

**Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Univ. Prof. Dr. Tom Lüdde

***Untersuchungen zum Nachweis
von Ki-67 bei Adenomen des
Gastrointestinaltraktes***

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Christine Adelhardt

2024

*Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ralf Kubitz

Zweitgutachter: Prof. Sascha Weggen

Widmung

Für ML

Zusammenfassung Deutsch

Adenome des Gastrointestinaltraktes sind gutartige Tumore der Magen- und Darmschleimhaut. Sie sind häufig und ihr Wachstumsverhalten ist sehr variabel. Da es keine allgemein akzeptierte einheitliche Klassifikation für Adenome gibt, schlugen Tischoff und Tannapfel 2013 vor, die Adenome u. a. in konventionelle und serratierte Adenome einzuteilen, zeitgleich unterschieden Snover et al. (2013) weitere Untergruppen. 2019 wurde die Klassifikation der WHO mit dem Ziel der Übersichtlichkeit aktualisiert. Es wurde der Begriff der „sessilen serratierten Läsion“ eingeführt. Hierunter werden alle serratierten Adenome des Kolons und Rektums, unabhängig davon, ob Dysplasien vorliegen oder nicht, und die metaplastischen Polypen zusammengefasst. 2021 schlugen Tischoff und Tannapfel vor, die kolorektalen Polypen ganz allgemein in konventionelle Adenome, serratierte Läsionen und polypöse Läsionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einzuteilen. Wegen ihrer Fähigkeit, maligne zu entarten, ist eine korrekte Zuordnung klinisch relevant, da hiervon die empfohlenen Kontrollintervalle der Koloskopie abhängen. So hielt Truninger in seiner Arbeit aus 2008 bei bestimmten tubulären Adenomen ein Kontrollintervall von 5 Jahren und bei anderen Adenomen sowie bei den metaplastischen Polypen ein Kontrollintervall von 3 Jahren für angemessen, eine Handlungsempfehlung, die sich auch in der aktuellen S3- Leitlinie zum kolorektalen Karzinom von 2019 findet.

Die Darstellung von Ki-67 ist ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der Proliferationsaktivität von Zellen mit großem prognostischem Wert (u.a. Luo et al., 2015). Eine Analyse des Nachweises von Ki-67 für die Einteilung von Adenomen des Gastrointestinaltraktes fehlt bislang. Diese Arbeit soll dies untersuchen.

Dazu wurden histologische Präparate mikroskopiert. Die Proben stammen aus Koloskopien des gesamten Kolons inklusive Rektum. Von 321 Materialien (Durchschnittsalter der Patienten 71 Jahre) aus den Jahren 1999 bis 2016 wurden je ein Hämatoxylin-Eosin und ein Ki-67 gefärbter Schnitt analysiert, insgesamt eine gemischte Anzahl von tubulären, villösen, tubulovillösen und traditionell bzw. sessil serratierten Adenomen. Nach der 2016 vorherrschenden Klassifikation der WHO lagen sowohl low grade als auch high grade intraepitheliale Neoplasien vor. Zum Vergleich wurden hyperplastische Polypen sowie Adenokarzinome des Kolons herangezogen.

Es zeigte sich, dass das Wachstumsverhalten unterschiedlich ist. Die mittels Ki-67 identifizierte Proliferationszone war bei den verschiedenen Adenomtypen an unterschiedlichen Orten lokalisiert. Bei den tubulären Adenomen lag die Proliferationszone überwiegend darmlumennah und bei den serratierten Adenomen / Läsionen darmlumenfern, d.h. an der Kryptenbasis. Zudem zeigte sich, dass sich bei den tubulären Adenomen die Proliferationszone in Abhängigkeit von der Adenomgröße zur Kryptenbasis hin ausdehnte, bis sie schließlich auch die Kryptenbasis erreichte. Bei den serratierten Läsionen ergab sich ein ähnliches Bild mit einer Ausbreitung der Proliferationszone von der Kryptenbasis zum Darmlumen. Zusammenfassend zeigte sich, dass tubuläre, tubulovillöse und villöse Adenome an der Kryptenöffnung entstehen, während serratierte Läsionen die Kryptenbasis als Ausgangspunkt erkennen lassen.

Summary English

Adenomas are benign gastrointestinal neoplasms. Their frequency and diversity generate the difficulty of pathologists to classify the submitted material. Within the last years nomenclature and terminology have been changed many times. Until today there exists no commonly accepted and standardized classification. Tischoff and Tannapfel grouped 2013 the adenomas in conventional and serrated adenomas, at the same time Snover et al. differentiated sessil serrated and traditional serrated adenomas. With the goal to achieve transparency the WHO updated the classification in 2019 and introduced the term “serrated lesion“, summarizing all colorectal serrated adenomas, regardless of existing dysplasia or not, including metaplastic polyps as well.

For clinical reasons a correct classification is extraordinarily relevant because the suggested intervals of coloscopic checks depends on it. Truninger proposed in 2008 an interval of 5 years concerning tubular adenomas (smaller than 10 mm and up to two polyps) and villous or tubulovillous adenomas and metaplastic polyps for 3 years. This recommendation of action was taken over in the german guideline for colorectal carcinomas of 2019 (valid up to 2024).

The use of Ki-67 as proliferation marker has been established to demonstrate the activity of proliferating cells, which has a great prognostic value (Luo et al., 2015, Pyo et al., 2015, Pezzili et al., 2016).

For gastrointestinal adenomas such an analysis is missing, the value of this approach is presented in this work. To realize this project histologic slides of 321 sample tissues had been analyzed by light microscopy, especially an H&E stained slide and one slide with the immunohistochemical detection of Ki-67. All 321 probes (average age of patient 71 year) had been taken during colonoscopies of the total colon, rectum included, between 1999 and 2016. A mixed assembly of tubular, tubulovillous, villous, traditional, sessil and serrated adenomas were analyzed. Filed accordingly to the dominating classification in 2016 they were all low grade and high grade intraepithelial lesions and metaplastic polyps. Colonic adenocarcinomas had been added for comparison.

It could be shown that the behavior of growing of the chosen lesions vary greatly. Related to the different types of adenomas especially the proliferation zone, detected by Ki-67, was placed at different locations. In tubular adenomas the zone of proliferation presented near the intestinal opening of a crypt, whereas the proliferating zone of serrated lesions was far away from the opening of a crypt, it could be located predominantly at the base of a crypt. Furthermore, it could be shown that the zone of proliferation expands from the opening of a crypt to the base de-pending on the size of a conventional adenoma and in serrated lesions the opposite was seen, an expanding from base to superficial opening.

In summary it could be shown that conventional adenomas develop at the opening of a crypt, whereas serrated lesions emerge at the base of a crypt.

Abkürzungsverzeichnis

Ad.	Adenom
App	Appendix
B'Klappe	Bauhin'sche Klappe
BNLI	Benign neoplasm of large intestine
bp	Basenpaar
BRAF	B-rapidly accelerated fibrosarcoma Proto-onkogen = v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, known as serine/threonine-protein kinase B-
B-Raf	Raf (Protein)
Ca	Carcinom
C.	Colon
C.asc.	Colon ascendens
C.desc.	Colon descendens
C.trans.	Colon transversum
CCA	Konventionelles kolorektales Adenom
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CSC	Colon stem cells
DALM	Dysplasia associated lesions or masses
dza	dachziegelartig
ECF	ektopische Krypten Foci
IEN	intraepitheliale Neoplasie
FFPE	Formalin fixiert, Paraffin eingebettet
GCHP	Becherzellreicher hyperplastischer Polyp
HGD	High Grade Dysplasie
HGIEN	High Grade intraepitheliale Neoplasie
HP (s)	Hyperplastischer Polyp (plural)
ICA	invasives Carcinom
IMC	intramucosales Carcinom
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogen
KB	Kryptenbasis
KRK	Kolorektale Karzinome
li.	links
L.p.	Lamina propria
LGD	Low Grade Dysplasie
LGIEN	Low Grade intraepitheliale Neoplasie
mP/hP	Metaplastischer/hyperplastischer Polyp
MSAP	Mixed Adenoma-Serrated Polyp
MVHP	Microvesikulärer hyperplastischer Polyp
nd	Nicht auswertbar und oder nicht geprüft
neg.	negativ
NOS	Not otherwise specified
o.A.f.M	Ohne Anhalt für Malignität
OF	Oberfläche
p	histologisch untersucht (TNM-Klassifikation)

PCL	perichromosomal layer
pos.	positiv
pTis	Carcinoma in situ, histologisch bestätigt
re.	rechts
s	serratiert
sL	serratierte Läsion
sLDHG	serratierte Läsion, Dysplasie high grade
sLDLG	serratierte Läsion, Dysplasie low grade
ssA(s)	sessiles serratiertes Adenom(e)
ssL(s)	sessile serratierte Läsion(en)
ssLD	sessile serratierte Läsion mit Dysplasie
SSP	Sessiler Serratiertes Polyp
sttvA	serratiertes tubulovillöses Adenom
tA(s)	tubuläres Adenom(e)
TNM	Tumorklassifikations-System nach WHO
tsA(s)	traditionelles serratiertes Adenom(e)
tssA(s)	traditionelles sessiles serratiertes Adenom(e)
tvA(s)	tubulovillöses Adenom(e)
usA	Unclassified serrated adenoma, inkl. sttvA
vA(s)	villöses Adenom(e)
WHO	World Health Organisation = Weltgesundheitsorganisation
ZK	Zellkern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomie und Physiologie des Kolons.....	2
1.2	Physiologie der Dickdarmmukosa.....	4
1.3	Polypen / Adenome.....	5
1.4	Carcinoma in situ.....	11
1.5	Adenokarzinome.....	11
1.6	Ki-67 Protein.....	11
1.7	Ziele der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Patientenproben.....	15
2.2	Definitionen.....	17
2.2.1	Konventionelle Adenome.....	17
2.2.2	Serratierte Läsionen (nach LAM - HIMLIN 2019 und WHO 2019).....	17
2.2.3	Dysplasie.....	19
2.3	Methoden.....	22
2.3.1	Hämatoxilin-Erythrosin-Färbung.....	22
2.3.2	Nachweis von Ki-67.....	23
2.3.3	Tris-Puffer für die Immunhistochemie (Waschpuffer für IH).....	24
2.3.4	Citratpuffer (6,0) für die Immunhistochemie.....	25
2.4	Kriterien der Auswertung.....	26
2.4.1	HE-Übersichtsfärbung.....	26
2.4.2	Ki-67 Nachweis.....	26
2.5	Statistische Analyse.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Qualitative Ergebnisse zum Nachweis der HE-Färbung.....	31
3.2	Qualitative Ergebnisse zum Nachweis von Ki-67.....	31
3.2.1	Allgemeine Beobachtungen.....	31
3.2.2	Normale Krypten.....	33
3.2.3	Metaplastische Polypen.....	34
3.2.4	Serratierte Läsionen.....	36
3.2.5	Konventionelle Adenome.....	38
3.2.6	Atypien.....	42
3.3	Quantitative Ergebnisse.....	43

3.3.1	Lokalisation der Entnahmeorte im Darm.....	43
3.3.2	Verteilung nach Dysplasiegraden	43
3.3.3	Verteilung nach morphologischen Diagnosen WHO 2010 vs. 2019	45
3.3.4	Verteilung der Proliferationszonen.....	46
4	Diskussion und Schlussfolgerungen.....	52
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Eigenschaften serratierter Läsionen.....	9
Tabelle 2: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Adenomerkrankung in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	16
Tabelle 3: Kriterien der Dysplasie	20
Tabelle 4: Untersuchungsergebnisse, aufgeschlüsselt nach WHO-Kriterien 2010 und 2019	45
Tabelle 5: Verteilung der Proliferationszonen nach WHO 2019	46
Tabelle 6: Verteilung des Intensivitätsmaximums der Ki-67 Expression	49
Tabelle 7: Position der Proliferationszone in den Krypten, analysiert nach WHO 2010	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HE, 20x (50003/16) Ausschnitt aus einer normalen Krypte	23
Abbildung 2: Nachweis von Ki-67 (10x) (50043/16) A = Ki-67 neg. Zellkerne, B = Ki-67 pos. Zellkerne	24
Abbildung 3: Einteilung der Proliferationszonen von 1/4 bis 4/4 (10x)	27
Abbildung 4: quer angeschnittene Krypte (40x)	28
Abbildung 5: Krypte im Längsschnitt (20 x)	29
Abbildung 6: sessile serratierte Läsion (ssL) (50042/16, 4x)	31
Abbildung 7: Ki-67, 40x (50043/16)	32
Abbildung 8: Ki-67, 40 x (HGIEN, 50091/16)	33
Abbildung 9: Ki-67 positive Zellkerne in normaler Krypte (50065/16, HE, 40x) Ausschnitt aus einer normalen Krypte	34
Abbildung 10: Beispiel eines metaplastischen Polypen (50157/16, Ki-67, 10x)	35
Abbildung 11: metaplastischer Polyp, tangential (50056a/16), Bild links HE- Färbung, rechts Ki-67 (HE 5 x, Ki-67 5x)	35
Abbildung 12: Hyperplastischer Polyp, kompletter Querschnitt, stärker positiv (50239/16, Ki-67, 5x)	36
Abbildung 13: sessiles serratiertes Adenom mit einer Ausbreitung der Proliferationszone auf 1/4 bis max. 2/4 der Kryptenlänge (50057/16), links HE 10x und rechts Ki-67 4x	37
Abbildung 14: sessiles serratiertes Adenom mit einer Ausbreitung der Proliferationszone auf 1/4 bis max 3/4 der Kryptenlänge (50154/16, Ki-67, 10x) ..	37
Abbildung 15: Längsschnitt eines serratierten Adenomes mit Ausdehnung der Proliferationszone vom 1/4 bis 4/4 der Kryptenhöhe (50312/16, Ki-67, 4x)	37
Abbildung 16: Knospe eines tubulären Adenoms, Ausbreitung 3/4 bis 4/4 (50310/16, Ki-67, 4x)	38
Abbildung 17: Tubuläres Adenom, Ausbreitung 3/4 bis 4/4 (50313/16, Ki-67, 4x)	38
Abbildung 18: Tubuläres Adenom, 3/4 bis 4/4 (50316/16, Ki-47 10x)	39

Abbildung 19: Beginnender Verzweigungsdruck der Krypten (50314/16, Ki-67, 4x)	39
Abbildung 20: Ausdehnung über die gesamte Länge der Krypten (4/4 bis 1/4) (50318/16, Ki-67, 4x).....	40
Abbildung 21: Ausdehnung über fast die gesamte Länge der Krypten, tangential angeschnitten (2/4 bis 4/4) (50319/16, Ki-67, 4x).....	40
Abbildung 22: Beispiel der Ausdehnung über die gesamte Länge der Krypten, hier serratierte Läsion von 1/4 bis 4/4 (50174/16, Ki-67, 4x).....	41
Abbildung 23: Beispiel der Ausdehnung über die gesamte Länge der Krypten, hier serratierte Läsion (50311/16, Ki-67, 4x).....	41
Abbildung 24: Tubulovillöses Adenom, Ausdehnung von 2/4 bis 4/4, fast senkrecht angeschnitten (50058/16, Ki-67, 2,5 x)	42
Abbildung 25: Verteilung der Biopsien nach Lokalisation und Geschlecht.....	43
Abbildung 26: Verteilung der Dysplasiegrade nach Geschlecht, nach WHO 2010/44	
Abbildung 27: Verteilung der Proliferationszone, WHO 2019.....	48

1 Einleitung

Adenome des Gastrointestinaltraktes sind gutartige Tumore der Magen- und Darmschleimhaut. Umgangssprachlich werden sie auch Polypen genannt. Sie sind häufig und ihr Wachstumsverhalten ist sehr unterschiedlich, einschließlich eines variablen Entartungsrisikos. Die Beurteilung von Adenomen zählt daher zum Arbeitsalltag von Pathologen und Pathologinnen (Lam-Himlin et al., 2019).

Der Begriff „Polyp“ selbst ist deskriptiv und bedeutet lediglich „Schleimhautvorwölbung in das Lumen/die Lichtung eines Hohlorganes, unabhängig vom histologischen Aufbau und von der Dignität“ (Pschyrembel, 2020).

Nach Tischoff und Tannapfel 2021 werden alle gut- und bösartigen Läsionen und Tumorbildungen unter diesem Begriff zusammengefasst

Neben vielen anderen Entstehungsorten treten Polypen besonders häufig im Gastrointestinaltrakt auf, vor allem im Verlauf des Magens, des Dickdarms und des Analkanales (Pschyrembel, 2020). Die Häufigkeit des Auftretens nimmt von oral nach aboral deutlich zu. Die meisten Adenome sind je nach Quelle mit 66-80% im Rektosigmoideum lokalisiert (Siegmond-Schultze, 2017, Tannapfel et al. 2010)

Die Inzidenz von Adenomen und Karzinomen im Kolon ist seit Jahren hoch und liegt auf Grund moderner Technik bei ca. 25-40% für die Adenome. Das kolorektale Karzinom ist mit mehr als 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr einer der häufigsten Tumore in Deutschland (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019).

Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes ist das kolorektale Karzinom bei Männern die dritthäufigste und bei Frauen die zweithäufigste Entität. Im Jahr 2019 erkrankten 32.701 Männer sowie 26.266 Frauen an Darmkrebs (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2019).

Obwohl als Ursachen für die Entstehung von Dickdarntumoren diverse exogene, endogene und genetische Einflüsse herausgefiltert worden sind, entstehen kolorektale Karzinome meist sporadisch, seltener im Rahmen einer genetischen Disposition (Jochum et al., 2019).

Es wird angenommen, dass der Bildung und Entwicklung von Polypen dem Entstehen und der Entwicklung von Dickdarmkarzinomen um etwa 5 - 10 Jahre vorausgehen (Jochum et al., 2019).

In der medizinischen Literatur wird versucht, von dem umgangssprachlichen Begriff „Polyp“ abzurücken. So wurde u.a. von Tannapfel und Mitautoren 2010 eine differenziertere Nomenklatur vorgeschlagen mit dem Hinweis, dass sich durch die Anwendung molekularpathologischer Methoden das Verständnis für die Entstehung dieser Tumoren erweitert und auch verändert habe.

Dennoch ist der Begriff „Polyp“ aus dem medizinischen Alltag nicht mehr wegdenken, da er in der Umgangssprache fest verankert ist und sich auch Nichtmediziner/Patienten etwas darunter vorstellen können.

Daher besteht nicht nur in Deutschland, sondern weltweit eine große sprachliche Vielfalt und Inkongruenz, die u.a. die Gastroenterologen, Pathologen, Allgemeinmediziner und Patienten betrifft.

In einer ihrer jüngst erschienenen Publikationen gehen Tischoff und Tannapfel (2021) auf diese Schwierigkeit ein. Sie legen dar, dass in der aktuellen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2019 zwei große Änderungen der Nomenklatur eingeführt worden seien.

