab fünf* Zellen entlang der invasiven Front. Wider die Annahme, PDC wären ein Indikator für eine schlechtere Prognose, hatten PDC bei neoadjuvant therapierten Tumoren keinen signifikanten Einfluss aufs Überleben. Letzten Endes konnte dem Tumor Budding kein prognostischer Nutzen zugeschrieben werden, da Budding in der Arbeit von *Yang et al.* weder ein erhöhtes Risiko für Metastasen noch für ein kürzeres OS darstellte. Signifikante Korrelationen zeigten sich jedoch, vergleichbar zu

unseren Daten, zwischen Budding und der Lymphgefäßinvasion und den Metastasen zum Zeitpunkt der OP.

Swets et al. schauten sich bei 221 neoadjuvant radiotherapierten Rektumkarzinomen neben dem Budding weitere histologische Highrisk-Faktoren an [70]. Budding spielte in dieser Arbeit eher eine nebensächliche Rolle. Ähnlich zu unseren Ergebnissen, konnte auch bei *Swets et al.* in multivariaten Analysen der negative prognostische Wert des Budding bezüglich des DFS und des OS aufgedeckt werden. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit lag bei *Swets et al.* eine höhere Budding-Rate von 45% vor, was möglicherweise auf die Definition zurückzuführen ist. Denn die Autoren klassifizierten den Tumor schon ab einem Bud im Gesichtsfeld als budding-positiv. *Swets et al.* wollten herausfinden, ob geeignete prädiktive Marker existieren, mit Hilfe derer Risiko-Patienten mit einer schlechten Prognose eingeteilt werden könnten, damit sie eine adjuvante Chemotherapie bekommen. Seine Kohorte bestand aus Patienten mit Rektumkarzinomen im Stadium II-III, welche in einer multizentrischen, randomisierten, Phase-III-Studie eingeschlossen worden waren. Nach neoadjuvanter Strahlentherapie und Tumoroperation wurden die Patienten in zwei Gruppen randomisiert: eine Gruppe bekam nach der OP eine adjuvante Therapie, in der anderen Gruppe gab es nur eine Nachsorge. Es stellte sich heraus, dass keiner der histologischen Marker, sowohl einzeln als auch kombiniert, die Wirkung einer adjuvanten Chemotherapie voraussagen konnte [70]. Im Vergleich zur alleinigen Nachsorge konnte für die adjuvante Therapie kein zusätzlicher Nutzen für die Prognose gezeigt werden. Selbst in der Subgruppe mit der schlechtesten Prognose, in welche Patienten mit zwei oder mehreren negativen prognostischen Markern eingeordnet wurden, gab es keinen sichtbaren Nutzen der adjuvanten Therapie.

Der soeben beschriebene Literaturvergleich zur Auswertung des Budding nach neoadjuvanter Therapie wird in der Tabelle 15 auf der nächsten Seite veranschaulicht.

Tabelle 15: Zusammenstellung der Literatur zum Thema Budding beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom

Erscheinungsjahr	Huebner et al. [66]	Du et al. [67]	Bhangu et al. [71]	Sannier et al. [49]	Yang et al. [69]	Swets et al. [70]	Jäger et al. [65]	Vorliegende Arbeit
Institut	Mayo Clinic, Rochester, USA	Beijing Cancer Hospital, China	Imperial College, London, UK	Beaujon Hospital, Clichy, France	AMC, Albany, USA	Radboud UMC Nijmegen, Holland	PMU, Salzburg, Österreich	Charité, Berlin, Deutschland
Patientenanzahl	237	96	69	113	72	221	128	124
Zeitraum	1996-2006	2001-2005	2009-2011	2005-2010	2002-2015	2000-2013	2003-2012	2002-2011
Alter (Jahre)	Mittelwert 60	Median 57	17/69 waren ≥ 65	Median 59	Median 57	Median 60	Mittelwert 64	Median 66
Tumorstadium	I, II, III	II, III	I, II, III	I-IV	I-IV	II, III	II, III	I-IV
Beschreibung der neoadjuvanten Therapie	CRT mit 5-FU und Radiatio	RT mit 36Gy über 2 Wochen	CRT mit 5-FU und 54Gy	CRT mit 5-FU und 45-50Gy über 5-6 Wochen	Keine Beschreibung	RT mit 25Gy über 1 Woche	CRT mit 5-FU und 45-50Gy über 5-6 Wochen	CRT mit 5-FU und 50Gy über 5 Wochen
Intervall bis zur OP (Wochen)	6-8	2-3	≤ 6	6-9	-	-	3-9	4-6
Adjuvante Chemotherapie erhalten	233 (98,3%)	96 (100%)	-	Erhalten, wenn ypN+ oder ycM+	-	104 (47,1%)	58 (47,9%)	71 (57,3%)
Definition Buds	Cluster ≤ 5 Zellen	Cluster ≤ 4 Zellen	Cluster, ohne spezielle Anzahl	Cluster ≤ 4 Zellen	Cluster ≤ 4 Zellen	Cluster ≤ 4 Zellen	Cluster ≤ 4 Zellen	Cluster ≤ 4 Zellen
Budding-positiv, wenn:	≥ 10 Buds in einem Feld	≥ 10 Buds in drei Feldern	≥ 1 Bud in einem Feld	≥ 1 Bud in einem Feld	≥ 6 Buds in einem Feld	≥ 1 Bud in einem Feld	≥ 2 Buds in zehn Feldern	Hase: moderat bis schweres Budding Ueno: ≥ 5 Buds in einem Feld
Anteil budding-positiver Fälle	24 (10,1%)	36 (37,5%)	IHC: 31 von 57 (54,4%)	25 (22,1%)	39 (54%)	99 (45%)	81 (63,2%)	H&E: Hase: 40 (38,8%) Ueno: 38 (36,9%) IHC: Beide: 55 (55,6%)
Assoziiert mit	CSS, RFS	DFS	OS, CSS	LR	-	OS, DFS	DR, OR, RFS	OS, DFS
Median Follow-Up	3,5 Jahre	5,9 Jahre	-	2,9 Jahre	1,5 Jahre	5,4 Jahre	7 Jahre	5,1 Jahre
Lokalrezidiv	6 (2,5%)	-	-	5 (4,6%)	8 (11,1%)	-	6 (4,7%)	7 (5,6%)
Fernmetastasen	43 (18,1%)	-	-	30 (27,8%)	12 (16,7%)	-	12 (9,4%)	18 (14,5%)

Abkürzungen: 5-FU = 5-Fluorouracil; AMC = Albany Medical Center; CRT = Chemoradiotherapie; CSS = krebsspezifisches Überleben; DFS = krankheitsfreies Überleben; DR = Fernmetastasierungs; Gy = Gray; IHC = Immunhistochemie; LR = Lokalrezidiv; OR = Gesamtrezidiv (Lokalrezidiv + Fernmetastasierungs); OS = Gesamtüberleben; PMU = Paracelsus Medizinische Privatuniversität; RFS = rezidivfreies Überleben; RT = Radiotherapie; UMC = Universität Medical Center;
 Quelle: In Anlehnung an Jäger et al., 2018 [65].

