

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wertigkeit des DNA-Index als prognostischer Faktor für das Überleben nach
Resektion kolorektaler Lebermetastasen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rebekka Schlage

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. P. Neumann
 2. Prof. Dr. med. R. Somasundaram
 3. Priv.-Doz. Dr. H.-P. Lemmens

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das kolorectale Karzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Pathogenese.....	2
1.1.4 Histologie und histopathologisches Grading.....	2
1.1.5 Lokalisation.....	3
1.1.6 Klassifizierung	3
1.1.7 Chirurgische Therapie	5
1.1.8 Neoadjuvante/Adjuvante Therapie.....	5
1.2 Kolorectale Lebermetastasen	7
1.2.1 Chirurgische Therapie	7
1.2.2 Neoadjuvante Therapie	9
1.2.3 Adjuvante Therapie	10
1.2.4 Alternative lokalregionäre Verfahren.....	10
1.2.5 Therapiealgorithmus.....	10
1.3 Prognose und Prognosefaktoren.....	12
1.3.1 Prognosefaktoren.....	12
1.3.2 Scoring Systeme.....	16
1.4 DNA-Ploidie.....	18
1.4.1 Der DNA-Gehalt der Zelle.....	18
1.4.2 Kenntnisstand	20
1.5 Fragestellung	22
2 Material und Methode	23
2.1 Patienten und Untersuchungsmaterial	23
2.2 DNA-Bildzytometrie.....	24
2.2.1 Verfahren.....	24
2.2.2 Vorbereitung der Präparate	24
2.2.3 Feulgen-Färbung	26
2.2.4 Messvorgang	27
2.2.5 Interpretation der Histogramme	30
2.3 Statistische Auswertung	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Patientencharakteristik	34
3.2 Korrelation klassischer Prognoseparameter zum Überleben	42
3.2.1 Alter.....	42
3.2.2 Geschlecht	43
3.2.3 T-Stadium.....	44
3.2.4 N-Stadium	45
3.2.5 M-Stadium.....	46

3.2.6 R-Status	47
3.2.7 Anzahl der Tumorknoten	48
3.2.8 Größe der Tumorknoten	49
3.2.9 Fong Score.....	50
3.2.10 Nordlinger-Score.....	51
3.3 Korrelation DNA-Index	52
3.3.1 DNA-Index/T-Stadium.....	52
3.3.2 DNA-Index/N-Stadium	52
3.3.3 DNA-Index/M-Stadium	53
3.3.4 DNA-Index/Anzahl Tumorknoten	53
3.3.5 DNA-Index/Größe der Tumorknoten.....	54
3.3.6 Korrelation des DNA-Index zum Überleben	55
3.4 Multivariate Analyse	57
4 Diskussion	58
5 Zusammenfassung	66
6 Literaturverzeichnis.....	67
7 Danksagung.....	77
Lebenslauf	VI
Erklärung.....	VII

Abkürzungsverzeichnis

5cEE	5 c exceeding events
9cEE	9 c exceeding events
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
APC	Adenomatöse Polyposis coli
ASA	American Society of Anesthesiologists
Bzw.	Beziehungsweise
C	Content
Ca.	Circa
CEA	Carcino-Embrionales Antigen
CT	Computertomographie
D.h.	das heißt
DCC	Deletet in Colon Carcinoma
Dest.	Destillata
EGF	Epidermal growth factor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FDG PET	18-Fluor-Deoxyglukose Positronen-Emissions-Tomographie
HCC	Hepato-Celluläres-Carcinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer
Hrsg	Herausgeber
KI	Konfidenzintervall
LITT	Laserinduzierte Thermotheapie
MSI	Mirkro-Satelitten-Instabilität
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
RFA	Radiofrequenzablation
SIRT	Selective Internal Radiation Therapy
STL	Stammlinie
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
U.a.	Unter anderem
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

WHO World-Health-Organisation

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Histopathologisches Grading des kolorectalen Karzinoms (aus Weitz et al., 2004).....	3
Tab. 2: TNM-Klassifikation des Kolon- und Rectumkarzinoms (UICC, 2002).....	4
Tab. 3: UICC Stadieneinteilung (UICC, 2002).....	4
Tab. 4: 5-Jahres-Überlebensraten nach kolorectaler Lebermetastasenresektion.	12
Tab. 5: ASA-Score	13
Tab. 6: Kategorien von Prognosefaktoren, Definitionen der Gruppen nach Compton (Compton et al. 2000).....	15
Tab. 7: Kategorien von Prognosefaktoren, College of American Pathologists Consensus Statement 1999 (Compton et al., 2000).....	15
Tab. 8: 5-Jahres-Überlebensraten nach Resektion kolorectaler Lebermetastasen nach Fong et al., 1999.....	16
Tab. 9: Anzahl Tumorknoten	39
Tab. 10: DNA-Index nach Häufigkeiten	41
Tab. 11: Korrelation DNA-Index mit T-Stadium.....	52
Tab. 12: Korrelation DNA-Index mit N-Stadium	52
Tab. 13: Korrelation DNA-Index mit M-Stadium	53
Tab. 14: Korrelation DNA-Index mit Anzahl der Tumorknoten	53
Tab. 15: Korrelation DNA-Index mit Tumorknotengröße.....	54
Tab. 16: Multivariate Analyse für das Überleben ausgewählter Prognoseparameter	57
Tab. 17: Omnibus-Test der Modellkoeffizienten.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.: Therapiealgorithmus nach Pawlik (Pawlik 2007).	11
Abb. 2: HE gefärbtes Leberparenchym (typische Leberzellbalken, ohne Pathologie)	25
Abb. 3: Feulgenfärbung (deutlich vergrößerte, pathologisch veränderte Zellkerne).....	27
Abb. 4: DNA-Bildanalyseeinheit	28
Abb. 5: Hypotetraploide Stammlinie bei 3,66c.....	29
Abb. 6: Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt von 6,2c bis 9,7c.	30
Abb. 7: Alter zum Zeitpunkt der Operation	34
Abb. 8: Kumuliertes Überleben bezogen auf alle Studienteilnehmer	35
Abb. 9: Lage des Primärtumors.....	36
Abb. 10: Verteilung des pT-Stadiums Primärtumor	37
Abb. 11: Verteilung des pN-Stadiums Primärtumor	37
Abb. 12: Verteilung des M-Stadiums Primärtumor	38
Abb. 13: R-Status	39
Abb. 14: Nordlinger Score	40
Abb. 15: Fong-Score	41
Abb. 16: Darstellung des Alters bezogen auf das kumulierte Überleben	42
Abb. 17: Darstellung der Geschlechtsverteilung bezogen auf das kumulierte Überleben.....	43
Abb. 18: Darstellung des T-Stadiums bezogen auf das kumulierte Überleben	44
Abb. 19: Darstellung des N-Stadiums bezogen auf das kumulierte Überleben	45
Abb. 20: Darstellung des M-Stadiums bezogen auf das kumulierte Überleben	46
Abb. 21: Darstellung des R-Status bezogen auf das kumulierte Überleben	47
Abb. 22: Darstellung der Tumorknotenanzahl bezogen auf das kumulierte Überleben	48
Abb. 23: Darstellung der Tumorknotengröße in Bezug auf das kumulierte Überleben	49
Abb. 24: Darstellung des Fong-Scores in Bezug zum kumulierten Überleben	50
Abb. 25: Darstellung des Nordlinger-Scores in Bezug zum kumulierten Überleben	51
Abb. 26: Darstellung des DNA-Index in Bezug zum kumulierten Überleben.....	55
Abb. 27: Darstellung des DNA-Index in Bezug zum kumulierten Überleben bei Patienten mit einem Nordlinger-Score von 5-7 Punkten.....	56

1 Einleitung

1.1 Das kolorectale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Kolorectale Karzinome sind in Europa und den USA für schätzungsweise 200.000 Todesfälle im Jahr verantwortlich (Nicum et al., 2003). In Deutschland zählt Darmkrebs nach dem Prostatakarzinom des Mannes und dem Mammakarzinom der Frau zu der zweithäufigsten Krebstodesursache beider Geschlechter. Die Neuerkrankungen liegen bei Männern bei über 37.000 Fällen und bei Frauen bei über 36.000 Fällen im Jahr. Während die Inzidenzrate seit 1980 zunächst zunahm, ist in den letzten zehn Jahren eine Stagnation eingetreten. Dennoch lag Deutschland im internationalen Vergleich der Neuerkrankungen 2002 und 2004 mit Tschechien an der Spitze (RKI, 2008). Im Gegensatz zur Inzidenz ist die Mortalitätsrate in den Industrienationen stetig rückläufig (Jemal et al., 2009). Das Robert Koch Institut gibt für Deutschland eine kumulierte 5-Jahres-Überlebensrate von 60% an (RKI, 2008).

1.1.2 Ätiologie

Als Erkrankungsursache kommen in ca. 5-10% der Fälle genetische Ursachen in Betracht. Insbesondere die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), eine autosomal dominant vererbte Keimbahn-Mutation auf dem APC-Gen (Chromosom 5q21), führt in nahezu 100 % der Fälle zur Entwicklung eines Kolonkarzinoms. Die Prävalenz liegt bei 1:5000 bis 1:10000. Typischerweise kommt es zu einem frühen Auftreten hunderter kolorectaler Adenome mit einer Prädominanz im linken Hemicolon. Hieraus entwickeln sich durchschnittlich um das 40. Lebensjahr kolorectale Karzinome.

Noch etwas häufiger liegt ein Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer Syndrom (HNPCC) vor. Die ebenso autosomal dominant vererbte Erkrankung beruht auf einer Mutation in sogenannten Mismatch-Repair-Genen (überwiegend *mlh1* und *msh1*), die Mikroinstabilitäten des Genoms zur Folge haben. Karzinome entwickeln sich hier in ca. 70-80% der Fälle. Bei alleiniger Manifestation im Kolon oder Rectum wird das HNPCC auch als Lynch-I-Syndrom bezeichnet. Mit dem HNPCC sind weitere Malignome wie Endometriumkarzinome, Dünndarmkarzinome oder hepatobiliäre Karzinome assoziiert. Das HNPCC wird bei Auftreten assoziierter Malignome auch Lynch-II-Syndrom genannt (Weitz et al., 2004).

Weiterhin soll die Gruppe der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen genannt sein. Speziell bei der Colitis ulcerosa gilt ein erhöhtes Karzinomrisiko als gesichert (Lehnert et al., 1999).

Der weitaus größte Teil, über 90% der kolorektalen Karzinome, tritt jedoch sporadisch auf. Man geht von einer multifaktoriellen Genese aus, bei der sowohl dem Lebensstil als auch einer allgemeinen familiären Disposition eine entscheidende Bedeutung zukommt. Übergewicht, ein hoher Konsum von „rotem“ Fleisch, Bewegungsmangel und Nikotin gelten als Risikofaktoren, während Obst, Gemüse und körperliche Aktivität einen protektiven Charakter haben (Becker, 2003).

1.1.3 Pathogenese

Nach dem heutigen Wissenstand führt eine Sequenz genetischer Defekte, an denen sowohl Onkogene (K-ras) als auch Tumorsuppressorgene (APC, p53, Dcc, Mcc) beteiligt sind, über eine Hyperproliferation der Darmmucosa zu adenomatösen Polypen unterschiedlicher Differenzierung, aus denen schließlich ein maligner Tumor entsteht. Diese Karzinomentwicklung wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet (Trümper et al., 2000).

Ein zweiter Mechanismus der Karzinomentstehung beruht auf der bereits erwähnten Mutation von Mismatch-Repair-Genen. Durch die durch Mutation inaktivierte Reparaturgene kommt es zu einer Störung der DNA-Reparaturkaskade mit einer Anhäufung von Replikationsfehlern bzw. Mutationen im Genom. Die resultierende Genominstabilität ist im Falle von HNPCC-Tumoren als Mikrosatelliteninstabilität nachweisbar (Weitz et al., 2004).

1.1.4 Histologie und histopathologisches Grading

Die histologische Einteilung des kolorektalen Karzinoms erfolgt nach Empfehlungen der WHO in Adenokarzinome (ca. 85-90%), muzinöse Adenokarzinome (10%), Siegelringzellkarzinome (1%), Plattenepithelzellkarzinome, adenosquamöse Karzinome (Mischtyp aus Adeno- und Plattenepithelkarzinom), kleinzellige Karzinome (neuroendokrine Differenzierung) und undifferenzierte Karzinome. Lymphome, Leiomyosarkome oder Kaposi-Sarkome bei AIDS spielen eine eher untergeordnete Rolle (Weitz et al., 2004, Renz-Polster, 2001). Der Differenzierungsgrad kolorektaler Karzinome kann in vier Grade eingeteilt werden und ist nachfolgend dargestellt (Tab. 1).

Grad	Beschreibung
I	Gute Differenzierung: Ein Karzinom mit histologischen und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel sehr ähnlich sind.
II	Mäßige Differenzierung: Ein Karzinom das im Differenzierungsmuster zwischen GI und GIII einzuordnen ist.
III	Schlechte Differenzierung: Ein Karzinom mit histologisch und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel kaum ähneln. (Mindestens eine Drüsenformation oder Schleimproduktion muss erkennbar sein).
IV	Undifferenziert: Es lassen sich keine glandulären oder plattenepithelische Differenzierungsmuster erkennen. (Beim kolorektalen Karzinom nur für undifferenzierte und kleinzellige Karzinome anwendbar).

Tab. 1: Histopathologisches Grading des kolorektalen Karzinoms (aus Weitz et al., 2004)

Die histologische Einteilung in verschiedene Differenzierungsgrade ist weltweit uneinheitlich und erschwert die Vergleichbarkeit in Studien. Einige Autoren empfehlen deshalb die Differenzierung in „Low-Grade“ und High-Grade“ Tumoren (Compton et al., 2000, Scheele et al., 2001).

1.1.5 Lokalisation

Ungefähr 60% der kolorektalen Karzinome sind im Rectum lokalisiert. Im deutschsprachigen Raum definieren sich Rectumkarzinome als Tumoren, die sich gemessen mit einem starren Rektoskop bis 16 cm von der Anokutanlinie liegend befinden. Im Sigma finden sich ca. 20% gefolgt von schätzungsweise 10% im Coecum und Colon ascendens sowie 10% im restlichen Colon (Renz-Polster, 2001).

1.1.6 Klassifizierung

Eine Klassifizierung kolorektaler Tumoren erfolgt nach dem TNM-System der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC). Anhand der Klassifikation können 5 UICC Stadien abgegrenzt werden (UICC, 2002). Eine Übersicht zeigen folgende Tabellen (Tab. 2 und 3).

T	Primärtumor
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria (ohne feststellbare Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa)
T1	Tumor infiltriert die Submucosa
T2	Tumor infiltriert die 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 und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
N	Regionäre Lymphknoten
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 2: TNM-Klassifikation des Kolon- und Rectumkarzinoms (UICC, 2002)

UICC Stadium	
0	Tis N0 M0
I	T1, T2 N0 M0
IIA	T3 N0 M0
IIB	T4 N0 M0
IIIA	T1, T2 N1 M0
IIIB	T3, T4 N1 M0
IIIC	Jedes T4 N2 M0
IV	Jedes T jedes N M1

Tab. 3: UICC Stadieneinteilung (UICC, 2002)

1.1.7 Chirurgische Therapie

Das primäre Ziel in der Behandlung kolorectaler Karzinome ist die chirurgische Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes, um auch bei fortgeschrittenem Tumorleiden lokale Komplikationen zu vermeiden. Bei kurativer Intention wird bei Kolonkarzinomen eine radikale Resektion mit En-bloc-Lymphknotendissektion angestrebt. Das Resektionsausmaß orientiert sich an dem Versorgungsgebiet der durchtrennten Gefäße, da die lymphogene Metastasierung entlang dem jeweiligen das Darmsegment versorgenden Gefäßes verläuft. Ein Sicherheitsabstand von 10 cm beidseits des makroskopisch detektierbaren Tumorrandes sollte eingehalten werden. Rectumkarzinome erfordern aufgrund der Lymphabflussverhältnisse neben der Resektion des Primärtumors eine partielle oder totale Resektion des Mesorectums. Bei Tumoren des oberen Rectumdrittels wird ein Sicherheitresektionssabstand von 5 cm distal des makroskopischen Tumors empfohlen. Bei gut differenzierten Tumoren des unteren Rectumdrittels kann in Anbetracht der Kontinenzhaltung ein Abstand von 2 cm toleriert werden (Schmiegel et al., 2008).

1.1.8 Neoadjuvante/Adjuvante Therapie

Um das Gesamtüberleben zu verbessern und die Tumorprogression aufzuhalten, gilt die Wirksamkeit einer adjuvanten chemotherapeutischen Behandlung bei kolorectalen Karzinomen als gesichert (Nicum et al., 2003). Aufgrund der aktuellen Studienlage empfehlen die S3-Leitlinien „kolorectales Karzinom“ eine adjuvante Chemotherapie ab dem UICC Stadium III. Bei Patienten im Stadium II mit kurativ reseziertem Kolokarzinom „kann“ eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, obwohl mehrere Studien keinen signifikanten Überlebensvorteil durch eine adjuvante postoperative Chemotherapie gezeigt haben (Schrug et al., 2002). Im Falle von T4 Tumoren oder Tumorperforation erscheint eine adjuvante Chemotherapie jedoch sinnvoll.

Im Gegensatz zu Kolokarzinomen besteht bei lokal fortgeschrittenen Rectumkarzinomen (UICC II-III) die Indikation zur neoadjuvanten Radio-/Chemotherapie (Schmiegel et al., 2008). Neben einer geringeren Lokalrezidivrate, kann durch signifikantes Downstaging und Downsizing die Chance auf eine R0-Resektion sowie eine sphinktererhaltende Operation gesteigert werden (Sauer et al., 2004). Die Empfehlungen für eine adjuvante postoperative Radio-/Chemotherapie bestehen für alle nicht neoadjuvant vorbehandelten Patienten im Stadium UICC II und III sowie nach R1-Resektion und intraoperativem Tumoreinriss. Patienten die präoperativ eine kombinier-

te Radio-/Chemotherapie erhalten haben, sollten unabhängig des resultierende Tumorstadiums adjuvant chemotherapiert werden (Schmiegel et al., 2008).

Nach kurativer Resektion entwickeln ca. 50% aller Patienten mit kolorectalem Karzinom im weiteren Verlauf eine Tumorprogression im Sinne eines Lokalrezidives oder eines metastatischen Geschehens. Die Rate an Lokalrezidiven ist hierbei aufgrund anatomischer Verhältnisse bei Rectumkarzinomen bedeutend höher und bestimmt die Prognose nicht unwesentlich (Adam et al., 2001, Scheele et al., 2001).

Liegen bereits bei Erstdiagnose des kolorectalen Karzinoms Fernmetastasen vor, so sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate von 90% bei lokal begrenztem Tumor auf 11% (Jemal et al., 2009). In bis zu einem Drittel der Fälle ist hierbei die Leber das einzige von Fernmetastasen betroffene Organ, (Adam et al., 2001). Das rückt die prognostische Bedeutung kolorectaler Lebermetastasen in den Mittelpunkt.

1.2 Kolorectale Lebermetastasen

Aufgrund des Metastasierungsweges ist die Leber in den allermeisten Fällen (ca. 70-80%) das erste von Fernmetastasen betroffene Organ. Die Metastasierung erfolgt lymphogen und hämatogen. Die Lymphabflusswege verlaufen entlang der A. mesenterica superior und der A. mesenterica inferior, beim Rectumkarzinom zusätzlich entlang der A. rectalis superior. Die hämatogene Tumoraussaat erfolgt über den Pfortaderkreislauf in die Leber. Tiefsitzende Rectumkarzinome metastasieren außerdem über den Plexus rectalis inferior in die Vena cava inferior. Die zweithäufigsten Metastasierungsorte sind die Lunge und das Peritoneum gefolgt von Skelett, Nebennieren und Gehirn (Lehnert et al., 1999). Bei ca. 15-20% des Patientengutes liegen bereits bei Diagnosestellung synchrone Lebermetastasen vor (Adam et al., 2001).

1.2.1 Chirurgische Therapie

Das Verfahren der Wahl und somit Goldstandard in der Therapie kolorectaler Lebermetastasen ist die Leberchirurgie (Scheele et al., 1996, Jaeck et al., 1997, Simmonds et al., 2006). Bei Fehlen effektiver alternativer Behandlungsmethoden bietet sie die einzige Chance auf eine dauerhafte Heilung. Patienten die nicht therapiert werden überleben im Mittel 8 Monate. Eine alleinige chemotherapeutische Behandlung gilt als palliativ und kann das Überleben verlängern, sie ist jedoch in keinem Fall kurativ (Simmonds et al., 2006). Durch moderne bildgebende Verfahren und somit eine verbesserte Diagnostik, durch standardisierte Operationsmethoden und eine Senkung der Klinikletalität hat die chirurgische Therapie in den letzten 20 Jahren noch an Bedeutung gewinnen können. Die 5-Jahresüberlebensraten nach Lebermetastasenresektion sind von 30% in den achtziger und neunziger Jahren auf heute 50% gestiegen (Konopke et al., 1999, de Jong et al., 2009). Trotz allem gelten auch heute lediglich ca. 10-20% aller Patienten mit kolorectalen Lebermetastasen als kurativ chirurgisch therapierbar (Mitry et al., 2008, Adam et al., 2001).

Die Hauptproblematik stellt die Resektabilität der Lebermetastasen dar. Eine von G. Poston und Mitarbeitern 2005 veröffentlichte Arbeit zur Beurteilung der Resezierbarkeit von Lebermetastasen, ist heute allgemein anerkannt und soll die Indikationsstellung erleichtern:

Resektable Lebermetastasen liegen vor, wenn

- Eine nicht resektable extrahepatische Tumormanifestation ausgeschlossen ist
- Weniger als 70% des Parenchyms befallen sind

- Weniger als 3 Lebervenen und weniger als 7 Segmente betroffen sind
- Keine Leberinsuffizienz oder Child B- oder Child C Zirrhose vorhanden sind
- Keine schwerwiegenden Begleiterkrankungen vorliegen

Wie der allgemeine leberferne Lymphknotenbefall, galten regionale Lymphknotenmetastasen im Leberhilus bzw. Ligamentum hepatoduodenale lange Zeit als Kontraindikation zur Leberresektion (Beckurts et al., 1997). Neuere Untersuchungen empfehlen jedoch eine Leberresektion mit vollständiger lebernaher Lymphknotendissektion und sehen darin einen wesentlichen Überlebensvorteil (Jaeck et al., 2002, Oussoultzoglou et al., 2009). Weitere häufig genannte Kontraindikationen wie 4 oder mehr Metastasen oder auch knapp im Gesunden liegende Resektionsgrenzen sollten nicht pauschal zum Ausschluss einer Operation führen, wenngleich immer eine R0 Situation erreicht werden muss. Weiterhin sind auch Debulking Operationen bei extrem großen Tumoren oder bei ausgeprägter Symptomatik vertretbar (Scheele et al., 2001).

Nach Literaturangaben stellen sich ca. 29-42% der Patienten intraoperativ als inoperabel dar. Die häufigsten Gründe hierfür sind eine diffuse Lebermetastasierung, eine Peritonealcarcinose oder lokoregionäre Rezidive. Präoperativ durchgeführte bildgebende Verfahren wie die routinemäßig eingesetzte B-Bild-Sonographie oder die Abdomen-Computertomographie können insbesondere eine Peritonealcarcinose oder ein lokoregionäres Rezidiv nicht sicher ausschließen. Um präoperativ ein genaueres Staging zu erreichen und somit den hohen Anteil an Probelaaparotomien zu senken, empfehlen neuere Studien den Einsatz einer Positronen-Emissions-Tomographie in Kombination mit einer Computertomographie (FDG-PET-CT). Aufgrund der hohen Kosten und der eingeschränkten Verfügbarkeit ist die Untersuchung in der Realität jedoch noch kein Standard. Alternativ sollte dann die Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz kommen (Koppe et al., 1999, Amthauer et al., 2006, Selzner et al., 2004, Fernandez et al., 2004).

Chirurgische Resektionsverfahren werden in anatomische und nichtanatomische Resektionen unterteilt. Anatomische Resektionen orientieren sich an der Lebersegmentanatomie nach Couinaud (1957) und ergeben aufgrund eines geringeren Blutverlustes bei gleichzeitigem Erhalt von möglichst viel funktionsfähigem Restlebergewebe signifikant bessere Überlebensraten. Anatomische Resektionen sollten aus diesem Grund den nichtanatomischen Resektionen vorgezogen werden (Scheele et al., 2001). Mögliche Operationsverfahren sind die Lebersegmentresektion, die Lobektomie oder die Hemihepatektomie. Die funktionelle, chirurgische Grenze beider Leberhälften bildet dabei die Vena cava-Gallenblasen-Linie, die sogenannte Fissura prinzipalis

(Sulcus medialis). Die Hemihepatektomie rechts beinhaltet die Segmente V bis VIII und kann im Bedarfsfall um Segment IV erweitert werden (erweiterte Hemihepatektomie rechts oder Trisegmentektomie). Die Hemihepatektomie links umfasst die Segmente I bis IV und kann ebenfalls erweitert werden. Von einer Lobektomie spricht man bei Resektion im anatomischen Lappenspalt, welcher durch das Ligamentum falciforme gebildet wird. Nichtanatomische Resektionen oder atypische Resektionen ohne Orientierung an anatomischen Strukturen werden beispielsweise als periphere Keilexzision (Wedge Resection) bei oberflächlich, peripher liegenden Metastasen durchgeführt (Markus et al., 2006). Neben der Frage der technischen Resektabilität durch die Beziehung der Metastase zu den großen Gefäßen, muss außerdem die funktionelle Resektabilität bestimmt werden. Bei einer gesunden Leber können bis zu 70% des Parenchyms entfernt werden. Eine präoperative Einschätzung ist u.a. anhand von Formeln zur Bestimmung der „partial hepatic resection rate“ (PHRR), der Bestimmung des Leberfunktionsstatus durch die Child-Pugh-Klassifikation oder auch durch die Berechnung des Leberrestvolumens durch dreidimensionale CT-Rekonstruktionen möglich (Okamoto et al., 1984, Rau et al., 2000). Insbesondere bei der erweiterten Hemihepatektomie rechts kann die Mindestmenge an Restlebervolumen oft nicht gewährleistet werden. Die präoperative selektive Pfortaderembolisation hat sich hierbei als ein geeignetes Hilfsmittel zur Induktion einer kontralateralen Leberhyperplasie erwiesen. Auch die „Two-Stage“ Hepatektomie bei bilateralen Metastasen bietet durch eine zwischengeschaltete Regenerationsphase Zeit für eine Parenchymneubildung (Donadon et al., 2007).