Zum einen wird in Bezug auf Adenome jedweder Lokalisation im Gastrointestinaltrakt für den Grad der zytologischen Atypie der Begriff der „intraepithelialen Neoplasie“ wieder durch den - in den 70/80 Jahren gebräuchlichen - Begriff der „Dysplasie“ ersetzt bzw. dem Begriff der intraepithelialen Neoplasie gleichgestellt. Zum anderen weisen sie auf den „neuen“ Begriff „sessile serratierte Läsion“ (SSL) hin, mit dem Anliegen, alle nach der WHO von 2010 benannten sessilen serratierten Adenome (SSA) des Kolons und Rektums jetzt als SSL zu bezeichnen, wobei es keinen Unterschied macht, ob Dysplasien nachweisbar sind oder nicht. Sie empfehlen auch, die metaplastischen/hyperplastischen Polypen hierunter einzuschließen, weil in der Literatur ähnliche genetische Veränderungen beschrieben worden sind.

1.1 Anatomie und Physiologie des Kolons

Das Kolon ist in Abhängigkeit vom Kontraktionszustand ein zwischen 80 und 180 cm langes Darmsegment, das mit dem Coecum beginnt und am Analkanal endet. Er wird - absprachegemäß, aber nicht unwidersprochen - eingeteilt in ein

rechtsseitiges Kolon (Coecum mit Appendix, Colon ascendens, Colon transversum), ein linksseitiges Kolon (Colon descendens und Colon sigmoideum) und das Rektum (Fanghänel et al., 2003).

Die Kolonwand ist regulär aus vier Schichten, nämlich Mukosa, Submukosa, Muscularis propria und Serosa, aufgebaut (Krstić, 1994).

In der Mukosa sind die Lieberkühn'schen Krypten, d.h. Einsenkungen, die von einer einzelnen Zellschicht ausgekleidet werden. Sie werden von einer Lamina propria umgeben und enden auf einer schwächtigen Schicht glatter Muskelfasern, der Lamina muscularis mucosae; kurz Muscularis mucosae (Krstić, 1994).

Die normale Architektur der Mukosa ist vergleichbar mit der Anordnung vieler Teströhrchen in einem großen Laborständer, und zwar unabhängig davon, ob sie von oben oder von der Seite her betrachtet werden. Dieses ordentliche und übersichtliche Arrangement ist der ähnlichen Größe und der Verteilung der Krypten geschuldet, die alle an die Muscularis mucosae stoßen (Lam-Himlin et al., 2019).

Jede Krypte wird von etwa 2000 Zellen ausgekleidet (Vaiopoulos et al., 2012). Das Oberflächenepithel besteht in variablen Mengenverhältnissen aus Enterozyten (absorptiven Columnarzellen), schleim-bildenden Becherzellen und endokrinen Zellen, sowie abschnittsweise auch Paneth' schen Körnchen-Zellen.

Die Mengenverhältnisse der verschiedenen Zellelemente, d.h. die Zellverteilungen, sind abhängig von der Lokalisation. In der rechten Kolonhälfte sind mehr absorptive Zellen für die Wasseraufnahme vorhanden und in der linken Kolonhälfte mehr Becherzellen, um die Gleitfähigkeit des Inhaltes zu steigern.

Die Muscularis mucosae, synonym verwendet Lamina muscularis mucosae - ist eine schmale Schicht aus glatten Muskelfasern. Diese Schicht gehört definitionsgemäß zur Mukosa und grenzt die Mukosa von der Submukosa ab. Ein invasives Tumorwachstum liegt vor, wenn ein Tumor diese Schicht überschreitet.

Insbesondere die epithelialen Zellen unterliegen einem permanenten Ersatzprozess, da sie altern und konstant in das Lumen „abschuppen“ (Vries et al., 2010 und Papailiou et al., 2011). Die Umsatzrate für intestinales Epithel liegt

bei etwa 5 Tagen und wird vom „Microenvironment“ beeinflusst (Ricci-Vitiani et al., 2009, Boman und Huang, 2008).

1.2 Physiologie der Dickdarmmukosa

Von den vielfältigen Arbeiten zur Physiologie der normalen Dün- und Dickdarmschleimhaut sind folgende Beobachtungen für die hier bearbeiteten Fragen beachtenswert.

Nach Vaiopoulos et al. (2012) befinden sich die Stammzellen auf dem Boden der Krypten, ungefähr 16 pro Krypte. Sie sind undifferenziert und besitzen eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit, aber nur eine relativ geringe Teilungsrate.

In der Regel teilen sich Stammzellen asymmetrisch, d.h. eine Tochterzelle wird wieder zur Stammzelle, die andere wandelt sich entlang der Kryptenachse in eine sogenannte transient amplifizierende Progenitorzelle um (Zeki et al., 2011 zitiert nach Langner 2011).

Diese sogenannten transient amplifizierenden Progenitorzellen haben ein im Vergleich zu den Stammzellen limitiertes Potential, jedoch eine hohe Teilungsrate. Aus diesen Zellen entwickeln sich die terminal differenzierten Zellen (z.B. Becherzellen, enteroabsorptive Zellen). Sie sind durch einen Zellzyklusarrest und kurze Lebensdauer gekennzeichnet.

Nur Stammzellen bleiben lange genug innerhalb ihrer Krypte, um nach einer ersten Mutation im Lauf der Zeit weitere onkogene Mutationen zu akkumulieren. Die mutierten Stammzellen können sich - wie nicht mutierte Stammzellen - asymmetrisch oder symmetrisch teilen. Auch die Nachkommen dieser Stammzellen weisen dann dieselbe Mutation bzw. dasselbe Mutationsspektrum auf (Ricci-Vitiani et al., 2009).

Hitara und Mitarbeiter haben 2019 beschrieben, dass auch die Krebsstammzellen von Dickdarntumoren sehr heterogen sind, insbesondere die Stammzellen von Kolonkarzinomen (Hitara et al., 2019).

1.3 Polypen / Adenome

Makroskopisch sind Polypen bzw. Adenome gestielte oder breitbasig auf einer Unterlage aufsitzende Läsionen der Schleimhaut. Sie treten zumeist einzeln auf, in etwa einem Viertel der Fälle sind sie multipel vorhanden.

Adenome, auch kolorektale Adenome, sind nach der aktuellen Lehrmeinung intraepitheliale Neoplasien, d.h. Neubildungen. Sie sind zwar benigne, aber "sie sind fakultative Präkanzerosen und können in ein invasives Adenokarzinom übergehen" (Jochum et al., 2019).

Die Häufigkeit von Adenomen wird mit 50 - 60% in Autopsiestudien angegeben, das Häufigkeitsmaximum liegt dabei im 6. - 7. Lebensjahrzehnt. Die meisten Adenome treten sporadisch auf, seltener entstehen sie im Rahmen eines Polypose-Syndroms.

1979 stellten Shinya und Wolff in einer richtungsweisenden Arbeit bei der Analyse von 7000 Polypen fest, dass die meisten Polypen und Adenome im absteigenden Kolon auftraten. Nach Tischoff und Tannapfel (2021) finden sich serratierte Polypen, zumeist sessile serratierte Adenome/Polypen (SSA/Ps) vorwiegend im Coecum bis einschließlich des Colon transversum. Andere serratierte Läsionen, zumeist hyperplastische Polypen, wurden im Colon transversum bis Rektum gefunden.

Histologisch bestehen Adenome aus einem einlagigen bis mehrreihigen Epithel, das der Basalmembran aufsitzt. Die Zellkernstellung ist polar, d.h. dass die Zellkerne zumeist nahe der Basalmembran lokalisiert sind. Ihre Morphologie ist sehr variabel und weicht von der Morphologie des normalen Epithels ab. Diese Abweichung von der Norm wird nach allgemeiner Übereinkunft als Dysplasie bzw. intraepitheliale Neoplasie bezeichnet und als gering oder schwer eingeteilt und dementsprechend klassifiziert.

Relevant sind bei der Analyse von Adenomen die Architektur, die Anordnung der Epithelzellen in ihrem Bezug zur Basalmembran und die Morphologie der Epithelzellen und ihrer Zellkerne. Im Einzelnen werden bei der Analyse die Zellgröße, die Zellform, der Zellkern mit seiner Form und seiner Lokalisation innerhalb der Zelle, das Zytoplasma mit Farbe, Erscheinungsbild und Zytoplasmaeinschlüssen, im

Zellkern die Anzahl und Morphologie der Nukleolen und Zellkerneinschlüsse, ferner das Vorkommen von Mitosen berücksichtigt.

Nach Montgomery und Mitarbeitern entstehen tubuläre Adenome an der Oberfläche einer Krypte. Die Tubuli verlieren die Orientierung zur Oberfläche und die Kerne werden zur Oberfläche hin größer. Das Adenom wächst dadurch, dass sich die Basis mit diesen Veränderungen anfüllt, wodurch die Architektur gestört wird, und zusätzlich zytologische Veränderungen auftreten, (Montgomery et al., 2017).

Nach der Architektur wurden und werden Adenome von den verschiedenen Autoren wie Shinya und Wolf (1979) und LIM HAMLIN (2019) oder Tischoff und Tannapfel (2021) unterschieden in u.g. Adenotypen:

- Tubuläre Adenome (etwa 60 - 65 % aller Adenome), die teils verzweigte Tubuli besitzen, häufig gestielt sind und selten auch breitbasig der Muscularis mucosae aufsitzen,
- Villöse Adenome (etwa 5 - 10 % aller Adenome), die aus finger- oder zottenartigen Strukturen bestehen, häufig ein basophiles, häufig pseudostratifiziertes Epithel aufweisen, überwiegend breitbasig oder gestielt angeordnet und meistens größer als tubuläre Adenome sind,
- Tubulovillöse Adenome (20 - 25% der Adenome), die eine variable Mischung aus tubulären und villösen Anteilen aufweisen, und
- Serratierte Adenome, die in zwei Gruppen eingeteilt werden: sessile serratierte Adenome (SSA 3 - 5%) und traditionelle serratierte Adenome (TSA 1%).
 - Sessile serratierte Adenome (SSAs) ähneln den hyperplastischen (metaplastischen) Polypen, sind aber größer und meist rechtskolisch lokalisiert. Sie zeigen eine sägeblattartige Architektur (Serratierung) der inneren Kryptenoberfläche, die bis in das untere Kryptendrittel reicht. Die Krypten sind an der Basis T- oder L-förmig verzweigt und dilatiert.
 - Traditionelle serratierte Adenome (TSAs) erinnern an tubulovillöse Adenome, weisen aber Krypten auf mit einem stark serratierten eosinophilen Epithel mit „ectopic crypt foci“ (ECF).
- Hyperplastische/metaplastische Polypen sind gutartige neoplastische Läsionen, die BRAF- und KRAS-Mutationen aufweisen können. Sie sind die häufigste Po-

lypenart in Kolon und Rektum, in der Regel leicht erhaben, messen meist weniger als 5 mm und treten häufig multipel auf. Sie besitzen elongierte Schleim-hautkrypten mit einer verbreiterten Proliferationszone und einer sägeblattartigen Architektur (Serratierung) in der oberen Kryptenhälfte. Das Kryptenepithel ist aus-differenziert und zeigt keine Dysplasie. Auch sie haben ein - wenn auch minima-les - Entartungsrisiko.

Der Vollständigkeit halber seien auch die übrigen bekannten Polypenformen genannt, nämlich die juvenilen Polypen und die Peutz-Jeghers Polypen. Diese werden in der hier vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

Am ausführlichsten haben LAM-HIMLIN et al. im Jahr 2019 in ihrem Buch "A Pattern Based Approach to Neoplastic Biopsies, Atlas of Gastrointestinal Pathology" die verschiedenen Formen von Adenomen/Polypen sehr detailliert beschrieben und abgebildet, da es bis 2019 keine universell akzeptierten Kriterien für die Klassifikation von Adenomen gab.

Im Einzelnen führen sie aus, dass konventionelle adenomatöse Polypen etwa 65 % aller colorektalen Polypen ausmachen. Hierunter ordnen sie tubuläre Adenome (TAs), tubulovillöse Adenome (TVAs) und villöse Adenome (VAs) ein.

Die subjektiv bestimmte Menge der villösen Komponente bestimmt dabei die weitere Subklassifikation der konventionellen Adenome als tubuläres Adenom, tubulovillöses Adenom oder villöses Adenom.

Nach den Ausführungen von Lam-Himlin et al. (2019) kann ein „Villus“ definiert werden als eine Struktur, die zweimal so lang wie breit ist. Tubuläre Adenome sind bis zu 25 % villös und mindestens bis 75% tubulär. Tubulovillöse Adenome sind zwischen zu 25 % und 75% villös (und zwischen 75 % und 25% tubulär). Villöse Adenome sind dagegen zu mindestens zu 75% und mehr villös und bis zu 25% tubulär.

Die Klassifikation von Adenomen ebenso die Angabe des Dysplasiegrades hat weitreichende Konsequenzen für die Nachsorgeintervalle.

So werden beispielsweise Hoch-Risiko-Adenome wie TVAs nach 3 Jahren verlaufskontrolliert, wohingegen beim Vorliegen von 1-2 tubulären Adenome (< 1

cm) ein Koloskopieintervall von 5 -10 Jahren empfohlen wird (S3-Leitlinie kolorektale Karzinome, 2019).

Weiterhin gehört nach Lam-Himlin et al. (2019) die Diagnose von serratierten Polypen zu den verworrensten Kapiteln der Pathologie, die sich mit gastroenterologischen Fragestellungen beschäftigen. Die Schwierigkeiten entstehen u.a. durch ähnlich klingende Namen, vielfältige histologische Kriterien und sich überlappende morphologische Merkmale. Sie schlagen daher vor, die Nomenklatur der serratierten Polypen zu vereinfachen.

Serratierte Polypen machen etwa 35% der kolorektalen Polypen aus. Der Begriff „serratiertes Polyp“ ist ein übergeordneter Begriff, ein sogenannter „umbrellaterm“, der eine Familie heterogener Polypen mit variabler Morphologie, diversen molekularen Veränderungen und neoplastischem Potential umschließt. In diese Familie sind hyperplastische Polypen (30% aller kolorektalen Polypen), SSA/P's (4% aller kolorektalen Polypen), traditionell serratierte Adenome (TSA, 0,7% aller kolorektalen Polypen) und unklassifizierbare serratierte Polypen eingeschlossen.

Snover und Mitautoren gliedern 2010 in der 4. Ausgabe der WHO, die in gleicher Weise in der 5. Ausgabe 2019 zitiert wurde, die Polypen wie folgt auf:

- Hyperplastische Polypen:
 - Microvesiculär
 - Becherzellreich
 - Muzinarm
- Sessile serratierte Adenome/Polyp (SSA/P):
 - ohne cytologische Dysplasie
 - mit LGD cytologischer Dysplasie
 - mit HGD cytologischer Dysplasie
- traditionelle serratierte Adenome (TSA):
 - flach, filiform, muzinös, ohne cytologische Dysplasie,
 - mit LGD cytologischer Dysplasie
 - mit HGD cytologischer Dysplasie

2016 führt Polydorides zusätzlich den Begriff des Mixed Adenoma-Serrated Polyp – kurz MASP – ein. Unter dieser Kategorie können seiner Ansicht nach größere

Adenome zusammengefasst werden, bei denen nur schwer zwischen serratiertem und nicht serratiertem Adenom unterschieden werden kann.

Die Grundlagen für die Einteilung der serratierten Läsionen nach WHO 2019 beruhen sowohl auf histologischen als auch auf molekularbiologischen Merkmalen. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle (s. Tabelle 1) aufgeführt.

Typ	Kryptenarchitektur	Histologische Merkmale			Molekularbiologische Merkmale		
		Proliferationszone	Cytologische Merkmale	Muzin-Typ	BRAF Mutation	KRAS Mutation	CpG-island methylierung
MVHP (mP/hP)	Trichterförmige Krypten, Serrationen auf die oberen 2/3 be-grenzt	Gleichförmig lokalisiert im basalen Abschnitt der Krypten	Kleine basal lokalisierte Kerne, keine Dysplasie	Gemische microvesikulärer Zellen und Becherzellen	70 - 80%	0%	+
GCHP (mP/hP)	Verlängerte Krypten, ähnlich normalen Krypten, wenige - keine Serrationen	Gleichförmig lokalisiert im basalen Abschnitt der Krypten	Kleine basal lokalisierte Kerne, keine Dysplasie	Becherzellen vorherrschend	0%	50%	-
SSL (sessile serratierte Läsion)	Horizontales Wachstum entlang der Mucosae, Dilatation der Kryptenbasis (basales 1/3 der Krypten) und / oder Serrationen bis zur Kryptenbasis	Proliferation kann abnormal entfernt von der Kryptenbasis lokalisiert sein, von Krypte zu Krypte variabel	Kleine basal lokalisierte Kerne mit gelegentlich größeren Kernen mit unauffälligen Nukleolen; keine Dysplasie	Gemische microvesikulär und Becherzellen	> 90%	0%	++
SSLD (sessile serratierte Läsion mit Dysplasien)	Komplexe Architektur in der dysplastischen Komponente (zusammendrückende Krypten, komplexe Verzweigungen, siebartige Anordnung, villöse Architektur	Wie in SSL, aber mit vermehrter Proliferation in der dysplastischen Komponente	Veränderliche morphologische Erscheinung von dysplastischen Komponenten	Veränderliche Typen	>90%	0%	+++
TSA (traditionelles serratiertes Adenom)	Schlitzförmige Serrationen, oft ektope Krypten	präsent in ektope Krypten und Kryptenbasis	Verlängerte, stiftförmige Zellkerne, geschichtet und cytoplasmatischer Eosinophilie. Können offene Dysplasien entwickeln.	Gelegentlich zerstreute Becherzellen, Becherzellarter Typ ist beschrieben worden.	20-40%	50-70%	+

Tabelle 1: Histologische Eigenschaften serratierter Läsionen

Legende: GCHP: becherzell-reicher hyperplastischer Polyp, Mm: Merkmale, MVHP: microvesikulärer hyperplastischer Polyp, SSL: serratierte Läsion, SSLD: serratierte Läsion mit Dysplasie, TSA: traditionelles serratiertes Adenom. Übersetzt aus WHO 2019, 5th edition, Digestive System Tumours

Weiterhin hat die WHO 2019 zum Zwecke der besser vergleichbaren Ergebnisse empfohlen, die erkennbaren Vorläuferläsionen des Dickdarmkrebses in relativer Abhängigkeit von ihrer Entstehung (pathway) einzuteilen in

- kolorektale serratierte Läsionen und Polypen
 - serratierte Dysplasie, low grade
 - serratierte Dysplasie, high grade
- konventionelle kolorektale Adenome
 - adenomatöser Polyp, low grade Dysplasie (LGD)
 - adenomatöser Polyp, high grade Dysplasie (HGD) mit den Typen:
 - tubuläres Adenom LGD
 - tubuläres Adenom HGD
 - villöses Adenom LGD
 - villöses Adenom HGD
 - tubulovillöses Adenom LGD
 - tubulovillöses Adenom HGD
 - “advanced adenoma“
- CED assoziierte Dysplasie

Das „advanced adenoma“ definiert die WHO als größer als 10 mm, mit einer villösen oder tubulovillösen Architektur und/oder einer hochgradigen Dysplasie oder einem intramucosalen Karzinom.