4.3 Internationale Tumor Budding Konsensus Konferenz

Weil es bisher keine Definition von Budding sowie keine einheitliche Auswertung gab, wurden zahlreiche Studien publiziert, die Budding auf unterschiedliche Arten definiert und ausgewertet haben. Alle Vorarbeiten waren sich darin einig, dass Tumor Budding einen negativen prognostischen Marker für das kolorektale Karzinom darstelle und man sich in Zukunft auf eine vereinheitlichte Definition und Auswertung einigen müsse, um sowohl die Auswertungsergebnisse besser miteinander vergleichen als auch den Faktor in der Routineuntersuchung etablieren zu können [63,64,72-74]. Im Jahre 2016 kamen 25 Forscher auf der Internationalen Tumor Budding Konsensus Konferenz (*International Tumor Budding Consensus Conference* [ITBCC]) in Bern zusammen [75]. Das Ziel war es, einen Konsens über eine standardisierte Art der Budding-Auswertung zu erzielen. In neun Sessions wurde über die bisherigen Erkenntnisse diskutiert, die relevanten Publikationen in einem E-Book gesammelt und erstmals ein Konsens zur Vorgehensweise der Budding-Auswertung erreicht. Diese Empfehlungen bezogen sich alle auf das unbehandelte kolorektale Karzinom und können folgendermaßen ins Deutsche übertragen werden:

1. *Tumor Budding ist definiert als eine einzelne Tumorzelle oder ein Cluster, bestehend aus vier Zellen oder weniger.* Es ist nicht gleichzusetzen mit PDC, da diese aus fünf oder mehr Zellen bestehen [76].
2. *Tumor Budding ist beim pT1-Kolonkarzinom ein unabhängiger Prädiktor von LK-Metastasen.* Deshalb sollte Budding neben den bekannten Prädiktoren für LK-Metastasen (wie der schlechten Differenzierung, der Lymphgefäßinvasion und der Mukosa-Infiltrations-tiefe) im pathologisch-anatomischen Bericht erwähnt werden [36,47,63,77,78]. Denn weitere Faktoren, die mit prognosemindernden LK-Metastasen in Beziehung stehen, könnten helfen, Risiko-Patienten ausfindig zu machen. Diese sollten sich dann nach einer endoskopischen Polypen-Resektion einem zusätzlichen radikal-chirurgischen Eingriff unterziehen.
3. *Tumor Budding ist bei Stadium-II-Patienten ein unabhängiger negativer Prädiktor für das Überleben und sollte neben den etablierten Hochrisikofaktoren (wie beispielsweise der Tumor-Perforation, lymphovaskulären Invasion, serosalen Infiltration, etc.) berichtet werden.* Studien haben gezeigt, dass budding-positive Stadium-II-Patienten teilweise gleiche oder noch schlechtere Prognosen haben als solche im Stadium III [43,79].
4. *Tumor Budding sollte mit anderen klinisch-pathologischen Parametern in einem multidisziplinären Setting einhergehen.* Denn der prognostische Wert des Budding ist – nach

der Meinung der ITBCC-Teilnehmer und basierend auf vorhandenen Evidenzen – äquivalent zur Gefäßinvasion, Grading und perineuraler Invasion [75].

5. *Tumor Budding sollte im H&E-Schnitt ausgewertet werden.* Vorgängerstudien zufolge unterscheidet sich die prognostische Aussagekraft des Budding nicht wesentlich davon, ob es im H&E oder in der Immunhistochemie ausgewertet wurde. Lediglich sei die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Übereinstimmung zwischen den Untersuchern bei der Auswertung des Budding in der IHC besser als im H&E [74,78,80]. Nichtsdestotrotz wurde die Auswertung im H&E empfohlen, da die meisten Daten zum Budding im H&E existieren und die H&E-Färbung günstig und weltweit verfügbar ist. Diese Empfehlung könnte sich in Zukunft ändern, sobald mehr Daten zur IHC vorhanden sind. Dennoch sollte die IHC – nach den Empfehlungen der ITBCC – in schwierigen Fällen, zum Beispiel bei einer starken peritumoralen Entzündungsreaktion, ergänzend zur H&E-Färbung angefordert werden [75].

6. *Neben dem peritumoralen Budding an der invasiven Front existiert beim Kolonkarzinom außerdem intratumorales Budding.* Dieses wurde erstmals in Biopsien entdeckt und ist mit LK-Metastasen assoziiert [42]. In Zukunft könnte intratumorales Budding im präoperativen Management ein erfolgversprechender Biomarker werden. Denn intratumorales Budding in den Biopsien korrelierte nicht nur – wie bislang nur wenige Arbeiten gezeigt haben – mit highgrade-peritumoralem Budding und LK-Metastasen im Resektat, sondern auch mit einem geringeren Tumor-Regressionsgrad [56,81,82]. Aufgrund der schlechten Datenlage sei weitere Forschung notwendig, bevor dieser Marker in der Routinediagnostik eingeführt werden kann [75].

7. *Tumor Budding sollte in einem Hotspot entlang der invasiven Front und auf einer Fläche von 0,785 mm² erfasst werden.* Standardisierung ist für die Einführung eines Biomarkers von entscheidender Rolle. Da, je nach Größe der Sehfeldzahl, die Fläche des Gesichtsfeldes (in dem Budding ausgezählt wird) unterschiedlich groß ist, wurde bei der ITBCC empfohlen, nicht nur das x20er-Objektiv zu verwenden, sondern auch die Sehfeldzahl des Okulars zu beachten. Denn je nach Größe der Fläche würde man deshalb mehr oder weniger Buds auszählen. Sind Sehfeldzahl und Fläche bekannt, gibt es eine Konvertierungstabelle, um die Gesichtsfeldgröße zu standardisieren. In dieser Tabelle sollte der Normierungsfaktor abgelesen werden, um auf eine Fläche von 0,785 mm² zu kommen. Diese Flächenangabe stammt ursprünglich von *Ueno et al.* [36,47] und wurde später von der *Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum* übernommen [83]. Wurde die Anzahl an Buds in einem Gesichtsfeld ausgezählt, wird im nächsten Schritt

diese Bud-Anzahl durch den Normierungsfaktor dividiert. Auf diese Weise sei eine Vergleichbarkeit der Bud-Anzahl gewährleistet, unabhängig vom Mikroskop und der Gesichtsfeldgröße [75].