1.2.2 Neoadjuvante Therapie

Eine neoadjuvante systemische Chemotherapie kann bei Patienten mit primär irresektablen Lebermetastasen zu einem Downsizing des Tumor führen und damit die Möglichkeit einer chirurgischen Therapie eröffnen. Adam et al. konnten so in einer groß angelegten Studie weitere 13,6% einer primär irresektablen Patientengruppe kurativ operieren. Es wird angenommen, dass die Langzeitüberlebensraten in der Folge denen von primär resezierten Patienten gleichen (Adam et al., 2001, Giacchetti et al., 1999). Die Ergebnisse der neoadjuvanten Therapie nach konventionellen Chemotherapie-Protokollen (FOLFOX-4, FOLFIRI) konnten in neueren Studien durch Hinzunahme des monoklonalen EGF-(epidermal-growth-factor) Rezeptor-Antikörpers Cetuximab weiter verbessert werden (Adam et al., 2007). Der Nutzen einer präoperativen Chemotherapie bei primär operablen Patienten wird derzeit kontrovers diskutiert. Den Hoffnungen einer anschließend verbesserten chirurgischen Versorgung im Sinne einer R0-Resektion sowie die frühzeitige Behandlung eventueller Mikrometastasen steht eine erhöhte perioperative Morbidität und

das deutlich erhöhte Risiko einer chemotherapeutischen Leberzellschädigung gegenüber (Donadon et al., 2007).

1.2.3 Adjuvante Therapie

Ungefähr 75% aller leberteilresezierten Patienten erleiden ein Rezidiv. Das rezidivfreie Überleben nach 5 Jahren liegt zwischen 15 und 35%. Die Rezidive treten zu 50% in der Leber auf und dies zumeist innerhalb der ersten beiden Jahre nach der Metastasenresektion. In Ermangelung publizierter Daten kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch keine generelle Empfehlung zur Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie gegeben werden. Neuere Analysen zeigen aber Überlebensvorteile bei Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Operation (Mitry et al., 2008, Schmiegel et al., 2008).

1.2.4 Alternative lokalregionäre Verfahren

In den letzten Jahren haben sich verschiedenste alternative Behandlungsmethoden entwickelt. Hierzu zählen u.a. die regionale Chemotherapie über einen Portkatheter in der A. hepatica, die Selective Internal Radiation Therapy (SIRT), die laserinduzierte Thermoablation (LITT) oder die Radiofrequenzablation (RFA). Alle Verfahren stellen derzeit keine Alternativen zu einer primär möglichen Operation dar, da ihr Vorteil gegenüber der chirurgischen Therapie in keiner Studie bewiesen wurde. Trotzdem ist die Anwendung bei als inoperabel eingestuften Patienten oft sinnvoll und effektiv (Abdalla et al., 2004, Schmiegel et al., 2008)

1.2.5 Therapiealgorithmus

Ein möglicher Behandlungsalgorithmus kolorektaler Lebermetastasen wurde 2007 von Pawlik et al. empfohlen:

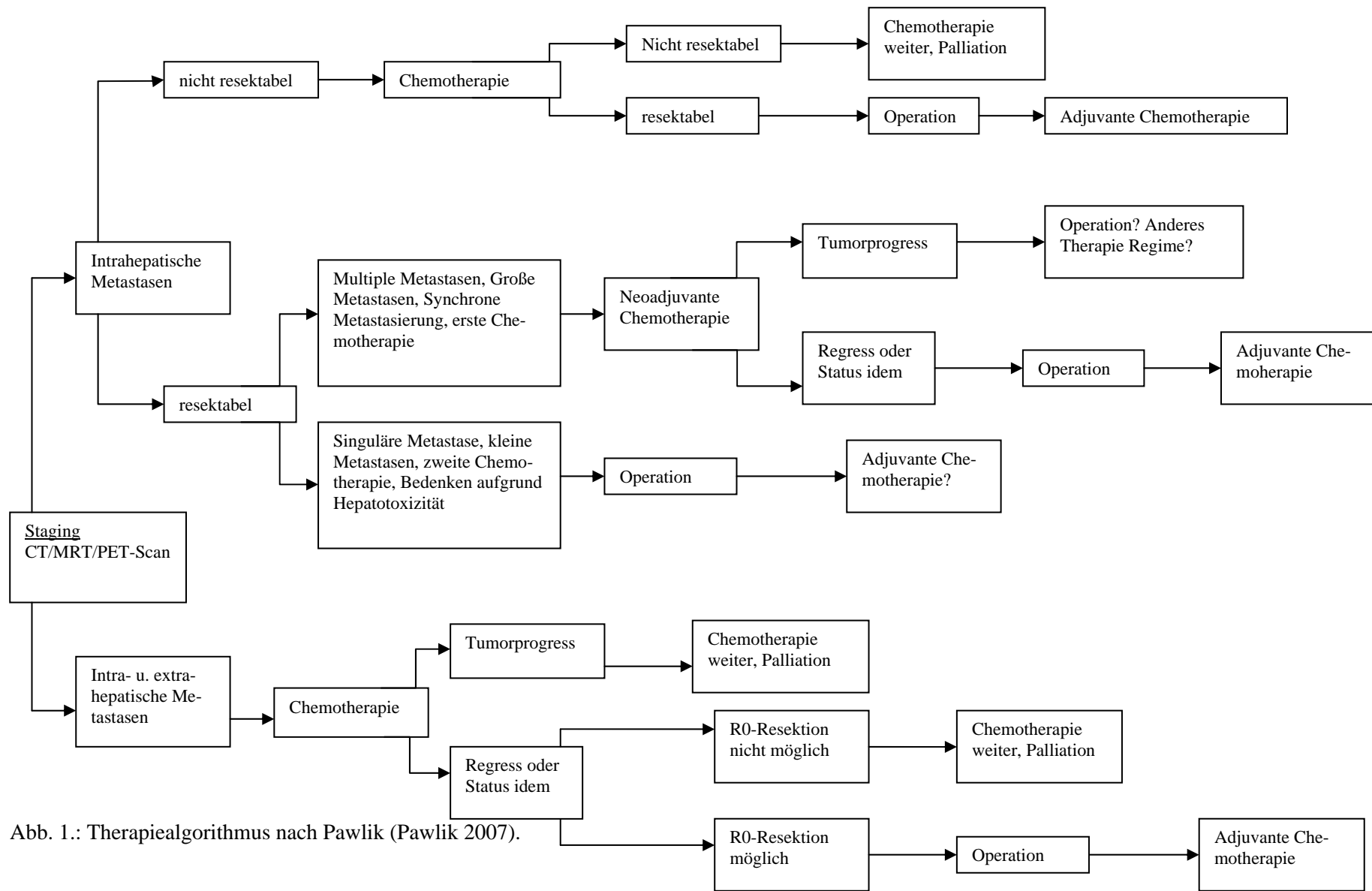


Abb. 1.: Therapiealgorithmus nach Pawlik (Pawlik 2007).

1.3 Prognose und Prognosefaktoren

1.3.1 Prognosefaktoren

Der hohe Stellenwert der Metastasen Chirurgie ist nicht zuletzt den deutlich verbesserten Ergebnissen der letzten Jahrzehnte geschuldet. Die 5-Jahres-Überlebensraten haben sich nahezu verdoppelt. Eine Übersicht einiger Fallstudien über die letzten 14 Jahre zeigt folgende Tabelle (Tab.4).

Untersucher	Publikationsdatum	5-Jahres-Überlebensrate (%)
Nordlinger et al.	1996	28
Fong et al.	1999	37
Pawlik et al.	2005	58

Tab. 4: 5-Jahres-Überlebensraten nach kolorektaler Lebermetastasenresektion.

Die perioperative Mortalität konnte ebenfalls von 20% in den späten 70er Jahren bis auf 1% heute gesenkt werden (Pawlik et al., 2007). Begründet liegt dies unter anderem in einer verbesserten Patientenauswahl. Die Evaluation des perioperativen Risikos sowie des Nutzens einer operativen Therapie kolorektaler Lebermetastasen kann anhand von Prognosefaktoren eingeschätzt werden.

Zu den allgemeinen Risikofaktoren zählt das Lebensalter in Kombination mit dem Allgemeinzustand bzw. der Komorbidität. Diese scheint prognostisch weitaus entscheidender zu sein als das Lebensalter. Verschiedene Klassifikationen wie der ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) -Performance Status, der Karnofski-Index oder der ASA-Score (American Society of Anesthesiologists) kategorisieren den körperlichen Zustand des Patienten. Während der ECOG-Performance-Status und der Karnofski-Index als weit verbreitete Klassifikationen in der Onkologie über die Erfolgsaussichten einer Operation hinsichtlich der Überlebenszeit einen beschränkten Aussagewert haben, hat sich der ASA-Score (Tab. 5) in der klinischen Routine zur Einschätzung des Operationsrisikos durchgesetzt (Senninger et al., 2001).

ASA	Klinischer Status
1	Normaler gesunder Patient
2	Patient mit leichter Allgemeinerkrankung
3	Patient mit schwerer Allgemeinerkrankung
4	Patient mit schwerer Allgemeinerkrankung, die eine ständige Lebensbedrohung ist
5	Moribunder Patient, der ohne Operation voraussichtlich nicht überleben wird
6	Hirntoter Patient, dessen Organe zur Organspende entnommen werden

Tab. 5: ASA-Score

Zu den spezifischeren Prognosefaktoren nach chirurgischer Resektion von kolorektalen Metastasen gehören insbesondere die Radikalität des Eingriffs mit sicherer R0-Resektion, d.h. auch mikroskopisch tumorfreien Resektionsrändern (Scheele et al., 2001). Als nicht unerheblich wird in diesem Zusammenhang immer wieder die Qualität der Operation und damit das Können und Wissen des onkologisch tätigen Chirurgen bezeichnet (Hermanek et al., 2000).

Der Vorteil anatomischer gegenüber atypischer Leberresektionen wurde bereits genannt. Neben geringerer operativer Komplikationen, weisen anatomische Resektionen darüber hinaus einen prognostischen Vorteil gegenüber nicht anatomischen Resektionen auf (DeMatteo et al., 2000, Zorzi et al., 2006).

Weiter gilt das anhand der TNM-Klassifikation gemessene Stadium des Primärtumors seit jeher als klassischer Prognosefaktor (Docì et al., 1991, Stangl et al., 1994), ebenso der Differenzierungsgrad (Grading) des Primärtumors. Schlecht differenzierte Karzinome haben eine signifikant schlechtere Prognose.

Ferner haben die Größe und Anzahl der Lebermetastasen Einfluss auf das Überleben. Mehr als vier Metastasen gelten als prognostisch ungünstig, wenngleich ein Langzeitüberleben durchaus beobachtet wurde. Eine deutlich ungünstigere Prognose wird Satellitenmetastasen, die durch Pfortaderinvasion und lokale Tumorzellverschleppung entstehen zugeschrieben.

In Bezug auf den Zeitpunkt der Diagnosesicherung haben metachrone Metastasen in den meisten Studien eine bessere Prognose als synchrone Lebermetastasen. Anzumerken sei eine nicht ein-

heitliche Definition synchroner Metastasen (Taylor et al., 1997, Lahr et al., 1983, Simmonds et al. 2006, Scheele et al., 2001).

Ein weiterer signifikanter Prognoseindikator ist der präoperative Serum CEA (carcinoembryonales-Antigen)-Spiegel. Die Langzeitüberlebensraten sind bei Patienten mit pathologischen Werten um bis zu 12% niedriger gegenüber einem normwertigen Patientenkollektiv (Pawlik et al., 2007, Scheele et al., 2001). Auch die Verdopplungszeit des CEA-Wertes kann als prognostisches Kriterium herangezogen werden (Koga et al., 1999). Nach Empfehlungen der European Group on Tumor Markers (EGTM) soll der CEA-Wert bei Patienten mit kolorectalem Karzinom im Stadium II bis III alle 2 bis 3 Monate kontrolliert werden (Duffy et al., 2007). Andere Serum-Tumormarker haben einen deutlich geringeren Stellenwert, können aber insbesondere bei Patienten die keine erhöhten CEA-Werte entwickeln alternativ eingesetzt werden. Hierzu zählen CA 19-9, CA 72-4, CA 50 u.a. (Duffy et al., 2002).

Der Einfluss verschiedenster molekularbiologischer Marker ist Gegenstand der Forschung. Für einige liegen repräsentative Ergebnisse vor. So scheinen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und des Onkogens k-ras die Prognose zu verschlechtern (Hamlin et al., 1994, Tannapfel et al., 2008). Auch der Allelverlust auf Chromosom 18q (DCC) wird überwiegend mit einer Prognoseverschlechterung in Verbindung gebracht (Popat et al., 2005). Der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bei HNPCC bedingten Kolonkarzinomen ist Teil des Screeningprogrammes. Das Vorhandensein einer MSI bei HNPCC assoziierten sowie bei sporadisch auftretenden Kolonkarzinomen scheint mit einer besseren Prognose einherzugehen. Als möglicher Grund wird ein durch die Mikroinstabilität aktiviertes Immunsystem angesehen (Duffy et al., 2007).

Das College of American Pathologists hat für Prognosefaktoren bei kolorectalen Karzinomen allgemein eine Gewichtung vorgenommen und 4 Kategorien erstellt. Die Gruppendifinitionen und die Klassifizierung vorhandener Prognosefaktoren sind in den folgenden Tabellen (Tab. 6 und 7) dargestellt (Compton et al., 2000).

Kategorie	Definition
I	Durch Studien belegte prognostisch wertvolle Faktoren. Allgemein bei Patientenversorgung berücksichtigt
IIa	In Studien ausgiebig untersuchte biologische/klinische Faktoren, die einen prognostischen Vorhersagewert haben, deren Nutzen jedoch in weiteren aussagefähigen Studien untersucht werden muss
IIb	In Studien untersuchte vielversprechende Faktoren. Keine ausreichenden Daten für eine Aufnahme in Kategorie I oder IIa vorhanden
III	Faktoren, deren prognostischer Wert noch nicht ausreichend untersucht wurde
IV	Durch Studien gut untersuchte Faktoren, die keinen prognostischen Wert haben

Tab. 6: Kategorien von Prognosefaktoren, Definitionen der Gruppen nach Compton (Compton et al. 2000)

Kategorie	Prognosefaktoren
I	Tumorausdehnung (T-Stadium), regionale Lymphknotenmetastasen (N-Stadium), Blutgefäß- und Lymphbahninvasion, tumorfreie Resektionsgrenzen (R-Klassifikation), präoperativer CEA-Wert
IIa	Tumordifferenzierung (Grading), Tumorfreie Operationsgrenzen, Residualtumor nach neoadjuvanter Therapie (ypTNM-Status)
IIb	Histologischer Typ, MSI, hoher Anteil an MSI, Verlust des DCC Genes, infiltratives versus verdrängendes Wachstum
III	-DNA Gehalt der Zelle, -weitere molekulare Marker wie Onkogene (k-ras, c-myc), Tumorsuppressorgene, DNA Synthese Gene (Thymidilat Synthase, Thymidin Phosphatase), Gene für den TGF, EGF, Gene für den VEGF, u.a. -weitere Tumormarker wie CA 19-9, CA 72-4 u.a.
IV	Tumorgröße

Tab. 7: Kategorien von Prognosefaktoren, College of American Pathologists Consensus Statement 1999 (Compton et al., 2000)

1.3.2 Scoring Systeme

Zur Einschätzung der Prognose und zur individuellen Therapieentscheidung bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen wurden außerdem Scoring-Systeme entwickelt. Einfach zu erfassende klinische Befunde werden zusammengeführt und anhand dieser die Prognose eingeschätzt. Einer dieser präoperativen Prognosescores stammt aus dem Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York und wird nach seinem Ersteller „Fong-Score“ genannt. Als prognostisch ungünstige Kriterien gelten:

- Nodal positiver Primärtumor
- Krankheitsfreies Intervall < 12 Monate
- Metastasengröße > 5 cm
- Anzahl der Metastasen > 1
- CEA präoperativ > 200 ng/ml

Jedes Kriterium erhält einen Punkt, so dass insgesamt 5 Punkte gezählt werden können. Eine gute Prognose wird Patienten mit einem präoperativen Score von maximal 2 Punkten zugeschrieben. Fong et al. erhielten nach einer Analyse von 1001 Patienten nach kolorektaler Leberresektion folgende 5-Jahres-Überlebensraten:

Fong-Score	5-Jahres-Überlebenrate (%)
0	60
1	44
2	40
3	20
4	25
5	14

Tab. 8: 5-Jahres-Überlebensraten nach Resektion kolorektaler Lebermetastasen nach Fong et al., 1999

Ein weiteres Scoring-System wurde von Nordlinger et al. entwickelt. Auch hier erhalten folgende Kriterien je einen Punkt:

- Alter > 60 Jahre
- Metastasengröße > 5 cm
- Lymphknotenstatus des Primarius positiv
- Primärtumorstadium \geq pT3
- Tumorfrees Intervall < 2 Jahre
- Anzahl der Metastasen \geq 4
- Resektionsabstand < 1 cm

Das Risiko wird bei Vorhandensein von 5 – 7 Punkten als hoch, bei 3 – 4 Punkten als mittel und bei 0 – 2 Punkten als gering eingeschätzt (Nordlinger et al., 1996).

Trotz aller Bemühungen um eine prä- oder intraoperative Vorhersage der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen, erleidet ein Großteil der Patienten eine Tumorprogression. Die aktuell in der klinischen Routine eingesetzten Prognoseparameter scheinen nicht sensitiv genug um das Patientenkollektiv herauszufiltern welches von einer Operation nicht profitiert. Molekularbiologische Marker haben sich in diesem Zusammenhang als Hoffnungsträger erwiesen. Insbesondere der Ploidiefaktor konnte in mehreren Studien als ein prognostisch wertvoller Marker für das Langzeitüberleben bestätigt werden.

1.4 DNA-Ploidie

1.4.1 Der DNA-Gehalt der Zelle

Träger des genetischen Materials und damit der Erbinformation des Organismus ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA von englisch: deoxyribonucleic acid). In menschlichen Zellen liegt die DNA, mit Ausnahme geringer Mengen in den Mitochondrien, in den Zellkernen vor. Über Gene, die für Ribonukleinsäuren und damit für Proteine kodieren, wird der gesamte Stoffwechsel und folglich die Entwicklung der Zelle gesteuert. Die DNA ist im Normalzustand in Form einer Doppelhelix organisiert und bildet gemeinsam verpackt mit Proteinen, u.a. so genannten Histonen, die Chromosomen. Ein menschlicher somatischer Zellkern enthält 46 Chromosomen in Form von 23 homologen Paaren. Dabei werden die 22 Autosomenpaare von den 2 Geschlechtschromosomen unterschieden.

Der DNA-Gehalt einer Zelle wird als DNA-Ploidie bezeichnet und analog zum Begriff Ploidie verwendet. In einer normalen Körperzelle liegt der Chromosomensatz doppelt vor, man spricht von einer **diploiden** Anzahl (griechisch: diploe = doppelt). Der DNA-Gehalt beträgt $2c$ ($c =$ „content“). Der in Keimzellen vorkommende einfache Chromosomensatz mit 22 Chromosomen (Autosomen) und einem Geschlechtschromosom (Gonosom) wird demgegenüber als **haploid** mit einem DNA-Gehalt von $1c$ bezeichnet. Regelrechte somatische diploide Zellen werden auch als „**euploid**“ (griech.: gut) bezeichnet. Eine diploide Zelle enthält eine DNA Menge von $6,3 \pm 0,5$ pg (10^{-12} g).

Die einzelne Zelle durchläuft einen Lebens- oder Zellzyklus an deren Ende die Zellteilung steht. Die Zellteilung kann in die Karyokinese (Kernteilung) und die Zytokinese (Zellplasmateilung) unterteilt werden. Der Zellteilungsprozess von Körperzellen wird Mitose, der von Geschlechtszellen Meiose genannt. Der Zellzyklus somatischer Zellen kann in vier Perioden unterteilt werden. In der ersten Wachstumsphase (G1) findet zum großen Teil eine Proteinbiosynthese statt. Für Zellen bei denen keine erneute Zellteilung erfolgt geht die G1-Phase in eine Ruhephase (G0) über. Bei allen anderen Zellen schießt sich die Synthesephase (S) an, in der durch DNA-Synthese der DNA-Gehalt der Zelle verdoppelt und somit die Grundlage zur Zell- bzw. Kernteilung geschaffen wird. Das nach der Zellteilung zunächst aus einem Chromatid bestehende Chromosom besteht nun aus zwei am Centromer zusammenhängenden Chromatiden und der DNA-Gehalt beträgt $4c$. Daraufhin folgt eine zweite Wachstumsphase (G2) und dieser wiederum

die Mitose (M-Phase). Die Mitose kann schließlich wieder in vier fließend in einander übergehende Phasen, die Pro-, Meta-, Ana- und Telophase, unterteilt werden. Als Resultat werden zwei identische DNA-Sätze auf zwei Tochterkerne verteilt. Jede Tochterzelle besitzt nun wieder ein DNA-Gehalt von $2c$. Als Sonderform der Zellteilung entstehen in der Meiose (Reifeteilung) durch zwei aufeinanderfolgende Kernteilungen einer anfangs diploiden Zelle vier haploide Zellen. Die zweite Teilung entspricht dabei einer mitotischen Kernteilung.

Treten Fehler im Zellzyklus zum Beispiel durch eine unregelmäßige Mitose oder durch eine unkontrolliert ablaufende Synthesephase auf, können **polyploide Zellen** entstehen. Polyploide Zellen enthalten ein Vielfaches des haploiden Chromosomensatzes im Sinne des ganzzahligen Vielfachen. So entstehen beispielsweise triploide ($3c$) oder tetraploide ($4c$) Zellen. Polyploidie kann im menschlichen Organismus selten physiologisch auftreten, so sind beispielsweise Megakaryozyten polyploid. Grundlage ist hierbei eine Verteilungsstörung in der Anaphase. Auch in funktionell stark beanspruchten Organen wie dem Myokard werden polyploide Kerne mit bis zu 16fachen Chromosomensätzen beobachtet. Eine regelhafte Polyploidie wird auch „**euploide Polyploidie**“ genannt. Weicht die Chromosomenmenge von der diploiden Zahl ab, entspricht aber nicht dem Vielfachen eines haploiden Satzes, spricht man von „**Aneuploidie**“. Beispiele hierfür sind die durch eine meiotische Verteilungsstörung entstehende Trisomie 21 oder Fehlverteilungen der Geschlechtschromosomen beim Turner- oder Klinefelter Syndrom. Alle genannten Abweichungen der Chromosomenzahl zählen zu den numerischen Chromosomenanomalien und werden unterschieden von den strukturellen Chromosomenanomalien. Hier ist durch Deletion, Inversion, Translokation oder Duplikation die Chromosomengestalt gestört. Als bekanntes Beispiel sei das Philadelphia-Chromosom genannt (Geneser, 1990, Feichter et al., 1984).

Bis auf einige wenige Ausnahmen, gilt eine Polyploidie bzw. Aneuploidie im menschlichen Organismus als Kennzeichen entarteter Zellen. Transformierend wirkende Mutationen, die eine Tumorenstehung induzieren sind zum Teil bekannt. So wirkt ionisierende Strahlung kanzerogen. Elektrophile organische Moleküle wie Nitrosamine, Aflatoxine oder polyaromatische Kohlenwasserstoffe sind ebenso nachgewiesenerweise Krebs induzierend wie zum Beispiel Asbest. Weiterhin sollen an dieser Stelle transformierend wirkende Retroviren und DNA-Viren genannt sein. Durch mehrere akkumulierende Mutationen, bei denen die bereits genannten Onkogene und Tumorsuppressorgene eine große Rolle spielen, kommt es zu Zellzyklusstörungen, die eine gestörte DNA-Synthese zur Folge haben. Regulierende Signale fehlen oder sind fehlerhaft, so dass Reparaturmechanismen außer Kraft gesetzt werden und ein gegebenenfalls notwendiger pro-

grammierter Zelltod (Apoptose, p53) ausbleibt. Es kommt zu einem Verlust der Proliferationskontrolle sowie der Positionskontrolle mit metastatischer Ausbreitung der monoklonal entarteten Zellen (Kleinig et al., 1999).

1.4.2 Kenntnisstand

In den vergangenen 30 Jahren wurden bei verschiedensten menschlichen Tumoren zytometrische Untersuchungen vorgenommen und so der DNA-Gehalt der Tumorzellen bestimmt. Abweichungen vom normalen, diploiden DNA-Gehalt der Zelle waren dabei in den allermeisten Fällen mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Gegenstand der Studien waren neben kolorektalen Karzinomen vor allem gynäkologische Tumoren wie das Mammakarzinom (Hedley et al., 1993, Moureau-Zabotto et al., 2005), das Endometrium- (Susini et al., 2007) oder das Ovarialkarzinom (Kimmig et al., 2002). Auch der Einfluss der DNA-Ploidie auf die Prognose des Prostatakarzinoms wurde mehrfach untersucht (Shankey et al., 1993, Kugler et al., 1997).