In ihrer jüngsten Publikation bereiten Tischoff und Tannapfel (2021) diese Vielfalt an Ansichten und Erkenntnissen für Internisten auf. Sie führen aus, dass in der aktuellen Klassifikation der WHO von 2019 zwei große Änderungen der Nomenklatur eingeführt worden seien.

Zum einen sei in Bezug auf Adenome jedweder Lokalisation im Gastrointestinaltrakt für den Grad der zytologischen Atypie der Begriff „intraepitheliale Neoplasie“ durch den (in den 70/80 Jahren schon einmal verwendeten) Begriff „Dysplasie“ ersetzt bzw. ihm gleichgestellt worden. Zum anderen sei der Begriff der „sessilen serratierten Läsion“ (SSL) eingeführt worden. Das bedeutet, dass alle nach der WHO von 2010 benannten sessilen serratierten Adenome (SSA) des Kolons und Rektum jetzt als SSL bezeichnet werden. Dabei macht es keinen Unterschied, ob Dysplasien nachweisbar sind oder nicht. Auch die metaplastischen/ hyperplastischen Polypen werden jetzt hierzu gezählt.

Trotz dieser Herausforderungen gilt eine exakte Klassifikation von Adenomen als essenziell, weil sich aus der histologischen Einordnung abweichende

Überwachungszeiträume ergeben können. Entsprechend der S3-Leitlinie zu Kolorektalen Karzinomen (2019) sollten serratierte Adenome wie klassische Adenome in Abhängigkeit von ihrer Anzahl, Größe und Dysplasiegrad verlaufskontrolliert werden.

1.4 Carcinoma in situ

Das Carcinoma in situ ist definiert als bösartiger epithelialer Tumor, der bis auf die Eigenschaft der Invasivität alle anderen Eigenschaften der Malignität aufweist. Die Basalmembran des Epithels ist überschritten, d.h. die Lamina propria infiltriert. Ebenso ist die Lamina muscularis mucosae infiltriert, nicht aber überschritten. (Pons de Leon et al., 2001). Diese Tumoren werden in dieser Arbeit exemplarisch als Vergleich herangezogen.

1.5 Adenokarzinome

Das Adenokarzinom des Kolons ist ein maligner epithelialer Tumor der kolorektalen Schleimhaut, der mindestens die Lamina propria als auch die Muskularis mucosae infiltriert bzw. überschreitet. Die Invasivität und Metastasierungsfähigkeit sind ohne Therapie grenzenlos möglich. Diese Tumoren werden in dieser Arbeit nicht untersucht, sie werden exemplarisch als Vergleich herangezogen.

1.6 Ki-67 Protein

Das in Kiel entdeckte Ki-67 ist ein Nicht-Histon Protein des Zellkernes, das in allen proliferierenden Zellen universell exprimiert wird und in ruhenden Zellen nicht detektierbar ist (Gerdes et al., 1983, Yerushalmi et al., 2010). Dieses Protein ist eng verknüpft mit der Proliferation von gutartigen und bösartigen Zellen. Es hat eine Halbwertszeit von nur 1 bis 1,5 h (Shirendeb et al., 2009). Es ist präsent bzw. detektierbar während aller aktiven Phasen des Zellzyklus, d.h. in G1-, S-, G2- und M-Phase, aber nicht nachweisbar in Zellen der G0 Phase (Hooghe et al., 2008; Li et al., 2015; Gerlach et al., 1997, Shirendeb et al., 2009). In der G1- und der S-Phase ist das Ki-67-Niveau niedrig und in der frühen Mitosephase hoch exprimiert.

In späteren Phasen der Mitose fällt der Ki-67-Level wieder rapide ab (Le Guellec et al., 2011).

Ki-67 wird in der Routinopathologie häufig verwendet (Li et al., 2015), da es als Marker für die Proliferationsaktivität von humanen Tumorzellen weit verbreitet und vergleichsweise einfach anzuwenden ist (Sun und Kaufmann, 2017). Erstmals berichteten 1983 Gerdes et al., dass Ki-67 in den Kernen von Hodgkin-Zellen stark exprimiert wurde, und zwar in denjenigen, die sich in Zellteilung befanden. Nur Zellen, die sich in der GO-Phase befanden, waren negativ.

Der prognostische Wert der Bestimmung ist in großen Studien z.B. von Luo et al., 2015 an hepatozellulären Karzinomen, von Pyo et al. (2015) an GIST-Tumoren, von Pezelli et al. (2016) an Pankreastumoren und von Richards-Taylor et al. (2015) an neuroendokrinen Tumoren gut etabliert worden.

Das Protein Ki-67 ist in den Zellen aller Wirbeltiere zu finden (Booth und Earnshaw, 2017). Das Gen MKI167, das beim Menschen das Protein Ki-67 kodiert, ist auf Chromosom 10 lokalisiert und organisiert in 15 Exonen. Es hat eine kontinuierliche Länge von 29.965 bp, lokalisiert auf Chromosom 10q25-ter und wird verstanden als 15 Exone mit Größen zwischen 67 und 6845 bp und 14 Introns mit Größen zwischen 87 und 3569 bp. Exon 13 enthält 16 homologe Segmente von 366 bp (Ki-67 repeats), lokalisiert im Zentrum dieses Gens.

Obwohl das Protein Ki-67 verschiedene konservierte funktionelle Regionen besitzt, ist die primäre Sequenz-Konservierung außerhalb dieser Regionen gering. Das Primärtranskript des Gens MKI 67 zeigt ein Spleißen in zwei Isoformen von 320 und 350 kDa (Gerdes et al., 1991). Sie werden kodiert durch zwei Haupt-Transcript-Varianten, die sich durch den alternativen Einschluss von Exon 7 unterscheiden (Gerdes et al., 1991). Drei zusätzliche Splicingvarianten des menschlichen Ki-67- Proteins sind in verschiedenen Geweben und primären und kultivierten Zellen entdeckt worden, die sich durch differente Expression in differenten Zelllinien unterscheiden (Schmidt et al., 2004).

Heute ist bekannt, dass der Promoter des MKI 67 Gens selbst zellzyklus-reguliert ist (Ishida et al., 2001) und dass die Ki-67 mRNA-Level während der G1 Phase ansteigen (Sobecki et al., 2016 und 2017). Der Abbau von Ki-67 erfolgt während

der G1 Phase über den Ubiquitin proteasom Komplex APC/C-Cdh1 (Chierico et al., 2017, Sobecki et al., 2017).

Die vorhandene Menge an Protein Ki-67 wird zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus durch eine präzise Bilanz zwischen Synthese und Degradation reguliert, angezeigt durch seine kurze Halbwertszeit von 1 bis 1,5 h.

Van Hooser und Kollegen arbeiteten 2005 heraus, dass Ki-67 eines der ersten Proteine ist, das mit der Mitose assoziiert ist und bis zur Telophase erhalten bleibt.

2018 haben Sun und Kaufmann in einer Übersichtsarbeit beschrieben, dass das Protein Ki-67 in Mitose befindliche Chromosomen überzieht. Nach ihren Ergebnissen hat Ki-67 in der Interphase auch die Aufgabe, das Heterochromatin zu organisieren, d.h. das Verpacken des Chromatins zu arrangieren.

Die Fragen, wie genau und wo das Eiweiß Ki-67 produziert, von welchen Chaperonen es in Form gebracht, wie es in der Zelle transportiert und nach dem Abschluss der Arbeiten wieder abgebaut wird, sind noch nicht abschließend geklärt.

Auch mit welchen antigenen Determinanten des Protein Ki-67 die kommerziell erhältlichen Antikörper reagieren, ist nicht sicher klärbar, da diese Angaben in den verschiedenen Produktbeschreibungen bzw. Begleittexten der diversen Hersteller nicht aufgeführt sind.

1.7 Ziele der Arbeit

Die eingangs beschriebenen Beobachtungen und Erkenntnisse haben zu den Fragen geführt, ob und wenn ja, welche Bedeutung der Nachweis von Ki-67 bei Adenomen des Gastrointestinaltrakts hat und weiter, ob Unterschiede bei den Wachstumsmustern sowie dem Proliferationsverhalten der verschiedenen Adenomtypen bestehen.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob der immunhistochemische Marker Ki-67 Hilfestellung bei der Analyse des Wachstumsverhaltens von Kolon-Adenomen geben kann.

Anhand der erhobenen Daten soll zudem herausgearbeitet werden, ob mittels Bestimmung von Ki-67 zwischen Low Grade und High Grade Neoplasien bei Adenomen unterschieden werden kann.

Zudem werden die Ergebnisse dieser Arbeit vor und nach Anpassung an die Einteilungskriterien der WHO-Klassifikation von 2019 verglichen, insbesondere mit der Frage, ob es Unterschiede gibt und welche Veränderungen diese Übertragung der neuen WHO - Klassifikation auf die hier erhobenen Daten bewirkt. Falls ja, stellt sich die Frage, ob eine klinische Relevanz, beispielsweise in Bezug auf den Zeitpunkt der Kontrollkoloskopie, besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenproben

Das Untersuchungsmaterial, entsprechend den histologischen Präparaten, stammt aus Einsendungen der Klinik für Gastroenterologie & Onkologie der Stiftung Bethanien Krankenhaus Moers unter der Leitung von Dr. Götz (bis 2013) und Prof. Dr. med. Ralf Kubitz aus den Jahren 1999 bis 2016. Für diese primär retrospektive Studie wurden stichprobenartig 300 Präparate von kolorektalen Adenomen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie Moers ausgewertet, sowie 12 Fälle von Adenocarcinomen, 5 mit Carcinoma in situ und 6 mit Regeneration (= sich in Reparatur befindliches Gewebe bspw. nach einer Entzündung), die zum Vergleich herangezogen wurden.

Aus Datenschutzgründen wurde jede Probe im Jahr 2016 anonymisiert und neu verschlüsselt.

In dieser Arbeit wird auf Grund der einfacheren Handhabung und Erhalt des Leseflusses das generische Maskulinum verwendet; darin inkludiert sind ausdrücklich alle Genderidentitäten. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung wurde die bis dahin in Deutschland allgemeingültige Geschlechterteilung in männlich und weiblich für die Auswertung verwendet.

Ausgewertet wurde das Untersuchungsgut von 321 Patienten im Alter zwischen 32 und 94 Jahren (s. Tabelle 2). Der Altersdurchschnitt und der Medianwert lagen jeweils bei 71 Jahren. 160 Proben stammten von weiblichen Patienten mit einem Altersmittelwert von 74 Jahren und einem Medianwert von 77 Jahren. Die jüngste Patientin war 46 Jahre und die älteste 94 Jahre alt. Die 161 Proben der männlichen Patienten stammten im Mittel von 67-jährigen Patienten, der Medianwert lag bei 68 Jahren, der älteste Patient war 90 Jahre und der jüngste 32 Jahre alt.

Altersverteilung	total	m	w
4. Dekade	5	5	0
5. Dekade	7	4	3
6. Dekade	25	15	10
7. Dekade	106	71	35
8. Dekade	109	43	66
9. Dekade	59	21	38
10. Dekade	10	1	9
Summe	321	160	161

Tabelle 2: Altersverteilung der Patienten zum Zeitpunkt der Adenomerkrankung in Abhängigkeit vom Geschlecht

Alle Untersuchungen wurden an routinemäßig hergestellten, formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeproben (FFPE - Proben) der oben aufgeführten Fälle vorgenommen.

2.2 Definitionen

Die zur Auswertung notwendigen histopathologischen Merkmale wurden wie folgt definiert.

2.2.1 Konventionelle Adenome

Adenome des Gastrointestinaltraktes, im Volksmund auch Polypen genannt, sind gutartige Tumore der Magen- und Darmschleimhaut unterschiedlicher Morphologie. Sie können eine variable Architektur (tubulär, tubulovillös, villös) aufweisen.

Tubulär: Ein Tubulus ist eine schlauch-, trichter- oder röhrenförmige Struktur in der Kolonmukosa, ausgekleidet von Epithelien, die in einer Reihe angeordnet sind.

Um ein Adenom als tubuläres Adenom bezeichnen zu können, müssen mindestens 75% des Adenoms aus tubulären Anteilen bestehen.

Villös: Ein Villus ist eine fingerförmige Struktur, mindestens doppelt so lang wie breit (Lam-Himlin et al., 2019), die im Kolon von einer mindestens einreihigen Zeile von Epithelien überkleidet wird.

Um ein Adenom als villöses Adenom bezeichnen zu können, müssen mindestens 75% des Adenoms aus villösen Anteilen bestehen.

Tubulovillös: Hier handelt es sich um eine Mischung aus tubulären und villösen Strukturen in variabler Zusammensetzung, jeweils > 25% bis < 75% villöse und tubuläre Anteile.

2.2.2 Serratierte Läsionen (nach LAM - HIMLIN 2019 und WHO 2019)

Zu den serratierten Läsionen gehören nach der Definition von Lam-Himlin (2019) und der WHO (2019) die hyperplastischen/metaplastischen Polypen, die sessilen serratierten Adenome/Polypen, die traditionellen serratierten Adenome und die unklassifizierbaren, serratierten Polypen.

- **Hyperplastischer Polyp**
 - Microvesiculär
 - Becherzellreich
 - Mucinreich
- **Sessiles serratiertes Adenom/Polyp (SSA/P)**
 - Ohne zytologische Dysplasie
 - Mit LGD zytologischer Dysplasie
 - Mit HGD zytologischer Dysplasie
- **Traditionelles serratiertes Adenom (TSA)**
 - Ohne zytologische Dysplasie
 - Mit LGD zytologischer Dysplasie
 - Mit HGD zytologischer Dysplasie
- **Serratiertes Polyp, unklassifizierbar (usA)**

a. Hyperplastischer Polyp

Ein hyperplastischer Polyp besitzt im Wesentlichen dieselbe Architektur wie die normale kolorektale Mukosa. Für jede Krypte gibt es eine „gerade“ Verbindung zwischen Lumenöffnung und Kryptenbasis, die auf der L. muscularis mucosae aufsitzt. Das einreihige Epithel enthält Becherzellen oder Zellen mit einem „sprudelnden“ (microvesikulären) Zytoplasma und die Basis der Krypten ist eng, abgerundet und insbesondere nicht abgeknickt oder verzweigt. Zytologisch finden sich keine Dysplasien (Snover et al., 2010). Nach Anzahl und Morphologie der Becherzellen werden nach der WHO 2019 zwei Typen abgegrenzt. Es wird zwischen becherzellreichen (GCHP) und microvesikulären hyperplastischen (MVHP) Polypen unterschieden.

b. Sessiles serratiertes Adenom

Sessile serratierte Adenome weisen grundsätzlich die gleiche Architektur auf wie die übliche Dickdarmschleimhaut. Es besteht eine intakte Verbindung zwischen dem oberflächlichen Lumen und der Basis der jeweiligen Krypte, die selbst auf der Muskularis mucosae fußt.

Es findet sich überwiegend eine Zellreihe, wobei die innere Oberfläche sägezahnartig aufgeworfen ist. In der Tiefe besitzen die Krypten Aussackungen und Abzweigungen, die die Form eines T oder eines L haben (Montgomery et al., 2017).

Die sessilen serratierten Läsionen ohne Dysplasie (SSL) besitzen kleine, basal lokalisierte Zellkerne und gelegentlich größere Zellkerne mit unauffälligen Nukleolen.

Die sessilen serratierten Adenome mit Dysplasien (SSLD) zeigen ein variables morphologisches Erscheinungsbild, insbesondere eine komplexe Architektur mit dysplastischen Komponenten und dysplastischen Zytoplasma- und Zellkernveränderungen.

c. Traditionelles serratiertes Adenom

Die traditionellen serratierten Adenome sind definiert als Adenome mit einem desorganisierten Wachstumsmuster. Die Läsion hat die Orientierung und den Bezug zur L. muscularis mucosae verloren, die Architektur ist abnormal (Montgomery et al., 2017).

Eine gezackte/ gezahnte bzw. serratierte innere Oberfläche ist überall zu sehen. Die Drüsen haben kleine Knospen (Auffaltungen und Taschenbildungen), die an Sterne erinnern. Die Zytologie weist deutliche Veränderungen auf mit kleineren Zellkernen als denjenigen, die in konventionellen Adenomen beobachtet werden.

Auch bei den serratierten Läsionen sind Dysplasien an Zell- und Zellkernunregelmäßigkeiten erkennbar, außerdem an prominenten apoptotischen Körperchen und einem abruptem Übergang zwischen Normal und Dysplasie.

Die morphologische Einordnung der serratierten Adenome nach WHO 2019 wurde zuvor tabellarisch (s. Tabelle 1) aufgeführt.

2.2.3 Dysplasie

Der Begriff „Dysplasie“ ist morphologisch definiert als ein sichtbares Abweichen von der Norm in Bezug auf Zellen, Zellkerne und Architektur. Wichtig zu erwähnen

ist, dass die Begriffe Dysplasie und Neoplasie von vielen Autoren synonym, von Anderen dagegen antonym verwendet werden. Feingeweblich werden Dysplasien beispielsweise erkennbar an prominenten apoptotischen Körperchen und an Zell- und Kernunregelmäßigkeiten. Weiterhin wird die Grenze zur normalen Mukosa als scharf und abrupt, dagegen bei reaktiven, sprich entzündlichen, Veränderungen als unscharf und fließend beschrieben.

Einige Pathologen benutzen stattdessen die Begriffe LGIEN und HGIEN zur Beschreibung der histologischen Veränderungen.

Wieder andere Pathologen benutzen die Begriffe LGD (Low Grade Dysplasie), HGD (High Grade Dysplasie) oder IMC (intramucosales Carcinom) (Lam-Himlin et al., 2019). Wieder andere fassen HGD und IMC zusammen und bezeichnen beide Läsionen als pTis (pathologisch Tumor in situ).