8. *Für die Auswertung des Tumor Budding ist die ein-Hotspot-Methode empfohlen.* Die Begrenzung der Auswertung nur auf ein einziges Gesichtsfeld mit dem dichtesten Budding ist bisher die am meisten publizierte Art, um Tumor Budding auszuwerten. Das spiegelt nicht nur die maximale Budding-Ausdehnung des Tumors wider, sondern zeigt auch akzeptable Übereinstimmungen unter den Untersuchern [63,64,72-74,78]. Um das Feld mit dem dichtesten Budding zu identifizieren, sollte vorher die invasive Front mit dem 20er-Objektiv an zehn Stellen angeschaut werden [75].

9. *Zwecks Einteilung in Risikogruppen sollte ein dreistufiges System angewendet werden: 0–4 Buds = low budding (BD-1), 5–9 Buds = intermediate budding (BD-2) und 10 oder mehr Buds = high budding (BD-3).* Zusätzlich sollte (beispielsweise daneben in Klammern) die absolute Gesamtanzahl an Buds aus dem ausgesuchten Hotspot angegeben werden, um Informationsverluste zu verhindern, die durch Cut-offs entstehen [75].

10. *Dieses Statement verlangt, dass Tumor Budding in die Leitlinien und Empfehlungsprotokolle zur pathologisch-anatomischen Diagnostik des Kolonkarzinoms aufgenommen werden sollte.* Denn Budding stellt einen bewährten, unabhängigen, prognostischen Marker des Kolonkarzinoms dar, welcher obendrein Potential zur Hilfestellung bei klinischer Entscheidungsfindung hat [75].

11. *Tumor Budding und Grading beschreiben nicht das gleiche Phänomen.* Grading ist definiert als der Anteil des Tumors, der drüsenartige Strukturen ausbildet; Budding – wie schon beschrieben – als eine einzelne Tumorzelle oder ein Cluster, bestehend aus vier Zellen oder weniger, entlang der invasiven Front. In multivariaten Analysen zeigte Budding einen vom Grading unabhängigen Effekt [35,63,64,72-74,78].

Die standardisierte und internationale Methode, die bei der Konferenz ausgearbeitet wurde, sollte zukünftig in der Routinediagnostik als Grundlage der Budding-Auswertung dienen. Dennoch gibt es eine geringe Anzahl an Fällen, bei denen Budding nicht akkurat beschrieben werden konnte. Hierzu gehören beispielsweise muzinöse Adenokarzinome (mit einzelnen im Muzin befindlichen Zellen) oder auch Tumore mit einer schweren peritumoralen Inflammationsreaktion (mit peritumoralen Entzündungszellen, welche Buds verschleiern könnten). In solchen Fällen empfiehlt die ITBCC zu schreiben: „Budding kann nicht beurteilt werden“ [75]. Da es für neoadjuvant therapierte Rektumkarzinome noch zu wenige Studien zum Thema Budding und dessen Prognose gibt, wurde bei der

ITBCC keine Empfehlung zur Auswertung des Budding nach neoadjuvanter Therapie abgegeben und keine Methode vorgeschlagen.

4.4 Worin besteht die Schwierigkeit beim neoadjuvant therapierten Tumor?

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, hat die neoadjuvante Radiochemotherapie relevante Auswirkungen auf die Morphologie des Rektumkarzinoms. Durch die gezielte Bestrahlung des Tumorbettes kommt es zum ausgedehnten makroskopischen und mikroskopischen Gewebsschaden. An ehemaliger Tumorstelle sowie peritumoral kann es zu einer ausgeprägten Fibrosereaktion, begleitet von Nekrosen und Inflammation, kommen [22]. Neben Veränderungen des umliegenden Gewebes sind die Auswirkungen der neoadjuvanten Therapie ebenso im eigentlichen Tumor sichtbar. Ein andersartiges morphologisches Erscheinungsbild mit Destruktion und Defragmentation glandulärer Strukturen kennzeichnet dann das vorbehandelte Adenokarzinom [65]. *Jessberger et al.* konnten zeigen, dass durch die neoadjuvante Therapie sich das Ausbreitungsmuster des Rektumkarzinoms verändert [84]. Im Vergleich zum Zustand vor der neoadjuvanten Therapie war die invasive Front des Tumors nach der Therapie deutlich mehr von *singulären* Zellen geprägt als von soliden glandulären Strukturen [84]. Die Studie von *Jessberger et al.* war die einzige, die das Auftreten von singulären Zellen als einen positiven prognostischen Marker bezüglich des krebsspezifischen Überlebens ansah. Nach *Du et al.* hänge die Morphologie und Bedeutung dieser einzelnen Zellen von der histologischen Response des Tumors ab [67]. Das bedeutet: Ist die Response schwach (Dworak Grad 1 und 2), was gekennzeichnet ist durch nur wenig Fibrose und viel Tumorgewebe, dann können diese einzelnen Zellen nach *Du et al.* als Budding bewertet werden. Ist die Response stark (Dworak Grad 3) und sind in der gesamten Darmwand nur noch wenige verstreute Tumorzellen zu finden, gibt es in diesem Sinne keine richtige Tumorfront mehr und diese Einzelzellen werden als *falsches* Budding bezeichnet [67]. „Falsch“ bedeutet in dem Fall, dass diese Zellen einen Tumorzerfall beschreiben. Dies würde sowohl für eine gute Prognose sprechen als auch bedeuten, dass der Tumor keinen aggressiven Phänotyp darstelle [67]. Bisher gibt es keine Publikationen darüber, welche Rolle *falsches* Budding für die Prognose von Patienten hat, da dieses Phänomen erst seit der Einführung der neoadjuvanten Therapie und ihrer Auswirkungen beobachtet wird. Wie bereits erwähnt, gab es in unserem Kollektiv einen solchen Fall mit nur 3 Tumorzellen ohne soliden Resttumor.