Eine der ersten Studien zur prognostischen Aussagekraft von Ploidiebestimmungen beim kolorektalen Karzinom wurde 1982 von Wolley veröffentlicht. Wolley berichtete von einer signifikant besseren Prognose bei 20 Patienten mit diploidem Tumor im Gegensatz zu 13 Patienten mit nicht diploidem Tumor (Wolley et al., 1982). In der Folge wurden zahlreiche Studien mit unterschiedlicher Methodik durchgeführt. Es finden sich retrospektive (Halvorsen et al., 1990) sowie prospektive (Banner et al., 1985, Jones et al., 1988) Studien. Einige Autoren favorisierten paraffiniertes (Schutte et al., 1987, Costa et al., 1992), andere frisches oder gefrorenes Gewebe (Silvestrini et al., 1992, Tomoda et al., 1993). Die meisten dieser Untersuchungen zeigten einen Überlebensvorteil für Patienten mit diploidem Tumor (Emdin et al., 1987, Armitage et al., 1985, Kouri et al., 1990). In manchen Studien stellte sich die DNA-Ploidie als ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben heraus (Emdin et al., 1987, Scott et al., 1987). Kokal und Mitarbeiter befanden die Ploidie sogar als den wichtigsten prognostischen Faktor für ein Rezidiv oder das Überleben bei kolorektalen Karzinomen. Der Ploidie wurde sogar ein größeres Gewicht als dem Tumorstadium beigemessen (Kokal et al., 1986). Wieder andere sahen keinen Überlebensunterschied zwischen Patienten mit diploiden oder aneuploiden Tumoren und hielten DNA-Bestimmungen daher für prognostisch nicht relevant (Enker et al., 1991). In einem 1993 veröffentlichten Rückblick auf die Ploidiebestimmungen bei kolorektalen Karzinomen der vorhergehenden zehn Jahre wurde angemerkt, dass „die DNA-Ploidie ein schwacher prognostischer Faktor ist, deren Aussagekraft durch unterschiedliche Methoden, unterschiedliche Patientenaus-

wahlkriterien und uneinheitliche Qualitätskontrollen verzerrt wird. In der Folge ist die allgemeine Rolle der DNA-Ploidie als Prognosefaktor bei colorektalen Karzinomen umstritten“ (Bauer et al., 1993). Empfehlungen für kommende Studien umfassten neben größeren Fallzahlen u.a. die Verwendung von frischem oder gefrorenem statt paraffiniertem Material sowie die Forderung nach ausreichenden Probenentnahmen (Bauer et al., 1993). Doch auch in den darauffolgenden Jahren bis zum heutigen Zeitpunkt herrscht keine Einigkeit über die Aussagekraft der DNA-Ploidie. Wiederholt wurden Studien veröffentlicht, die den prognostischen Wert der DNA-Bestimmungen priesen (Lanza et al., 1998, Tonouchi et al., 1998, Purdie et al., 2000, Russo et al., 2002). Andere hielten dagegen und sahen keinen Zusammenhang zwischen dem DNA-Gehalt der Tumorzellen und dem Überleben nach Resektion kolorektaler Karzinome (Zarbo et al., 1997, Yamamoto et al., 1998, Soreide et al., 2009).

Trotz vieler Untersuchungen zur diagnostischen Aussagefähigkeit des DNA-Gehalts von kolorektalen Primärtumoren, gibt es bisher nur eine geringe Anzahl von Studien, die die prognostische Signifikanz des DNA-Gehaltes kolorektaler Lebermetastasen analysierten. In einer Studie von 31 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen, konnte Yamaguchi et al. den Ploidiefaktor als einen sinnvollen Prognoseindikator bestätigen (Yamaguchi et al., 1990). Auch Riesener et al. untersuchten den DNA-Gehalt kolorektaler Lebermetastasen von 75 Patienten und kamen zu dem Schluss die Ploidie sei ein unabhängiger prognostischer Faktor (Riesener et al., 1999). Demgegenüber stehen mehrere Untersuchungen, die keinerlei prognostischen Wert und keine Beziehung der DNA-Ploidie von Lebermetastasen zum Gesamtüberleben darstellen konnten (Kokal et al., 1986, Lind et al., 1992, Russo et al., 1998). In Zusammenschau mit vielen positiven Untersuchungen zur Wertigkeit des Ploidiefaktors wurde davon ausgegangen, dass die Tumorploidie in fortgeschrittenen Stadien ihre Wertigkeit verliert (Finan et al., 1986).

1.5 Fragestellung

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist unklar, welche klinische Bedeutung der Messung des DNA-Gehaltes von kolorektalen Lebermetastasen zukommt. Die vorhandenen klinisch-pathologischen Prognosefaktoren und Prognosescores zur Einschätzung einer Rezidivwahrscheinlichkeit und des Überlebens nach resezierten Lebermetastasen sind nicht spezifisch genug solche Patienten zu identifizieren, die aufgrund ihrer Tumorbiologie eine schlechtere Prognose aufweisen und die von einer operativen Therapie nicht profitieren. Die Tumorploidie als objektiver Indikator hat sich in mehreren Studien bewährt und gilt, obwohl weiterhin umstritten, als Hoffnungsträger. In der hier vorliegenden Arbeit soll an einer Fallzahl von 161 Patienten, die sich aufgrund eines hepatisch metastasierten colorektalen Karzinoms einer Leberresektion unterzogen, der prognostische Wert der Ploidie anhand des DNA-Index geprüft werden.

Hierzu sollen zunächst die klassischen, konventionellen Prognosefaktoren mit dem Überleben korreliert werden. Daran anschließend möchten wir den mittels DNA-Bildzytometrie ermittelten DNA-Index als Ausdruck der DNA-Menge wiederum mit einigen ausgewählten konventionellen Faktoren korrelieren und schließlich den Einfluss des DNA-Indexes auf das Überleben untersuchen.

2 Material und Methode

2.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Zur Auswertung kamen 161 Patienten, die sich im Zeitraum von September 1999 bis Dezember 2006 in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, einer Leberresektion unterzogen. Alle Patienten wurden aufgrund colorektaler Lebermetastasen infolge eines Rectum- oder Koloncarinoms behandelt. Durch Auswertung der Krankenakten inklusive histopathologischer Befunde und Operationsberichte, wurden retrospektiv Daten zur primären Operation des Patienten, Art der Leberresektion, Anzahl und Größe der Tumorknoten, zum Abstand zum Resektionsrand, R-Status und histopathologischen Gradings ermittelt. Der Krankheitsverlauf konnte ebenfalls zum Teil den der Klinik vorliegenden Dokumenten entnommen werden. Insbesondere Daten zum Survival und der weiteren onkologischen Behandlung der Patienten wurden durch Kontaktierung der Hausärzte und Onkologen oder durch Rücksprache mit den noch lebenden Patienten selbst evaluiert. Alle Überlebensdaten wurden in der zweiten Kalenderwoche des Jahres 2010 aktualisiert. So konnte zum Ende des Beobachtungszeitraumes bis auf wenige „lost to follow-up“ Fälle, ermittelt werden, ob die Patienten leben oder bereits verstorben sind.

Die Untersuchung der DNA-Ploidie und somit des DNA-Gehaltes der Tumorzellen gelang mit Hilfe der sogenannten statischen DNA-Bildzytometrie. Nach spezifischer Anfärbung der Zellkerne bzw. ihrer DNA durch die Feulgen Reaktion, kann durch ein digitales Bildanalyse-System die optische Dichte der Kerne gemessen und so durch Referenzwerte die DNA-Menge bestimmt werden. Die Tumorzellen entstammen der während der Operation entnommenen Tumorproben, welche zunächst bei -80°C tiefgefroren und in der Tumorbank der Klinik gelagert wurden. Eine kontinuierliche Aufarbeitung der Präparate erfolgte im eigenen zytometrischen Labor der Klinik.

2.2 DNA-Bildzytometrie

2.2.1 Verfahren

Die Bestimmung der DNA-Ploidie gelingt heutzutage im Wesentlichen mit zwei Methoden. Konkurrierend stehen sich hierbei die DNA-Durchflusszytometrie und die von uns verwendete statische DNA-Bildzytometrie gegenüber. Das Verfahren der Durchflusszytometrie beruht auf der Messung und Analyse von Signalen die entstehen, wenn Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einen Laser passieren. Die Intensität der Signale wird erfasst und aufgezeichnet. Der Vorteil der Durchflusszytometrie liegt in der schnellen Messung großer Zellzahlen. Die Messwerte lassen sich jedoch nicht spezifisch den Tumorzellen zuordnen. Selten vorkommende Zellen können nicht gesondert erfasst werden, da eine morphologische Beurteilung der Zellen nicht möglich ist. Bei der statischen DNA-Bildzytometrie erfolgt eine interaktive Messung der Zellen. Durch die Möglichkeit der zeitgleichen morphologischen Beurteilung der Zellen können Messfehler sofort erkannt und jederzeit in die Messung eingegriffen werden. So können Artefakte weitgehend ausgeschlossen werden. Nachteilig ist der deutlich höhere Zeitaufwand (Remmele, 1999).

2.2.2 Vorbereitung der Präparate

Die tiefgefrorenen Tumorproben wurden unter Raumtemperatur aufgetaut. War dies geschehen, wurde die Schnittfläche der Probe „abgekratzt“ und das Material durch einen Objektträger auf einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Auf diese Weise wurden für die folgende Untersuchung mindestens drei Ausstrichpräparate hergestellt. Zwei Präparate wurden luftgetrocknet. Ein Ausstrichpräparat wurde sofort mittels Fixierungsspray fixiert. Dieses Präparat diente der zytomorphologischen Untersuchung der Probe und wurde nachdem es 15 Minuten lang getrocknet war einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) unterzogen. Hierzu wurde folgendes Färbeprotokoll verwendet:

1. 15-20 Sekunden Kernfärbung in Papanicolaou-Lösung 1b
2. Kurz spülen in Aqua destillata
3. 2-3 x Eintauchen in HCL-Alkohol
4. Mehrmals in heißem Leitungswasser gut spülen
5. 2-5 Sekunden Zytoplasmafärbung in Eosin
6. Kurz spülen in Ethanol (absolut, vergällt)
7. Letzten Punkt 3 x wiederholen

8. Kurz spülen in Ethanol-Toluol
9. Kurz spülen in Toluol
10. Eindecken (z.B. Entellan Schnelleindeckmittel)

Die HE Färbung führt zu zartblauen Zellkernen mit rosarotem Zytoplasma, die Zytoplasmamembranen lassen sich gut abgrenzen.

Das Präparat konnte nun lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen, wie die Kern-Plasmarelation, Anisozytose, Zunahme der Mitoserate, Mehrkernigkeit oder Konglomeratbildung untersucht werden. Waren typische Zeichen der malignen Transformation vorhanden, wurde mit der Weiterverarbeitung der anderen Ausstrichpräparate fortgefahren.

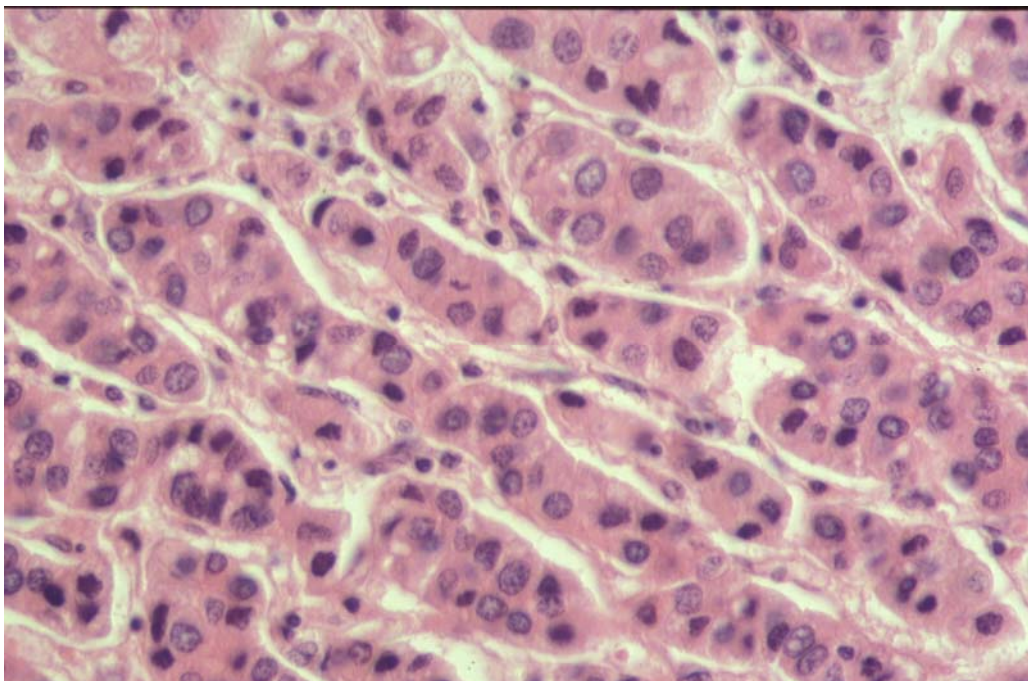


Abb. 2: HE gefärbtes Leberparenchym (typische Leberzellbalken, ohne Pathologie)

2.2.3 Feulgen-Färbung

Nachdem die Ausstrichpräparate ca. 24 Stunden luftgetrocknet waren, erfolgte eine Fixierung mittels Formalin. Dann konnte mit der Feulgen Färbung begonnen werden. Die sogenannte Feulgenreaktion ist eine 1924 von Feulgen und Rosenbeck entwickelte histochemische Methode zum spezifischen Nachweis von DNA. Sie bildet die Grundlage der quantitativen DNA-Messung der Zytometrie. Hauptreagenzien der Feulgenfärbung stellen Salzsäure (HCl) und fuch-sinschweflige Säure (Schiffs Reagenz) dar. Durch die Salzsäure wird die DNA hydrolisiert. Dabei brechen die Wasserstoffbrücken der DNA-Doppelhelix und die Purinbasen (Adenin und Guanin) werden abgespalten. So entstehen freie Aldehydgruppen. Die eigentlich farblose fuch-sinschweflige Säure reagiert mit den Aldehydgruppen. Durch Abspaltung des Fuch-sins entsteht so eine rot-violette Farbe (Buchner et al, 1997). Eine Färbung dauerte bis zu 6 Stunden. Das verwendete Protokoll ist folgend aufgeführt:

1. Die luftgerockneten Präparate in 4 % gepuffertem Formalin 30 Minuten fixieren.
2. 2-3 x mit Aqua dest. Spülen, dann Küvette stehen lassen und Aqua dest. mindestens 10 Minuten laufen lassen.
3. 5 N HCL ansetzen: 1 N HCL (Titrisol) 1 mol/l (Fertiglösung) auf 200 ml Aqua dest. auffüllen und in Küvette umfüllen.
4. Präparate in Glasfärbeständer 50 Minuten stehen lassen.
5. Präparate 3 x mit Aqua dest. Spülen
6. Küvette mit Schiffsreagenz (gebrauchsfertig) füllen, Präparate in der Küvette bewegen.
7. Küvette 60 Minuten dunkel stellen.
8. SO₂ Spülung herstellen (500 ml Aqua dest., 30 ml 10% Kaliumdisulfat, 30 ml 1% HCL, dann auf 600 ml Aqua dest. auffüllen).
9. SO₂ Spülung auf die 3 Küvetten verteilen.
10. Glasständer in die Küvetten je 1. Küvette 4 min., 2. Küvette 4 min., 3. Küvette 4 min.
11. 15 Minuten mit Leitungswasser gründlich spülen.
12. Spülung mit Aqua dest.
13. 2 x Spülen mit Alkohol.
14. Spülung mit Toluol.
15. Eindecken mit Entelan.

HCl (Titrisol 1 mol/l, 1N, MerckKGaA, Darmstadt) und Schiff's Reagenz (Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe) standen als Fertiglösungen zur Verfügung.

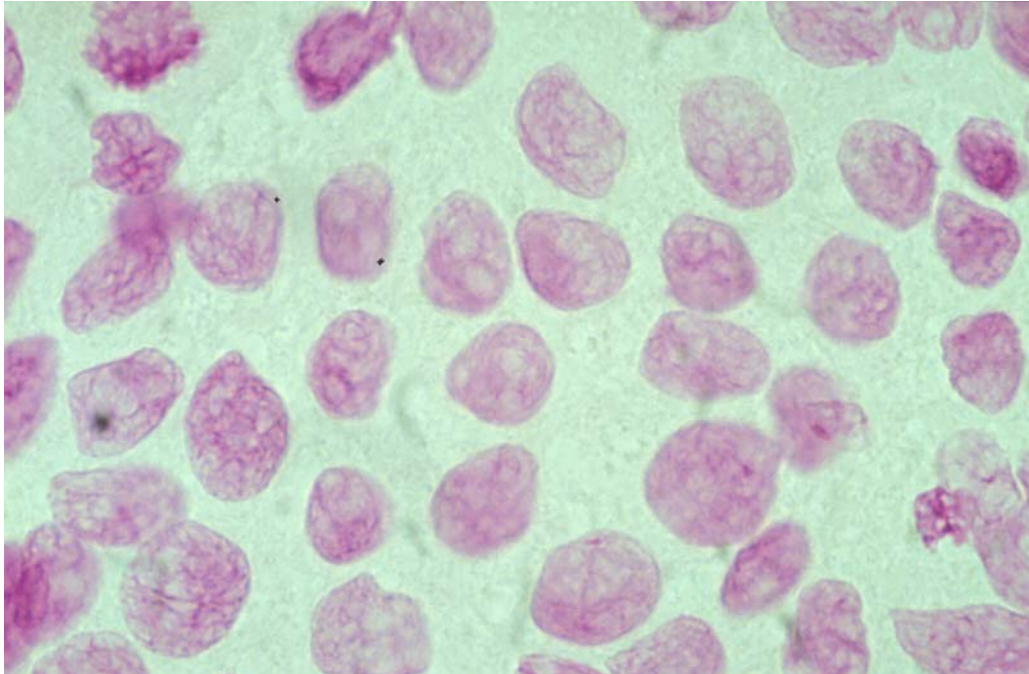


Abb. 3: Feulgenfärbung (deutlich vergrößerte, pathologisch veränderte Zellkerne)

2.2.4 Messvorgang

Für die Messung des DNA-Gehalt durch Absorptionsphotometrie verwendeten wir ein computergestütztes Bildanalysegerät. Es setzt sich zusammen aus einem Mikroskop (Nikon Eclipse 50i) und einer integrierten Kamera (CCD-Charge-Coupled-Device-Farbkamera JAIS 3300). Die Kamera ist mit einem Computer verbunden, der mit einer speziellen DNA-Software ausgestattet ist. Die Messdaten können digital gespeichert und mittels Farbdrucker ausgegeben werden. Eine solche klassische Bildanalyseeinheit ist in der folgenden Abbildung (Abb. 4) dargestellt.



Abb. 4: DNA-Bildanalyseeinheit

Das Prinzip der Messung beruht auf der Bestimmung der optischen Dichte der Zellkerne. Die zuvor durch die Feulgenreaktion angefärbten Zellkerne werden durch das Mikroskop sichtbar und durch die Kamera auf den Computer übertragen. Hierbei entsteht ein Spannungssignal das proportional zur Lichtintensität ist und nun durch den Rechner in Grauwertstufen umgerechnet wird. Die verschiedenen Intensitätswerte werden als Pixel auf dem Monitor sichtbar. Durch vorhandene Lichtintensitätsreferenzwerte kann daraufhin die integrierte optische Dichte als Summe der Grauwerte aller Pixel bestimmt werden. Die gemessene integrierte optische Dichte ist äquivalent zum DNA-Gehalt der Zellen.

Zur Messung der eigentlichen Tumorzellen wurde eines der zwei nach Feulgen gefärbten Präparate verwendet. Aus diesem Präparat wurden mindestens 300 Tumorzellen vermessen. Nach Einstellen des Präparates wurde das Mikroskop zunächst kalibriert. In der Übersichtseinstellung konnte das gesamte Präparat sodann meanderförmig durchgemustert und geeignete Areale auffindig gemacht werden. Die Messung erfolgte mit dem 20x0,4 Objektiv. Das Bild wurde „eingefroren“ und die Messung gestartet. Die Zellen wurden nun automatisch kategorisiert und farblich markiert. Eine dunkelblaue Farbe entsprach einem DNA-Gehalt von 2c, hellblau 4c, hellgrün < 1,8c und gelb 2,2c-3,6c. Es war zu diesem Zeitpunkt möglich manuell Korrekturen vorzunehmen. So konnten die Zellkerngrenzen mit der linken Maustaste markiert und besser dargestellt werden. Artefakte oder zur Messung ungeeignete Zellen oder Zellüberlagerungen wurden von

der Messung ausgeschlossen. Konnten mindestens 300 Zellen zufriedenstellend vermessen werden, wurde der Vorgang beendet. Zur Messung der Referenzzellen wurde das zweite nach Feulgen gefärbte Präparat verwendet. Als Referenzzellen dienen Lymphozyten und Granulozyten mit einem normalen DNA-Gehalt von $2c$. Diese Zellen finden sich grundsätzlich in jedem Präparat, sollten aber auch zur internen Qualitätskontrolle gesondert untersucht werden. Das Referenzpräparat wurde zuvor unter den gleichen Bedingungen fixiert und gefärbt werden wie das Präparat, welches der Tumorzellmessung diente. Die Referenzzellen mussten bei der Messung gesondert mit der rechten Maustaste angeklickt werden und erschienen dann rotmarkiert. Die mittlere integrierte optische Dichte der Referenzzellen wurde als $2c$ Wert festgelegt, die Tumorzellen konnten nun in Bezug hierzu eingeteilt werden. Sobald die Vermessung von Tumorzellen und Referenzzellen abgeschlossen war, wurden die Ergebnisse in einem Histogramm dargestellt. Die Referenzzellkurve wurde zur besseren optischen Differenzierung blau dargestellt.

Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele aus unserer Messreihe. In Abbildung 5 kommt eine hypotetraploide Stammlinie bei $3,66c$ zur Darstellung. Insgesamt wurden 640 Zellen vermessen. Es finden sich 24 Zellen mit einem DNA-Gehalt von $> 5c$, jedoch keine Einzelzellen $> 9c$.

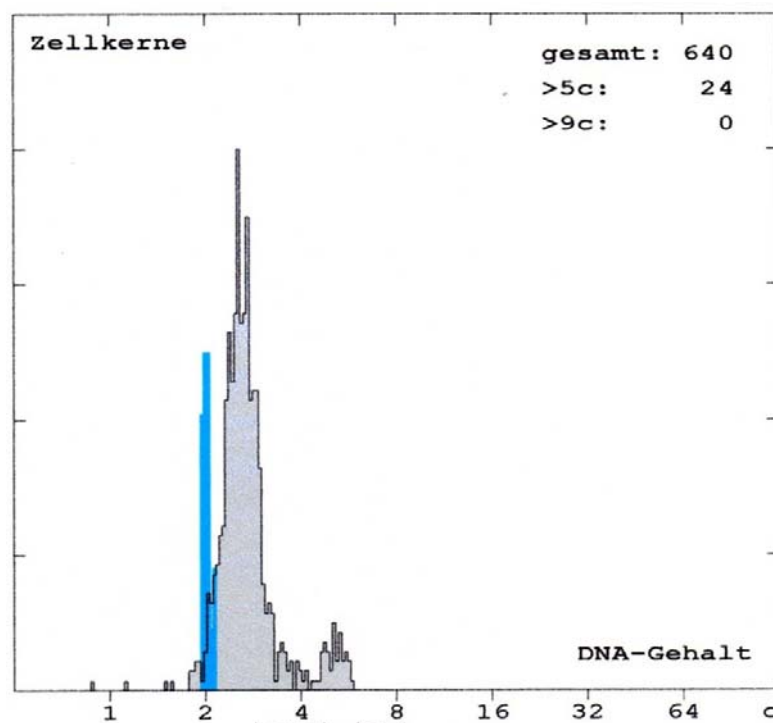


Abb. 5: Hypotetraploide Stammlinie bei $3,66c$.

Abbildung 6 zeigt durch das Softwareprogramm rot markierte Zellkerne deren Vermessung eine Einzelzellaneuploidie ergeben hat.

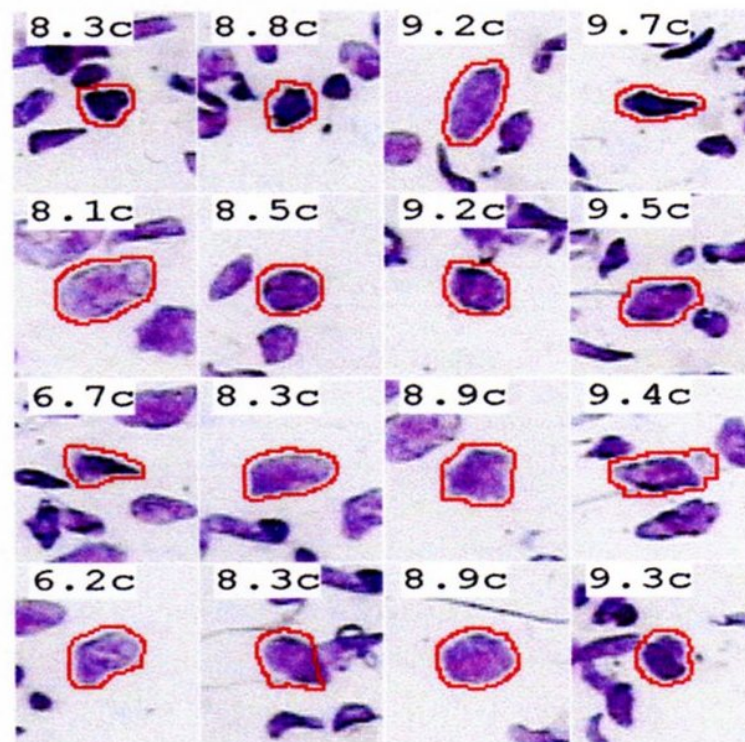


Abb. 6: Einzelzellen mit einem DNA-Gehalt von 6,2c bis 9,7c.

2.2.5 Interpretation der Histogramme

Die Interpretation der DNA-Bildzytometrie bzw. der Histogramme folgt den Richtlinien der European Society for Analytic Cellular Pathology (Haroske et al, 1998).

Das DNA-Histogramm dient der Darstellung des DNA-Gehaltes einer repräsentativen Anzahl von Zellkernen. Auf der Ordinate kann die Anzahl der gemessenen Zellkerne (n) und auf der Abszisse der relative DNA-Gehalt der Zelle ($c = \text{DNA-Gehalt des einfachen Chromosomensatz}$) abgelesen werden. Zellen mit gleichem DNA-Gehalt kommen in einem scharf begrenzten Peak zur Darstellung. Diploide, nichtproliferierende Gewebe, bilden diesen sogenannten G₀/G₁ Peak bei 2c. Das DNA-Histogramm kann zum einen die Wachstumstendenz einer Zellpopulation darstellen zum anderen eine Aneuploidie nachweisen. Nichttumoröses Gewebe befindet sich zum großen Teil in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus. Tritt ein Teil der Zellen jedoch aus der Teilungsruhe aus, gelangen sie über die S-Phase in die kurze G₂ und teilen sich in der Mitose. Während der S-Phase verdoppelt sich die DNA-Menge von 2c auf 4c. Bei Messung einer großen Zahl von

Zellkernen lassen sich diese DNA-Mengenverteilungen im Histogramm darstellen und geben Auskunft über die Proliferationsrate einer Zellprobe. Im Histogramm wird ein G2/M Peak sichtbar. Im Falle einer malignen Entartung einer Zelle, befinden sich mehr Zellen im Stadium der Proliferation. Außerdem kommt es zu einer Erhöhung der DNA-Menge in nicht proliferierenden Zellkernen. Der Häufigkeitssgipfel verschiebt sich dann in den aneuploiden Bereich (Al-Abadi, 2002).