Für die Zwecke dieser Arbeit habe ich die in den untersuchten Gewebeproben dokumentierten, morphologischen Veränderungen angelehnt an nachfolgende Ausführungen definiert (s. Tabelle 3):

	LGD	HGD	IMC	ICA
Zellkerne	Kerne polar	Kerne apolar	Kerne apolar	Kerne apolar
Kernform	länglich	partiell dysform	partiell dysform	dysform
Zytoplasma	Keine Atypien	Atypien	Atypien	Atypien
Architektur	Keine Störung	Komplex	Komplex	Komplex
Invasion	Keine	Keine	Solitär durch Basalmembran in L.propria	Klar erkennbar
Submucosa	Frei	Frei	Frei	Invasion

Tabelle 3: Kriterien der Dysplasie

Legende: LGD = low grade Dysplasie, HGD = high grade Dysplasie, IMC = intramucosales Carcinom, pTis = morphologisch gesichertes Carcinoma in situ, L.p. = Lamina propria, ICA = invasives Carcinom. Aus LAM-HINLIN et al., 2019¹

Die WHO definiert die High grade Dysplasia (HGD) mit dem Vorliegen von intraluminalen Nekrosen, unregelmäßigen Krypten, cerebriformer Architektur, dem Verlust der Zellpolarität, vergrößerten Zellkernen mit prominenten Nukleolen, einem verteilten Chromatinmuster und atypischen Mitosen. Diese genannten Kriterien sollen bereits in der Übersicht (4-10 fache Vergrößerung) erkennbar sein.

2.3 Methoden

Von den asservierten formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Gewebeproben wurden sowohl eine Hämatoxilin-Erythrosin-Färbung, eine routinemäßig durchgeführte Übersichtsfärbung, als auch ein immunhistochemischer Nachweis mit Ki-67 gefertigt.

2.3.1 Hämatoxilin-Erythrosin-Färbung

Von den ausgesuchten FFPE-Blöcken wurden bis 10µ dicke, auf dem Mikrotom hergestellte, Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Die aufgezogenen Schnittpräparate wurden in einem Brutschrank bei 62-70 °C getrocknet und das Paraffin mit warmem Xylol aus dem Gewebeschnitt gelöst. Über die absteigende Alkoholreihe (100-70%) wurden die Objektträger in Wasser überführt, für 2 ½ Min. in unverdünntes Hämatoxilin Gill 3 (Thermo 6765010) eingestellt und anschließend für 10 Min. in warmem fließendem Wasser gebläut. Für die Färbung des Zytoplasmas wurden die Schnittpräparate für 8-10 Min. in Erythrosin (Stammlösung 1:1 mit Aqua dest. plus 8 - 10 Tropfen Eisessig) eingestellt, kurz in 70%igen Alkohol eingetaucht, zügig die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90% und 100%) heraufgeführt, dreimal in jeweils frischem Xylol gespült und abschließend mit Kindlers Eukitt unter einem Deckgläschen dauerhaft eingedeckt und versiegelt.

Im Ergebnis stellt sich das Zytoplasma in verschiedenfarbigen Pinktönen dar, Erythrozyten und Eosinophile sind orangerot, die Kerne in unterschiedlichen Nuancen blau bis blauviolett angefärbt (s. Abb 1).

Die so hergestellten Präparate sind lichtgeschützt unbegrenzt haltbar.

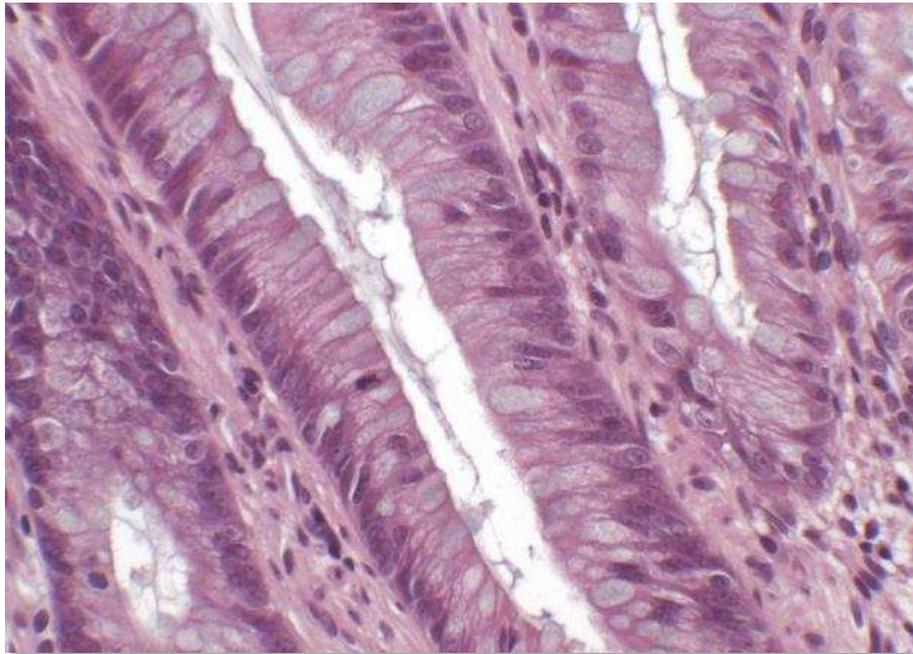


Abbildung 1: HE, 20x (50003/16) Ausschnitt aus einer normalen Krypte

2.3.2 Nachweis von Ki-67

Die immunhistochemische Färbung von Ki-67 wurde ebenfalls manuell angefertigt.

Dazu wurden die bis 8µm dicken, auf dem Mikrotom angefertigten Schnitte der FFPE-Blöcke auf silanisierte Objektträger (Super Frost Plus der Firma Thermo) aufgezogen, über Nacht bei Raumluft getrocknet, 20 Min. in reines, kaltes Xylol eingestellt und über die absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%) bis zum Wasser heruntergeführt. Vor der Anwendung des Large Polymer Systems von Thermo wurden die Schnittpräparate von Wasser in Citratpuffer überführt.

Die so vorbereiteten Objektträger wurden - liegend in einer feuchten Kammer - für 60 Min. mit der Primärantikörperlösung beschichtet, 10 Min. in Tris-Puffer gespült, 20 Min. mit dem Sekundärantikörper-Enhancer (Thermo TL-125-PB) beschichtet, erneut in Tris-Puffer gespült, für 20 Min. in Polymer (Thermo TL-125-PH) eingestellt, erneut in Tris-Puffer gespült, für 15 - 20 Min. dem AEC -Chromogen (Thermo TS-125-HRS), benetzt und anschließend in Aqua dest. gespült. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für 10 - 20 Sec. in Hämatoxylin Gill3 (Thermo 6765010) gegengefärbt, für 10 Min. in 32-38°C warmem Leitungswasser gebläut und abschließend aus dem Wasser mit Aquatex eingedeckt.

Der Antikörper Ki-67 wurde von DCS und Biogenex als Konzentrat (AM-297-UC) bezogen und in einer Verdünnung von 1:30 verwendet.

Im Ergebnis sind die Stellen der immunhistochemischen Reaktion des Antikörpers in unterschiedlich kräftigen Nuancen rot-braun (= Ki-67 pos. Zellkerne) und die restlichen Zellkerne blau gefärbt (s. Abb. 2).

Das Präparat ist, am besten lichtgeschützt, unbegrenzt haltbar.

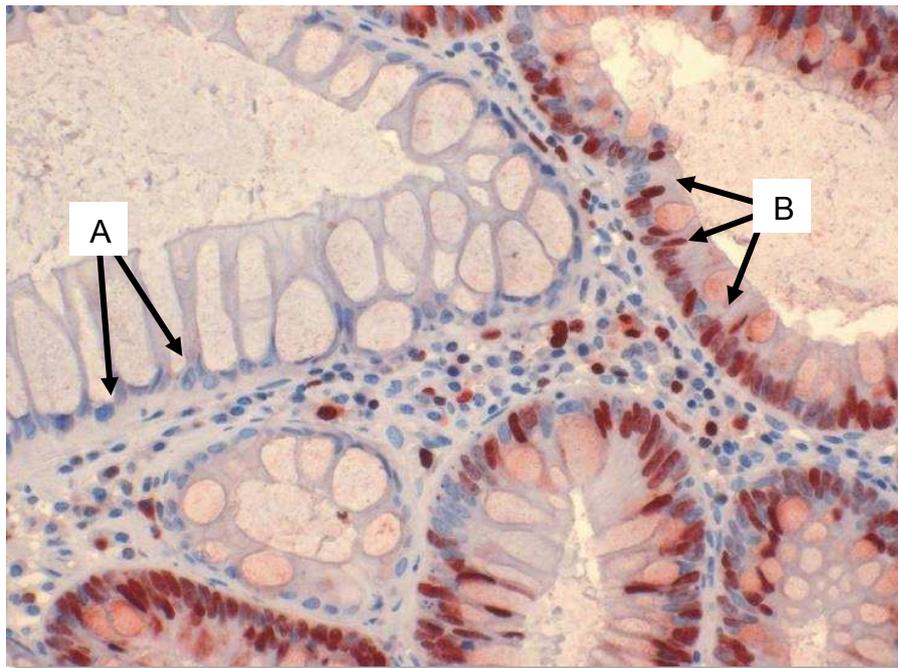


Abbildung 2: Nachweis von Ki-67 (10x) (50043/16) A = Ki-67 neg. Zellkerne, B = Ki-67 pos. Zellkerne

2.3.3 Tris-Puffer für die Immunhistochemie (Waschpuffer für IH)

61 g Tris (Trishydroxymethylaminomethan, Merck 1.08382) in
ca. 500 ml Aqua dest. auflösen,
400 ml 1 N Salzsäure (Merck 1.09057) hin zu fügen und auf 10 Liter mit
 Aqua dest. auffüllen

pH-Wert: 7,5 +/- 0,2

Haltbarkeit: 3 – 4 Monate bei Raumtemperatur

2.3.4 Citratpuffer (6,0) für die Immunhistochemie

Ein Fläschchen Citratpuffer-Konzentrat (Quartett 400300692) mit A. dest auf 1000 ml auffüllen.

Alternativ bei Lieferengpass:

2,1 g Zitronensäuremonohydrat (Riesel-de Häen 33144) in 1000 ml A. dest lösen und mit ca. 13 ml 2N NaOH (Merk 9136) den pH-Wert auf 6,0 einstellen.

pH-Wert: 6,0 (+/- 0,1)

Haltbarkeit: 3 - 4 Monate bei Raumtemperatur

2.4 Kriterien der Auswertung

Für die Auswertung wurden die Präparate am Lichtmikroskop bei 4-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung mikroskopiert und anhand folgender Kriterien ausgewertet. Den Kriterien wurden zur besseren Auswertbarkeit im Anschluss Zahlenwerte (1-n) zugeordnet und in Excel-Tabellen übertragen.

2.4.1 HE-Übersichtsfärbung

In der HE-Färbung wurden für jedes Schnittpräparat die u.g. Kriterien überprüft und dokumentiert.

a. allgemeiner Aufbau des Adenoms

Wachstumsmuster	tubulär, tubulovillös, villös, serratiert, sessil, hyper-/metaplastisch, Carcinom, Entzündung
Kryptenlänge	normal, verkürzt, verlängert, variabel
Kryptenverlauf	nicht verzweigt, leicht verzweigt, stark verzweigt, variabel, L-förmig
Lumenform	glatt-rundoval, gezackt, sternförmig gerafft, variabel
Kryptendurchmesser	normal, vermindert, dilatiert, variabel

b. Zellzusammensetzung der Mucosa und Lamina propria mucosae

Becherzellen	normal, vermindert, vermehrt, variabel
Markrophagen	schaumig, viele, einige, keine
Entzündung	nein, ja ohne Lymphfollikel, ja mit Lymphfollikeln
Blutgefäße	normal, vermindert, vermehrt, variabel
Lage der Blutgefäße	gesamte Mukosabreite = normal, vermehrt darmlumennah
Durchmesser der Blutgefäße	kapillär (7µm), dilatiert

2.4.2 Ki-67 Nachweis

Bei der Analyse der Ki-67 gefärbten Präparate wurden die u.g. Kriterien angewandt.

a. Positivität von Ki-67 in den Zellkernen

Farbintensität der Zellkerne	schwach, kräftig, inhomogen, variabel
Form der positiven Zellkerne	rundlich-oval, längsoval, spindelrig, variabel
Größe der positiven Zellkerne verglichen mit negativen Epithelzellkernen	normal (gleichgroß), kleiner oder größer, variabel
Lage der positiven Zellkerne in der Zelle	basal, basal-mittig, basal-apikal, apikal, variabel

b. Lage und Form der Ki-67 positiven Zellen in der Krypte (Proliferationszone)

Zum Zweck der Vergleichbarkeit und Übersichtlichkeit der großen Variabilität der Kryptenlängen wurde die Kryptenlänge bei jedem Präparat gleich „1“ gesetzt und jede Krypte in 4 Teile aufgeteilt. Ein „1.Viertel“, im Bereich des Kryptenbodens, ein „2.Viertel“ und ein „3.Viertel“ jeweils darüber sowie ein „4.Viertel“, das mit der Kryptenöffnung am Darmlumen endet (s. Abb. 3). Eine Ausbreitung in die Tiefe, also eine Überschreitung der L. muscularis mucosae wurde mit „0“ bewertet.

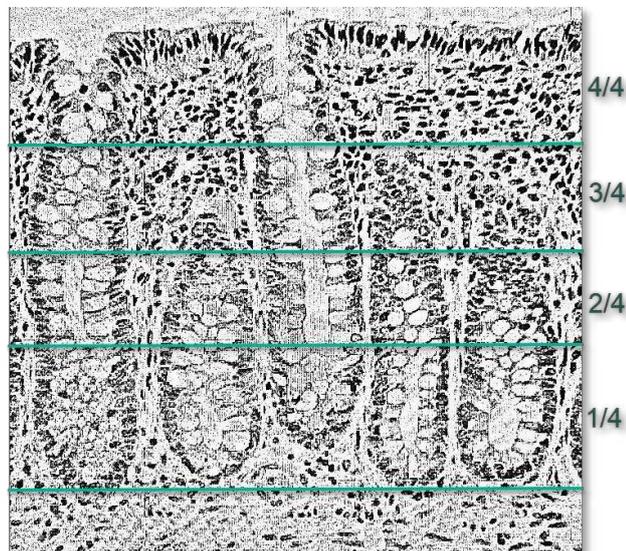


Abbildung 3: Einteilung der Proliferationszonen von 1/4 bis 4/4 (10x)

entnommen aus <https://www.pathologyoutlines.com/topic/colonhistology.html>

Kryptenboden	nein, ja nur am Kryptenboden, ja und im Kryptenverlauf
Kryptenabschnitte:	
Tiefe Wandschichten	0/4
Erstes Viertel	Kryptenboden (1/4 - 1/4)
Zweites Viertel	kryptenbodennahes Viertel (2/4 - 2/4)
Drittes Viertel	kryptenbodenfernes = darmlumennahes Viertel (3/4 - 3/4)
Viertes Viertel	Kryptenöffnung (4/4 - 4/4)
	sowie alle Bereiche dazwischen (bspw. 1/4-3/4)
Dichte der Positivität	kräftig, schwach
Mehrrichtigkeit	einreihig, mehrrichtig, dachziegelartig, variabel
Grobe Zelltypen	nein, fokal, ganze Länge, variabel
Grobes Chromatin	ja, nein
Chromatindichte	normal, dichter, blasig
Nucleolen	normal, fehlend, vermehrt

In Abbildung 4 ist beispielhaft eine quer angeschnittene Krypte mit glatt begrenztem, rund-ovalem Lumen, vielen Becherzellen und runden, basal liegenden Zellkernen dargestellt.

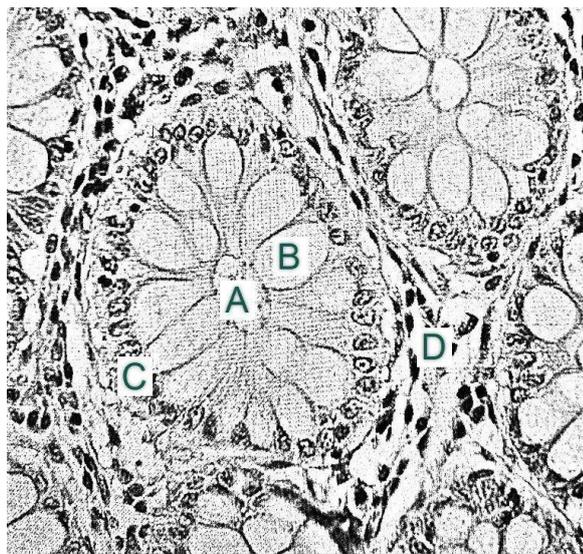


Abbildung 4: quer angeschnittene Krypte (40x)

Legende: A = Lumen, B = Becherzelle, C = Zellkern, D = Lamina propria

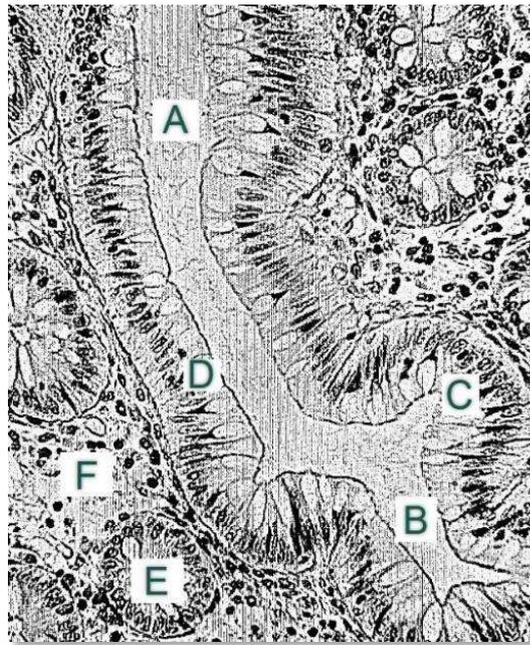


Abbildung 5: Krypte im Längsschnitt (20 x)

entnommen aus <https://www.mikroskopie-forum.de/index.php?topic=3746.0>

Legende: Krypte A = darmlumennahes Kryptenlumen, B = Kryptenbasisnahes Kryptenlumen, C = beginnende Serratierung, D=Zellkernstellung, E = quer angeschnittene Krypte, F = Lamina propria

In Abbildung 5 ist beispielhaft ein Teil einer längs angetroffenen Krypte dargestellt, wobei sich im Bereich des Kryptenbodens (1-2/4 = B) eine beginnende Serratierung mit Ausstülpungen zur Seite erkennen lässt. Es sind weniger Becherzellen vorhanden. Die Zellkerne sind eher längs-oval und liegen basal-mittig innerhalb der Zelle.

2.5 Statistische Analyse

Zur Ermittlung der Verteilung und Häufigkeiten wurden zum Zwecke statistischer Analysen eine Mittelwertbestimmung und Medianwertbestimmung durchgeführt., ebenso eine Bestimmung der Signifikanz. Die Daten wurden in EXCEL-Tabellen (EXCEL 2013) dokumentiert und mit diesem Programm unter Verwendung von PIVOT-Tabellen und diversen Diagrammtypen analysiert.