Aufgrund Bedenken, wie man mit diesem Fall verfahren sollte, wurde er aus der Auswertung ausgeschlossen mit der Erklärung, dass zu wenig Material für die Untersuchung des Buddings zur Verfügung stand. Die Rolle der verstreuten Zellen muss an größeren Dworak-Grad-3-Kollektiven untersucht werden, um endlich Gewissheit zu schaffen, ob diese Zellen einen Vorteil oder einen Nachteil für die Prognose der Patienten darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Buds nicht nur an der invasiven Front, sondern auch intratumoral ausgezählt. Dies war größtenteils damit begründet, dass es selten nur eine einzelne invasive Front gab. Innerhalb der Fibrosereaktion bildeten größere Tumordrüsen teilweise mehrere Tumorfronten aus. Dass intratumorales Budding mit peritumoralem Budding korreliert, zeigten *Lugli et al.* und *Rieger et al.* [51,85]. Solange das Gesichtsfeld mit dem dichtesten Budding verwendet wurde, spielt es keine Rolle, an welcher Stelle die Buds ausgezählt werden [51,85]. Die Ausweitung der Budding-Detektion, nämlich Buds auch intratumoral zu erfassen, bildet in der vorliegenden Arbeit die einzige Ausnahme bei der Definition des Budding und dessen Auswertung beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom.

4.5 Budding und die Vorteile der Immunhistochemie

Mit Hilfe der Zytokeratinfärbung konnten mehr budding-positive Fälle detektiert werden als mit Hilfe der H&E-Färbung. Dieses Phänomen wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [37,52,64]. Nach dem Review von *Koelzer et al.* erleichterte die IHC das Auffinden von Buds, sodass durch die IHC zwischen den Untersuchern es zu einer höheren Übereinstimmung von budding-positiven Fällen kam (im Englischen als *interobserver agreement* bezeichnet) [78]. Die Reproduzierbarkeit der Budding-Auswertung nach der IHC und das verbesserte *interobserver agreement* konnten bisher von mehreren Vorgängerarbeiten zum kolorektalen Karzinom ohne neoadjuvante Therapie gezeigt werden [74,80,86]. Mit Hilfe der IHC konnten Buds leichter und schneller innerhalb einer starken Inflammations- oder Stromareaktion detektiert werden und den Untersuchern fiel es leichter, zwischen echten Buds und fragmentierten Tumordrüsen zu unterscheiden [64]. *Kai et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass mit Hilfe der IHC die Variabilität der Budding-Evaluation zwischen erfahrenen und unerfahrenen Untersuchern sank [87]. Die IHC eignet sich demzufolge gut dafür, junge Pathologen, die noch wenig Erfahrung auf dem Gebiet gesammelt haben, einzuarbeiten.

Ein weiterer interessanter Aspekt in Vorgängerarbeiten ist der verwendete Cut-off bei budding-positiven Fällen in der IHC. Dieser variierte in der Literatur zwischen 5 und 25

Buds und wurde von den Untersuchern meist erst retrospektiv errechnet [64]. Unsere Arbeit zeigte, dass derselbe Cut-off wie im H&E (≥ 5 Buds pro Feld) auch in der IHC sowohl gut geeignet war, Patienten in Risikogruppen aufzuteilen, als auch in der Lage war, den T- und N-Status hinsichtlich der Prognosevorhersage zu übertreffen. Nichtsdestotrotz hatte die ITBCC die Auswertung des Budding vorerst nur im H&E empfohlen, mit dem Zusatz, in schwierigen Situationen die IHC zur H&E-Färbung zu ergänzen [75]. Wir erwarten, dass sich diese Vorgaben noch ändern, sobald mehr Daten zu Budding und IHC publiziert werden.

4.6 Klinische Relevanz des Tumor Budding und die aktuelle deutsche S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom

Zusammenfassend wird in der Literatur von drei klinikrelevanten Aspekten, die das Budding betreffen, gesprochen. Bei dem ersten Punkt handelt es sich um die Rolle des Budding bei pT1-Karzinomen. Dieser Punkt fand mittlerweile Einzug in der aktuellen deutschen S3-Leitlinie zum kolorektalen Karzinom von 2019. Im Abschnitt zum Polypenmanagement wird Tumor Budding bei vollständig entfernten pT1-Karzinomen als zusätzlicher *High-risk*-Faktor neben einem niedrigen Differenzierungsgrad und/oder einer Lymphgefäßinvasion eingeführt [3]. Diese histologischen Merkmale beeinflussen maßgeblich den weiteren Therapieplan, da Tumore mit *High-risk*-Faktoren eine radikal chirurgische Nachresektion erhalten sollen im Vergleich zur alleinigen Nachsorge, auch wenn diese tumoröse Läsion vollständig vorher entfernt wurde. Das bedeutet, wurde bei einem Polypen, welcher sich in der histologischen Untersuchung als pT1-Karzinom darstellte, Budding diagnostiziert, sollte der Patient ein strengeres Therapieregime erhalten. Der Empfehlungsgrad, Budding als zusätzlichen *High-risk*-Faktor zu verwenden, wird in der deutschen Leitlinie jedoch abgeschwächt. Es wird damit begründet, dass die meisten Arbeiten zum Thema Budding aus Japan stammen und in Deutschland dieser Faktor momentan noch nicht ausreichend etabliert sei [3].

Der zweite wichtige Aspekt bezieht sich auf die prognostische Rolle des Budding bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen. Dieser Aspekt fand noch keinen Einzug in die deutsche Leitlinie, hat aber in der Literatur einen mindestens genauso hohen Stellenwert wie bei pT1-Tumoren. Aufgrund der hohen prognostischen Aussagekraft könnte sich Budding in Zukunft als Hilfestellung anbieten bezüglich der Frage nach adjuvanter Therapie oder risikoadaptierter Nachsorge.

Zuletzt muss die Rolle des Budding in prätherapeutischen Biopsien untersucht werden. Es besteht ein starker Verdacht, dass Budding sowohl verantwortlich ist für das Nichtansprechen auf die neoadjuvante Therapie, als auch einen prädiktiven Faktor darstellt für LK- und Fernmetastasen [78]. Mit diesem Wissen könnte die weitere Therapie von Patienten, bei welchen Budding in der Biopsie gesichtet wurde, beschleunigt werden. Diesen Risikopatienten könnte dann schnellstmöglich ein radikal-chirurgisches Vorgehen angeboten werden, ohne dass sie Zeit verlieren bei einer, in ihrem Fall, unwirksamen neoadjuvanten Therapie. Die Datenlage hierzu ist im Moment noch sehr dünn, sodass dieser Aspekt des Buddings erst in weiter Ferne für den Patienten eine Rolle spielen wird.