Folgende definierte Begriffe werden zur Beschreibung eines Histogramms verwendet (Haroske et al., 1998, Böcking, 1998):

1. DNA-Stammlinie (STL): G0/G1-Phase-Fraktion einer proliferierenden Zellpopulation.
2. Stammlinienploidie: Modalwert einer DNA-Stammlinie in der Dimension c .
3. Modaler Wert: Häufigster Wert (Gipfel) eines DNA-Histogramms.
4. DNA-Euploidie: DNA-Verteilung von Zellpopulationen, die sich statistisch nicht von denen normaler (ruhender, proliferierender oder polyploider Zellen) unterscheidet.
5. DNA-Polyploidie: Vorkommen von DNA-Stammlinien in den Verdoppelungsregionen euploider Stammlinien (bei $4c$, $8c$, $16c$).
6. DNA-Aneuploidie: DNA-Verteilung von Zellpopulationen, die statistisch signifikant different von denen normaler (ruhender, proliferierender oder polyploider) Zellpopulationen sind.
7. DNA-Index: Modaler DNA-Wert eines Häufigkeitssgipfels, dividiert durch den Modalwert diploider Referenzzellen.

Nach Böcking liegt eine DNA-Diploidie vor, wenn die Stammlinie einen DNA-Gehalt zwischen $1,80c$ und $2,2c$ aufweist. Eine Probe wird als DNA-Polyploid bezeichnet, wenn die Stammlinie über $1,80c$ und unter $2,20c$ oder über $3,60c$ und unter $4,40c$ liegt. Eine DNA-Aneuploidie liegt vor bei einer abnormen Stammlinie unter $1,80c$ und über $2,20c$ oder unter $3,6c$ und über $4,40c$ und/ oder Werten über $9c$ (Böcking, 1998).

Durch die Bildzytometrie lassen sich außerdem Einzelzellaneuploidien nachweisen. Sie werden in $5c$ exceeding events ($5cEE$) und $9c$ exceeding events ($9cEE$) angegeben. Dabei entspricht die Anzahl der $5cE$ Events der Menge der Zellkerne mit einem DNA-Gehalt über $5c$ und die Anzahl der $9cEE$ der Menge der Zellkerne mit einem DNA-Gehalt von über $9c$ (Haroske et al., 2001).

In unserer Studie erfolgt die Malignitätsbeurteilung der colorektalen Lebermetastasen anhand des DNA-Index. Dieses Verfahren hat sich in unserer Klinik und einer kürzlich veröffentlichten Studie zur prognostischen Signifikanz des DNA-Index bei HCC bedingten Lebertransplantationen bewährt (Jonas et al., 2009).

Gemäß o.g. Definition, haben Zellen mit einem diploiden Karyotyp einen DNA-Index von 1,0. Entsprechend vorhergehender Untersuchungen sollen Tumoren mit einem DNA-Index $< 1,5$ den Tumoren mit einem DNA-Gehalt von $> 1,5$ gegenübergestellt werden. Es wird angenommen, dass Tumoren mit einem DNA-Index von $< 1,5$ eine bessere Prognose aufweisen.

2.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten kam das Analysesoftwareprogramm SPSS Statistics Version 16 für das Betriebssystem Microsoft Windows zur Anwendung.

Um Häufigkeitsunterschiede bestimmter Merkmale auf ihre Signifikanz zu überprüfen, verwendeten wir den **Chi-Quadrat-Test**.

Die Überlebenszeitanalyse gelang mit der **Kaplan-Meier-Methode**. Bei dieser Methode wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt. Die Methode ist im speziellen dann von Vorteil, wenn Patienten wie in der hier vorliegenden Studie unterschiedliche Beobachtungszeiträume haben. Auch zensierte Beobachtungszeiten fließen in die Berechnung mit ein. Von einer Zensierung spricht man, wenn ein Ereignis (zum Beispiel der Tod) bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht eingetreten ist, wenn ein konkurrierendes Ereignis (zum Beispiel Tod durch einen Unfall und nicht die untersuchte Krankheit) eingetreten ist oder der Patient „verloren“ gegangen ist („lost to follow-up“). In einem Diagramm wird die Überlebenszeit auf der x-Achse und die Überlebenswahrscheinlichkeit auf der y-Achse aufgetragen. So können spezifische Überlebenszeiten bzw. Überlebensraten abgelesen werden (Ziegler et al., 2007).

Für die Vergleichsanalyse einzelner Überlebenskurven kam der **Log-Rank-Test** zur Anwendung. Mit dem Test lässt sich überprüfen, ob in zwei oder mehr Gruppen ein unterschiedliches Mortalitätsrisiko besteht, bzw. welche Signifikanz statistische Unterschiede haben (Ziegler et al., 2007).

Nachdem **univariate** Analysen zwei Gruppen mit jedoch nur einer Variablen untereinander vergleichen, kommen **multivariate** Verfahren zum Einsatz, wenn mehrere Einflussvariable miteinander verglichen werden sollen. Hierzu wurde von uns die Regressionsanalyse nach Cox verwendet. Mit diesem Verfahren lässt sich vorhersagen, wie unabhängige Variablen (Kovariaten) die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen (Ziegler et al., 2007).

In allen Test gilt eine Irrtumswahrscheinlichkeit (**p**) von $p > 0,05$ als nicht signifikant, $p \leq 0,05$ als signifikant, $p \leq 0,01$ als sehr signifikant und $p \leq 0,001$ als höchst signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristik

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Daten von insgesamt 161 Patienten mit der Diagnose kolorektaler Lebermetastasen ausgewertet. Von diesen 161 Patienten waren 99 (61,5%) männlichen und 62 (38,5%) weiblichen **Geschlechts**. Alle Patienten erhielten im Zeitraum von September 1999 bis Dezember 2006 eine chirurgische Leberteilresektion. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 10 Jahre bis einschließlich Januar 2010.

Das mediane **Erkrankungsalter** des Patientenkollektivs betrug 63 Jahre. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Operation 33 Jahre, der älteste Patient 80 Jahre alt (Abb. 7).

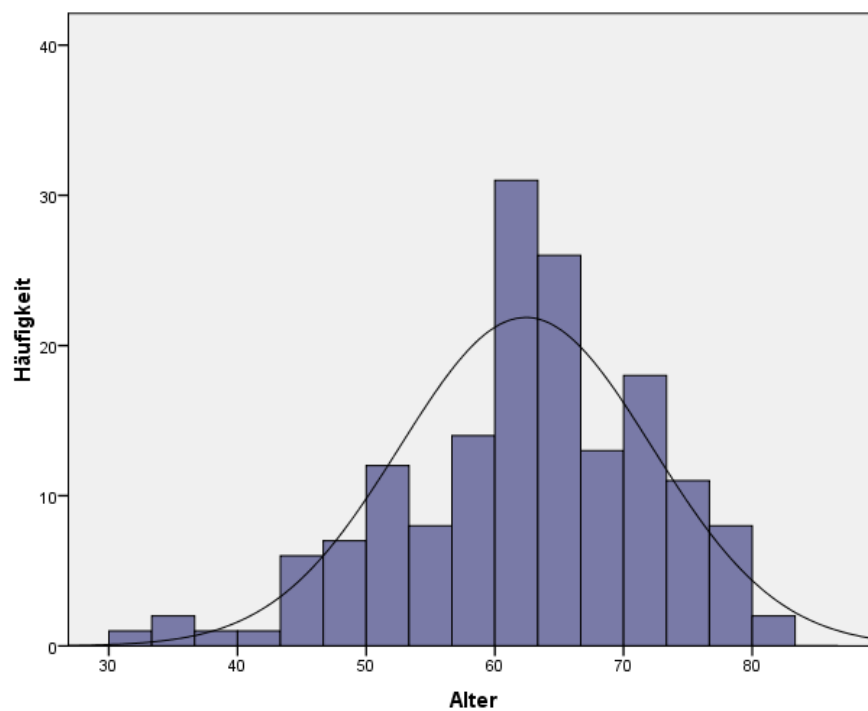


Abb. 7: Alter zum Zeitpunkt der Operation

Das entscheidende Kriterium für die Auswertung unserer Studie, war die Länge des Überlebens nach Resektion der kolorektalen Lebermetastasen. Am Ende des Beobachtungszeitraums der Studie waren 61,5% (n=99) der Patienten verstorben. 38,5 % (n=62) der Studienteilnehmer lebten. In der folgenden Kaplan-Meier-Kurve ist das kumulierte Überleben aller Studienteilnehmer dargestellt (Abb. 8). Für unser Patientenkollektiv ergibt sich eine geschätzte 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 42%. Das mediane Überleben beträgt 3,8 Jahre (Konfidenzintervall (KI) 2,65-4,98).

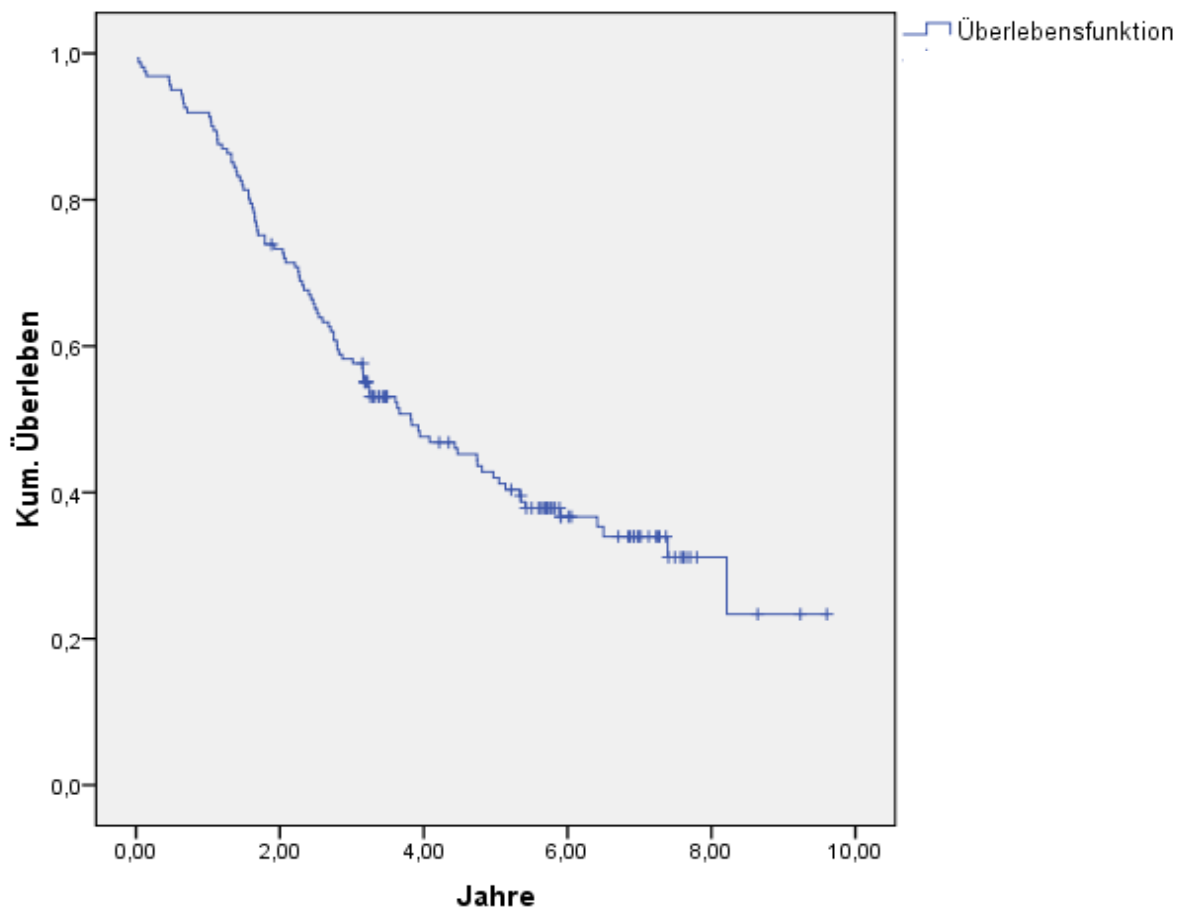


Abb. 8: Kumuliertes Überleben bezogen auf alle Studienteilnehmer

In die Untersuchungen eingeschlossen wurden Patienten mit Lebermetastasen dessen **Primarius** im Rektum oder Kolon lag. Wir nahmen eine Einteilung in Karzinome des Colon ascendens und Colon transversum, Colon descendens und Colon sigmoideum sowie in Rektumkarzinome vor. Nur 6,8% (n=11) der Patienten litten unter einem Karzinom des Colons ascendens oder Colon

transversum. In 23% (n=37) lag der Primarius im Colon descendens oder Colon sigmoideum. In den allermeisten Fällen, nämlich zu 70,2% (n=113) war ein Rektumkarzinom Ausgangspunkt der Metastasierung (Abb. 9).

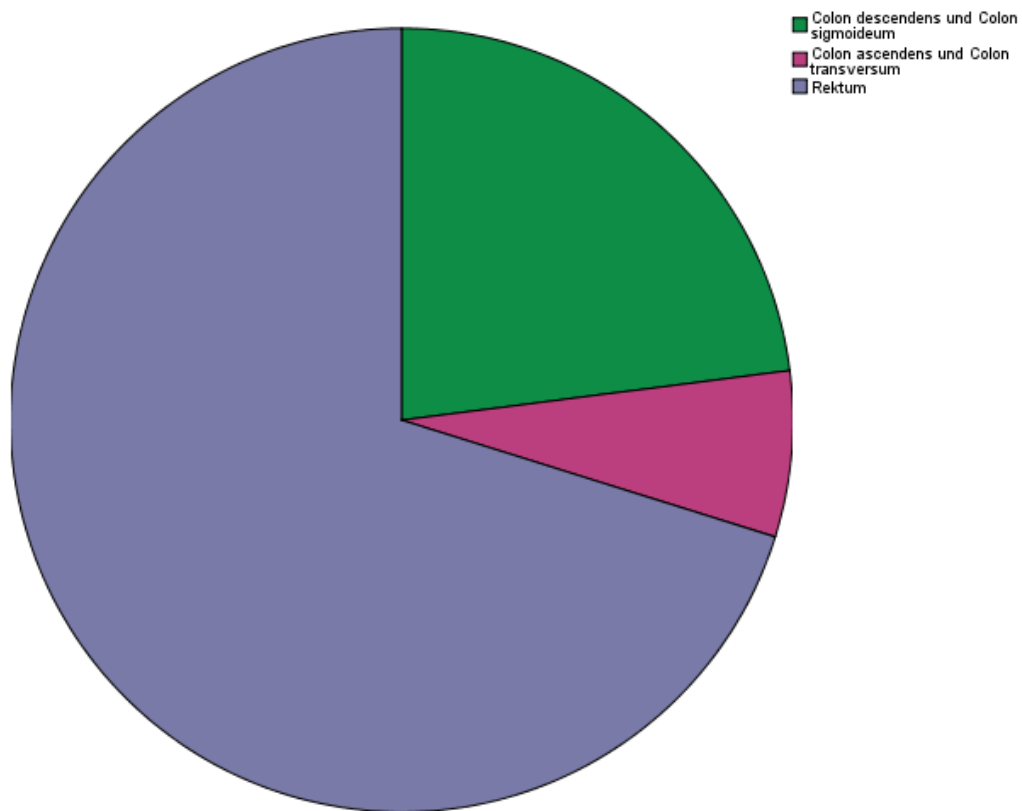


Abb. 9: Lage des Primärtumors

Als wichtige klassische Prognoseparameter wurden die Größe des Primärtumors, der Lymphknotenbefall und die Fernmetastasierung, kategorisiert anhand des **TNM-Stadiums**, dokumentiert.

Von den diesbezüglich auswertbaren Patienten, befanden sich 2,5% (n=4) im Stadium pT1, 8,1% (n=13) im Stadium pT2, 73,3% (n=118) im Stadium pT3 und 5,6% (n=9) der Fälle im Stadium pT4 (Abb. 10).

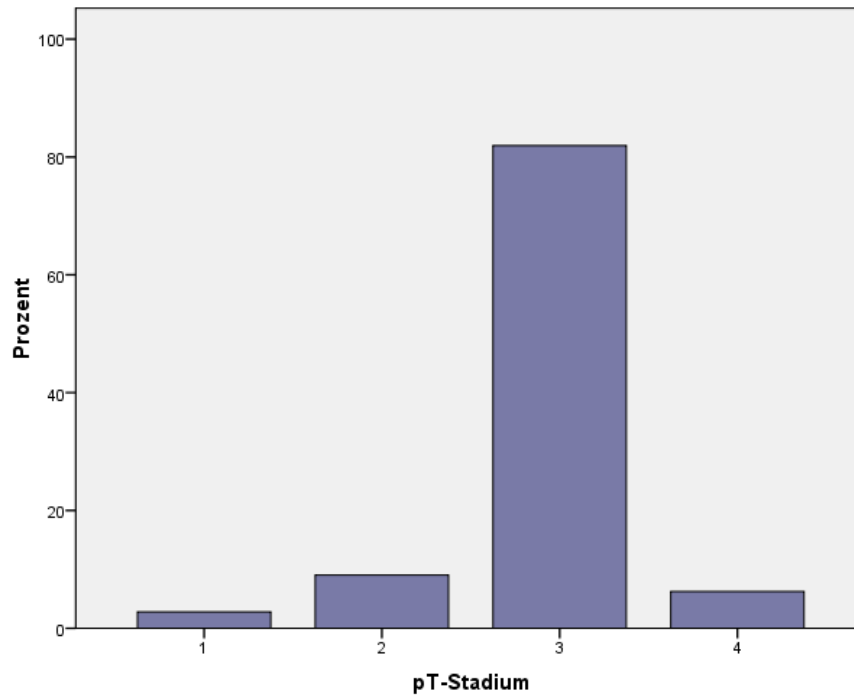


Abb. 10: Verteilung des pT-Stadiums Primärtumor

Als relativ ausgeglichen kann das Verhältnis zwischen den N-Stadien bezeichnet werden. Im Stadium pN0 befanden sich 28% (n=45) der Patienten, im Stadium pN1 32,3% (n=52) und im Stadium pN2 28,6% (n=46) der ausgewerteten Fälle (Abb. 11).

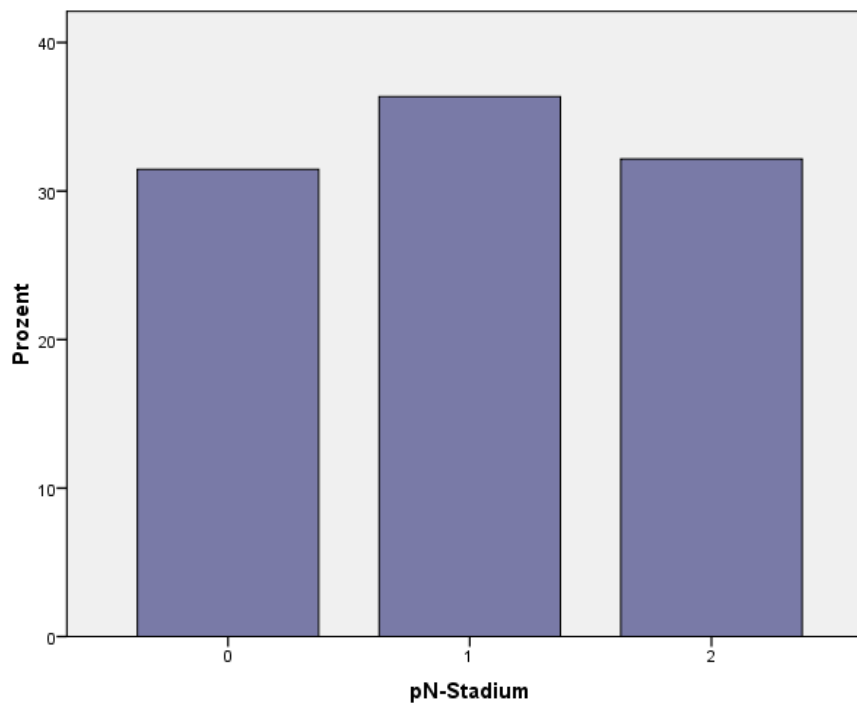


Abb. 11: Verteilung des pN-Stadiums Primärtumor

Bezüglich der Fernmetastasierung des Primärtumors, fand sich zu 49,1% (n=79) ein M1 Stadium. In 38,5% (n=62) der Fälle konnten zunächst keine Fernmetastasen (M0) nachgewiesen werden (Abb. 12).

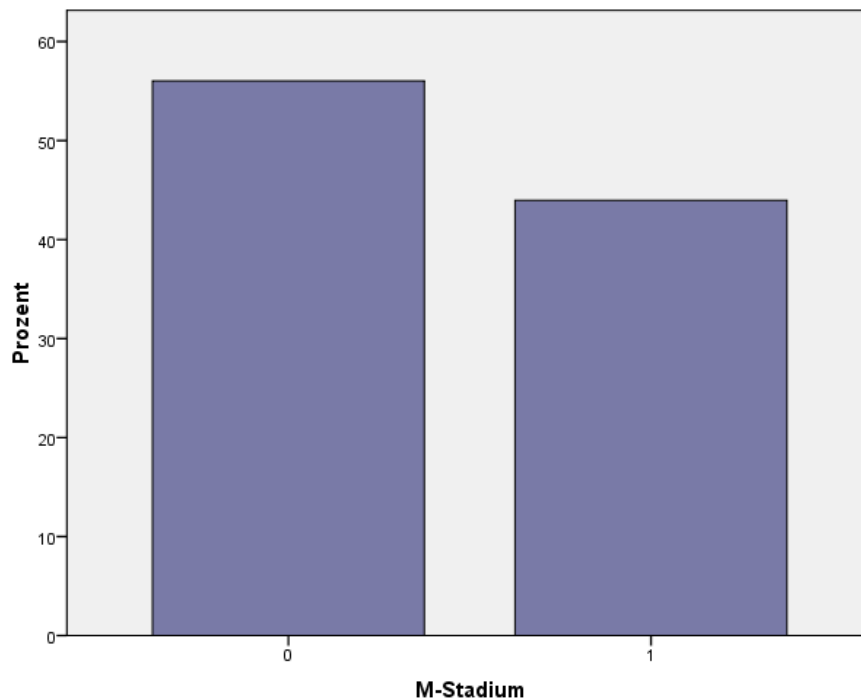


Abb. 12: Verteilung des M-Stadiums Primärtumor

Als weiterer Parameter wurden die **Anzahl der Tumorknoten** (im resezierten Leberpräparat) in die Auswertungen aufgenommen. So konnten bei 41% (n=66) der Patienten lediglich ein Tumorknoten und bei 18% (n=29) zwei Tumorknoten nachgewiesen werden. Drei und vier Metastasen gab es in 9,9% (n=16) bzw. 6,2% (n=10) der Fälle. 4,3% (n=7) der Patienten hatten fünf, 3,1% (n=5) sechs Tumorknoten. Letztendlich wiesen 11,1% (n=18) der Patienten mit mehr als sieben Metastasen multiple Knoten auf (Tab. 12).

Knotenanzahl	Prozent (%)	Fälle (n)
1	41	66
2	18	29
3	9,9	16
4	6,2	10
5	4,3	7
6	3,1	5
7 und mehr	11,1	18

Tab. 9: Anzahl Tumorknoten

Die maximale **Größe der Lebermetastasen** je Patient variierte von einem von minimal 5 bis maximal 261 mm. Der Median betrug 48,5 mm. Zu 61,2% (n=97) war jeweils ein Leberlappen involviert, in 31,1 (n=50) der Fälle waren beide Leberlappen von Metastasen befallen.

Als weiteres prognostisches Kriterium kam der histologisch ermittelte **R-Status** zur Auswertung. Bei 71,4% (n=115) der Patienten konnte postoperativ ein R0-Status erreicht werden. In 10,6% (n=17) der Fälle wurde der Tumor mikroskopisch nicht im Gesunden entfernt (R1) und zu 6,2% (n=10) war makroskopisch ein Tumorrest (R2) detektierbar (Abb. 13).

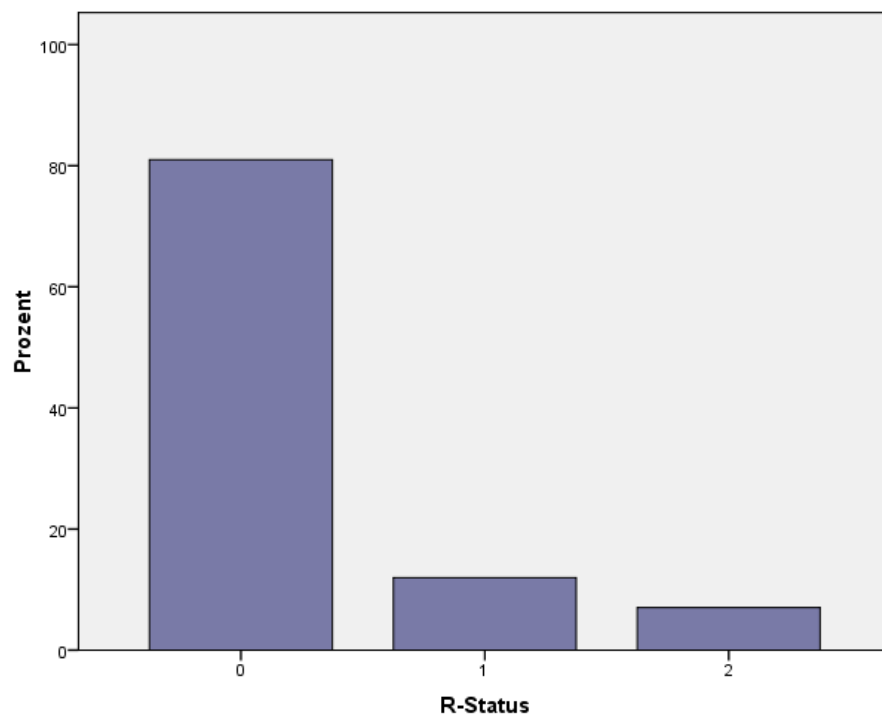


Abb. 13: R-Status

Bezüglich des **histopathologischen Gradings** fanden sich 67,1% (n=108) Tumoren im G2-Stadium, 5% (n=8) im Stadium G3 und 6,2% (n=10) der Tumoren im Stadium G4.