Das Hauptaugenmerk liegt auf einer Häufigkeitsverteilung der Proliferationszonen.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitative Ergebnisse zum Nachweis der HE-Färbung

In der Übersichtsfärbung sind die Zellkerne blau und das Zytoplasma, sowie die Fasern in unterschiedlichen Rosatönen angefärbt. Im HE-Schnitt ist die Architektur der Mukosa am besten zu bewerten. Insbesondere lassen sich das Wachstumsmuster und der Kryptenverlauf, sowie die Zellzusammensetzung beurteilen. Die Einordnung der untersuchten Läsionen in die verschiedenen Adenomtypen erfolgte mittels der HE-Färbung (s. Abb. 6).

Die nachfolgenden Abbildungen der verschiedenen Adenome entstammen allen von mir untersuchten histologischen Präparaten.



Abbildung 6: sessile serratierte Läsion (ssL) (50042/16, 4x)

3.2 Qualitative Ergebnisse zum Nachweis von Ki-67

3.2.1 Allgemeine Beobachtungen

Beim Nachweis von Ki-67 sind alle Zellkerne, die sich in Proliferation befinden, in unterschiedlich stark leuchtenden Brauntönen angefärbt. Der Hintergrund, sprich alle anderen Zellen der G0-Phase und das Stroma, ist blassblau gefärbt.

Die Aktivität in Form von unterschiedlichen Brauntönen reicht von einzelnen blassbraunen intranukleären Punkten (s. Abb. 7) bis zu einer so starken Positivität,

dass eine weitere Differenzierung des Reaktionsmusters dieser Zellkerne nicht mehr möglich ist (s. Abb. 8).

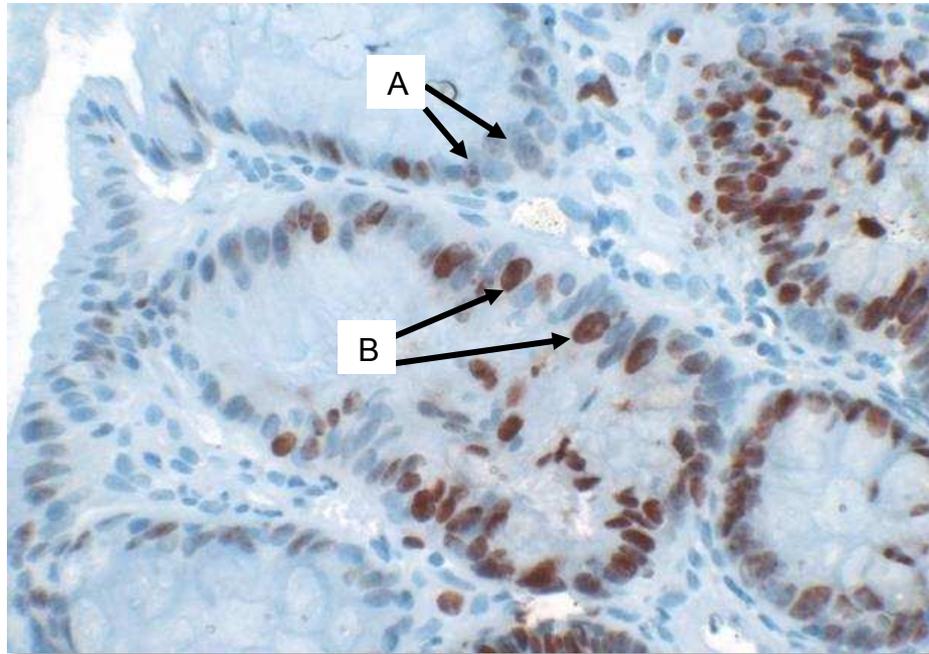


Abbildung 7: Ki-67, 40x (50043/16)

A = schwach pos. Zellkerne mit einzelnen intranukleären braunen Punkten, B = stark positive Zellkerne

Dass nicht nur die Kerne der Epithelzellen, sondern auch andere Zellarten des Gewebes proliferieren können, zeigen Abbildung 10 und 11 mit ebenfalls Ki-67 positiven lymphoiden Zellelementen in der Lamina propria.

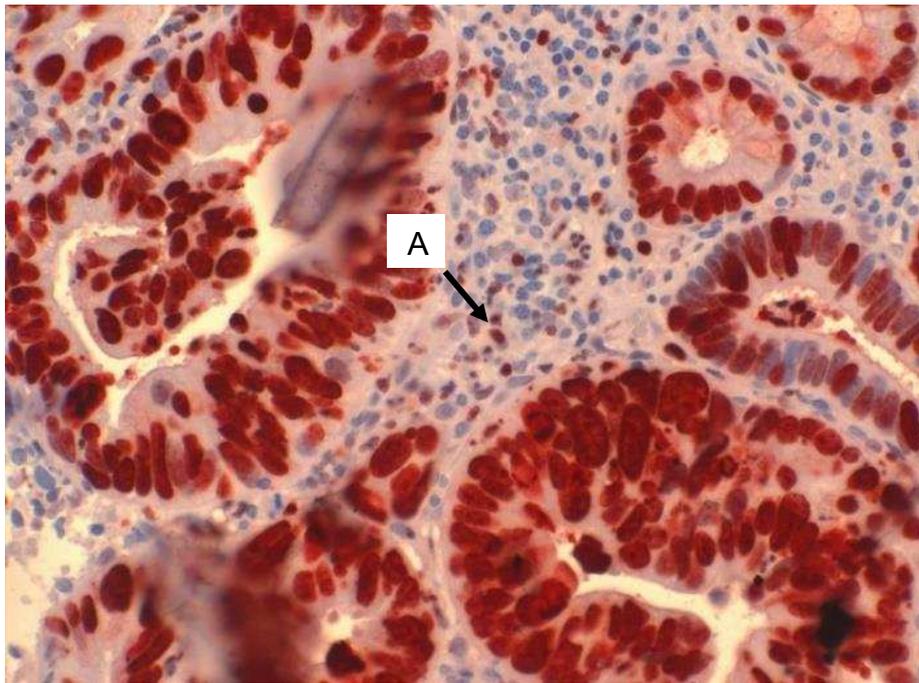


Abbildung 8: Ki-67, 40 x (HGIEN, 50091/16)

A = Lymphozyt

Bei Arealen mit stark positiven Zellkernen kann zudem beobachtet werden, dass in einigen Zellen das Zytoplasma ebenfalls partiell einen Brauntön aufweist.

Je nach Proliferationsaktivität liegen die positiven Zellkerne in den einzelnen Epithelzellen basal, in der Mitte der Zellebene oder lumenwärts (s. Abb. 8).

In regulären Krypten sind die positiven Zellkerne nur in ihren basalen Abschnitten nachweisbar, die Positivität beschränkt sich auf das basale Viertel einer Krypte.

In der Regel liegt der positive Zellkern in der Nähe der Ansatzstelle der Zelle an der Basalmembran ebenso wie der nicht gefärbte Zellkern in der G₀-Phase.

3.2.2 Normale Krypten

In normalen Krypten des gesunden Kolonepithels liegen einzelne wenige Zellen mit Ki-67 positiven Zellkernen am Kryptengrund sowie basal nahe der Basalmembran (s. Abb. 9). Die Positivität reicht vom Kryptengrund bis maximal zum Beginn des zweiten Viertels der Kryptenhöhe.

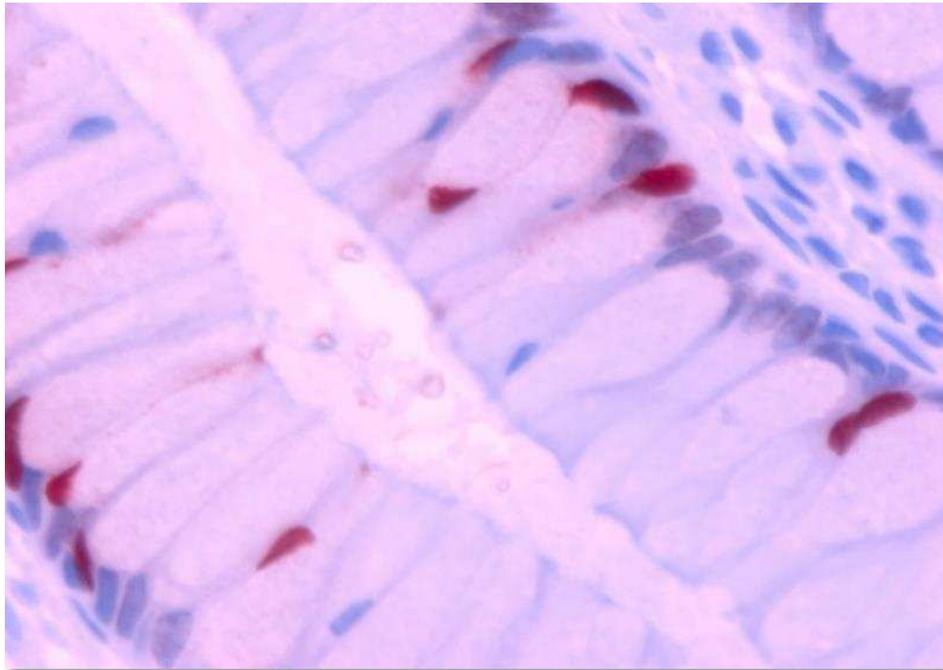


Abbildung 9: Ki-67 positive Zellkerne in normaler Krypte (50065/16, HE, 40x) Ausschnitt aus einer normalen Krypte.

Normalerweise liegt die Proliferationszone basal am Kryptenboden, d.h. im unteren Viertel der Krypte (1/4), da sich in der Regel dort die Stammzellen befinden. Die Zellkerne liegen basal innerhalb der Zellen, also in der Nähe der Ansatzstelle der Zelle auf der Basalmembran. So basal liegen auch die nicht gefärbten Zellkerne, welche sich in der G0 Phase befinden. Dies sieht man am einfachsten, wenn man den Querschnitt einer Krypte betrachtet (s. Abb. 9)

3.2.3 Metaplastische Polypen

Bei den metaplastischen/hyperplastischen Polypen findet sich die Proliferationszone an der Kryptenbasis und reicht bis maximal zur Hälfte der Kryptenhöhe (s. Abb. 10). Nur ganz vereinzelt sind Ki-67 positive Zellkerne auch in den übrigen Kryptenvierteln nachweisbar.

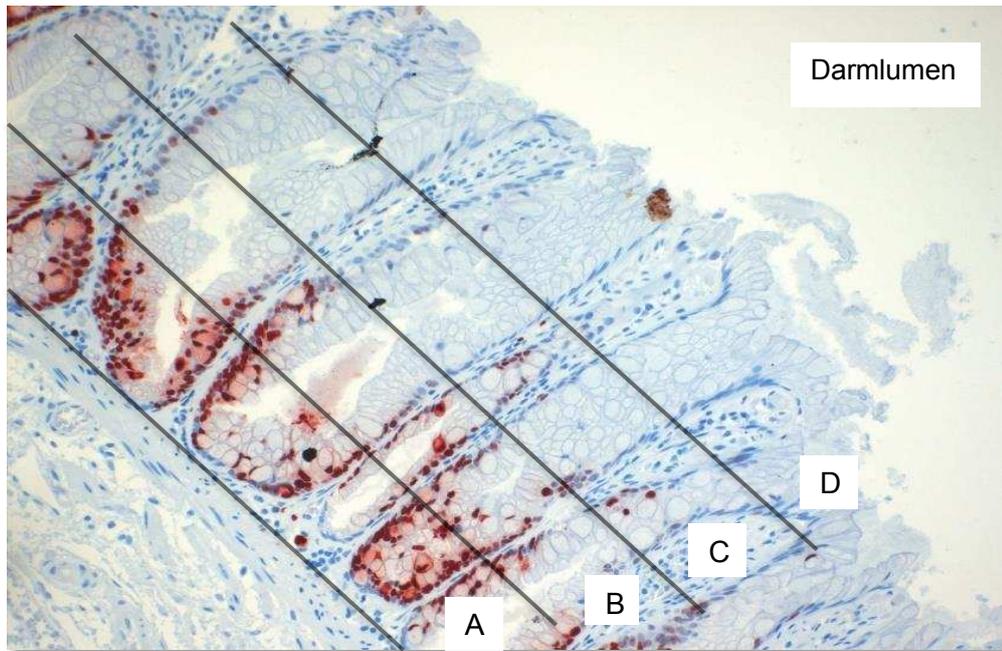


Abbildung 10: Beispiel eines metaplastischen Polypen (50157/16, Ki-67, 10x)

$A = 1/4, B = 2/4, C = 3/4, D = 4/4$

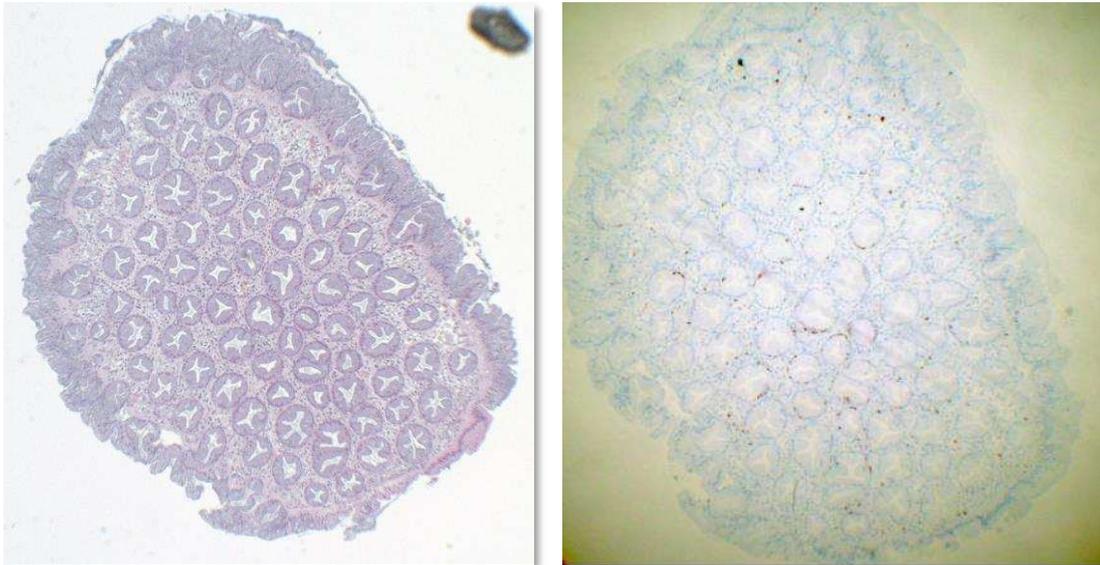


Abbildung 11: metaplastischer Polyp, tangential (50056a/16), Bild links HE-Färbung, rechts Ki-67 (HE 5x, Ki-67 5x)

Bei den serratierten Läsionen und den metaplastischen/hyperplastischen Polypen ist die Anzahl der Ki-67 positiven Zellkerne in der Tiefe der Krypten im ersten und

zweiten Viertel vermehrt, sie stehen dichter und reichen vom Kryptenboden bis etwas zu Hälfte der Kryptenhöhe (s. Abb. 11 und Abb. 12).

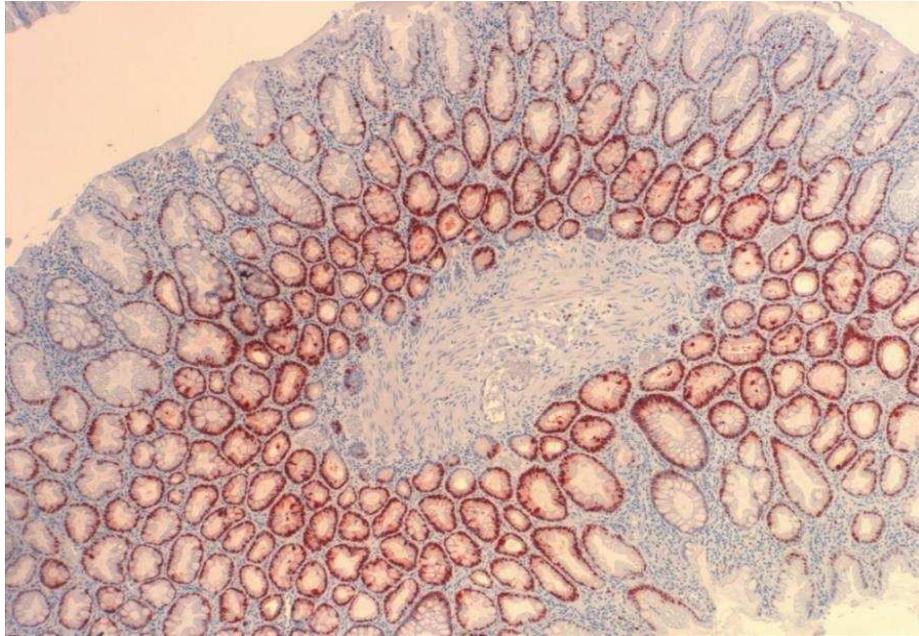


Abbildung 12: Hyperplastischer Polyp, kompletter Querschnitt, stärker positiv (50239/16, Ki-67, 5x)

Je größer eine Läsion als Ausdruck ihrer längeren Wachstumszeit, wird, desto mehr dehnt sich die Proliferationszone bis zum lumenwärtigen obersten Viertel (4/4) aus, wobei die Dichte der Ki-67 positiven Zellkerne partiell abnimmt.

3.2.4 Serratierte Läsionen

Bei den serratierten Adenomen beginnt die Proliferationszone an der Kryptenbasis (1. Viertel der Krypte) und reicht bis zur Hälfte (2. Viertel der Krypte). Die Krypten weisen eine stärker ausgeprägte Serratierung auf. Die Verteilung der Ki-67 positiven Zellkerne ist schon in der Übersicht (Abb. 13) gut zu erkennen. In den Abbildungen 17 und 18 ist das Vorrücken der Proliferationszone in die oberen Kryptenviertel bis hin zum Lumen exemplarisch dargestellt.