In der Leitlinie wird die Budding-Auswertung nach dem Vorbild der japanischen Autoren empfohlen. In den Hintergrundinformationen wird auf die Methodik näher eingegangen. Dort werden Buds definiert als einzelne Tumorzellen oder Tumorzell-Cluster mit fünf oder weniger Zellen, die an der Invasionsfront in einem Feld mit einer 200-fachen Vergrößerung ausgezählt werden [3]. Danach sollte noch der Budding-Grad bestimmt werden, der folgendermaßen lautet: Grad 1 mit 0-4, Grad 2 mit 5-9 und Grad 3 mit > 9 Buds in einem Feld. Die Budding-Auswertung aus der Leitlinie unterscheidet sich zur festgelegten Definition auf der ITBCC nur durch die Anzahl an Zellen, bis wann ein Cluster noch als ein Bud bezeichnet wird. Wie schon im Kapitel 4.3 beschrieben, wurde auf der ITBCC definiert, dass ein Cluster nur bis zu vier Zellen als ein Bud betrachtet werden soll [75]. Anders als auf der ITBCC beschlossen, wird in der Leitlinie noch nicht auf die exakte Gesichtsfeldgröße eingegangen. Demzufolge kann nicht berücksichtigt werden, dass die betrachtete Vergrößerung und die darin enthaltene Anzahl an Zellen sich von Mikroskop zu Mikroskop unterscheidet. Nichtsdestotrotz ist durch die Einführung des Budding in die deutsche Leitlinie der erste Schritt getan und wird in Deutschland hoffentlich in der Routinediagnostik nach und nach Einzug finden.

4.7 Limitationen

In erster Linie besteht die Limitation dieser Arbeit in der Studienart. Es handelt sich um eine Beobachtungsstudie, im Speziellen um eine retrospektive Kohortenstudie, die, wie alle retrospektiven Studien zwar mögliche Kausalzusammenhänge nahelegen, jedoch nicht endgültig nachweisen können. Auch die Anzahl der eingeschlossenen Patienten und die Stichprobenzusammensetzung können die Auswertung und zuletzt die Interpretation der statistischen Analysen verfälschen. Es handelte sich nur um 124 Patienten, die alle in Berlin operiert wurden und fast alle Einwohner Berlins waren. Aufgrund möglicher

fehlender Daten im Outcome könnte die Anzahl an Events im Follow-up eine weitere Limitation darstellen, vor allem bei der Analyse und Interpretation der multivariaten Cox-Regressions-Modelle. Die vollständigen Informationen der 5-Jahres-Überlebensdaten konnten nur für 92 Patienten (74,2 %) ermittelt werden, für weitere 17 Patienten (13,7%) waren detaillierte Informationen für 2-4 Jahre vorhanden und für 15 Patienten (12,1%) gab es keine Daten seit der OP. Aufgrund dieser unvollständigen Datenlage könnte sich ein Bias in den Überlebenszeitanalysen ergeben haben. Auch der Ausschluss kurzzeit-bestrahlter Patienten (n = 3) aus den gesamten Analysen könnte möglicherweise einen Datenverlust zur Folge haben, da auf diese Art Informationen verloren gehen könnten, die unter Umständen weitere Zusammenhänge aufdecken würden. Ferner könnte die Beschränkung auf den Zytokeratinmarker AE1/AE3 zur Folge haben, dass nicht alle vom Tumor exprimierte Zytokeratine erfasst werden können. Demnach würden sich einige Rektumkarzinome nicht anfärben und folglich nicht auswerten lassen [51]. In unserer Kohorte gab es jedoch keinen solchen Fall. Letztendlich fehlen jegliche prospektive Studien zum Thema Budding, die dessen Potential in der klinischen Entscheidungsfindung endgültig aufzeigen würden.

Die aktuelle Datenlage ist für neoadjuvant therapierte Rektumkarzinome sowohl für die Auswertung als auch für die Prognose des Tumor Budding sehr bescheiden. Im Hinblick dazu liefert diese Arbeit detaillierte Überlebensdaten für 5 Jahre für 92 Patienten und für 2-4 Jahre für 17 Patienten, was insgesamt 87,9% der Kohorte abdeckt. Die Analysen haben ein klares und aussagekräftiges Resultat und sind vereinbar mit Vorgängerstudien.

4.8 Bezug zur Fragestellung

Die aus der Einleitung entstandenen Teilfragestellungen werden im Folgenden kurz beantwortet:

1. *Gibt es Unterschiede beim Alter oder beim Geschlecht im Hinblick auf das Budding?*
Eine signifikante Korrelation von Budding zum Patientenalter gab es nur nach der Methode von Ueno im H&E. Eher etwas ältere Patienten, durchschnittlich 67 Jahre alt, waren budding-positiv im Vergleich zu den budding-negativen Patienten, die im Durchschnitt 63 Jahre alt waren. Zum Geschlecht gab es, unabhängig von der untersuchten Methode und Färbung, keine signifikanten Korrelationen mit Budding.
2. *Liefert das Budding in den Resektaten Hinweise auf ein erhöhtes Rezidivrisiko oder auf einen früheren Tod?*

Unabhängig der angewandten Methode war Budding signifikant assoziiert mit einem Rezidiv und Tod im Follow-up. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse blieb Budding weiterhin signifikant und zeigte negativen Einfluss sowohl auf DFS als auch auf OS. Budding kann somit als ein unabhängiger prognostischer Marker für ein negatives Outcome bei Patienten mit einem neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom betrachtet werden.

3. *Bringt die IHC einen Vorteil bei der Beurteilung von Budding?*

Generell konnten Buds nach der immunhistochemischen Färbung besser und schneller erkannt werden. Demzufolge ist die IHC sensitiver für das Auffinden der Buds. Ein in der IHC budding-negativer Fall kann tatsächlich als budding-negativ betrachtet werden. Das erklärt die bessere Überlebenszeit der Patienten ohne Budding, ausgewertet in der IHC, im Vergleich zu den Patienten ohne Budding, ausgewertet in der H&E. In der multivariaten Regressionsanalyse blieb Budding im AE1/AE3-Präparat sowohl beim DFS als auch beim OS als einziger Faktor signifikant und übertraf damit sogar den ypT- und ypN-Status.

4. *Welche Methode ist zur Auswertung des Budding besser geeignet?*

Trotz unterschiedlicher Herangehensweise an die Auswertung des Budding haben sich die qualitative Methode nach Hase und die quantitative nach Ueno im Vergleich als sehr ähnlich herausgestellt. Sie sind sehr einfach erlernbar und unterscheiden sich kaum in der Auswertung oder in der Prognose; denn die Fallzahl der beiden Methoden innerhalb derselben Färbemethode zeigte nur geringgradige Veränderungen bezüglich der budding-positiven Fälle. So eignen sich beide Methoden gleichrangig zur Budding-Auswertung und können die Patienten in prognostisch relevante Risikogruppen einteilen.