Zur besseren Einschätzung der Prognose ermittelten wir außerdem den **Fong** sowie den **Nordlinger Score**. Die Vorgehensweise zur Berechnung der Scores wurde bereits in Kapitel 1.3.2 erläutert. Eine Übersicht über die prozentuale Verteilung zeigen folgende Diagramme (Abb. 14 und 15). Entsprechend den Empfehlungen von Nordlinger und Mitarbeitern kann anhand der errechneten Punktwerte eine prognostische Einschätzung vorgenommen werden (Nordlinger et al., 1996). Bezogen auf unsere Studien lagen 6,8% (n=11) der Patienten im prognostisch günstigen Bereich von 0-2 Punkten. 36,6% (n=59) hatten ein mittleres Rezidivrisiko von 3-4 Punkten und bei 29,8% (n=64) Patienten konnte bei einem Punktwert von 5-7 von einer schlechten Prognose ausgegangen werden. Fong et al. sprechen Patienten mit bis zu 2 Punkten im Fong Score eine gute Prognose zu (Fong et al., 1999). In diesem Bereich lagen in unserer Untersuchung 31,8%. Aufgrund unvollständiger CEA-Werte konnte eine Auswertung des Fong Scores jedoch lediglich für 94 Patientenfälle vorgenommen werden.

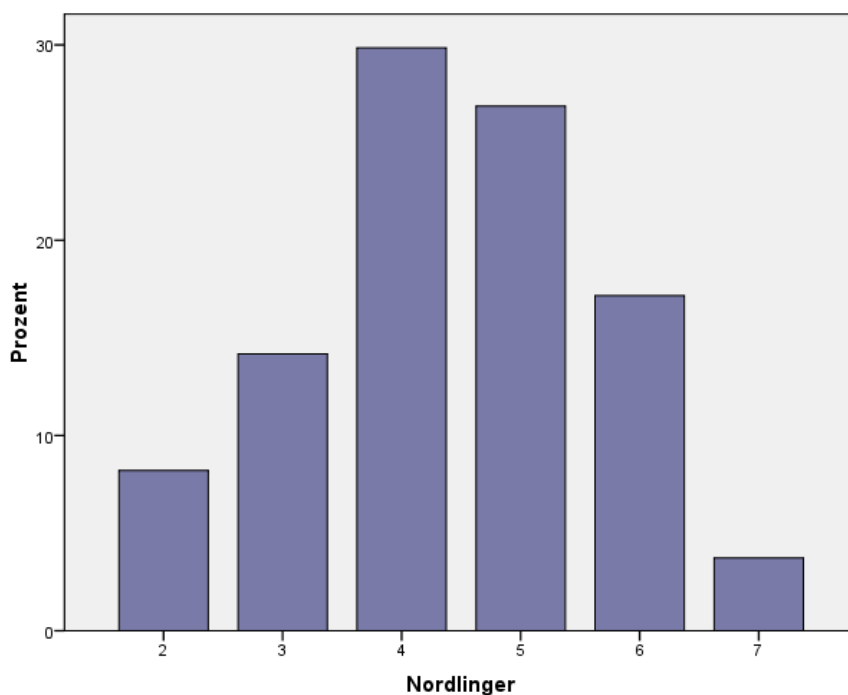


Abb. 14: Nordlinger Score

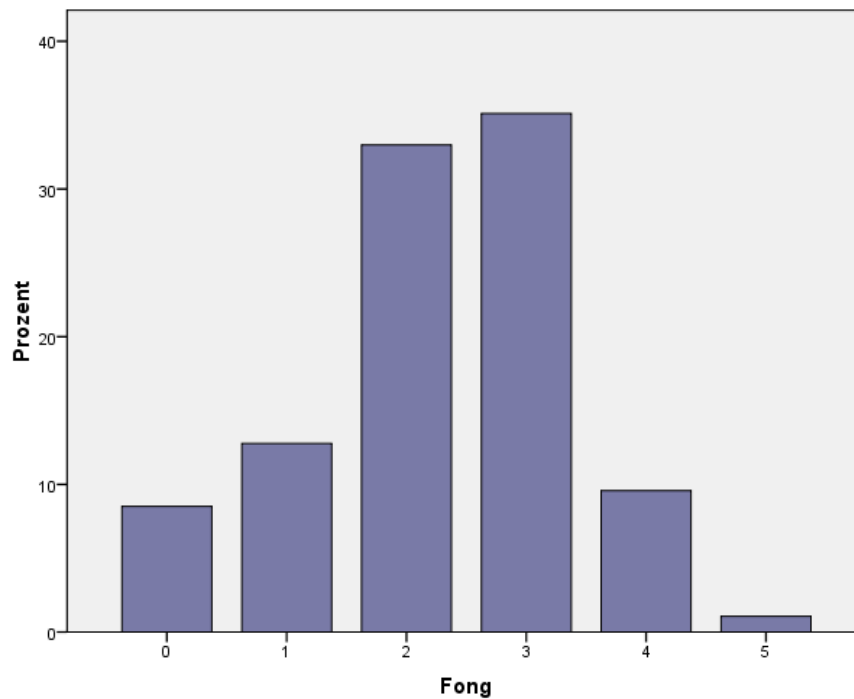


Abb. 15: Fong-Score

Zur Beurteilung des durch unsere photozytometrischen Untersuchungen ermittelten **DNA-Indexes** erfolgte eine Einteilung in eine Gruppe mit einem DNA-Index $< 1,5$ und eine Gruppe mit einem DNA-Index $> 1,5$. Hierbei hatten 52,8% ($n=85$) unserer für diesen Faktor auswertbaren Patienten einen DNA-Index unter 1,5 und 39,8% ($n=64$) einen DNA-Index über 1,5 (Tab. 10).

DNA-Index	Prozent (%)	Fälle (n)
DNA-Index $< 1,5$	52,8	85
DNA-Index $> 1,5$	39,8	64

Tab. 10: DNA-Index nach Häufigkeiten

3.2 Korrelation klassischer Prognoseparameter zum Überleben

Klassische Prognosefaktoren haben das Ziel den individuellen Krankheitsverlauf bei hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen vorherzusagen. Folgend soll die prognostischen Relevanz ausgewählter Faktoren in Korrelation zum Überleben geprüft werden. Hierzu wird die Wahrscheinlichkeit für den Tod zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet und anhand von Kaplan-Meier-Kurven graphisch dargestellt.

3.2.1 Alter

Um die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Alters zu betrachten, nahmen wir zunächst eine Einteilung des Kollektivs in Patienten bis 60 Jahre und Patienten über 60 Jahre vor. Bezogen auf diese beiden Gruppen ergibt sich für Patienten unter 60 Jahren eine 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) von 41,9% und für die Gruppe von Patienten über 60 Jahre eine 5-JÜR von 42%. Das mediane Überleben beträgt in beiden Gruppen 3,8 Jahre. Der Einfluss des Alters auf das Überleben ist ohne statistische Relevanz ($p = 0,81$).

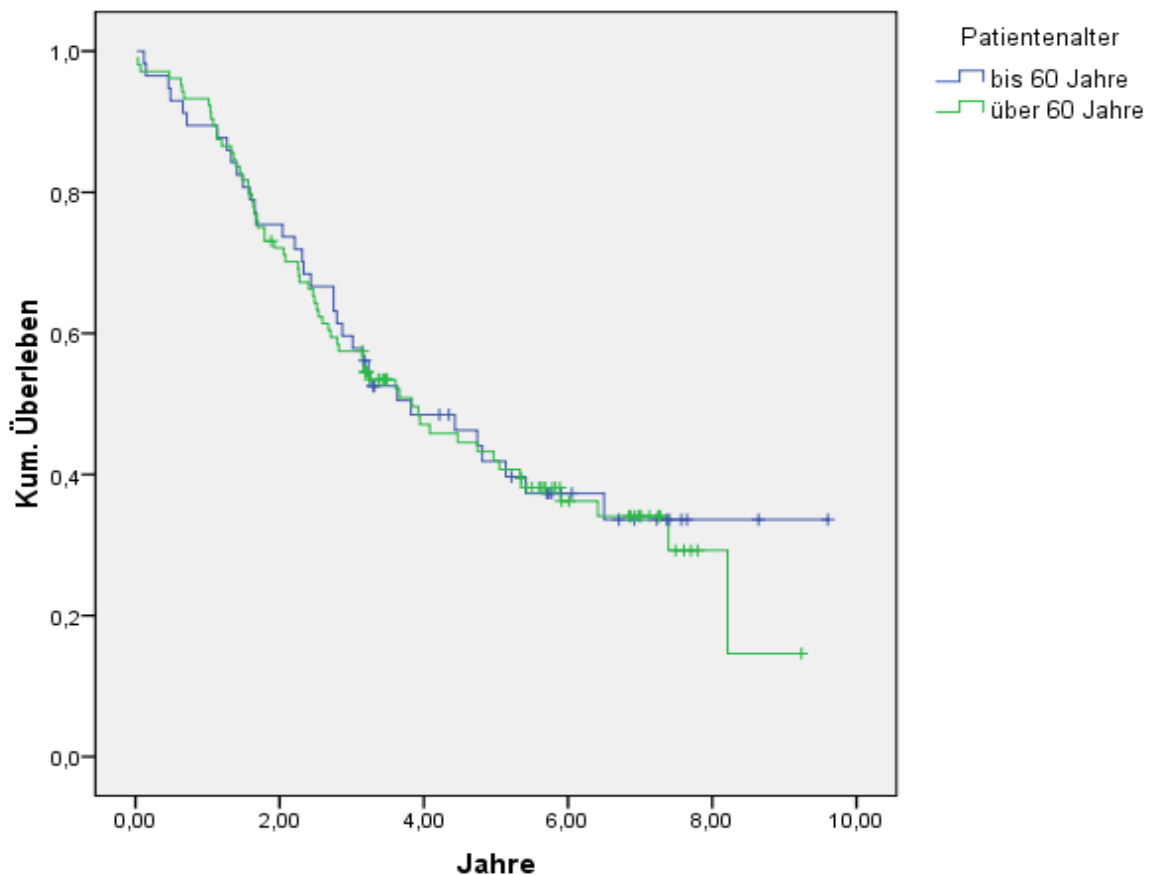


Abb. 16: Darstellung des Alters bezogen auf das kumulierte Überleben

3.2.2 Geschlecht

Bei Betrachtung der Verteilung des Geschlechts bezogen auf das Überleben ergibt sich eine bessere 5-JÜR für weibliche Patienten mit hepatisch metastasiertem kolorectalen Karzinom als für männliche Patienten. Nach fünf Jahren liegt die Wahrscheinlichkeit zu Leben für Frauen bei 47,1% und für Männer bei 38,4%. Das mediane Überleben beträgt für weibliche Patienten 4,4 Jahre (95% KI 2,00-6,86) sowie für männliche Patienten 3,6 Jahre (95% KI 2,79-4,46). Auch hier zeigt jedoch statistisch keine Signifikanz ($p = 0,38$) (Abb. 17).

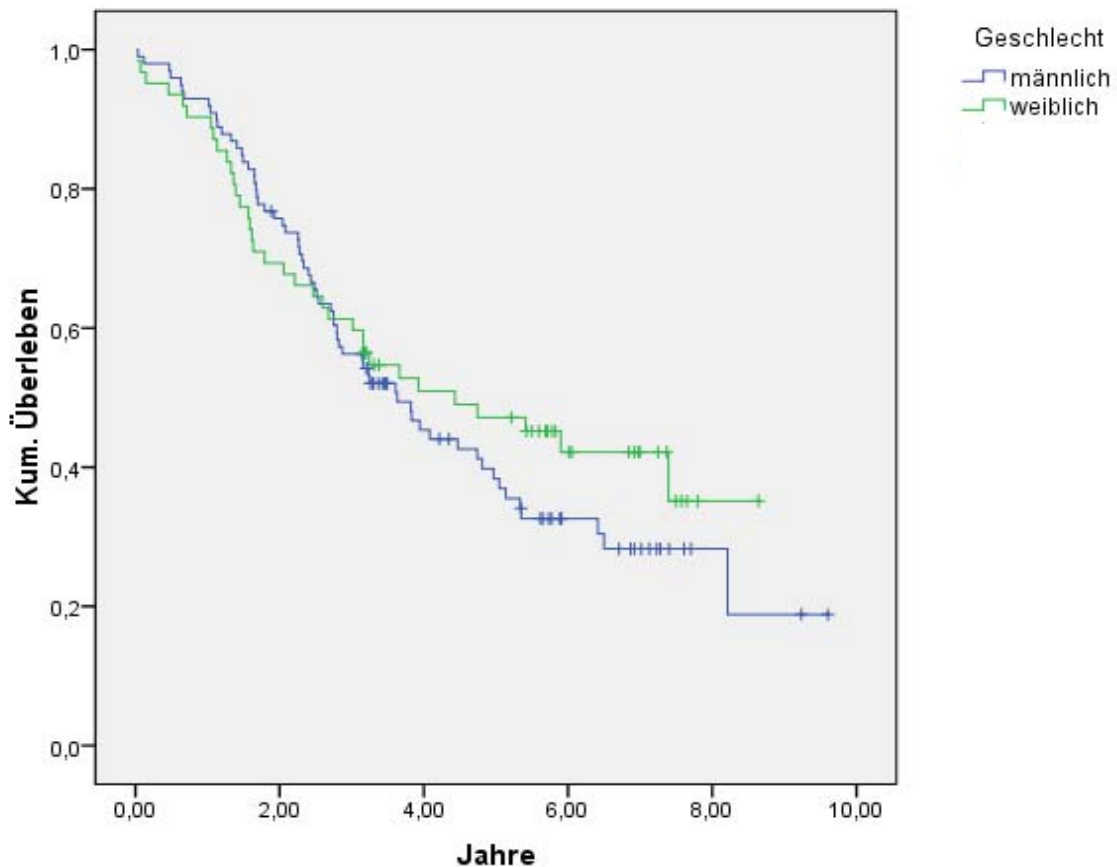


Abb. 17: Darstellung der Geschlechtsverteilung bezogen auf das kumulierte Überleben

3.2.3 T-Stadium

Betrachtet man das T-Stadium, d.h. die Tumorgroße des Primärtumors in Bezug auf das kumulierte Überleben zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stadien T1 bis T4 ($p = 0,25$). Die 5-JÜR für T1-Tumore beträgt 66%, für das Stadium T2 76% und für das T3-Stadium 38,1%. Liegt ein Stadium T4 vor beträgt die Wahrscheinlichkeit fünf Jahre zu Überleben 53,3%. (Abb. 18)

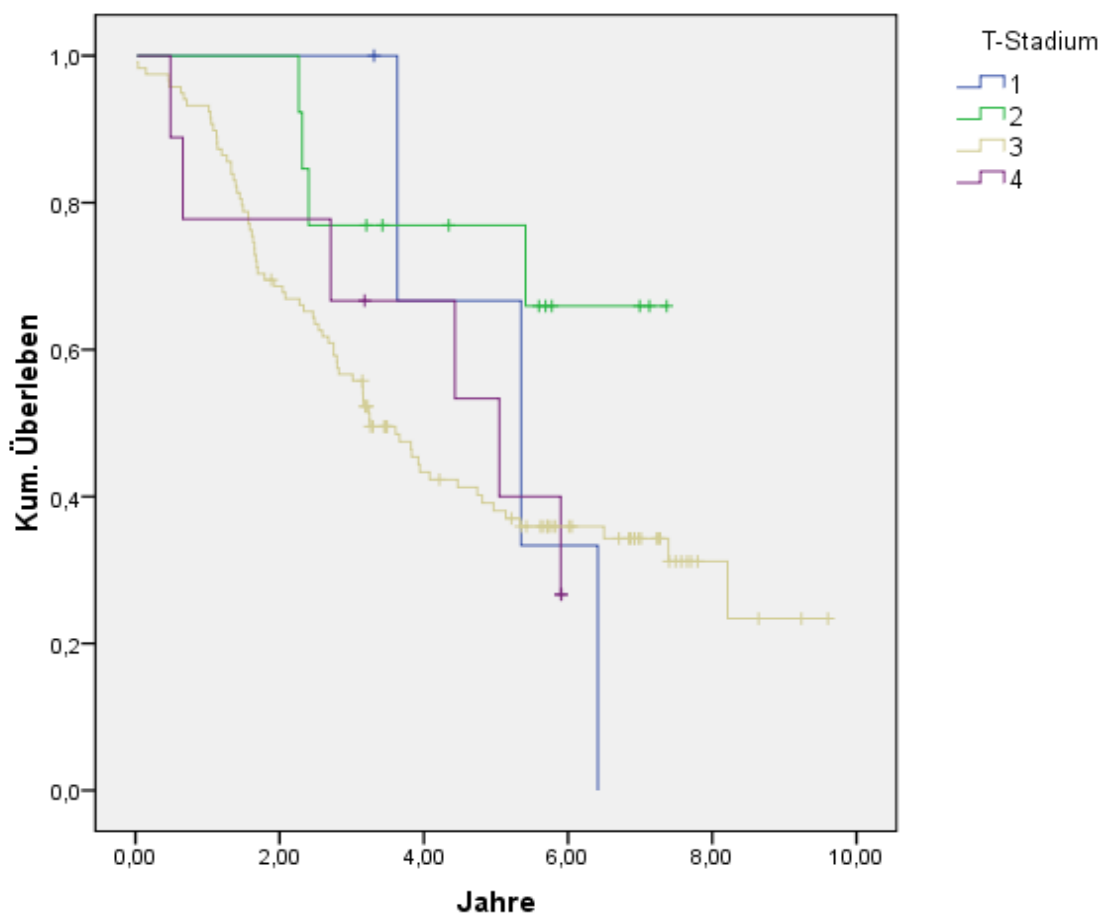


Abb. 18: Darstellung des T-Stadiums bezogen auf das kumulierte Überleben

3.2.4 N-Stadium

Die Anzahl der regionären Lymphknotenmetastasen des Primärtumors kategorisiert anhand des N-Stadiums der TNM-Klassifikation zeigen in Bezug auf das Überleben signifikant unterschiedliche Überlebenswahrscheinlichkeiten. So ergibt sich im Stadium N0, d.h. wenn keine regionären Lymphknotenmetastasen vorliegen eine 5-JÜR von 55% und ein medianes Überleben von 5,1 Jahren (95% KI 3,33-6,93). Im Stadium N1, d.h. bei bis zu 3 parakolischen bzw. pararectalen Lymphknotenmetastasen zeigt sich eine 5-JÜR von 51,7%. Das mediane Überleben beträgt 5,3 Jahre. Liegt ein T3 Stadium vor, beträgt die Wahrscheinlichkeit 5 Jahre zu überleben 23% bei einem medianen Überleben von 2,4 Jahren (95% KI 1,55-3,37). Der Log-Rank-Test ergibt $p = 0,001$, das Ergebnis kann damit als höchst signifikant bezeichnet werden (Abb. 19).

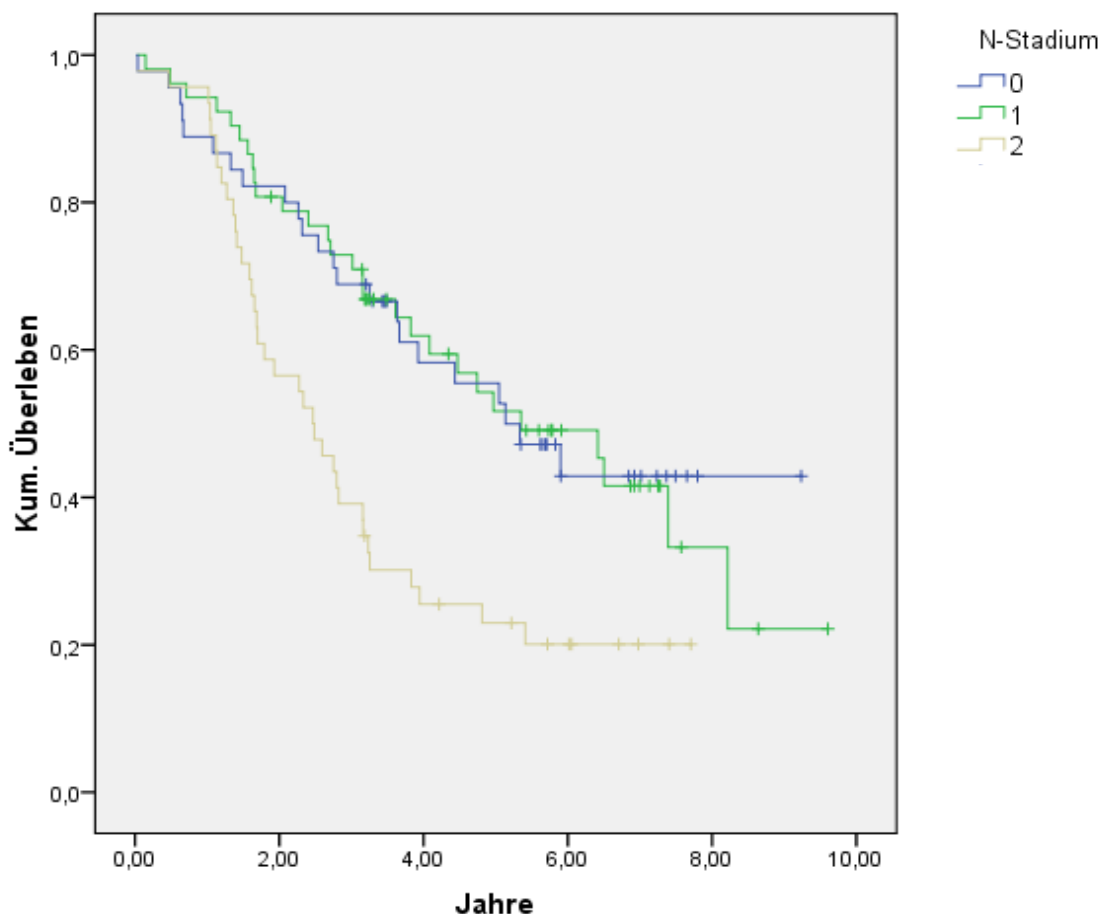


Abb. 19: Darstellung des N-Stadiums bezogen auf das kumulierte Überleben

3.2.5 M-Stadium

Betrachtet man das M-Stadium des Primärtumors in Bezug auf das kumulierte Überleben, so findet man keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten die sich zu Beginn der Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom im Stadium M0 befanden, d.h. bei denen eine metachrone Lebermetastasierung vorlag, im Vergleich zu Patienten mit dem Stadium M1 im Sinne einer synchronen hepatischen Metastasierung ($p = 0,59$). Im Stadium M0 lässt sich eine 5-JÜR von 40,4% nachweisen. Im Stadium M1 überleben Patienten 5 Jahre mit einer Wahrscheinlichkeit von 47,9%. Das mediane Überleben beträgt 3,6 (95% KI 2,77-4,54) bzw. 4,8 Jahre (95% KI 2,84-6,77) (Abb. 20).

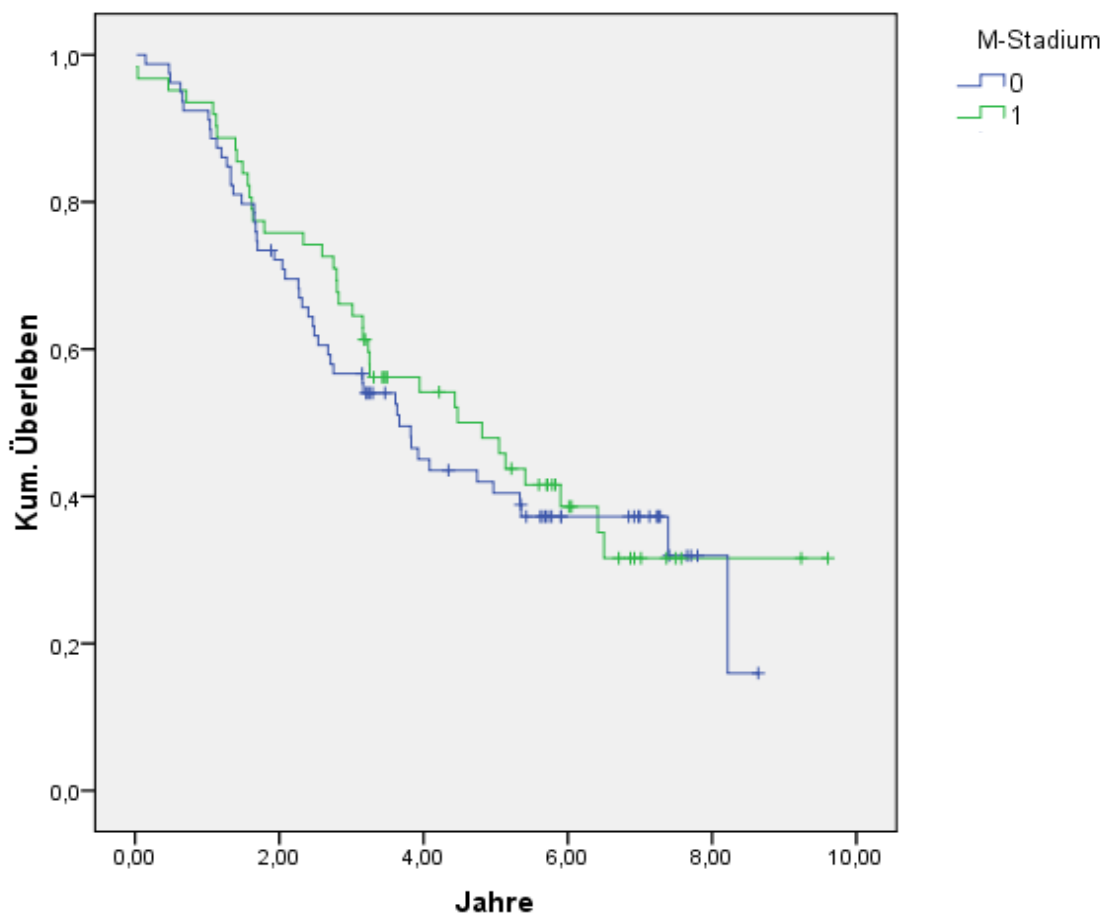


Abb. 20: Darstellung des M-Stadiums bezogen auf das kumulierte Überleben

3.2.6 R-Status

Bezüglich des nach der Leberresektion pathologisch untersuchten R-Status, ergibt sich für vollständig im Gesunden entfernte Tumoren (R0) eine 5-JÜR von 41,5%. Ist der Tumor mikroskopisch nicht im Gesunden entfernt (R1) ist die Überlebenschance nach 5 Jahren noch 45,9%. Konnten die Metastasen makroskopisch nicht im Gesunden entfernt werden (R2), ergibt sich eine 5-JÜR von 22,2%. Das mediane Überleben beträgt 3,6 (95% KI 2,61-4,70), 4,9 (95% KI 1,57-8,35) bzw. 2,4 Jahre (95% KI 0,017-4,78). Der Einfluss auf das Überleben ist ohne statistische Relevanz ($p = 0,61$) (Abb. 21).