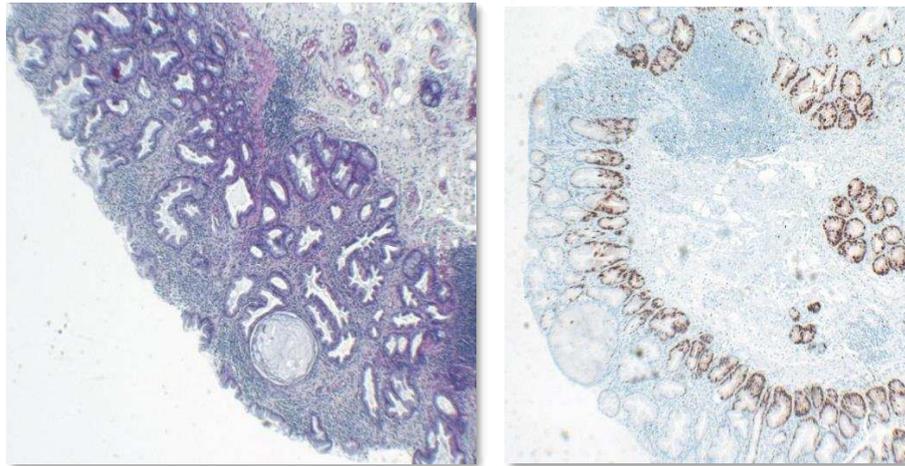


Abbildung 13: sessiles serratiertes Adenom mit einer Ausbreitung der Proliferationszone auf 1/4 bis max. 2/4 der Kryptenlänge (50057/16), links HE 10x und rechts Ki-67 4x

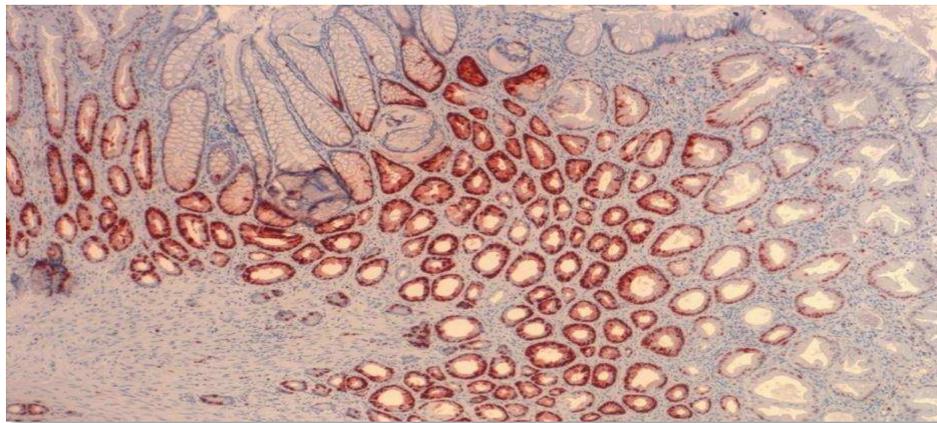


Abbildung 14: sessiles serratiertes Adenom mit einer Ausbreitung der Proliferationszone auf 1/4 bis max. 3/4 der Kryptenlänge (50154/16, Ki-67, 10x)



Abbildung 15: Längsschnitt eines serratierten Adenomes mit Ausdehnung der Proliferationszone vom 1/4 bis 4/4 der Kryptenhöhe (50312/16, Ki-67, 4x)

3.2.5 Konventionelle Adenome

Bei den kleinen tubulären Adenomen findet sich die Zone mit der höchsten Proliferationsaktivität an der Öffnung der Krypten, also im lumenwärtigen Viertel (4/4). In der Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten Fälle ist das 3. Viertel bereits in den Prozess miteinbezogen. Als Beispiel dienen die Abbildungen 16 und 17.



Abbildung 16: Knospe eines tubulären Adenoms, Ausbreitung 3/4 bis 4/4 (50310/16, Ki-67, 4x)



Abbildung 17: Tubuläres Adenom, Ausbreitung 3/4 bis 4/4 (50313/16, Ki-67, 4x)

Hinzu kommt, dass Krypten, bedingt durch Lage im Paraffinblock, häufig nicht nur der Länge nach, sondern auch tangential (s. Abb. 16) oder im Querschnitt (s. Abb. 17) dargestellt werden. Die topografische Position der Proliferationszone lässt sich dennoch den darmlumennahen oder darmlumenfernen Kryptenabschnitten zuordnen.



Abbildung 18: Tubuläres Adenom, 3/4 bis 4/4 (50316/16, Ki-47 10x)



Abbildung 19: Beginnender Verzweigungsdruck der Krypten (50314/16, Ki-67, 4x)

A = beginnende Verzweigung der Krypten, B = normale Krypte

Rücken die Zellen auf Grund des Größenwachstums dichter aufeinander entstehen Ausstülpungen (s. Abb. 18), welche dann dann zu einer Verzweigung der Krypten führen (Abb. 19).

Je größer und im Verlauf auch verzweigter die Adenome werden, desto größer wird die Proliferationszone, bis sich diese schließlich über die gesamte Länge einer Krypte bzw. das gesamte Adenom erstreckt. Beispielhaft sind die Abbildungen 20-24 angeführt.

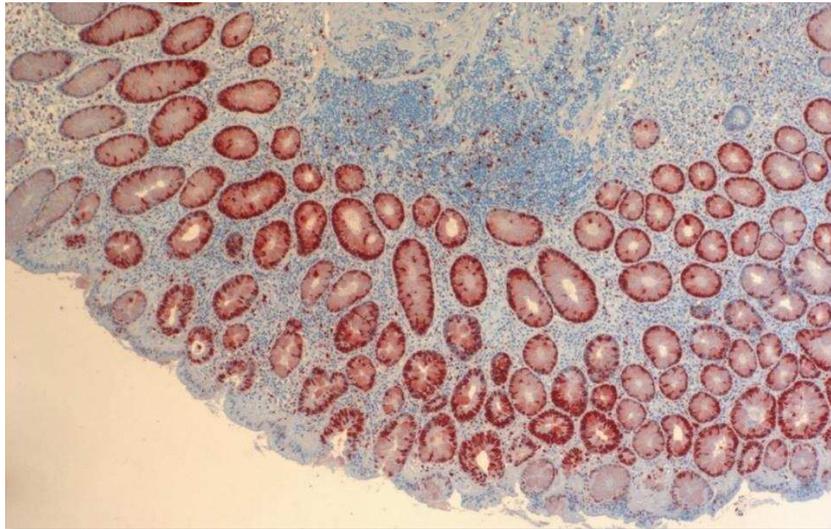


Abbildung 20: Ausdehnung über die gesamte Länge der Krypten (4/4 bis 1/4) (50318/16, Ki-67, 4x)

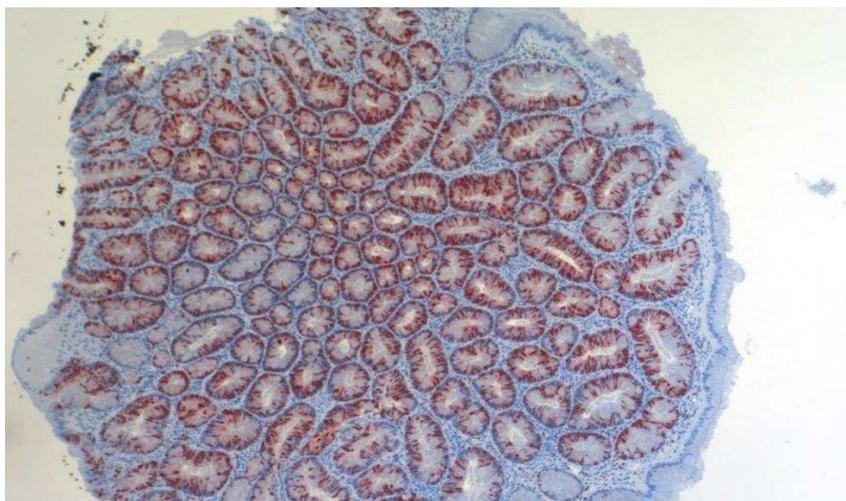


Abbildung 21: Ausdehnung über fast die gesamte Länge der Krypten, tangential angeschnitten (2/4 bis 4/4) (50319/16, Ki-67, 4x)

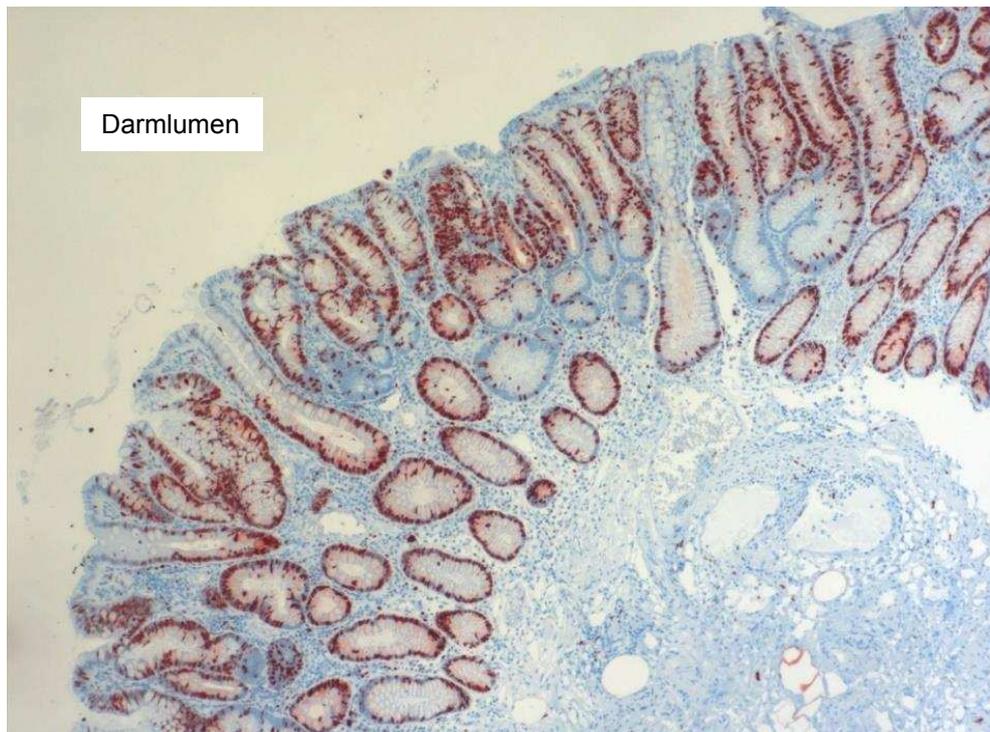


Abbildung 22: Beispiel der Ausdehnung über die gesamte Länge der Krypten, hier serratierte Läsion von 1/4 bis 4/4 (50174/16, Ki-67, 4x)

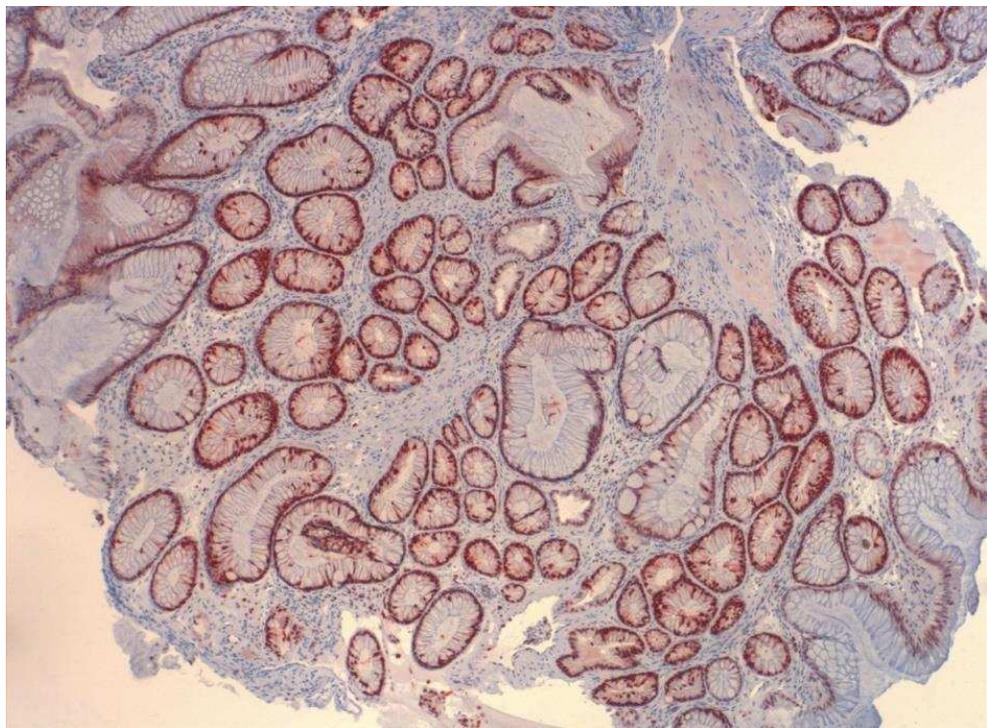
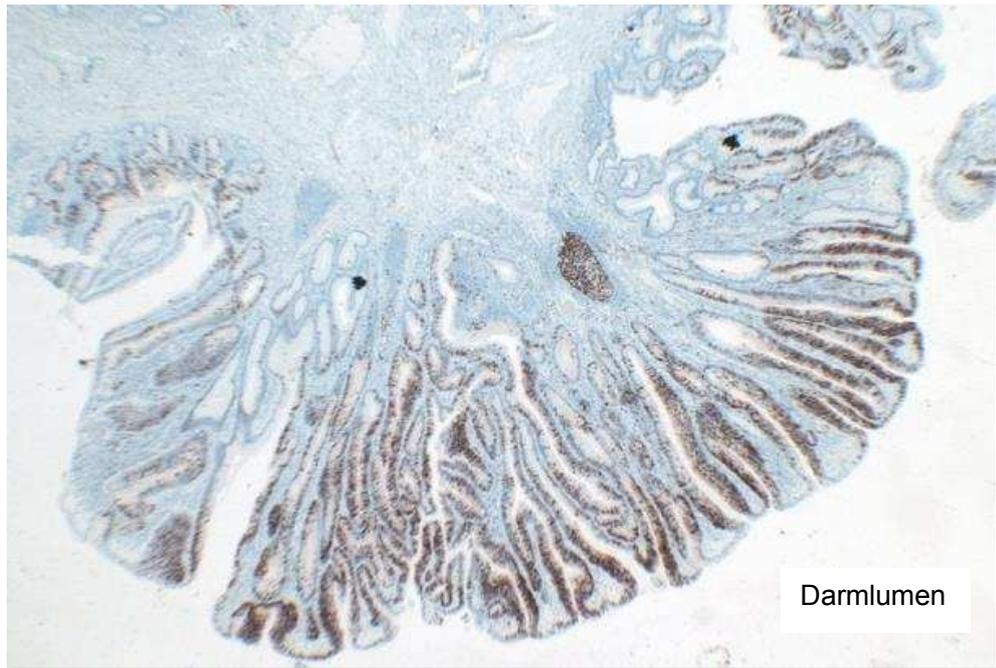


Abbildung 23: Beispiel der Ausdehnung über die gesamte Länge der Krypten, hier serratierte Läsion (50311/16, Ki-67, 4x)



*Abbildung 24: Tubulovillöses Adenom, Ausdehnung von 2/4 bis 4/4, fast senkrecht angeschnitten
(50058/16, Ki-67, 2,5 x)*

3.2.6 Atypien

Atypien gibt es in vielfältigen Variationen, bspw. in Bezug auf die Zellgröße, Zellform, Zellkernform, Zelldichte, Positivität und Verteilung.

Für die Bestimmung des Unterschiedes zwischen Karzinom und Carcinoma in situ ist der Nachweis einer Invasion über die L. muscularis mucosae hinaus in die Submukosa definitionsgemäß unverzichtbar.

Die Analyse dieser Atypien und der Lage sowie Ausbreitung der Proliferationszonen in Carcinomata in situ und Karzinomen geht über die Fragestellung dieser Arbeit hinaus. Einige Präparate wurden jedoch zu Vergleichszwecken hinzugezogen.

3.3 Quantitative Ergebnisse

3.3.1 Lokalisation der Entnahmeorte im Darm

Die Gewebeproben stammten aus allen Abschnitten des Kolons, inklusive des Rektums und verteilten sich über alle Kolonabschnitte mit Maximum im Rektosigmoideum. Die Kliniker, insbesondere Gastroenterologen und Onkologen, teilen nach Siegmund-Schultze (2017) das Kolon in einen rechtsseitig und einen linksseitig gelegenen Kolonabschnitt ein, dessen Grenze bei der linken Flexur verläuft, welche auch splenische Flexur genannt wird. 132 entstammten dem rechtsseitigen Kolonabschnitt und 167 dem Linksseitigen. Von 22 Fällen war der exakte Entnahmeort nicht mehr zu eruieren.

Danach verteilten sich die Entnahmeorte der Biopsien wie folgt (s. Abb. 25):

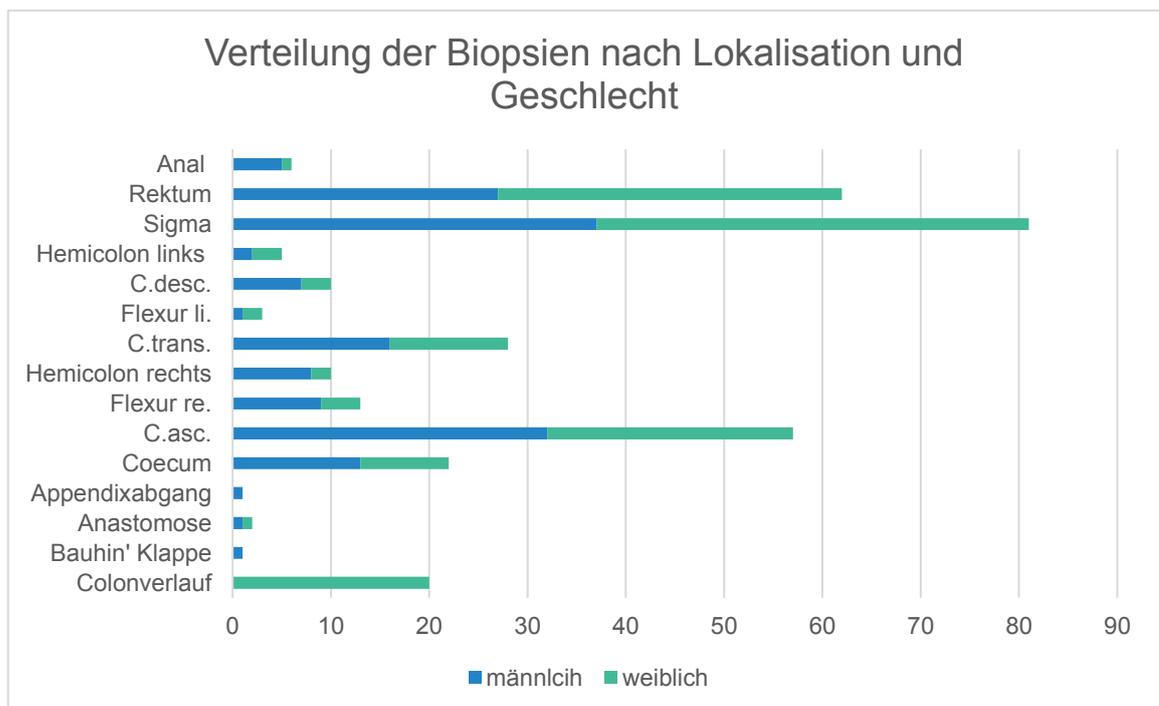


Abbildung 25: Verteilung der Biopsien nach Lokalisation und Geschlecht

3.3.2 Verteilung nach Dysplasiegraden

Auf der Grundlage dieser zuvor genannten Ausführungen lässt sich das Untersuchungsgut nach den Diagnosen der WHO 2010, geltend bis 2019, einteilen nach Grad der Dysplasie (s. Abb. 26).