5. *Können weitere Faktoren als prognostische Marker des neoadjuvant therapierten Rektumkarzinoms identifiziert werden?*

Die weiteren Marker, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wie Muzin und Kalk im Resektat, regressive LK sowie das Vorhandensein einer Immunreaktion, lieferten in uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalysen kein erhöhtes Risiko zum Rezidiv oder Tod. Diese nicht signifikanten Daten wurden im Ergebnisteil nicht explizit dargestellt.

4.9 Fazit

Diese Arbeit liefert für das neoadjuvant therapierte Rektumkarzinom zwei Herangehensweisen an das Thema Budding, eine qualitative Methode nach Hase und eine quantitative Methode nach Ueno. Beide Methoden sind einfach anwendbar, erfassen ähnliche Budding-Raten und unterscheiden sich bezüglich der Prognose kaum. Damit sind beide Methoden gut geeignet, um in der Routine-Diagnostik eingeführt zu werden. In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass die IHC, was das Auffinden der Buds betrifft, sensitiver ist. Dadurch, dass die Buds mit Hilfe des Zytokeratins markiert werden, können sie leichter und schneller erkannt werden. Immunhistochemisch-gefärbte Schnitte können somit bei der Einarbeitung unerfahrener Untersucher in das Thema Budding helfen, da mit Hilfe der Färbung ein besseres Verständnis für diese Zellcluster entwickelt wird. Weiterhin übertraf Budding, ausgewertet in der IHC, den ypT- und ypN-Status in multivariaten Überlebensanalysen und zeigte sich als ein unabhängiger Faktor für die Prognose des DSF und des OS. Da die IHC kostenintensiv ist, sollte diese vor allem bei schwierigen Umständen, wie beispielweise bei Tumoren mit einer ausgeprägten peritumoralen Entzündungsreaktion herangezogen werden. Ob die IHC beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom der H&E-Färbung überlegen ist, müsste in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Tumor Budding, unabhängig von der Methode und der Färbung, einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt, dessen Anwendbarkeit sich auch bei Tumoren nach neoadjuvanter Therapie erwiesen hat. Aufgrund großer Unsicherheit in der Erfassung des Buddings findet die Dokumentation dessen in der täglichen Routinediagnostik immer noch zu wenig Beachtung. Während für das unbehandelte Karzinom eine vereinheitlichte Definition und ein Vorschlag für die Dokumentation bei der ITBCC entwickelt wurde, gibt es noch zu wenige Studien und zu wenig Konsens zum Budding beim neoadjuvant therapierten Karzinom. Nichtsdestotrotz sollte die herausragende Rolle des Tumor Budding beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom in weiteren Arbeiten untersucht und dessen prognostischer Wert in prospektiven Studien geklärt werden.

Literaturverzeichnis

1. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, Becker H, Raab HR, Villanueva MT, Witzigmann H, Wittekind C, Beissbarth T, Rödel C. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 2012;30:1926-33.
2. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R, Group GRCS. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731-40.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [Stand: 13.02.2019, 11:54].
4. Fleischhauer K, Drenckhahn D. Dickdarm. In: Drenckhahn D, Zenker W. Benninghoff Anatomie Band 1: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 15. Aufl. München: Urban & Schwarzenberg, 1994. S. 893.
5. Von Flüe M, Harder F. Rektumchirurgie Sphinktererhaltung und Rektumersatz. 1. Aufl. Berlin: Springer; 1997. S. 26.
6. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag; 2012. S. 407.
7. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system. 4. Aufl. Lyon: IARC Press, 2010. S. 134.
8. Robert-Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Aufl. 2019. S. 38-41.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c18_c20_darm.pdf;jsessionid=F5DB52FABDC542A1A491B9416B9BDA50.1_cid363?__blob=publicationFile [Stand: 09.03.2020, 11:45].
9. Wittekind C, Meyer H-J. International Union Against Cancer: TNM Klassifikation maligner Tumore. 7. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2010.
10. Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J. Dependence of 5-fluorouracil-mediated radiosensitization on DNA-directed effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:519-23.
11. Sauer H. [Systemic cytostatic chemotherapy]. *Internist (Berl)* 1998;39:1104-14.
12. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier JC, 22921 ERGT. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006;355:1114-23.
13. Gérard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, Untereiner M, Leduc B, Francois E, Maurel J, Seitz JF, Buecher B, Mackiewicz R, Ducreux M, Bedenne L. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 2006;24:4620-5.
14. Marijnen CA, Nagtegaal ID, Klein Kranenbarg E, Hermans J, van de Velde CJ, Leer JW, van Krieken JH, Investigators PRCatCC. No downstaging after short-term preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19:1976-84.
15. Rödel C, Graeven U, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Arnold D, Hofheinz RD, Ghadimi M, Wolff HA, Lang-Welzenbach M, Raab HR, Wittekind C, Ströbel P, Staib L, Wilhelm M, Grabenbauer GG, Hoffmanns H, Lindemann F, Schlenska-Lange A, Folprecht G, Sauer R, Liersch T, Group GRCS. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy

of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:979-89.

16. Hermanek P. [Multivisceral resection of colorectal cancer--experiences of the Colorectal Cancer Study Group]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1992;95-100.

17. Hohenberger W, Lahmer G, Fietkau R, Croner RS, Merkel S, Göhl J, Sauer R. [Neoadjuvant radiochemotherapy for rectal cancer]. *Chirurg* 2009;80:294-302.

18. Cali RL, Pitsch RM, Thorson AG, Watson P, Tapia P, Blatchford GJ, Christensen MA. Cumulative incidence of metachronous colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36:388-93.

19. Enblad P, Adami HO, Glimelius B, Krusemo U, Pählman L. The risk of subsequent primary malignant diseases after cancers of the colon and rectum. A nationwide cohort study. *Cancer* 1990;65:2091-100.

20. Bülow S, Christensen IJ, Harling H, Kronborg O, Fenger C, Nielsen HJ, Group DTS, Group RCCS. Recurrence and survival after mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 2003;90:974-80.

21. Wichmann MW, Müller C, Hornung HM, Lau-Werner U, Schildberg FW, Group CCS. Results of long-term follow-up after curative resection of Dukes A colorectal cancer. *World J Surg* 2002;26:732-6.

22. Wittekind C, Tannapfel A. [Regression grading of colorectal carcinoma after preoperative radiochemotherapy. An inventory]. *Pathologe* 2003;24:61-5.

23. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:19-23.

24. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73:2680-6.

25. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfing M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8688-96.