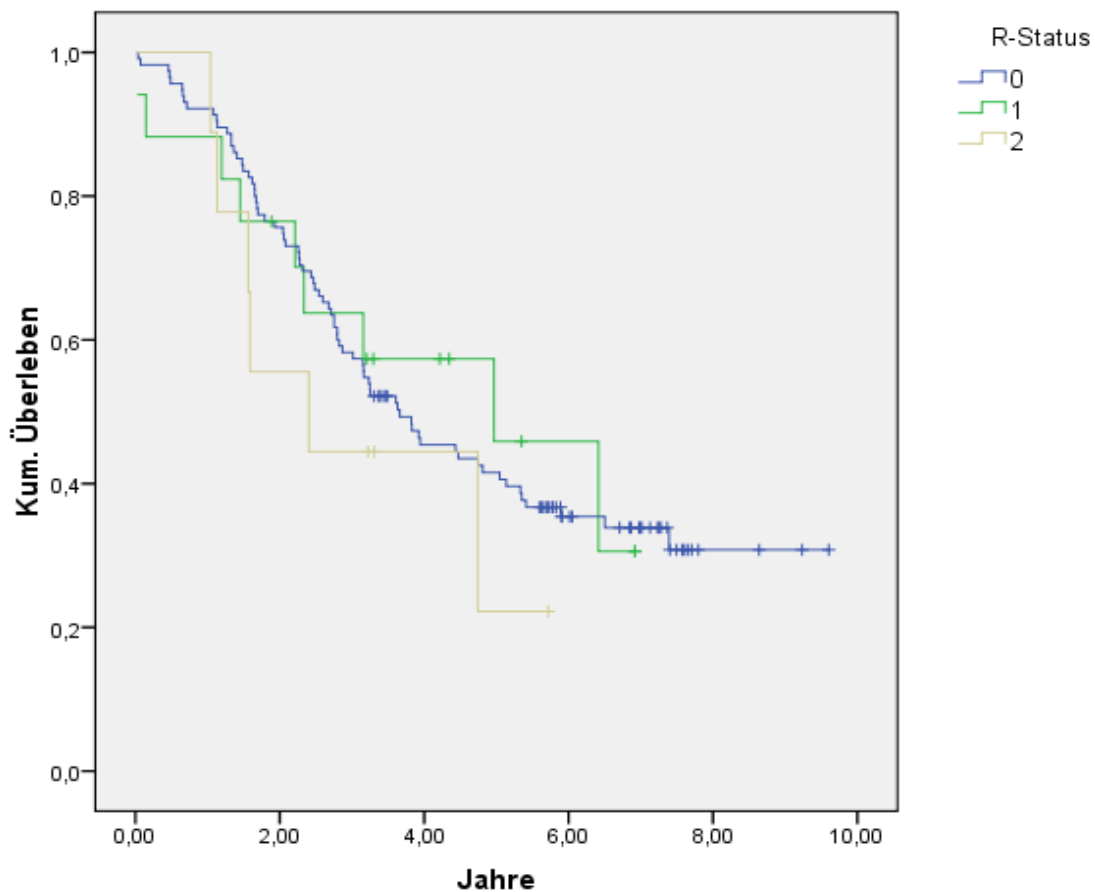


Abb. 21: Darstellung des R-Status bezogen auf das kumulierte Überleben

3.2.7 Anzahl der Tumorknoten

Um die Anzahl der Tumorknoten in Bezug auf das Überleben zu untersuchen, nahmen wir zunächst eine Einteilung in 2 Gruppen vor. In die erste Kategorie fielen Patienten mit einer Tumoranzahl von 1 – 3 Tumorknoten und in die zweite Kategorie Patienten mit mehr als 3 Tumorknoten. Die Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit durch die Kaplan-Meier-Methode zeigt so für Patienten mit 1 – 3 Tumorknoten eine 5-JÜR von 46,5% sowie für Patienten mit mehr als 3 Tumorknoten eine 5-JÜR von 26,6%. Das mediane Überleben beträgt für die erste Gruppe 4,7 Jahre (95% KI 3,49-6,00) und für die zweite Gruppe 2,7 Jahre (95% KI 1,65-3,94). Dieser Unterschied kann statistisch als knapp signifikant bezeichnet werden ($p = 0,05$) (Abb. 22).

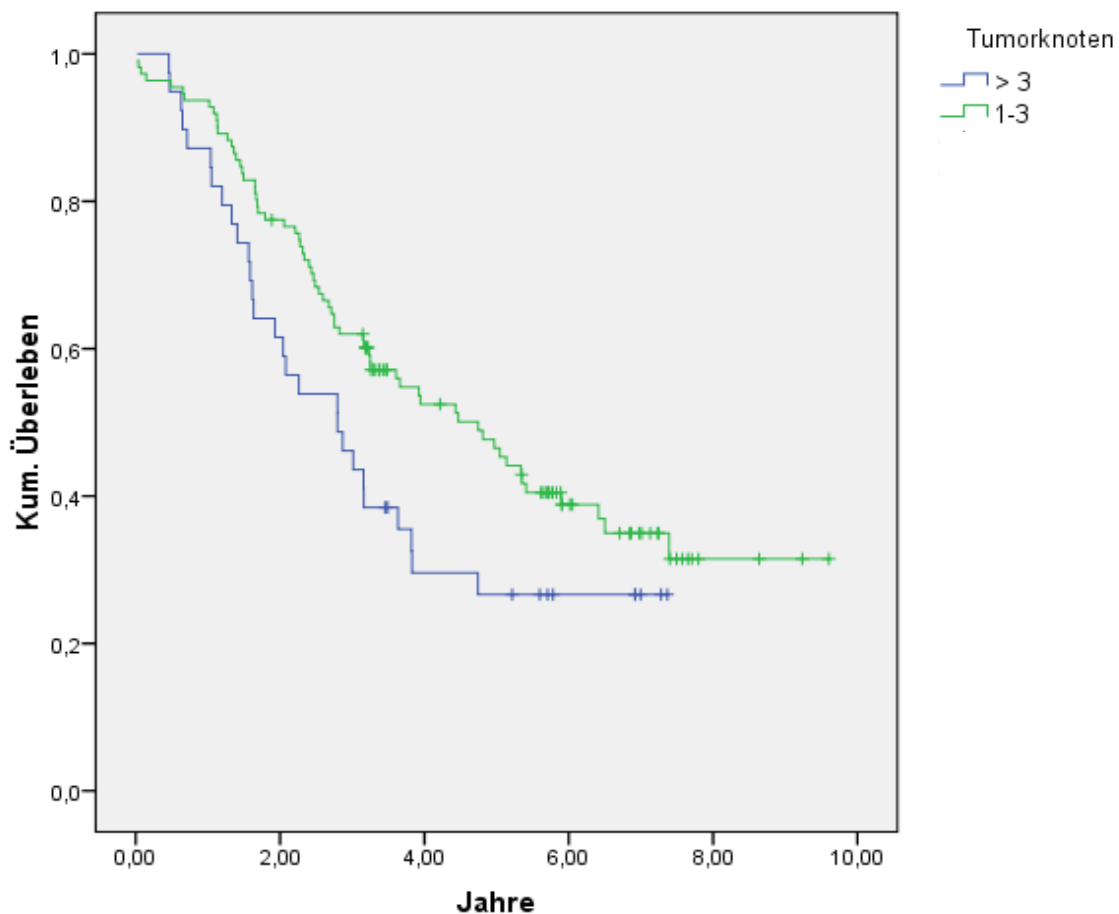


Abb. 22: Darstellung der Tumorknotenanzahl bezogen auf das kumulierte Überleben

3.2.8 Größe der Tumorknoten

Auch in Bezug auf die maximale Größe der Lebermetastasen bildeten wir für unsere statistische Analyse zwei Gruppen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit einer maximalen Tumorgöße von bis zu 5 cm (einschließlich) wird der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit einer Tumorknotengröße von mehr als 5 cm gegenübergestellt. Die 5-JÜR für Patienten mit einer Tumorknotengröße unter 5 cm beträgt 46,4% bei einem medianen Überleben von 4,7 Jahren (95% KI 2,62-6,86). Patienten mit einer Tumorgöße von mehr als 5 cm überleben die ersten 5 postoperativen Jahre mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 36,9%. Das mediane Überleben beträgt hier 3,6 Jahre (95% KI 2,64-4,57). Trotzdem erreicht der Unterschied statistisch keine Signifikanz ($p = 0,08$) (Abb. 23).

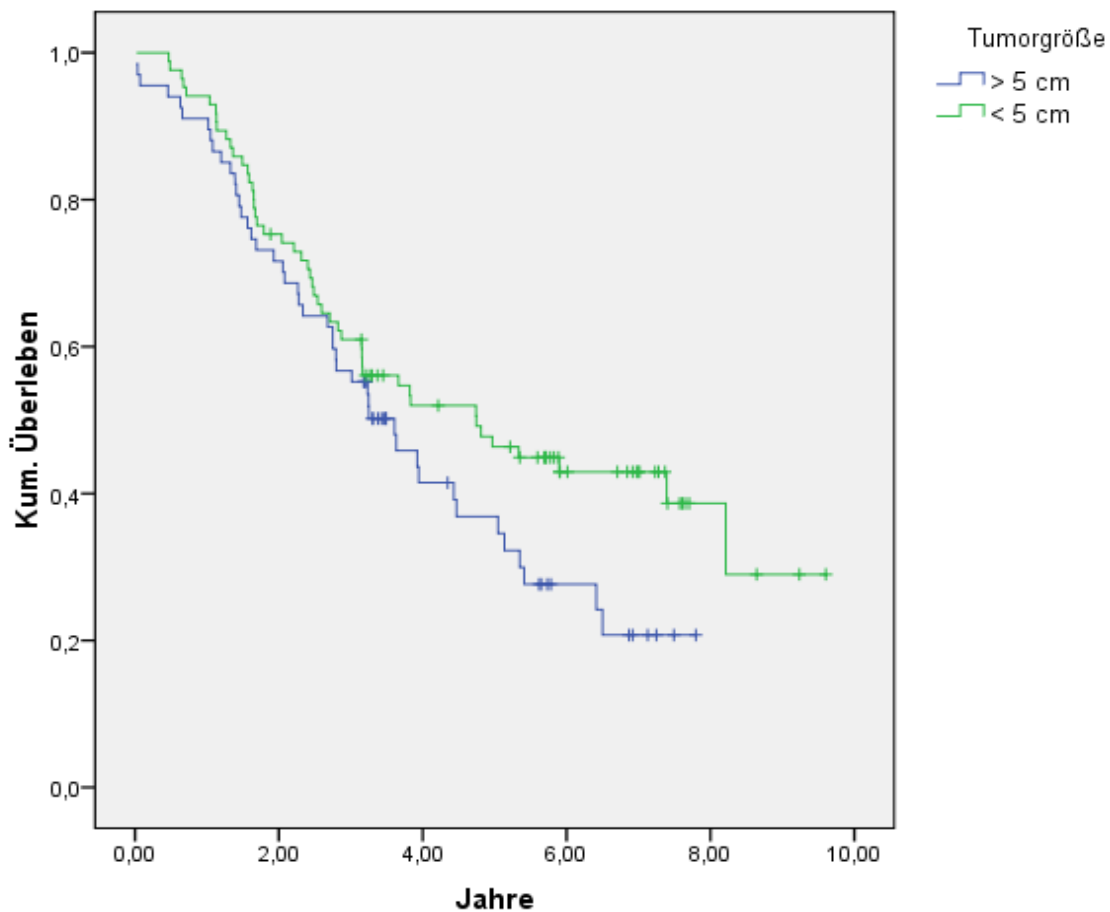


Abb. 23: Darstellung der Tumorknotengröße in Bezug auf das kumulierte Überleben

3.2.9 Fong Score

Die Einschätzung der Prognose anhand des Fong-Scores erfolgt durch ein fünf Punkte System. Für unsere Berechnungen bildeten wir wiederum zwei Gruppen und verglichen Patienten mit bis zu 3 Punkten mit Patienten die in dem postoperativen Prognosescore 4-5 Punkte erzielten. Patienten mit einem Punktwert von bis zu 3 erzielen so eine 5-JÜR von 44,6%, während Patienten über 3 Punkten eine 5-JÜR von lediglich 15% zugesprochen werden kann. Das mediane Überleben beträgt bei 1-3 Punkten 3,6 Jahre (95% KI 1,70-5,62) gegenüber 1,6 Jahren (95% KI 0,42-2,80) bei 4-5 Punkten. Die Ergebnisse erreichen knapp das Signifikanzniveau ($p = 0,05$) (Abb. 24).

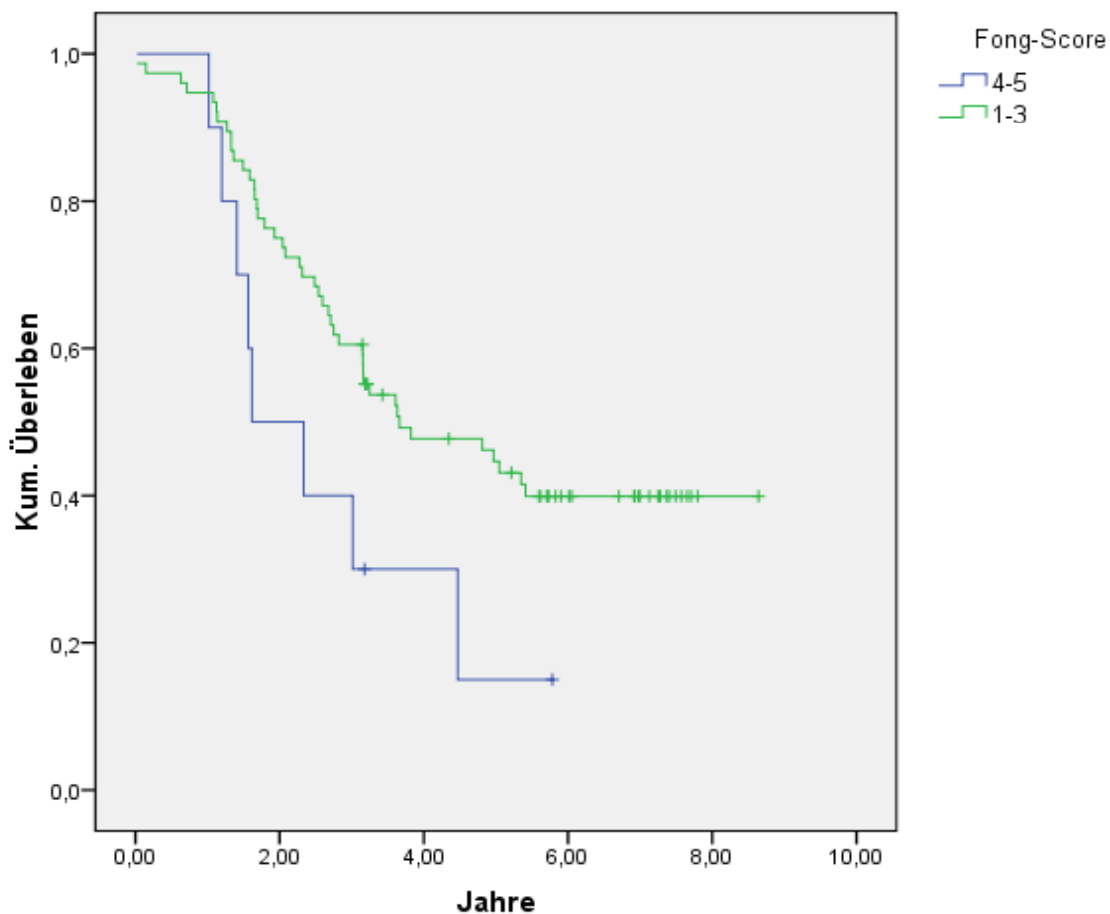


Abb. 24: Darstellung des Fong-Scores in Bezug zum kumulierten Überleben

3.2.10 Nordlinger-Score

Auch um die Vorhersagekraft des Nordlinger-Scores zu überprüfen, nahmen wir eine Kategorisierung in zwei Gruppen vor und verglichen die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit bis zu 4 Punkten mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit 5–7 Punkten. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit bis zu 4 Punkten im Vergleich der Patienten mit über 4 Punkten ($p = 0,026$). Die 5-JÜR in der Gruppe von 1 – 4 Punkten liegt bei 54,5% und beträgt in der Gruppe von Patienten über 4 Punkten nur noch 30,7% (Abb. 25). Das mediane Überleben beträgt 5,3 (95% KI 3,77-6,92) bzw. 3,1 Jahre (95% KI 2,33-3,98).

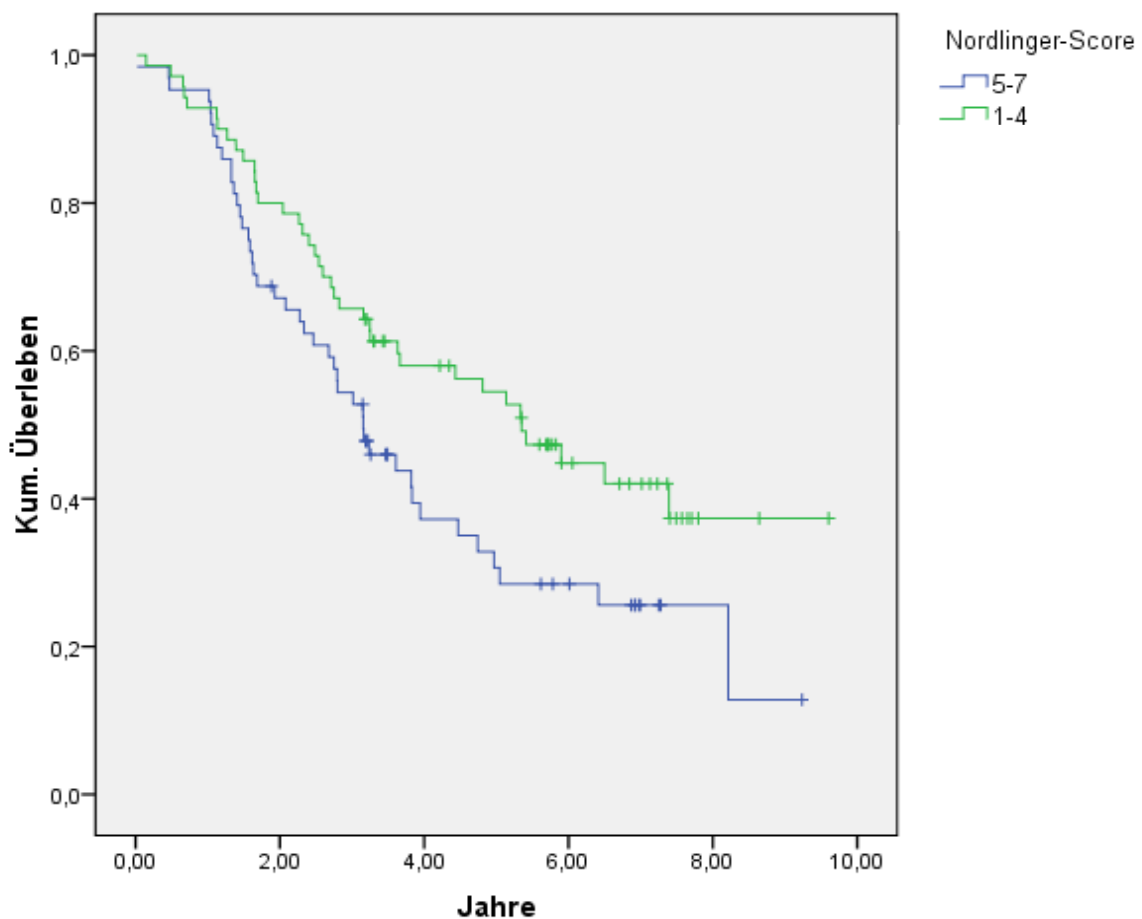


Abb. 25: Darstellung des Nordlinger-Scores in Bezug zum kumulierten Überleben

3.3 Korrelation DNA-Index

Um eine Aussage über die prognostische Aussagekraft des DNA-Indexes bei kolorektalen Lebermetastasen machen zu können, überprüfen wir zunächst den Zusammenhang des Indexes mit einigen klassischen Prognosefaktoren anhand des Exakten Tests nach Fisher. Darauffolgen wurde mit der Kaplan-Meier-Methode der Bezug zum kumulierten Überleben hergestellt. Bei allen Berechnungen wurde der DNA-Index in kleiner 1,5 und größer/gleich 1,5 bemessen.

3.3.1 DNA-Index/T-Stadium

Bei der Berechnung des statistischen Zusammenhanges zwischen DNA-Index und T-Stadium, ergibt sich statistisch keine Signifikanz ($p = 0,93$). Die Verteilung der auswertbaren Patientenfälle auf beide Faktoren zeigt folgende Tabelle (Tab. 11).

DNA-Index	T1-Stadium	T2-Stadium	T3-Stadium	T4-Stadium	gesamt
< 1,5	3	7	64	6	80
> 1,5	1	4	45	3	53
gesamt	4	11	109	9	133

Tab. 11: Korrelation DNA-Index mit T-Stadium

3.3.2 DNA-Index/N-Stadium

Korreliert man den DNA-Index mit dem N-Stadium, lässt sich kein Zusammenhang nachweisen. Die Signifikanz erreicht mit $p = 0,30$ keine statistische Relevanz (Tab. 12).

DNA-Index	N0-Stadium	N1-Stadium	N2-Stadium	gesamt
< 1,5	27	31	22	80
> 1,5	15	16	21	52
gesamt	42	47	43	132

Tab. 12: Korrelation DNA-Index mit N-Stadium

3.3.3 DNA-Index/M-Stadium

Überprüft man den Zusammenhang zwischen dem DNA-Index und dem M-Stadium verteilen sich die Patienten wie in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 13). Auch hier lässt sich jedoch kein statistischer signifikanter Zusammenhang nachweisen ($p = 0,95$).

DNA-Index	M0-Stadium	M1-Stadium	gesamt
< 1,5	44	35	79
> 1,5	30	21	51
gesamt	74	56	130

Tab. 13: Korrelation DNA-Index mit M-Stadium

3.3.4 DNA-Index/Anzahl Tumorknoten

Die Verteilung des DNA-Indexes auf die Menge der Tumorknoten zeigt keine relevanten Häufungen in bestimmten Gruppen ($p = 0,21$) (Tab. 14). Auch wenn die Anzahl der Tumorknoten erneut in zwei Gruppen (< 3/> 3 Knoten) eingeteilt wird ergibt sich keine statistische Relevanz zwischen DNA-Index und Anzahl der Metastasen in der Leber ($p = 0,55$).

DNA-Index	Anzahl Knoten							gesamt
	1	2	3	4	5	6	7	
< 1,5	39	16	8	6	3	0	10	82
> 1,5	23	12	7	4	3	5	5	59
gesamt	62	28	15	10	6	5	15	141

Tab. 14: Korrelation DNA-Index mit Anzahl der Tumorknoten

3.3.5 DNA-Index/Größe der Tumorknoten

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen dem DNA-Index und der Größe der Tumorknoten, so zeigt sich ebenfalls kein statistischer signifikanter Zusammenhang zwischen den Patienten mit einem DNA-Index kleiner oder größer 1,5 und der Tumorgöße ($p = 0,30$). Die Häufigkeitsverteilung ist folgend aufgeführt.(Tab. 15).

DNA-Index	Tumor $\leq 5\text{cm}$	Tumor $> 5\text{cm}$	gesamt
< 1,5	48	32	80
> 1,5	31	30	61
gesamt	79	62	141

Tab. 15: Korrelation DNA-Index mit Tumorknotengröße

3.3.6 Korrelation des DNA-Index zum Überleben

Den Zusammenhang zwischen dem DNA-Index der Tumorzellen und dem Überleben überprüfen wir erneut mit der Kaplan-Meier-Methode. Hier zeigt sich ein statistisch signifikant besseres Überleben für Patienten mit einem DNA-Index $< 1,5$ gegenüber Patienten mit einem DNA-Index $> 1,5$. Die 5-JÜR beträgt im ersten Fall 50,3%, im zweiten Fall 33,7%, das mediane Überleben 5,0 (95% KI 3,25-6,83) bzw. 2,7 Jahre (95% KI 2,04-3,46) (Abb. 26). Der Log-Rank-Test ergibt $p = 0,016$.