Von den 189 Adenomen mit low grade Dysplasie waren 98 männlichen und 91 weiblichen Geschlechts. Bei den high grade Dysplasien waren 38 männlich und 34 weiblichen Geschlechts. Bei den 37 mP/hP waren 14 männlich und 23 weiblich.

4 der 5 Carcinoma in situ stammen von männlichen Patienten. Bei den 12 Adenocarcinomen waren 4 männlich und 8 weiblichen Ursprungs. Von den 6 Fällen mit Regeneration waren 4 weiblich und 2 männlich.

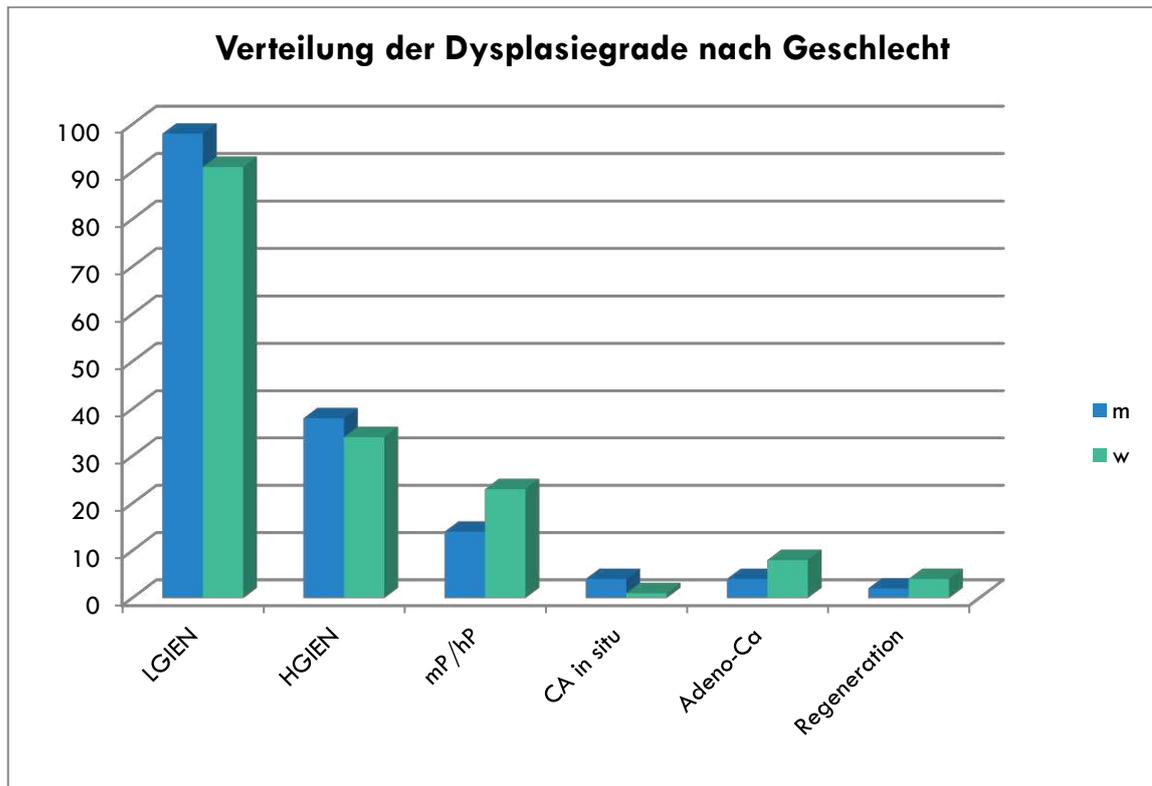


Abbildung 26: Verteilung der Dysplasiegrade nach Geschlecht, nach WHO 2010

Legende: LGIEN = low grade intraepitheliale Neoplasie, HGIEN = high grade intraepitheliale Neoplasie, Ca in situ = Carcinoma in situ, Adeno-Ca = Adenocarcinom, mP/hP = metaplastischer/hyperplastischer Poly

Legt man für die Auswertung den Dysplasiegrad nach WHO 2019 zu Grunde, erhält man ein gleichartiges Verhältnis. Der Grund dafür ist offenkundig. Die Kriterien von Dysplasie und Neoplasie haben sich in den Nomenklaturen nicht geändert, lediglich die Begriffe wurden ausgetauscht. Beispielsweise entspricht eine low grade IEN einer leichtgradigen Dysplasie und umgekehrt. Daher wird Diese hier nicht gesondert aufgeführt.

3.3.3 Verteilung nach morphologischen Diagnosen WHO 2010 vs. 2019

Schlüsselt man die Fälle gemäß der Adenomklassifikation der WHO 2010, d.h. nach der Architektur auf, ergibt sich untenstehende Verteilung (s. Tabelle 4).

Zwischen WHO 2010 und WHO 2019 gibt es bezüglich der konventionellen Adenome keinen Wandel in der Beurteilung.

Bei den serratierten Läsionen ist das anders. 2019 werden die metaplastischen/hyperplastischen Polypen zu den serratierten Läsionen gezählt. Unter dem Oberbegriff „Serratierte Läsionen“ werden auch alle anderen Adenome, die morphologisch ähnlich sind, d.h. serratierte Strukturen aufweisen, zusammengefasst. Das Untersuchungsgut besteht aus 197 konventionellen und 101 serratierten Läsionen.

Adenomtypen	Klassifikation	
	WHO 2010	WHO 2019
Metaplastische Polypen (mP/hP)	37	
Serratierte Läsionen (sL)	56	93
Sessile serratierte Läsionen (ssL)	4	4
Traditionelle serratierte Adenom (tsA)	2	2
Serratiert tubulovillöses Adenom (sttvA)	2	2
Sessiles tubulovillöses Adenom (stvA)	1	1
Tubuläre Adenome (tA)	130	130
Tubulovillöse Adenome (tvA)	65	65
Villöse Adenome (vA)	1	1
Carcinoma in situ	5	5
Adeno-Karzinome	12	12
Regeneration (o.A.f.M.)	6	6
Summe	321	321

Tabelle 4: Untersuchungsergebnisse, aufgeschlüsselt nach WHO-Kriterien 2010 und 2019

3.3.4 Verteilung der Proliferationszonen

Bei der quantitativen Analyse der Ergebnisse zeigt sich, dass bei fast allen Fällen nicht nur ein Viertel einer Krypte in den Prozess involviert ist, sondern die Veränderungen meistens das benachbarte Viertel mit einbeziehen (s. Tabelle 5/ Abbildung 28). Wenn man die Verteilung der positiven Kryptenviertel auf die Architektur der Adenome bezieht, stellt sich heraus, dass bei den tubulären Adenomen die Hauptmenge der Ki-67 positiven Zellkerne hauptsächlich in den oberen, kryptenbasisfernen Abschnitten – entsprechend dem 3-4/4 – liegt. Hingegen liegt diese Zone bei den serratierten Läsionen in den unteren, kryptenbasisnahen, sprich 1-2/4, Abschnitten.

Lage der Proliferationszone in der Krypte	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4	2/4	2/4	3/4	3/4	4/4	Summe
Diagnose	- 4/4	- 1/4	- 2/4	- 3/4	- 4/4	- 2/4	- 3/4	- 4/4	- 3/4	- 4/4	- 4/4	
Regeneration	0	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	6
Hyper-/metaplast. Polyp	0	18	16	2	1	0	0	0	0	0	0	37
Serratierte Läsion	0	6	38	6	6	0	0	0	0	0	0	56
Sessiles serratiertes Adenom	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	4
Traditionell serratiertes Adenom	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Serratiertes tubulovillöses Adenom	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
sessiles tubulovillöses Adenom	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Tubuläres Adenom	0	0	0	7	41	0	0	11	4	43	23	129
Tubulovillöses Adenom	0	0	0	1	17	0	2	6	0	33	7	66
Villöses Adenom	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Carcinoma in situ	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
Adeno-Karzinom	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Quersumme	12	27	59	21	71	0	2	18	4	77	30	321

Tabelle 5: Verteilung der Proliferationszonen nach WHO 2019

Anmerkung: Die hyper-/metaplastischen Polypen werden zur Veranschaulichung der ähnlichen Lage der Proliferationszone wie der der serratierten Läsionen separat aufgeführt.

Bei den hyperplastischen/metaplastischen Polypen waren die Ki-67 positiven Zellkerne bis auf 3 Fälle immer in den unteren Kryptenvierteln zu finden. Ki-67 Positivität in den lumennahen Vierteln ohne Nachweis von Positivität in den lumenfernen Vierteln gab es nicht.

Dieses Ergebnis zeigt sich auch bei den serratierten Läsionen, wobei in 6 von 56 Fällen (10,7%) das 3/4 und in weiteren 6 Fällen auch das 4/4 bereits involviert waren.

Diese Beobachtung trifft auf alle serratierten Läsionen zu, da immer die basalen Abschnitte der Krypten als auch, in unterschiedlicher Ausdehnung lumenwärts, benachbarte Viertel positiv sind.

Bei den konventionellen Adenomen ist das Gegenteil der Fall. Ein Adenom, dessen Proliferationszone nur in den basalen Kryptenabschnitten liegt, kommt bei den in dieser Studie ausgewerteten Fällen nicht vor. Hingegen liegt die Ki-67 Positivität hauptsächlich in den lumennahen Vierteln 3-4/4 oder dehnt sich in 41 von 192 tubulären Adenomen (21,4%) und in 17 von 66 tubulovillösen Adenomen (25,8%) auch über die gesamte Kryptenlänge aus.

Veranschaulicht dargestellt wird oben genanntes in Abbildung 27.

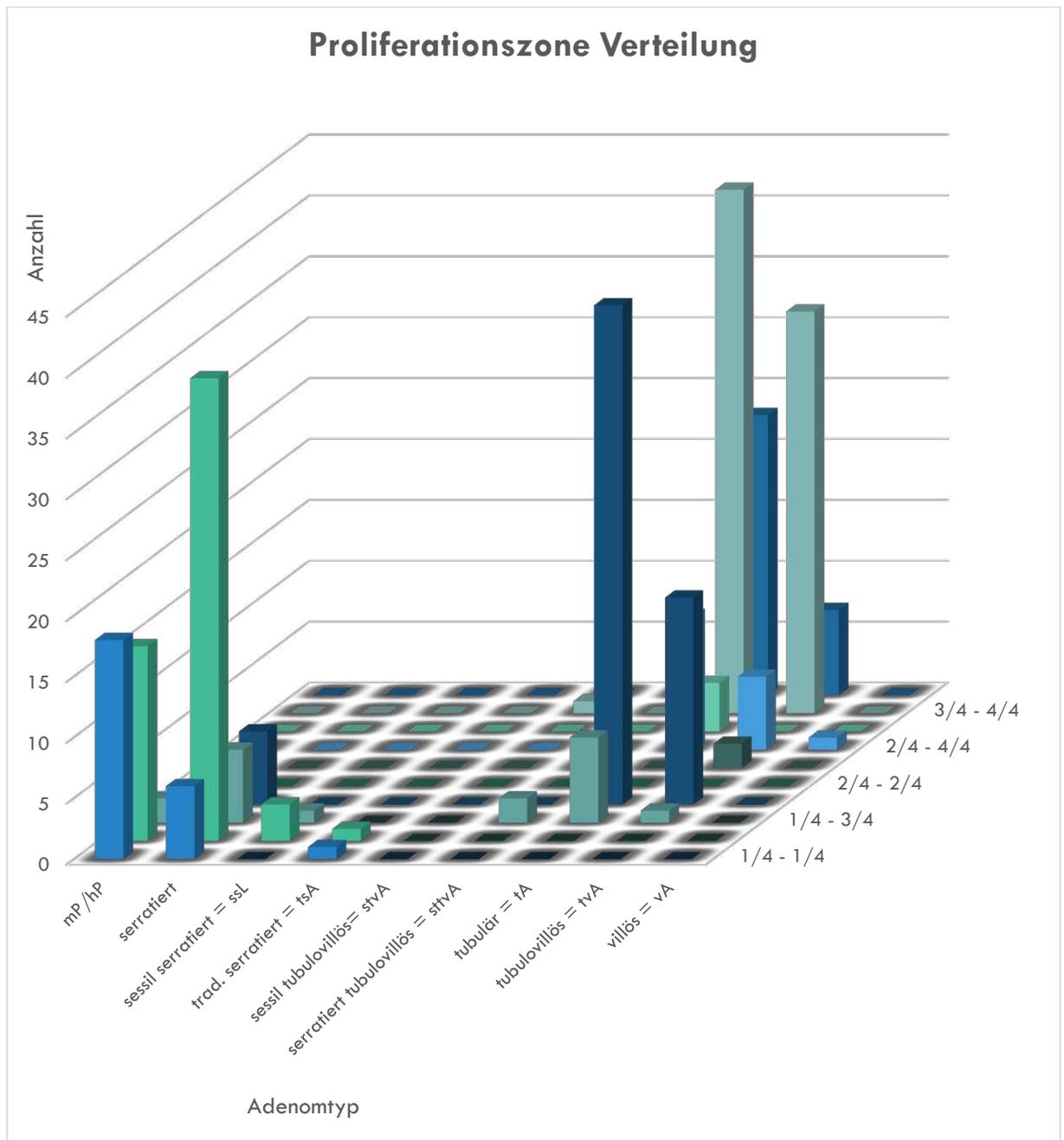


Abbildung 27: Verteilung der Proliferationszone, WHO 2019

Anmerkung: Die hyper-/metaplastischen Polypen werden zur Veranschaulichung der ähnlichen Lage der Proliferationszone wie der der serratierten Läsionen separat aufgeführt.

Ausgewertet nach der intensivsten Farbreaktion bestätigen sich die bisher beschriebenen Ergebnisse (s. Tabelle 6).

Diagnose	Submucosa	1.Viertel	2.Viertel	3.Viertel	4.Viertel	Summe
mP/hP	0	19	18	0	0	37
Sessile serratierte Läsion	0	6	38	6	6	56
sessil serratiertes Adenom	0	0	3	1	0	4
trad. Serratiertes Adenom	0	1	1	0	0	2
serratiertes tubulovillös Adenom	0	0	0	2	0	2
sessil tubulovillöses Adenom	0	0	0	0	1	1
Tubuläres Adenom	0	0	11	11	108	130
tubulovillöses Adenom	0	0	2	6	57	65
Villöses Adenom	0	0	0	1	0	1
Regeneration	0	6	0	0	0	6
Carcinoma in situ	0	5	0	0	0	5
Adenocarcinom	12	0	0	0	0	12
Quersumme	12	37	73	27	172	321

Tabelle 6: Verteilung des Intensivitätsmaximums der Ki-67 Expression

Bei den 56 serratierten Läsionen belegt die Proliferationszone in 6 Fällen nur das basisnahe Viertel, in 38 Fällen das erste und zweite Viertel, in 6 Fällen das erste bis dritte Viertel und in 6 Fällen alle Viertel.

Bei den 37 metaplastischen Polypen belegt die Proliferationszone in 19 Fällen das erste Viertel und in 18 Fällen das erste und zweite Viertel.

Von den 130 tubulären Adenomen sind 108 nur im vierten Viertel (83,0%), d.h. lumennah positiv. In 11 Fällen in den oberen Vierteln 3 und 4 und bei weiteren 11 Fällen in den Vierteln 4, 3 und 2. Ein Nachweis von Proliferationsaktivität in der basalen Krypte lässt sich nicht finden.

Bei den 65 tubulovillösen Adenomen sieht die Verteilung ähnlich aus.

Zieht man jedoch die Einteilung nach WHO 2010 heran, bei der primär der Grad der Dysplasie und nicht der Adenomtyp gewichtet werden, ist die Verteilung der Ki-67 Positivität deutlich heterogener. Angemerkt sei, dass metaplastische/hyperplastische Polypen nicht als maligne Vorläuferläsionen gewertet werden.

Lage der Proliferationszone in der Krypte	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4	2/4	2/4	3/4	3/4	4/4	Summe
	- 4/4	- 1/4	- 2/4	- 3/4	- 4/4	- 2/4	- 3/4	- 4/4	- 3/4	- 4/4	- 4/4	
Diagnose												
Adenokarzinom	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Ca in situ	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
HGIEN	0	1	1	3	32	0	2	4	0	19	10	72
LGIEN	0	8	41	11	33	0	1	14	4	57	20	189
mP/hP	0	18	16	2	1	0	0	0	0	0	0	37
Regeneration	0	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	6
Summe	12	29	59	18	72	0	3	18	4	76	30	321

Tabelle 7: Position der Proliferationszone in den Krypten, analysiert nach WHO 2010

Unterteilt man nur nach LGIEN und HGIEN lässt sich die Proliferationszone nicht sicher einem bestimmten Kryptenabschnitt zuordnen (s. Tabelle 7).

Bei HGIEN liegt der Großteil der Ki-67 Positivität bei 1-4/4 oder 3-4 bzw. 4/4. Bei den LGIEN hingegen ist die Variabilität noch stärker ausgeprägt und die Positivität über alle Kryptenviertel hinweg verteilt, wobei das basisnahe Viertel nicht immer positiv ist.

Bei den metaplastischen/hyperplastischen Polypen fällt auf, dass die Proliferationszone in den basalen Abschnitten, also dem 1. und 2. Viertel, liegt und dass das 1. Viertel immer mit einbezogen ist. Zu Vergleichszwecken wurden Carciomata in situ und Adenocarcinome herangezogen. Hier erstreckt sich die Proliferativität über den gesamten Tumor. Auch bei den Präparaten mit Regeneration erstreckt sich die Proliferationszone über den gesamten Kryptenverlauf, da es sich um einen Heilungsprozess handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es einen Unterschied in Bezug auf die Lage der Proliferationszone gibt, je nachdem, ob es sich um eine serratierte Läsion oder um ein konventionelles Adenom handelt. Bei den konventionellen Adenomen liegt die Proliferationszone in den darmlumennahen Vierteln und dehnt sich, wenn die Adenome an Größe zunehmen, zur Kryptenbasis hin aus.

Im Gegensatz dazu liegt die Proliferationszone der serratierten Läsionen einschließlich der hyperplastischen Polypen, an der Kryptenbasis. Im Laufe ihres Größenwachstums besetzten sie auch die darmlumennahen Kryptenabschnitte.