26. Mace AG, Pai RK, Stocchi L, Kalady MF. American Joint Committee on Cancer and College of American Pathologists regression grade: a new prognostic factor in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2015;58:32-44.

27. Fokas E, Liersch T, Fietkau R, Hohenberger W, Beissbarth T, Hess C, Becker H, Ghadimi M, Mrak K, Merkel S, Raab HR, Sauer R, Wittekind C, Rödel C. Tumor Regression Grading After Preoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Carcinoma Revisited: Updated Results of the CAO/ARO/AIO-94 Trial. *J Clin Oncol* 2014;32:1554-62.

28. Pucciarelli S, Capirci C, Emanuele U, Toppan P, Friso ML, Pennelli GM, Crepaldi G, Pasetto L, Nitti D, Lise M. Relationship between pathologic T-stage and nodal metastasis after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12:111-6.

29. Kuo LJ, Liu MC, Jian JJ, Horng CF, Cheng TI, Chen CM, Fang WT, Chung YL. Is final TNM staging a predictor for survival in locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiation therapy? *Ann Surg Oncol* 2007;14:2766-72.

30. Kim TH, Chang HJ, Kim DY, Jung KH, Hong YS, Kim SY, Park JW, Oh JH, Lim SB, Choi HS, Jeong SY. Pathologic nodal classification is the most discriminating prognostic factor for disease-free survival in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy and curative resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;77:1158-65.

31. Chan AK, Wong AO, Langevin JM, Jenken DA, Khoo R, Heine JA, Buie WD, Johnson DR. "Sandwich" preoperative and postoperative combined chemotherapy and radiation in tethered and fixed rectal cancer: impact of treatment intensity on local control and survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:629-37.

32. Mohiuddin M, Regine WF, John WJ, Hagihara PF, McGrath PC, Kenady DE, Marks G. Preoperative chemoradiation in fixed distal rectal cancer: dose time factors for pathological complete response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:883-8.
33. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36:627-35.
34. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, O'Donoghue D, Sheahan K. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:134-41.
35. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002;40:127-32.
36. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, Matsukuma S, Kanai T, Kurihara H, Ozawa K, Yoshimura K, Bekku S. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:385-94.
37. Puppa G, Senore C, Sheahan K, Vieth M, Lugli A, Zlobec I, Pecori S, Wang LM, Langner C, Mitomi H, Nakamura T, Watanabe M, Ueno H, Chasle J, Conley SA, Herlin P, Lauwers GY, Risio M. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology* 2012;61:562-75.
38. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg* 2004;240:832-9.
39. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Terracciano L, Puppa G, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol* 2013;44:697-705.
40. Gabbert H. Mechanisms of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer Metastasis Rev* 1985;4:293-309.
41. Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, Kishimoto I, Fukui N, Nakamura T, Watanabe M. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2008;10:41-7.
42. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989;63:539-43.
43. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2003;83:42-7.
44. Suzuki A, Togashi K, Nokubi M, Koinuma K, Miyakura Y, Horie H, Lefor AT, Yasuda Y. Evaluation of venous invasion by Elastica van Gieson stain and tumor budding predicts local and distant metastases in patients with T1 stage colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1601-7.
45. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1432-5.
46. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology* 2005;47:17-24.
47. Ueno H, Hashiguchi Y, Kajiwara Y, Shinto E, Shimazaki H, Kurihara H, Mochizuki H, Hase K. Proposed objective criteria for "grade 3" in early invasive colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 2010;134:312-22.

48. Choi JP, Kim SJ, Park IJ, Hong SM, Lee JL, Yoon YS, Kim CW, Lim SB, Lee JB, Yu CS, Kim JC. Is the pathological regression level of metastatic lymph nodes associated with oncologic outcomes following preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer? *Oncotarget* 2017;8:10375-84.
49. Sannier A, Lefèvre JH, Panis Y, Cazals-Hatem D, Bedossa P, Guedj N. Pathological prognostic factors in locally advanced rectal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: analysis of 113 cases. *Histopathology* 2014;65:623-30.
50. Max N, Harbaum L, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Langner C. Tumour budding with and without admixed inflammation: two different sides of the same coin? *Br J Cancer* 2016;114:368-71.
51. Rieger G, Koelzer VH, Dawson HE, Berger MD, Hadrich M, Inderbitzin D, Lugli A, Zlobec I. Comprehensive assessment of tumour budding by cytokeratin staining in colorectal cancer. *Histopathology* 2017.
52. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, Enomoto Y, Fujii H, Mukogawa T, Nakagawa T, Uchimoto K, Nakamura S, Nonomura A, Nakajima Y. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28:1831-6.
53. Marwedel AL. Zytokeratine (07.04.2009). In: Epithelzellen-Marker, URL: <http://www.antikoerper-online.de/news/2/485/epithelzellen-marker/> [Stand: 18.05.2017, 19:45].
54. Büttner R, Thomas C. Allgemeine Pathologie. 3.Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2003. S. 13.
55. Sannier A, Lefèvre JH, Panis Y, Cazals-Hatem D, Bedossa P, Guedj N. Pathological prognostic factors in locally advanced rectal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: analysis of 113 cases. *Histopathology* 2014.
56. Giger OT, Comtesse SC, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol* 2012;25:1048-53.
57. Key M. Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods, Fourth Edition. 2006 Dako, Carpinteria, California, http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf [Stand: 03.05.2017, 14:30].
58. Zwiener I, Blettner M, Hommel G. Survival analysis: part 15 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:163-9.
59. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.
60. McNEMAR Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika* 1947;12:153-7.
61. Merkel S, Mansmann U, Papadopoulos T, Wittekind C, Hohenberger W, Hermanek P. The prognostic inhomogeneity of colorectal carcinomas Stage III: a proposal for subdivision of Stage III. *Cancer* 2001;92:2754-9.
62. Nagtegaal ID, Gosens MJ, Marijnen CA, Rutten HJ, van de Velde CJ, van Krieken JH. Combinations of tumor and treatment parameters are more discriminative for prognosis than the present TNM system in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:1647-50.
63. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, Sheahan K. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2016;115:831-40.
64. van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, Horgan P, Foulis A, McMillan DC. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2015;41:151-9.