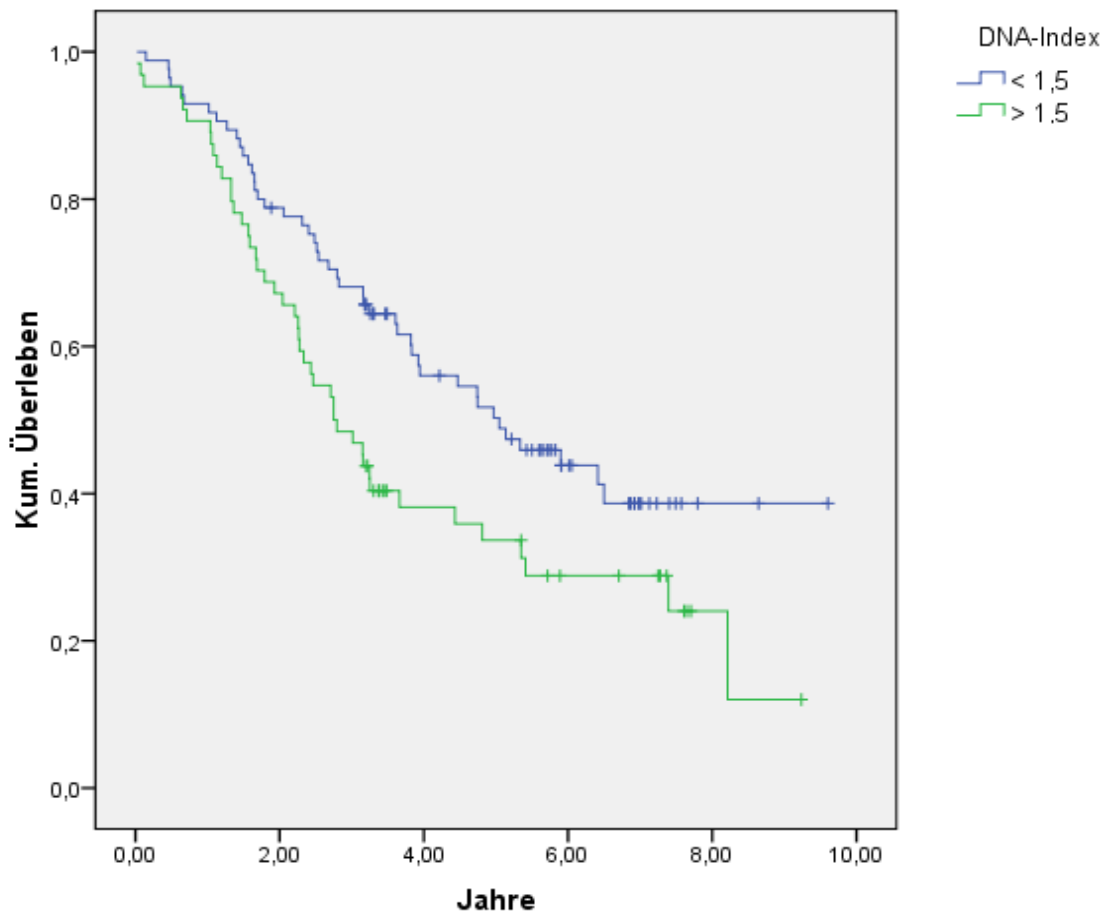


Abb. 26: Darstellung des DNA-Index in Bezug zum kumulierten Überleben

Um den Einfluss des DNA-Index als prognostischen Faktor bei Hochrisikopatienten zu untersuchen, korrelierten wir ihn außerdem mit der Auswahl der Patienten mit einem Nordlinger Score von 5-7 Punkten. Dies umfasst ein Patientenkollektiv von 60 Fällen. Es zeigt sich auch hier ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit einem DNA-Index von $< 1,5$. Die 5-JÜR beträgt in diesem Fall 36,5%, das mediane Überleben 3,9 Jahre (95% KI 2,95-4,94). Bei einem DNA-Index von $> 1,5$ sinkt die 5-JÜR auf 25% bei einem medianen Überleben von 2,2 Jahren (95% KI 1,26-3,28). Das Ergebnis ist statistisch signifikant ($p = 0,039$) (Abb.27).

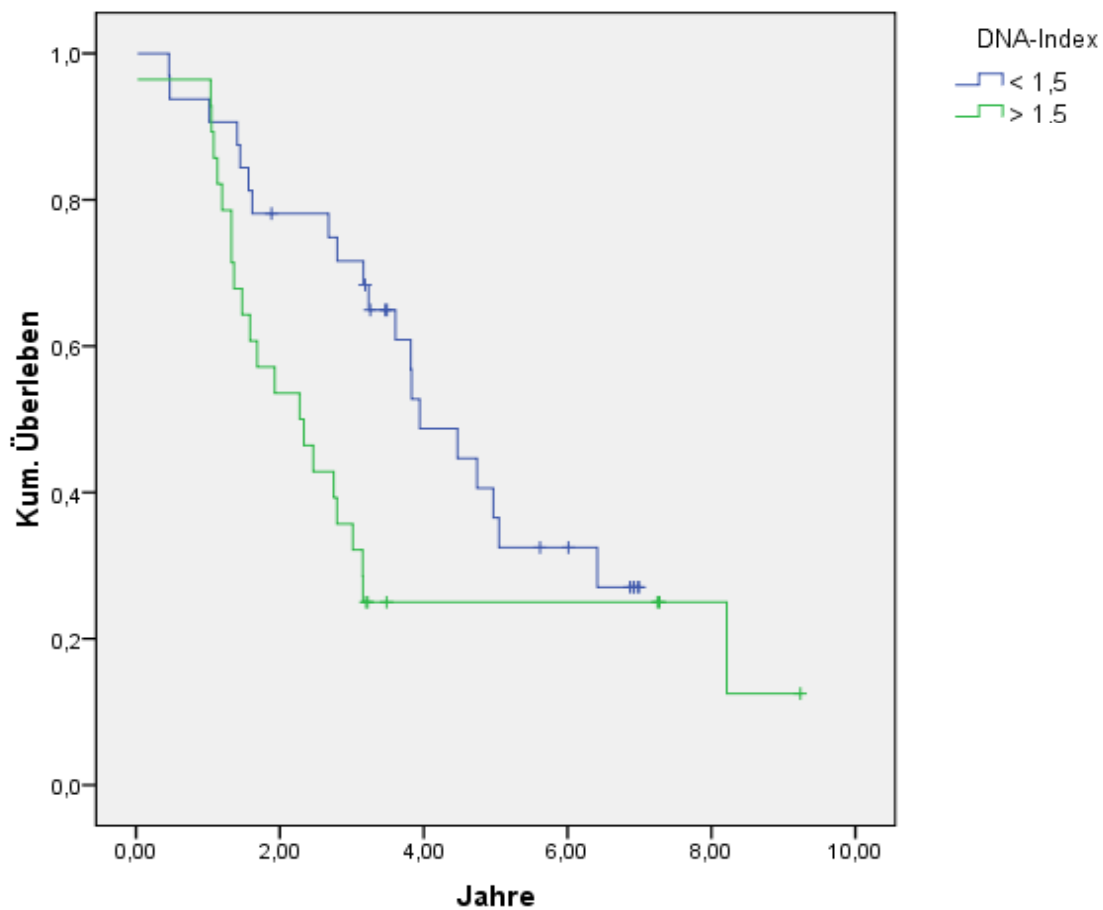


Abb. 27: Darstellung des DNA-Index in Bezug zum kumulierten Überleben bei Patienten mit einem Nordlinger-Score von 5-7 Punkten

3.4 Multivariate Analyse

Um den Zusammenhang zwischen verschiedenen Risikofaktoren, d.h. verschiedenen Einflussgrößen auf das Überleben zu überprüfen und somit eine Aussage über ihre jeweilige klinische Relevanz untereinander machen zu können verwendeten wir als multivariaten Test die Überlebensanalyse nach dem Cox Regressionsmodell.

In die Analyse mit aufgenommen wurden alle Parameter, die in der Überlebensanalyse nach der Kaplan-Meier-Methode ein Signifikanzniveau von $p < 0,1$ hatten. Der Fong-Score und der Nordlinger-Score wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 16 zeigt das Ergebnis der Untersuchung. Demnach zeigt sich die Größe der Tumorknoten, d.h. der maximale Durchmesser der Lebermetastasen als der wichtigste prognostische Parameter gefolgt von der Anzahl der regionären Lymphknotenmetastasen bzw. dem N-Stadium des Primärtumors. Weiterhin erweist sich die Anzahl der Tumorknoten als sehr signifikant, gefolgt vom DNA-Index mit immer noch deutlicher statistischer Signifikanz.

	df (Freiheitsgrad)	Signifikanz (p)	Exp. (B)
Größe Tumorknoten	1	0,001	1,008
N-Stadium	1	0,004	1,546
Anzahl Tumorknoten	1	0,008	1,149
DNA-Index	1	0,011	1,630

Tab. 16: Multivariate Analyse für das Überleben ausgewählter Prognoseparameter

Das Gesamtmodell der Cox-Regressionsanalyse mit den ausgewählten Prognoseparametern ist laut Omnibus Test der Modellkoeffizienten statistisch als höchstsignifikant einzustufen ($p < 0,001$) (Tab. 17).

Chi-Quadrat	Df (Freiheitsgrade)	Signifikanz (p)
30,722	4	0,000

Tab. 17: Omnibus-Test der Modellkoeffizienten

4 Diskussion

Kolorektale Karzinome zählen weltweit und vor allem in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten malignen Erkrankungen. Bei gleichbleibender Inzidenz sind sie in Deutschland die zweithäufigste Ursache für einen durch Malignome verursachten Tod (RKI, 2008). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt in Deutschland bei 60%, die Mortalitätszahlen sind rückläufig. Nichtsdestotrotz kommt es bei einem Großteil der Patienten im Verlauf der Erkrankung zu einer Metastasierung. Aufgrund des Metastasierungsweges ist die Leber meist das erste von Metastasen betroffene Organ. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des kolorektalen Karzinoms, werden bei ca. 15-20% der Patienten bereits Metastasen in der Leber nachgewiesen (Adam et al., 2001). Obwohl nur ein geringer Teil der Patienten aufgrund des oft fortgeschrittenen Tumorleidens für eine operative Therapie infrage kommt, ist die Resektion der Lebermetastasen trotz verbesserter Chemotherapie und aufkommender interventioneller radiologischer Verfahren zur Zeit noch der einzige kurative Therapieansatz (Mitry et al., 2008). Durch eine gezieltere Patientenselektion, standardisierte Operationsverfahren und ein verbessertes perioperatives Management können in Zentren postoperative 5-Jahres-Überlebensraten von über 50% erreicht werden (Pawlik et al., 2007). Rezidive sind jedoch häufig und liegen zu 50% erneut in der Leber. Um vorhersagen zu können welche Patientenkriterien und welche Tumorkriterien mit einer guten bzw. einer schlechten postoperativen Prognose einhergehen wurden in den letzten Jahrzehnten wiederholt verschiedenste Faktoren untersucht die das Überleben bei Erkrankung an einem fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom allein bzw. nach Resektion von Lebermetastasen beeinflussen. Zu den klassischen Prognosefaktoren zählt hier insbesondere der anhand des TNM-Systems zusammengefasste Tumorstatus des Primärtumors mit Größe des Tumors, Anzahl der regionären Lymphknotenmetastasen und einem Vorhandensein von Fernmetastasen. Weiterhin hat die Anzahl der Lebermetastasen und die Größe Einfluss auf die Prognose. Die Art der chirurgischen Therapie, der erreichte Resektionsabstand mit einer Entfernung des kompletten Tumors im Gesunden, pathologisch klassifiziert anhand des R-Status, gelten außerdem als gut untersuchte Prognosefaktoren (Simmonds et al., 2006). Durch Scoring-Systeme wie den Fong-Score und den Nordlinger-Score sollte die Aussagekraft der in diesen Systemen zusammengefassten Prognosefaktoren noch gesteigert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte bei einem Patientenkollektiv von 161 Patienten, die sich aufgrund eines hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinoms einer Leberteilektomie unterzogen, eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 42% erreicht werden. Dieses Ergebnis liegt

zwischen den bisher an großen Fallzahlen publizierten Ergebnissen von 37% bis 58% (Fong et al., 1999, Abdalla et al., 2004).

Das Alter der Patienten hatte ebenso wie das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben ($p > 0,05$), wenngleich sich wie auch in vielen anderen Studien eine etwas bessere 5-JÜR für weibliche Patienten nachweisen ließ. Die Ursachen hierfür lassen sich nicht eindeutig klären. Die allgemeinen Erwartungen bezüglich einer schlechteren Prognose bei älteren Patienten lassen sich vor allem auf die im Alter ansteigende Mortalität zurückführen. Insbesondere die Komorbidität als die Summe der physischen und psychischen Begleiterkrankungen spielt diesbezüglich eine Rolle, da konkurrierende Todesursachen so an Bedeutung gewinnen. Statistisch ließ sich jedoch in unserer univariaten Analyse kein signifikanter Überlebensvorteil für jüngere Patienten nachweisen, dieses Ergebnis stimmt mit anderen Untersuchungen überein (Taylor et al., 1997, Moroz et al., 2002).

Ein Einfluss des T-Stadium des Primärtumors auf das Überleben konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Anzumerken seien hier die kleinen Fallzahlen in den Stadien T1, T2 und T4. In 73,3% der Fälle lag in unserem Untersuchungsgut ein T3 Stadium vor, so dass statistische Aussagen nur eingeschränkt möglich waren.

In Übereinstimmung mit anderen Publikationen (Doci et al., 1995, Fong et al., 1999) fanden wir hingegen einen deutlichen prognostischen Einfluss des primären Lymphknotenstatus auf das Überleben ($p < 0,05$). Lag bei Diagnosestellung des Primärtumors ein N0- oder ein N1-Stadium vor, so konnte eine 5-JÜR von über 50% erreicht werden, während im Stadium N2 die 5-JÜR bei lediglich 23% rangierte. Auch in der multivariaten Analyse hatte der Lymphknotenstatus des Primärtumors eine signifikante prognostische Relevanz ($p < 0,005$).

Bezüglich des M-Stadiums der TNM-Klassifikation, gilt in einer Vielzahl von Untersuchungen eine metachrone Diagnosesicherung, d.h. ein M0-Stadium des Primärtumors als prognostisch günstiger (Harms et al., 1999, Scheele et al., 2001). Dieses Ergebnis kann von uns nicht vertreten werden, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p > 0,5$).

Die Untersuchung der prognostischen Relevanz des R-Status ergab ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen diesem und dem Überleben ($p > 0,05$). Auch hier lagen jedoch in über 70% der Fälle R0 Resektionen vor, so dass das Ergebnis durch kleine Fallzahlen des R1- und R2-Status

nur eingeschränkt aussagekräftig ist. Dem Resektionsabstand wird in vielen Publikationen eine große Bedeutung beigemessen (Jaeck et al., 1996, Harms et al., 1999), obgleich auch Studien vorliegen, in denen der Resektionsabstand keinen Einfluss auf die Prognose hatte (de Jong et al., 2009).

Die Anzahl der Tumorknoten als prognostischer Parameter erreichte in unserer univariaten Analyse knapp statistische Signifikanz ($p = 0,05$). Patienten mit 4 Tumorknoten und mehr, haben eine ca. 20% niedrigere 5-JÜR als Patienten mit bis zu 3 hepatischen Metastasen. In der multivariaten Analyse konnte sogar eine eindeutige prognostische Relevanz der Anzahl der Tumorknoten nachgewiesen werden ($p < 0,05$). In der Literatur sind multiple Metastasen häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Taylor et al., 1997, Donadon et al., 2007), wenngleich einige Autoren keinen Unterschied feststellen konnten (Moroz et al., 2002, Scheele et al., 2001). Aufgrund unseres Ergebnisses können jedoch auch wir die Aussage treffen, dass die Anzahl der Tumorknoten bei technischer Resektabilität der Metastasen nicht zum Ausschluss von einer Operation führen sollten.

Die Größe der Tumorknoten als Einflussfaktor auf das Überleben verfehlte in der univariaten Analyse knapp das Signifikanzniveau ($p = 0,08$), stellt sich in der anschließenden multivariaten Untersuchung dabei als wichtigster unabhängiger Prognosefaktor dar ($p = 0,001$). Dieses Ergebnis wird durch ältere Publikationen unterstützt (Fong et al., 1999, Scheele et al., 1996 und 2001). Die Grenze wurde bei uns wie auch in den meisten früheren Studien bei 5 cm angelegt. Eine präoperative Differenzierung in Tumoren größer oder kleiner 5 cm scheint damit eine sinnvolle Maßnahme zu Einschätzung des postoperativen Überlebens.

Die Differenzierung der Tumorknoten in größer oder kleiner 5 cm, ist darüberhinaus Teil verschiedener Scoring-Systeme zur Ermittlung des individuellen Risikoprofils jedes Patienten. Um die Aussagekraft des Fong- sowie des Nordlinger-Scores zu testen, wurden diese von uns ebenso mit dem Überleben korreliert. Bei einer Gruppierung der Patienten in jeweils eine Gruppe mit 1-3 sowie mit 4-5 Punkten, erreichte der Fong-Score knapp die Signifikanzgrenze ($p = 0,05$). Zur einfacheren Darstellung des Nordlinger-Scores erfolgte desgleichen eine Gruppierung in Patienten mit 1-4 und Patienten mit 5-7 Punkten. Patienten ersterer Gruppe wiesen ein signifikant besseres Überleben auf ($p < 0,05$), so dass dem Nordlinger eine gute prognostische Relevanz zugesprochen werden kann. Beide Systeme stellen folgernd gute Optionen in der postoperativen Einschätzung der Prognose dar.

Das Ziel muss es jedoch sein, solche Prognosefaktoren zu identifizieren, die die Patienten vor einer operativen Therapie kolorektaler Lebermetastasen selektionieren, und jene zu finden, die am meisten von einer Operation profitieren. Oder umgekehrt, solche Patienten herauszufiltern, die von einer operativen Therapie nur wenig profitieren und bei denen auf die durchaus belastende und zeitintensive chirurgische Therapie zugunsten von alternativen Therapieverfahren verzichtet werden sollte. Dieses Ziel ist durch konventionelle Prognosefaktoren bisher nicht erreicht worden (Riesener et al., 1999). Aufgrund des stetig zunehmenden Wissens um die genetischen Grundlagen der Tumorentstehung, die besonders für das kolorektale Karzinom im Vergleich zu anderen Tumorentitäten gut untersucht sind, wurde ein Vielzahl von molekularbiologischen Markern untersucht und auf ihr Potential hinsichtlich der Vorhersagekraft getestet. Messbar sind diese Faktoren im Serum, Gewebe oder im Stuhl der Patienten. Zu den am besten untersuchten Faktoren zählen CEA, CA 19.9, MSI, APC, K-ras, p53 u.a.. Bezüglich der prognostischen Relevanz sporadisch auftretender kolorektaler Karzinome hat sich die Messung des Serum CEA-Levels etabliert, wenngleich auch hier besonders bei frühen Karzinome ein Mangel an Sensitivität und Spezifität besteht (Duffy et al., 2007), so wird der CEA-Spiegel bei Patienten, die an kolorektalen Karzinomen operiert wurden routinemäßig eingesetzt und als Verlaufsparemeter genutzt.

Mit dem Ziel weitere Prognosefaktoren mit einem besseren prädiktiven Wert zu finden, begannen DNA-Analysen zur Bestimmung der Ploidie bei verschiedenen Tumorentitäten. Viele benigne als auch maligne Veränderungen gehen mit einer chromosomalen Abberation einher, die Menge des genetischen Materials verändert sich und ist somit Ausdruck einer pathologischen Transformation. Bis auf wenige Ausnahmen ist eine Veränderung der DNA-Menge deshalb ein Marker für Malignität (Böcking et al., 1998). Auch die Proliferationsaktivität einer neoplastischen Zellpopulation gilt als wichtiger Indikator der biologischen Aggressivität des Tumors (Silvestrini et. al., 1993). Durch Messung des DNA-Gehaltes mit Hilfe zytometrischer Methoden kann so eine Beurteilung des Malignitätsgrades möglich werden. Obwohl sich viele Studien auf die Untersuchung von neuen prognostischen Faktoren bei primären kolorektalen Karzinomen konzentrierten, wurden molekularbiologische Faktoren bei hepatisch metastasierten Tumoren noch nicht intensiv untersucht und die vorliegenden Studien zeigen kontroverse Ergebnisse.

In einer 1986 von Kokal und Mitarbeitern veröffentlichten Studie mit 133 Patienten wurde die Ploidie mittels Durchflusszytometrie an paraffiniertem Gewebe bestimmt. Bei 77 Patienten mit nicht metastasierten kolorektalen Karzinomen stellte sich ein abnormer DNA-Gehalt als wich-

tigster Prognosefaktor zur Vorhersage eines Rezidivs oder eines krankheitsbedingten Todes dar. Hingegen konnte bei 56 Patienten mit hepatischen Metastasen eines kolorektalen Karzinoms keine Beziehung zwischen Überleben und Ploidiestatus hergestellt werden. Ebenso konnte Lind et al., 1992 keinen Überlebensunterschied zwischen diploiden und aneuploiden Tumoren ausmachen. In dieser Studie kamen 37 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen zur Auswertung. Die Messungen erfolgten wie bei Kokal und Mitarbeitern an archiviertem, paraffinierten Geweben durch die Durchflusszytometrie. 15 Patienten hatten nach Interpretation der Histogramme einen diploiden Tumor und 22 einen aneuploiden Tumor. Obwohl die geringe Fallzahl von den Autoren selbst bemängelt wurde, kommen sie zu dem Schluss, dass die DNA-Ploidie bei fortgeschrittenen Tumoren jegliche Signifikanz verliert. Russo und Mitarbeiter führten 1998 eine Studie an 36 Patienten durch. Neben weiteren Faktoren wurde auch die Ploidie mittels Durchflusszytometrie bestimmt, die Messungen erfolgten hier an gefrorenen Präparaten. Aneuploide Tumoren fanden sich in 78% der Fälle. Der Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und Überleben erreichte keine statistische Signifikanz, wenngleich ein geringer Überlebensvorteil für Patienten mit diploiden Tumoren ausgemacht werden konnte. Yamaguchi et al. untersuchen den DNA-Gehalt bei 31 Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms. Hier fanden sich 35,5% diploide und 64,5% aneuploide Tumoren. Die Rezidivrate der aneuploiden Tumoren lag bei 50% und damit deutlich höher als die Rezidivrate von 36,4% bei diploiden Tumoren. Yamaguchi und Mitarbeiter bescheinigten diploiden Tumoren folglich eine signifikant bessere Prognose. Auch Riesener et al. befanden 1998 DNA-Messungen bei kolorektalen Lebermetastasen als sinnvoll und prognostisch aussagekräftig. In dieser Studie kamen 75 Patienten mit resezierten Metastasen zur Auswertung. Die paraffinierten Präparate wurden im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien mittels DNA-Bildzytometrie analysiert. Es fanden sich 50 aneuploide und 25 nicht aneuploide Tumoren. Durch die Kombination mit weiteren Interpretationsalgorithmen der durch die Bildzytometrie entwickelten Histogramme, konnten insgesamt 70 aneuploide Tumoren nachgewiesen werden. In der multivariaten Analyse zeigten sich letztendlich die Stammlinienploidie als auch der maximale DNA-Gehalt der Einzelzellen als unabhängig das Überleben signifikant beeinflussende Parameter.

Grundsätzlich fällt auf, dass die bisher veröffentlichten DNA-Analysen von kolorektalen Lebermetastasen überwiegend in den neunziger Jahren veröffentlicht wurden. Neuere Untersuchungen zumindest für das hepatisch metastasierte kolorektale Karzinom fehlen, obwohl aktuellere Studien zu nicht metastasierten kolorektalen Karzinomen vorliegen (Buhmeida et al., 2009). Die Hauptursache hierfür ist u.a. in mangelnde Fallzahlen des durchaus speziellen Krankenguts zu

suchen. Ziel unserer Studie war es deshalb an einer repräsentativen Fallzahl von 161 Patienten die prognostische Aussagekraft der DNA-Analysen bzw. des DNA-Index als neuen objektiven Parameter in Bezug auf das Überleben zu evaluieren. Auch wir verwendeten für unsere Messungen das Verfahren der DNA-Bildzytometrie. Ein deutlicher Vorteil gegenüber der vielfach verwendeten Durchflusszytometrie liegt in der Möglichkeit der morphologischen Beurteilung jeder einzelnen Zelle. Das Verfahren ist zeitaufwendig und es werden in der Regel weniger Zellen pro Präparat untersucht. Einen Nachteil könnte man außerdem in der subjektiven Beurteilung der Zellgüte durch den einzelnen Untersucher sehen, grundsätzlich wird jedoch nur sehr gut geschultes Personal für die Untersuchungen eingesetzt. Eine Mindestanzahl von 300 zu analysierenden Zellen trägt außerdem zur Optimierung des Messergebnisses bei. Mittels Durchflusszytometrie kann in einem kurzen Zeitraum weitgehend automatisiert eine große Zellzahl vermessen werden, eine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und anderen Zellen ist in derselben Probe jedoch nicht möglich. Hierdurch sind ungenauere Ergebnisse zu erwarten. Weiterhin ist eine Interpretation der Messungen nicht auf eine Einteilung in diploide und aneuploide Tumoren beschränkt, sondern liefert zusätzliche Informationen wie die Menge der Einzelzellaneuploidien. Dieser Vorteil wird auch von andere Autoren geschätzt (Riesener et al., 1998).

Um den DNA-Gehalt der Zellen in Bezug auf das Überleben zu untersuchen, entschieden wir uns für den DNA-Index als Parameter für die DNA-Menge und damit die Ploidie der Tumorzellen. Der DNA-Index ist definiert als modaler DNA-Wert eines Häufigkeitsgipfels in einem DNA-Histogramm, dividiert durch den Modalwert diploider Referenzzellen (Haroske et al., 1998). Normale Körperzellen weisen einen DNA-Index von 1 auf. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Jonas und Mitarbeitern bewährte sich der DNA-Index als starker prognostischer Indikator nach einer Lebertransplantation aufgrund von Zirrhose bedingter hepatozellulärer Karzinome (HCC). Der Index der Tumorzellen wurde bei insgesamt 246 Patienten bestimmt und der Cut-Off Wert bei einem Index von 1,5 festgelegt. Der DNA-Index erwies sich in der univariaten, als auch in der multivariaten Analyse als signifikanter prognostischer Marker für das Überleben nach einer Lebertransplantation aufgrund eines HCC (Jonas et al., 2009). Auch andere Autoren bestätigten eine höhere prognostische Signifikanz des DNA-Index im Vergleich zu einer Einteilung der Tumoren in Diploid und Aneuploid nach der Stammlinie. So konnten Yamamoto und Mitarbeiter den DNA-Index primärer kolorektaler Karzinome an 230 paraffinierten Tumorproben bestimmen. Patienten mit einem DNA-Index $> 1,5$ zeigten ein signifikant schlechteres Überleben, während nach der Definition in diploid und aneuploid kein Überlebensunterschied

zwischen diesen beiden Kategorien festzustellen war. Schlussfolgernd wurde dem DNA-Index eine höhere prognostische Relevanz zugesprochen (Yamamoto et al., 1998).

Auch in unserer Studie konnte ein deutlicher Überlebensvorteil für Patienten mit einem DNA-Index $< 1,5$ festgestellt werden. Mit einer 5-JÜR von 50,3% im Gegensatz zu einer 5-JÜR von 33,7% bei Patienten mit einem DNA-Index von $> 1,5$, erweist sich der DNA-Index als signifikanter prognostischer Marker ($p < 0,05$). Das mediane Überleben beträgt für Patienten mit einem Index $< 1,5$ 5 Jahre im Gegensatz zu 2,7 Jahren bei Patienten mit einem Index $> 1,5$. Um die den Einfluss des DNA-Index auf Hochrisikopatienten zu untersuchen, wählten wir Patienten mit einem Nordlinger-Score von 5-7 Punkten und überprüften in diesem Kollektiv die Überlebenswahrscheinlichkeit. Auch hier zeigte sich ein signifikante Einfluss des DNA-Index auf das Überleben ($p < 0,05$). Ein Zusammenhang des DNA-Index mit der Größe, dem Lymphknotenstatus und dem Fernmetastasierungsstatus des Primärtumors konnte nicht festgestellt werden ($p > 0,05$). Auch die Anzahl und die Größe der Tumorknoten korrelierten nicht mit dem DNA-Index ($p > 0,05$).

In der multivariaten Untersuchung zeigten sich die Größe der Tumorknoten, der Lymphknotenstatus des Primärtumors, die Anzahl der Tumorknoten und der DNA-Index in dieser Reihenfolge als in Bezug auf das Überleben prognostisch signifikant ($p < 0,05$).

Grundsätzlich bleibt also festzuhalten, dass auch wir einen Einfluss des DNA-Gehaltes dargestellt in Form des DNA-Index der Tumorzellen kolorektaler Lebermetastasen auf das postoperative Überleben nachweisen konnten. Aufgrund der Vielzahl der unterschiedlichen Methoden in anderen Publikation, angefangen von der Art der Fixierung des Gewebes und der unterschiedlichen zytometrischen Nachweiserfahren bis zu den durch die Interpretation der Histogramme gegebenen Auswertungsmöglichkeiten, ist ein Vergleich mit anderen Studien jedoch schwierig. Eine weitere Untersuchung zum Einfluss des DNA-Gehaltes in Form des DNA-Index auf das Überleben nach hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen ist uns nicht bekannt. Weiterhin wiesen andere Publikationen zum Thema Ploidie bei kolorektalen Lebermetastasen durchgehend weitaus geringere Fallzahlen auf. Als Kritikpunkt unserer Arbeit sei demgegenüber die geringe Zahl an untersuchten Tumorproben zu nennen. Aufgrund eines Mangels an zur Verfügung stehenden Tumorproben pro Patient, wurde im Regelfall nur jeweils ein Präparat und ein Referenzzellpräparat für jeden Patienten angefertigt und ausgewertet. Aufgrund der Heterogeni-

tät der Tumoren ist es nicht ausgeschlossen, dass der DNA-Gehalt in den Tumoren variiert und somit bei der Untersuchung mehrerer Präparate abweichende Ergebnisse erzielt worden wären.

Zusammenfassend kann der DNA-Index als ein zusätzlicher, objektiver, prädiktiver Marker in Bezug auf das Überleben nach Resektion kolorektaler Lebermetastasen bezeichnet werden. Wir sind jedoch weiterhin nicht in der Lage durch diesen Faktor für sich, eine individuelle risiko-adaptierte Therapieplanung vorzunehmen und solche Patienten zu selektionieren, welche von einer Operation nicht profitieren. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema bleiben abzuwarten.

5 Zusammenfassung

Die derzeit einzige kurative Therapieoption kolorektaler Lebermetastasen stellt die Operation dar. Die Langzeitergebnisse bezüglich des klinischen postoperativen Verlaufs, haben sich über die letzten Jahrzehnte deutlich verbessert. Trotz gut untersuchter konventioneller Prognosefaktoren und klinischer Prognosecores, ist es jedoch nicht möglich Patienten zu identifizieren, die von einer Operation nicht profitieren und bei denen vermehrt alternative Behandlungsstrategien zum Einsatz kommen sollten.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es deshalb den DNA-Index der Tumorzellen im Vergleich zu retrospektiv erhebbaren konventionellen Prognosefaktoren sowie zum klinischen Verlauf auf dessen Aussagekraft zu testen und als weiteren prognostischen Marker zu etablieren.

In die Studie eingeschlossen wurden 161 Patienten, die sich aufgrund eines hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinoms in der Abteilung für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie des Campus Virchow Klinikums der Charité Universitätsmedizin Berlin von 1999 bis 2006 einer Leberresektion unterzogen. Mittels DNA-Bildzytometrie wurde der DNA-Index anhand gefrorener Tumorproben ermittelt.

Ein DNA-Index von $< 1,5$ konnte in 52,8% ($n=85$) der auswertbaren Fälle und ein DNA-Index $> 1,5$ in 39,8% ($n=64$) der Patienten nachgewiesen werden. Mit einer 5-JÜR von 50,3% wiesen Patienten mit einem Index $< 1,5$ im Vergleich zu einer 5-JÜR von 33,7% bei einem Index $> 1,5$ ein signifikant besseres Überleben auf. Als ebenfalls signifikanter prognostischer Faktor in der univariaten Analyse stellte sich das N-Stadium des Primärtumors dar. In der multivariaten Untersuchung konnten die Metastasengröße, der Lymphknotenstatus des Primärtumors, die Metastasenanzahl und der DNA-Index als signifikante prognostische Marker identifiziert werden.

Der DNA-Index stellt somit einen weiteren verwendbaren Prognosefaktor in der Beurteilung des individuellen Risikoprofils im Sinne des Langzeitüberlebens bei Patienten mit hepatisch metastasiertem kolorektalen Karzinom dar.

6 Literaturverzeichnis

- Abdalla E., Vauthey J.N., Ellis L., et al.:** Recurrences and Outcomes Following Hepatic Resection, Radiofrequency Ablation, and Combined Resection/Ablation for Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgery* 2004;239(6):818-827.
- Adam R., Aloia T., Lévi F., et al.:** Hepatic Resection After Rescue Cetuximab Treatment for Colorectal Liver Metastases Previously Refractory to Conventional Systemic Therapy. *Journal of clinical Oncology* 2007;25(29):4593-4601.
- Adam R., Avisar E., Ariche A., et al.:** Five-Year Survival Following Hepatic Resection After Neoadjuvant Therapy for Nonresectable Colorectal (Liver) Metastases. *Annals of Surgical Oncology* 2001;8(4):347-353.
- Al-Abadi, H.:** Klinischer Verlauf von Karzinomen der ableitenden Harnwege. Prognostische Bedeutung von Zytomorphologie und DNS-Zytometrie für den Krankheitsverlauf mit besonderer Berücksichtigung des Analgetikaabusus. Habilitationsschrift aus der Urologischen Klinik und der Chirurgischen Klinik, Universitätsklinikum Rudolf Virchow der Humboldt-Universität Berlin 2002.
- Amthauer H., Denecke T., Hildebrandt B., et al.:** Evaluation of patients with liver metastases from colorectal cancer for locally ablative treatment with laser induced thermotherapy. Impact of PET with 18F-fluorodeoxyglucose on therapeutic decisions. *Nuklearmedizin* 2006;45(4):177-184.
- Armitage N., Robins R., Evans D., et al.:** The influence of tumour cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. *British Journal of Surgery* 1985;72:828-830.
- ASA-Score:** <http://www.asahq.org/clinical/physicalstatus.htm> (Zugriff 29.11.2009)
- Banner B., Tomas-de la Vega J., Roseman D., et al.:** Should Flow Cytometric DNA Analysis Precede Definitive Surgery for Colon Carcinoma? *Annals of Surgery* 1985;202(6):740-744.
- Bauer K., Bagwell C., Giaretti W., et al.:** Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Flow Cytometry in Colorectal Cancer. *Cytometry* 1993;14:486-491.

- Becker N.:** Epidemiologie kolorektaler Karzinome. *Radiologe* 2003;43(2):98-104.
- Beckurts K., Holscher A., Thorban S., et al.:** Significance of lymph node involvement at the hepatic hilum in the resection of colorectal liver metastases. *British Journal of Surgery* 1997;84(8):1081-1084.
- Böcking A.:** Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. *Deutsches Ärzteblatt* 1998;95(12):658-662.
- Buchner O. und H. Wartenberg:** Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12., vollständig überarbeitete Auflage. Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle 1997:14.
- Buhmeida A., Hilska M., Elzagheid A., et al.:** DNA Image Cytometry Predicts Disease Outcome in Stage II Colorectal Carcinoma. *Anticancer Research* 2009;29:99-106.
- Compton C., Fielding L., Burgard L., et al.:** Prognostic Factors in Colorectal Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2000;124:979-994.
- Costa A., Faranda A. Scalmati A., et al.:** Autoradiographic and Flow-Cytometric Assessment of Cell Proliferation in Primary Colorectal Cancer: Relationship to DNA Ploidy and Clinico-Pathological Features. *International Journal of Cancer* 1992;50:719-723.
- De Jong M., Pulitano C., Ribero D.:** Rates and Patterns of Recurrence Following Curative Intent Surgery for Colorectal Liver Metastasis. An International Multi-Institutional Analysis of 1669 Patients. *Annals of Surgery* 2009;250(3):440-448.
- DeMatteo R., Palese C., Janargin W., et al.:** Anatomic Segmental Hepatic Resection Is Superior to Wedge Resection as an Oncologic Operation for Colorectal Liver Metastases. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2000;4:178-184.
- Docì R., Gennari L., Bignami P., et al.:** One hundred patients with hepatic metastases from colorectal cancer treated by resection: analysis of prognostic determinants. *British Journal of Surgery* 1991;78:797-801.

- Donadon M., Ribero D., Morris-Stiff G., et al.:** New Paradigm in the Management of Liver-Only Metastases From Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research* 2007;1(1):20-27.
- Duffy M.J., van Dalen A., Haglund C., et al.:** Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumor Markers (EGTM) guidelines. *European Journal of Cancer* 2003;39:718-727.
- Duffy M.J., van Dalen A., Haglund C., et al.:** Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGMT) guidelines for clinical use. *European Journal of Cancer* 2007;43:1348-1360.
- Emdin O., Stenling R. and G. Roos:** Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. A flow cytometric study with some methodologic aspects. *Cancer* 1987;60(6):1282-1287.
- Enker W., Kimmel M., Cibas E., et al.:** DNA/RNA Content and Proliferative Fractions of Colorectal Carcinomas: A Five-Year Prospective Study Relating Flow Cytometry to Survival. *Journal of the National Cancer Institute* 1991;83(10):701-707.
- Feichter G., Goertler K., Haag J., et al.:** DNS-Messung von malignen Tumoren mittels Impulszytometrie. Prinzipien und Bedeutung für die Beurteilung von Wachstumsverhalten und Abnormitätsgrad. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1984;109(19):738-744.
- Fernandez F., Drebin J., Linehan D.:** Five-Year Survival After Resection of Hepatic Metastases From Colorectal Cancer in Patients Screened by Positron Emission Tomography With F-18 Fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Annals of Surgery* 2004;240(3):438-450.
- Finan P., Quirke P., Dixon M., et al.:** Is DNA aneuploidy a good prognostic indicator in patients with advanced colorectal cancer? *British Journal of Cancer* 1986;54:327-330.
- Fong Y., MD, Fortner J., Sun R., et al.:** Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer Analysis of 1001 Consecutive Cases. *Annals of Surgery* 1999;230(3):309-321.
- Geneser, F.:** *Histologie*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1990: 87-110. (englischsprachige Originalausgabe: *Textbook of Histology*. Munksgaard, Kopenhagen 1986)

- Giacchetti S., Itzhaki M., Gruia G., et al.:** Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Annals of Oncology* 1999;10(6):663-669.
- Halvorsen T. and E. Johannesen:** DNA Ploidy, Tumour Site, and Prognosis in Colorectal Cancer. A Flow Cytometric Study of Paraffin-Embedded Tissue. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1990;25:141-148.
- Hamelin R., Laurent-Puig P., Olschwang S., et al.:** Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994;106(1):42-48.
- Harms J., Obst T., Thorban S.:** The role of surgery in the treatment of liver metastases for colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology* 1999;46(28):2321-2328.
- Haroske G., Baak JP., Danielsen H., et al.:** Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analytical Cellular Pathology* 2001;23(2):89-95.
- Haroske G., Giroud F., Reith A., et al.:** 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: Basic considerations for preparation, measurement and interpretation. *Analytical Cellular Pathology* 1998;17:189-200.
- Hedley D., Clark G., Cornelisse C., et al.:** Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Cytometry in Carcinoma of the Breast. *Cytometry* 1993;14:482-485.
- Hermanek P. and PJ. Hermanek:** Role of the surgeon as a variable in the treatment of rectal cancer. *Seminars in surgical Oncology* 2000;19(4):329-35.
- Jaeck D., Bachellier P., Guiguet M., et al.:** Long-term survival following resection of colorectal hepatic metastases. *British Journal of Surgery* 1997;84:977-980.
- Jaeck D., Nakano H., Bachellier P., et al.:** Significance of hepatic pedicle lymph node involvement in Patients with colorectal liver metastases: a prospective study. *Annals of Surgical Oncology* 2002;9(5): 430-438.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu, Thun M.J.:** Cancer Statistics, 2009. *CA A Cancer Journal for Clinicians* 2009; 59:235.

- Jonas S., Al-Abadi H., Benckert C., et al.:** Prognostic Significance of the DNA-Index in Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis. *Annals of Surgery* 2009;250(6):1008-1013.
- Jones D., Moore M. and P. Schofield:** Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. *British Journal of Surgery* 1988;75(1):28-33.
- Kimmig R., Wimberger P., Hillemanns P., et al.:** Multivariate Analysis of the Prognostic Significance of DNA-Ploidy and S-Phase Fraction in Ovarian Cancer Determined by Flow Cytometry Following Detection of Cytokeratin-Labeled Tumor Cells. *Gynecologic Oncology* 2002;84:21-31.
- Kleinig, H. und U. Maier:** Zellbiologie. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm 1999: 445-455.
- Koga H., Moriya J., Akasu T., et al.:** The relationship between prognosis and CEA-dt after hepatic resection in patients with colorectal carcinomas. *European Journal of Oncology* 1999;25(3):292-296.
- Kokal W., Duda R., Azumi N., et al.:** Tumor DNA Content in Primary and Metastatic Colorectal Carcinoma. *Archives of Surgery* 1986;121:1434-1439.
- Konopke R., Stoelben E., Bunk A., et al.:** Frühergebnisse und Komplikationen der Chirurgie von Lebermetastasen. *Der Chirurg* 1999;70:763-769.
- Kouri M., Pyrhönen S., Mecklin J.-P., et al.:** The prognostic value of DNA-ploidy in colorectal carcinoma: a prospective study. *British Journal of Cancer* 1990;62:976-981.
- Kugler A., Gross A., Zöller G., et al.:** Einfluß von DNA-Ploidie und Grading auf die Überlebenszeit beim primär metastasierten Prostatakarzinom. *Urologe* 1997;36:138-142.
- Lahr C., Soong S.-J., Cloud G., et al.:** A Multifactorial Analysis of Prognostic Factors in Patients with Liver Metastases from Colorectal Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 1983;1(11):720-725.
- Lanza G., Gafà R., Santini A., et al.:** Prognostic Significance of DNA Ploidy in Patients with Stage II and Stage III Colon Carcinoma. A Prospective Flow Cytometric Study. *American Cancer Society* 1998;82(1):49-59.

- Lehnert T., Schaible A., Herfahrt Ch.:** Onkologische Prinzipien beim Koloncarcinom. *Chirurg* 1999;70:499-510.
- Lind S., Parker G., Horsley J., et al.:** Formal Hepatic Resection of Colorectal Liver Metastases. Ploidy and Prognosis. *Annals of Surgery* 1992;215(6):677-684.
- Markus B. und A. Encke:** Hepatobiliäre und Pankreaschirurgie. In: *Viszeralchirurgie*. Hrsg.: H. Becker, A. Encke und H.-D. Röher. Urban und Fischer, München, Jena 2006:693-699.
- Mitry E., Fields A., Bleiberg H., et al.:** Adjuvant Chemotherapy After Potentially Curative Resection of Metastases From Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of Two Randomized Trials. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(30):4906-4911.
- Moroz P., Salama P. and B. Gray:** Resecting large numbers of hepatic colorectal metastases. *ANZ Journal of Surgery* 2002;72(1):5-10.
- Moureau-Zabotto L., Bouchet C., Cesari C., et al.:** Combined flow cytometry determination of S phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node-negative invasive breast carcinoma: analysis of a series of 271 patients with stage I and II breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2005;91:61-71.
- Nicum S., Midgley R., Kerr D.J.:** Colorectal cancer. *Acta Oncologica*.2003;42(4):263-275.
- Nordlinger B., Guiguet M., Vaillant J.-C., et al.:** Surgical Resection of Colorectal Carcinoma Metastases to the Liver A Prognostic Scoring System to Improve Case Selection, Based on 1568 Patients. *American Cancer Society (Cancer)* 1996;77(7):1254-1262.
- Okamoto E., Kyo A., Yamanak N., et al.:** Prediction of the safe limits of hepatectomy by combined volumetric and functional measurements in patients with impaired hepatic function. *Surgery* 1984;95:586-592.
- Oussoultzoglou E., Romain B., Panaro F., et al.:** Long-term survival after liver resection for colorectal liver metastases in patients with hepatic pedicle lymph nodes involvement in the era of new chemotherapy regimens. *Annals of Surgery* 2009;249(6):879-986.
- Pawlik M. und M. Choti:** Surgical Therapy for Colorectal Metastases to the Liver. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2007;11:1057-1077.

- Pawlik T., Scoggins C., Zorzi D., et al.:** Effect of Surgical Margin Status on Survival and Site of Recurrence After Hepatic Resection for Colorectal Metastases. *Annals of Surgery* 2005;241(5):715-724.
- Popat S. und R. Houlston:** A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 2005;41(14):2060-2070.
- Poston G., Adam R., Alberts S., et al.:** OncoSurge: A Strategy for Improving Resectability With Curative Intent in Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23(28):7125-7134.
- Purdie C. and J. Piris:** Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2000;36:121-126.
- Rau H., Schauer R., Helmberger T., et al.:** Impact of virtual reality imaging on hepatic liver tumor resection: calculation of risk. *Langenbecks Archives of Surgery* 2000;385(3):162-170.
- Remmele W. (Hrsg.):** Pathologie Bd.1, Rechtsfragen in der Pathologie, Einführung in die bioptische Diagnostik, Herz- und Gefäßsystem, Hämatologie, Milz, Thymus. 2., neubearbeitete Auflage. Springer Heidelberg, Berlin 1999:71-74.
- Renz-Polster H.:** Innere Medizin. Hrsg. H. Renz-Polster und J. Braun. Urban und Fischer, München, Jena 2001:567.
- Riesener KP., Füzesie L., Biesterfeld S., et al.:** Prognostic value of DNA image cytometry in resected colorectal hepatic metastases. *Analytical and quantitative Cytology and Histology* 1999;21(4):311-318.
- Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.v. (Hrsg.):** Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. Überarbeitete Auflage. Berlin, 2008.
- Russo A., Migliavacca M., Bazan V., et al.:** Prognostic significance of proliferative activity, DNA-ploidy, p53 and Ki-ras point mutations in colorectal liver metastases. *Cell Proliferation* 1998;31:139-153.

- Russo A., Migliavacca M., Zanna I., et al.:** p53 Mutations in L3-Loop Zinc-binding Domain, DNA-Ploidy, and S Phase Fraction Are Independent Prognostic Indicators in Colorectal Cancer: A Prospective Study with a Five-Year Follow-Up. *Cancer Epidemiology, Biomarkers&Prevention* 2002;11:1322-1331.
- Sauer R., Becker H., Hohenberger W., et al.:** Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *New England Journal of Medicin* 2004;351:1731-1740.
- Scheele J., Altendorf-Hofmann A., Grube T., et al.:** Resektion colorectaler Lebermetastasen. Welche Prognosefaktoren bestimmen die Patientenselektion? *Chirurg* 2001;72:547-560.
- Scheele J., Altendorf-Hofmann A., Stangl R., Schmidt K.:** Surgical resection of colorectal liver metastases: gold standard for solitary and completely resectable lesions. *Swiss Surgery Suppl*, 1996;4: 4-17.
- Schmiegel W., Pox C., Reinacher-Schick A., et al.:** S3 Leitlinie „Colorectales Carcinom“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2008;46:1-73.
- Schrag, et al.:** Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20(19):3999-4005.
- Schutte B., Reynders M., Wiggers T., et al.:** Retrospective Analysis of the Prognostic Significance of DNA Content and Proliferative Activity in Large Bowel Carcinoma. *Cancer Research* 1987;47:5494-5496.
- Scott N., Wieand H., Moertel C., et al.:** Colorectal Cancer. Dukes Stage, Tumor Site, Preoperative Plasma CEA Level, and Patient Prognosis Related to Tumor DNA Ploidy Pattern. *Archives of surgery* 1987;122:1375-1379.
- Selzner M., Hany TF., Wildbrett P., et al.:** Does the novel Pet/CT imaging modality impact on the treatment of patients with metastatic colorectal cancer of the liver? *Annals of Surgery* 2004;240(6):1027-1036.
- Senninger N. und H.P. Preusser:** Langzeitergebnisse der onkologischen Chirurgie: Einfluss individueller Prognosefaktoren. *Der Chirurg* 2001;72:489-493
- Shankey T., Kallioniemi O.-P., Koslowski J., et al.:** Consensus Review of the Clinical Utility of DNA Content Cytometry in Prostate Cancer. *Cytometry* 1993;14:497-500.

- Silvestrini R., D`Agnano I., Faranda A., et al.:** Flow cytometric analysis of ploidy in colorectal cancer: a multicentric experience. *British Journal of Cancer* 1993;87:1042-1046.
- Simmonds PC., Primrose JN., Colquitt JL., et al.:** Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: A systematic review of published studies. *British Journal of Cancer* 2006;94:982-999.
- Soreide K., Slewa A., Stokkeland P., et al.:** Microsatellite Instability and DNA Ploidy in Colorectal Cancer. *Cancer* 2009;115:271-282.
- Stangl R., Altendorf-Hofmann H., Charnley R. and Scheele J.:** Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet* 1994;343:1405-1410.
- Susini T., Amunni G., Molino C., et al.:** Ten-Year Results of a Prospective Study on the Prognostic Role of Ploidy in Endometrial Carcinoma DNA Aneuploidy Identifies High-Risk Cases Among the So-Called 'Low-Risk' Patients With Well and Moderately Differentiated Tumors. *Cancer* 2007;109:882-890.
- Tannapfel A. und A. Reinacher-Schick:** Colorectal carcinoma molekular markers in clinical routine. *Onkologie* 2008; 31suppl.5:1-2.
- Taylor M., Forster J., Langer B., et al.:** A Study of Prognostic Factors for Hepatic Resection for Colorectal Metastases. *The American Journal of Surgery* 1997;173:467-471.
- Tomoda H., Kakeji Y. und M. Furusawa:** Prognostic significance of Flow Cytometric Analysis of DNA Content in Colorectal Cancer: A Prospective Study. *Journal of Surgical Oncology* 1993;53:144-148.
- Tonouchi H., Matsumoto K., Kinoshita T, et al.:** Prognostic Value of DNA Ploidy Patterns of Colorectal Adenocarcinoma: Univariate and Multivariate Analysis. *Digestive Surgery* 1998;15:687-692.
- Trümper L., Pfreundschuh M.:** Wachstumsregulation und Neoplasie. In *Pathophysiologie und Pathobiochemie*. Hrsg. M. Pfreundschuh und J. Schölmerich. Urban und Fischer, München, Jena 2000.

- Weitz J., Schalhorn, A., Kadmon, et al.:** Kolon- und Rektumkarzinom. In (Hrsg) W. Hidemann, H. Huber und C. Bartram. Die Onkologie. Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien, Teil 2. Springer, Berlin, Heidelberg 2004:876-922.
- Wittekind C., Meyer H.J. und F Bootz (Hrsg.):** UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6 Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 2002.
- Wolley R., Schreiber K., Koss L. et al.:** DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behaviour. *Journal of the National Cancer Institute* 1982;69(1):15-22.
- Yamaguchi A., Ishida T., Takegawa S., et al.:** Flow-cytometric analysis of colorectal cancer with hepatic metastases and its relationship to metastatic characteristics and prognosis. *Oncology* 1990;47(6):478-482.
- Yamamoto T., Matsumoto K. and K. Iriyama:** Prognostic Significance of the DNA-Index in a Colorectal Cancer. *Japanese Journal of Surgery* 1998;28:792-796.
- Zarbo R., Nakhleh R., Brown R., et al.:** Prognostic Significance of DNA Ploidy and Proliferation in 309 Colorectal Carcinomas as Determined by Two-Color Multiparametric DNA Flow Cytometry. *American Cancer Society* 1997;79:2073-2086.
- Ziegler A., Lange S., Bender R.:** Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rank-Test. *Deutsche Medizinische Wochenzeitschrift* 2007;132:e39-41.
- Ziegler A., Lange S., Bender R.:** Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. *Deutsche Medizinische Wochenzeitschrift* 2007;132:e42-e44.
- Ziegler A., Lange S., Bender R.:** Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *Deutsche Medizinische Wochenzeitschrift* 2007;132:e36-e38.
- Zorzi D., Mullen J., Abdalla E., et al.:** Comparison Between Hepatic Wedge Resection and Anatomic Resection for Colorectal Liver Metastases. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2006;10(1):86-94.

7 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Personen, durch deren Unterstützung die Arbeit ermöglicht bzw. erleichtert wurde.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulf Neumann für die Überlassung des Themas und die unkomplizierte Betreuung der Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Hans-Peter Lemmens für die Vermittlung der Arbeit und fortwährende Motivation.

Frau Dr. med. Roberta Bova für die Betreuung und Zusammenarbeit bei der Gewinnung des Patientenkollektivs.

Frau Angelika Dürr und Herrn Prof. Dr. med. Al-Abadi für die praktische Hilfe bezüglich der DNA-Messungen.

Meiner Schwester Tanja Schlage für viele Ratschläge und Hilfestellungen zur Gestaltung der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Rebekka Schlage, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Wertigkeit des DNA-Index als prognostischer Faktor für das Überleben nach Resektion kolorectaler Lebermetastasen, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin den 31.08.2010