65. Jäger T, Neureiter D, Fallaha M, Schredl P, Kiesslich T, Urbas R, Klieser E, Holzinger J, Sedlmayer F, Emmanuel K, Dinnewitzer A. The potential predictive value of tumor budding for neoadjuvant chemoradiotherapy response in locally advanced rectal cancer. *Strahlenther Onkol* 2018;194:991-1006.
66. Huebner M, Wolff BG, Smyrk TC, Aakre J, Larson DW. Partial pathologic response and nodal status as most significant prognostic factors for advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *World J Surg* 2012;36:675-83.
67. Du C, Xue W, Li J, Cai Y, Gu J. Morphology and prognostic value of tumor budding in rectal cancer after neoadjuvant radiotherapy. *Hum Pathol* 2012;43:1061-7.
68. Bhangu A, Wood G, Mirnezami A, Darzi A, Tekkis P, Goldin R. Epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer: Seminal role in promoting disease progression and resistance to neoadjuvant therapy. *Surg Oncol* 2012;21:316-23.
69. Yang M, Rehman AU, Zuo C, Sheehan CE, Lee EC, Lin J, Zhao Z, Choi E, Lee H. A novel histologic grading scheme based on poorly differentiated clusters is applicable to treated rectal cancer and is associated with established histopathological prognosticators. *Cancer Med* 2016;5:1510-8.
70. Swets M, Kuppen PJK, Blok EJ, Gelderblom H, van de Velde CJH, Nagtegaal ID. Are pathological high-risk features in locally advanced rectal cancer a useful selection tool for adjuvant chemotherapy? *Eur J Cancer* 2018;89:1-8.
71. Bhangu A, Wood G, Brown G, Darzi A, Tekkis P, Goldin R. The role of epithelial mesenchymal transition and resistance to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *Colorectal Dis* 2014;16:O133-43.
72. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012;106:1713-7.
73. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol* 2012;25:1315-25.
74. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch* 2016;468:397-408.
75. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, El Zimaity H, Fléjou JF, Hansen TP, Hartmann A, Kakar S, Langner C, Nagtegaal I, Puppa G, Riddell R, Ristimäki A, Sheahan K, Smyrk T, Sugihara K, Terris B, Ueno H, Vieth M, Zlobec I, Quirke P. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 2017;30:1299-311.
76. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, Maekawa K, Katsurada Y, Nakamura T, Mochizuki H, Yamamoto J, Hase K. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2012;36:193-201.
77. Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Yoshii S, Kudo SE, Tanaka M, Akagi Y, Suto T, Nagata S, Matsuda K, Komori K, Yoshimatsu K, Tomita Y, Yokoyama S, Shinto E, Nakamura T, Sugihara K. Novel risk factors for lymph node metastasis in early invasive colorectal cancer: a multi-institution pathology review. *J Gastroenterol* 2014;49:1314-23.
78. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol* 2016;47:4-19.
79. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2008;51:568-72.
80. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, Hädrich M, Inderbitzin D, Offner F, Puppa G, Seelentag W, Schnüriger B, Tornillo L, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch* 2015;466:485-93.

81. Rogers AC, Gibbons D, Hanly AM, Hyland JM, O'Connell PR, Winter DC, Sheahan K. Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Mod Pathol* 2014;27:156-62.
82. Zlobec I, Hädrich M, Dawson H, Koelzer VH, Borner M, Mallaev M, Schnüriger B, Inderbitzin D, Lugli A. Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients. *Br J Cancer* 2014;110:1008-13.
83. Watanabe T, Muro K, Ajioka Y, Hashiguchi Y, Ito Y, Saito Y, Hamaguchi T, Ishida H, Ishiguro M, Ishihara S, Kanemitsu Y, Kawano H, Kinugasa Y, Kokudo N, Murofushi K, Nakajima T, Oka S, Sakai Y, Tsuji A, Uehara K, Ueno H, Yamazaki K, Yoshida M, Yoshino T, Boku N, Fujimori T, Itabashi M, Koinuma N, Morita T, Nishimura G, Sakata Y, Shimada Y, Takahashi K, Tanaka S, Tsuruta O, Yamaguchi T, Yamaguchi N, Tanaka T, Kotake K, Sugihara K, Rectum JSfCotCa. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2016 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2017.
84. Jessberger J, Erlenbach-Wünsch K, Posselt R, Haderlein M, Agaimy A, Fietkau R, Hartmann A, Distel L. Combination of growth pattern and tumor regression identifies a high-risk group in neoadjuvant treated rectal cancer patients. *J Dig Dis* 2017;18:283-91.
85. Lugli A, Vlajnic T, Giger O, Karamitopoulou E, Patsouris ES, Peros G, Terracciano LM, Zlobec I. Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2011;42:1833-40.
86. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, Lugli A. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2013;26:295-301.
87. Kai K, Aishima S, Aoki S, Takase Y, Uchihashi K, Masuda M, Nishijima-Matsunobu A, Yamamoto M, Ide K, Nakayama A, Yamasaki M, Toda S. Cytokeratin immunohistochemistry improves interobserver variability between unskilled pathologists in the evaluation of tumor budding in T1 colorectal cancer. *Pathol Int* 2016;66:75-82.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Iryna Trotsyuk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Tumor Budding beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Iryna Trotsyuk hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Trotsyuk I, Sparschuh H, Müller AJ, Neumann K, Kruschewski M, Horst D, Elez Kurtaj S. Tumor budding outperforms ypT and ypN classification in predicting outcome of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. BMC Cancer 19, 1033 (2019).

Beitrag im Einzelnen:

Histologische Auswertung, Immunhistochemische Färbungen, Pflegen der Überlebenszeitanalysen des Patientenkollektivs, statistische Datenauswertung, Fotografie der histologischen Bilder, Autor des gesamten publizierten Textes (Abstract, Einleitung, Methoden, Ergebnisse, Diskussion, Fazit).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Trotskyuk I, Sparschuh H, Müller AJ, Neumann K, Kruschewski M, Horst D, Elezkurtaj S. Tumor budding outperforms ypT and ypN classification in predicting outcome of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC Cancer* **19**, 1033 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6261-5>.

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Sefer Elezkurtaj für die Überlassung des Themas, Unterstützung während der Datenerhebung und die Einarbeitung in die Morphologie des Rektumkarzinoms. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Konrad Neumann aus dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE) danken, dass er immer ein offenes Ohr für meine statistischen Fragen hatte. Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Carsten Denkert für die Mitbenutzung der Laborgeräte und vor allem danke ich Frau Ines Koch für die Einarbeitung im Labor und die Hilfe bei der Herstellung immunhistochemisch-gefärbter Präparate. Zuletzt möchte ich mich noch bei Herrn Dr. Sven Voigt für die sprachliche Korrektur bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Ulyana Bogoslawski und Andreas Bogoslawski sowie meiner kleinen Schwester Elisabeth Bogoslawski, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet und mit lieben Worten während der Dissertation unterstützt haben.