Ab einer gewissen Größe sind die konventionellen Adenome (tubulär, tubulovillös, villös) und die serratierten Läsionen allein anhand der mit Ki-67 markierten Proliferationszone nicht mehr voneinander zu unterscheiden. Weder die Bestimmung der Menge an Becherzellen noch die Analyse des Zellbesatzes der Lamina propria führen hier weiter. Die übrigen analysierten Merkmale der Kriptenstrukturen wie Kripten-länge, Form der Kriptenlichtung, Verzweigungstendenz und Kryptendurchmesser können bzw. müssen dann als Unterscheidungskriterien herangezogen werden. Sie sind auch für das Einordnen in das histopathologische Grading-System unverzichtbar.

4 Diskussion und Schlussfolgerungen

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass sich mit dem Nachweis von Ki-67 in den verschiedenen Adenomtypen des Dickdarmes ein Unterschied feststellen lässt, insbesondere zwischen den nicht serratierten Adenomen und den serratierten Läsionen. Bei den kleinen traditionellen Adenomen wie bspw. den tubulären Adenomen, findet sich die Hauptmenge Ki-67 positiver Zellkerne in den lumennahen Vierteln der Krypten, d.h. an der Schleimhautoberfläche zum Darmlumen. Bei den serratierten Läsionen zeigen meine Untersuchungsergebnisse, dass sich ihre Proliferationszone, ebenso wie die der metaplastischen/hyperplastischen Polypen, an der Kryptenbasis befindet, dem Ort, an dem die Regeneration des Kryptenepithels stattfindet.

Diese Beobachtung ist geeignet, die Empfehlung der WHO 2019 zu stützen, die metaplastischen/hyperplastischen Polypen den serratierten Läsionen zurechnen.

Weiterhin lässt sich diese neue Einordnung durch die von Pai et al. (2019) erhobenen Daten untermauern. Sie haben bei metaplastischen/hyperplastischen Polypen molekularbiologisch Veränderungen im Genom, nämlich KRAS- und auch BRAF- Mutationen, nachweisen können. Es konnte von Ihnen gezeigt werden, dass die BRAF-Mutation vor allem bei mikrovesikulären hyperplastischen Polypen und die KRAS-Mutation bei becherzellreichen hyperplastischen Polypen auftreten. Bezogen auf die Position der mit Ki-67 markierten Proliferationszone ergibt sich in meiner Arbeit kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die Dysregulation des Zellzyklus mit Proliferation und Apoptose führt zu einer Ausweitung der Proliferationszone von den unteren über die mittleren bis zu den oberen Kryptenabschnitten. Nach Polydorides (2016) stützt dieser Befund die Annahme, dass hyperplastische Polypen zu den Neoplasien gerechnet werden sollten.

Bei den konventionellen Adenomen stellte sich heraus, dass die Hauptmenge der Ki-67 positiven Zellkerne in den lumennahen Vierteln der Krypten gefunden werden konnten. Je kleiner die Läsion, desto eher waren nur die obersten lumennahen Viertel betroffen. Bei den kleinsten Adenomen fand sich die Proliferationszone sogar nur im lumennahen Viertel, also bei 4/4. Je größer das

Adenom war, desto eher enthielten auch weiter basal gelegene Kryptenviertel Ki-67 positive Zellkerne.

Die Heterogenität der Befunde ist möglicherweise auch der Grund, warum bisher so wenig über den Nachweis von Ki-67 in Kolonpolyphen berichtet worden ist. So haben bereits Shih und Kollegen (2001) in ihrer Arbeit „Topdown morphogenesis of colorectal tumours“ beschrieben, dass sich bei typischen kleinen adenomatösen Polyphen die dysplastischen Zellen und die Ki-67 Positivität an der Spitze der Krypten („top of the crypts“) befänden.

Die Vielfalt der Befunde lässt sich u.a. durch den Umstand erklären, dass es sich bei den analysierten histologischen Präparaten jeweils um einen Schnitt aus einem drei-dimensionalen Körper handelt. Dies bedeutet, dass die Adenom- bzw. Kryptenachse nicht in der Schnittebene liegt und daher eine exakte Zuordnung der Proliferationszone nicht immer gelingt. Doch reichen meines Erachtens auch gut dokumentierte Näherungswerte aus, derartige Untersuchungen durchzuführen. Beispielsweise habe ich in meiner Arbeit die Kryptenlängen nicht in mm ausgemessen, sondern die Kryptenlängen in gleichmäßige Viertel aufgeteilt, um die erhobenen Daten miteinander vergleichen zu können.

Ein weiterer Diskussionspunkt beim Nachweis von Ki-67 ist darüber hinaus die Anfärbarkeit des Zytoplasmas durch das Ki-67 Antigen in einzelnen Zellen. Es ist denkbar, dass am Ort der Reaktion sehr viel Reaktionsprodukt entsteht. Die einzelnen Farbstoffmoleküle füllen den vorhandenen Raum dann so stark aus, dass sie sich gegenseitig verdrängen, in die Umgebung diffundieren müssen und dadurch das Zytoplasma anfärben. Ferner spielen sowohl die Qualität der Färbung als auch die Art und Qualität des Zuschnittes eine Rolle. Je dicker bspw. der Schnitt, desto mehr Hintergrundfärbung und vermeintliche Positivität sind möglich. Bei Nicht-einhalten der Zeitvorgaben während des Färbeprozesses, sind sowohl zu schwach gefärbte als auch zu stark gefärbte Präparate möglich, welche die Auswertung erschweren.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass Ki-67 ein Nicht-Histon Protein Komplex ist, der – um zu entstehen – den regulären Bildungsprozess eines Proteins durchlaufen muss. Der Bausatz zu diesem Protein wird von der DNA im Chromosom 10 abgelesen, als m-RNA transkribiert und diese aus dem Zellkern an

ein Ribosom überführt. Dort wird die m-RNA abgelesen und das Protein Basentriplett für Basentriplett aus Aminosäuren synthetisiert. Es entsteht eine Basis-Eiweiß-Sequenz, welche anschließend im Zytoplasma von Chaperonen übernommen, zurechtgeschnitten und gefaltet wird. Zum Schluss wird das fertige Protein in den Zellkern zu seinem Einsatzort zurück transportiert.

Im Verlauf dieses Prozesses gibt es zahlreiche Möglichkeiten, an denen passager Epitope, sog. Bindungsstellen, vorliegen, an welche Antikörper andocken können, die dann positiv dargestellt werden. Daraus ergibt sich folgerichtig, dass auch das Zytoplasma gelegentlich angefärbt sein kann.

Die weiteren ausgewerteten Kriterien wie Kryptenlänge, Zellkernform und Zellkern-Lokalisation waren in den Gruppen so variabel, dass sich aus ihnen keine weiteren Unterscheidungsmerkmale ableiten ließen als die schon in der Literatur bekannten. Auch die Menge an Entzündungszellen lieferte keine weiterführenden Ergebnisse. Die Menge bzw. das Fehlen von Becherzellen ließ ebenfalls keine weiteren Unterscheidungen zu, die als signifikant hätten gewertet werden können. Daher wurden diese Kriterien im Ergebnisteil nicht näher erläutert.

Nach vielen Klassifikationsvorschlägen scheint sich die Einteilung der kolorektalen Polypen in konventionelle Adenome und serratierte Läsionen durchzusetzen.

Zu den konventionellen Adenomen werden die tubulären, tubulovillösen und villösen Adenome gerechnet, die nach morphologischen Eigenschaften in High Grade und Low grade Adenome - entsprechend Adenomen mit schwerer oder leichter Dysplasie - unterteilt werden, um einen Hinweis auf eine inzipiente Malignisierung zu finden, letztendlich mit dem Ziel, geeignete therapeutische und präventive Maßnahmen festlegen zu können.

Zu den serratierten Läsionen werden nun auch die hyperplastischen/metaplastischen Polypen, die sessilen serratierten Adenome und die traditionellen serratierten Adenome gerechnet (Moussata et al., 2015 und WHO 2019).

2007 haben Sandmeier, Seelentag und Bou-Zourene versucht, die Unterschiede herauszuarbeiten. Sie berichteten, dass sessile serratierte Adenome signifikant häufiger in der rechten Kolonhälfte vorkommen als metaplastische Polypen und

diese außerdem größer (11 mm versus 4 mm) seien. Sie sahen in Ihnen die Vorläufer für die serratierten Adenokarzinome.

Dazu kommt, dass Goldstein schon 2006 berichtete, dass auch serratierte sessile Adenome Vorstufen invasiver Karzinome sein können.

Die Arbeitsgruppe um Sandmeier et al. (2007) fand es aber sehr kompliziert, zwischen serratierten sessilen Adenomen und metaplastischen Polypen zu unterscheiden. Als Grund führten sie u.a. die suboptimale Ausrichtung des Gewebes im Paraffinblock an. Ferner stellten sie fest, dass je kleiner die Läsionen, desto größer die histologischen Ähnlichkeiten waren. Eine Beobachtung, die auch ich in meinem Untersuchungsgut erheben konnte.

Die histologische Überschneidung zwischen SSA und den metaplastischen/hyperplastischen Polypen wird noch deutlicher, wenn die Proliferationsaktivität herangezogen wird, weil sich diese in den gleichen Kryptenvierteln befindet. Sandmeier et al. (2007) beschrieben jedoch, dass das Vorkommen undifferenzierter Zellen, die Lokalisation der Serratierung, das Verzweigen, die Horizentralisierung und die Herniation der Krypten gute Diskriminatoren seien.

Die hier vorgelegten Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass bei der Analyse von kolorektalen Adenomen, insbesondere von kleinen Adenomen, der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 die Diagnosestellung erleichtern kann, da er hilft, serratierte von nicht serratierten Läsionen zu differenzieren, in dem die Lage der Proliferationszone präzise festgelegt werden kann. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei den serratierten Läsionen die Proliferationszone im Bereich der Kryptenbasis und bei den nicht serratierten Läsionen, also den konventionellen Adenomen, im Bereich der Kryptenlichtung liegt. Mit Hilfe der mit Ki-67 markierten Proliferationszone könnte also ein Rückschluss auf den Adenomtyp gezogen werden.

Während sich die kleinen Adenome durch den Ki-67 Nachweis gut unterscheiden lassen, kann dies bei größeren Läsionen nicht als alleiniges Unterscheidungskriterium herangezogen werden. Bei den sehr großen Läsionen scheint die Abgrenzung zwischen serratierten und nicht serratierten, also den konventionellen Adenomen, zu verschwimmen. Sie werden nach Polydorides (2010, 2016) auch als gemischte Adenome/serratierte Polypen (kurz MASP) bezeichnet. In der

Literatur werden auch die Begriffe „mixed hyperplastic adenomatous polyp (MHAP), mixed polyp oder mixed TSA-SSA/P benutzt. In der neuen Empfehlung der WHO von 2019 findet keine dieser Bezeichnungen eine Mehrheit.

Die Verwendung der Bezeichnung „Mischtyp“ scheint aber auf Grund aktueller Forschungen zu den verschiedenen Karzinogenesewegen – Adenom-Karzinom-Sequenz vs. Serratiertes Karzinogeneseweg – diskussionswürdig. Es sollte viel mehr geklärt werden, welcher der verschiedenen Karzinogeneseweg vorliegt und welche Vorläuferläsionen möglicherweise in Betracht kommen (Gibson et al. 2016, Shetty 2016, S3-Leitlinie kolorektale Karzinome, 2019). Die Erläuterung und Besprechung dieser Möglichkeiten geht weit über den Rahmen dieser auf immunhistochemischen Methoden basierenden Dissertation hinaus.

Ein nicht zu gering zu schätzender Vorteil gegenüber molekularbiologischer Methoden ist, dass der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 leicht zu bewerkstelligen und auch bereits weit verbreitet ist. Darüber hinaus ist er kostengünstig. Er könnte dazu genutzt werden, die Nachsorgeintervalle für Koloskopien zu beeinflussen, wenn man bspw. annimmt, dass eine große Proliferationszone mit einem höheren Entartungsrisiko einhergeht.

Allein auf der Basis des Ki-67 Nachweises, sicher zwischen high grade und low grade bzw. leichter und schwerer Dysplasie zu unterscheiden, erscheint zweifelhaft und lässt sich auch aus meinen erhobenen Daten nicht ableiten.

Sinnvoll erscheint eine prospektive Studie an einem größeren Patientengut mit doppelter Verblindung. Unabhängig voneinander sollten die mit Ki-67 markierten Proliferationszonen sowie die histologischen Merkmale ausgewertet werden, um bspw. zu bestätigen, dass mit Hilfe der Lokalisation der Proliferationszone die Diagnose von Adenomen möglich ist.

Ob sich der Nachweis von Ki-67 als ein geeignetes Hilfsmittel nutzen lässt, um eine computerbasierte Auswertung zu etablieren, ist eine weitere spannende Frage, die sich jetzt noch nicht beantworten lässt

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aust AE, Baretton GB et al. (2010) *Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria*
 Aust DE, Baretton GB; Members of the Working Group GI-Pathology of the German Society of Pathology. Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria. *Virchows Arch.* 2010 Sep;457(3):291-7. doi: 10.1007/s00428-010-0945-1. Epub 2010 Jul 9. PMID: 20617338.
- Boman BM, Huang E. (2008) *Human Colon Cancer Stem Cells: A new paradigm in gastrointestinal oncology*
 Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol.* 2008 Jun 10;26(17):2828-38. doi: 10.1200/JCO.2008.17.6941. PMID: 18539961.
- Chetty, R., (2016) *Traditional serrated adenoma (TSA): morphological questions, queries and quandaries*
 Chetty R. Traditional serrated adenoma (TSA): morphological questions, queries and quandaries. *J Clin Pathol.* 2016 Jan;69(1):6-11. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203452. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26553935.
- Booth DG, Earnshaw WC (2017) *Ki-67 and the chromosome periphery compartment in mitosis*
 Booth DG, Earnshaw WC. Ki-67 and the Chromosome Periphery Compartment in Mitosis. *Trends Cell Biol.* 2017 Dec;27(12):906-916. doi: 10.1016/j.tcb.2017.08.001. Epub 2017 Aug 23. PMID: 28838621
- Chierico L., Rizzello L., Guan L., Joseph AS, Lewis A., Battaglia G. (2017) *The role of the two splice variants and extranuclear pathway on Ki-67 regulation in non-cancer and cancer cells*
 Chierico L, Rizzello L, Guan L, Joseph AS, Lewis A, Battaglia G. The role of the two splice variants and extranuclear pathway on Ki-67 regulation in non-cancer and cancer cells. *PLoS One.* 2017 Feb 10;12(2):e0171815. doi: 10.1371/journal.pone.0171815. PMID: 28187152; PMCID: PMC5302784.
- de Leon P., Gregorio CD, (2001), *Pathology of colorectal cancer*
 Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis.* 2001 May;33(4):372-88. doi: 10.1016/s1590-8658(01)80095-5. PMID: 11432519.
- Fanghänel J., Pera F., Anderhuber F., Nitsch R. (Hrsg.) (2003) *Waldeyer - Anatomie des Menschen*, de Gruyter, Berlin u. New York, 17. völlig überarbeitete Auflage
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. (1983) *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*
 Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983 Jan 15;31(1):13-20. doi: 10.1002/ijc.2910310104. PMID: 6339421.
- Gerdes J., Li L., Schlueter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Gerlach C., Stahmer I., Kloth S., Brandt E., Flad ND (1991) *Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki67*
 Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991 Apr;138(4):867-73. PMID: 2012175; PMCID: PMC1886092.
- Gerlach, C, Sakkab DY, Scholzen T et al. (1997) *Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy*, *Hepatology*
 Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, Dassler R, Alison MR, Gerdes J. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology.* 1997 Sep;26(3):573-8. doi: 10.1002/hep.510260307. PMID: 9303485.

- Gibson, J.A. and R.D. Odze (2016), *Pathology of premalignant colorectal neoplasia*
Gibson JA, Odze RD. Pathology of premalignant colorectal neoplasia. Dig Endosc. 2016 Apr;28(3):312-23. doi: 10.1111/den.12633. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26861656.
- Hirata A., Hatano Y., Niwa M., Hara A., Tomita H. (2019) *Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells*
Hirata A, Hatano Y, Niwa M, Hara A, Tomita H. Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells. Adv Exp Med Biol. 2019;1139:115-126. doi: 10.1007/978-3-030-14366-4_7. PMID: 31134498.
- Hooghe B., Hulpiau P., Van Roy F., De Bleser PD (2008) *ConTra: a promotor alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species.*
Hooghe B, Hulpiau P, van Roy F, De Bleser P. ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species. Nucleic Acids Res. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W128-32. doi: 10.1093/nar/gkn195. Epub 2008 May 3. PMID: 18453628; PMCID: PMC2447729.
- <https://www.mikroskopie-forum.de/index.php?topic=3746.0> (Abbildung 8)
- <https://www.pathologyoutlines.com/topic/colohistology.html> (Abbildungen 6 und 7)
- Ishida S., Huang E., Zuzan H., Spang R., Leone G., West M., Nevins JR (2001) *Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis*
Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, Nevins JR. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. Mol Cell Biol. 2001 Jul;21(14):4684-99. doi: 10.1128/MCB.21.14.4684-4699.2001. PMID: 11416145; PMCID: PMC87143.
- Jochum W., Weber A., Baretton G., Kirchner Th. (2019), Kapitel: Kolon Rektum und Analkanal in Höfler G, Kreipe H, Moch H (Hrsg.) *Pathologie, Das Lehrbuch*, 6. Auflage, Urban & Fischer Elsevier GmbH, S. 618- 623
- Krstić, RV. *Human Microscopic Anatomy: An Atlas for Students of Medicine and Biology*, 1corrected second printing 1994, 2.Auflage, Springer Berlin (Verlag), S.220 -221
- Lam-Himlin DM, Montgomery EA, Arnold CA. (2019), *Atlas of Gastrointestinal Pathology: A Pattern Based Approach to Neoplastic Biopsies*, Wolters Kluwer, S.283 – 451
- Langner, C. (2011), *Nichtserratierete Vorläuferläsionen von Tumoren des Dickdarmes*, Der Pathologe
Langner, C. Nichtserratierete Vorläuferläsionen von Tumoren des Dickdarms. *Pathologe* 32(Suppl 2), 206 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00292-011-1495-2>
- Le Guellec S., Perallon R., Alunni JP et al. (2011) *Neoadjuvant treatment of breast cancer: implications for the pathologists* (in French)
Le Guellec S, Perallon R, Alunni JP, Charitansky H, Leaha C, Gonzalez AM, Chateau MC, Simony-Lafontaine J, Jacot W, Gutowski M, Penault-Llorca F, Dalenc F, Lacroix-Triki M. Place du pathologiste dans la prise en charge néoadjuvante des cancers du sein [Neoadjuvant treatment of breast cancer: implications for the pathologist]. Ann Pathol. 2011 Dec;31(6):442-54. French. doi: 10.1016/j.annpat.2011.10.003. Epub 2011 Nov 23. PMID: 22172117
- Li TL, Jiang G., Chen Q., Zheng JN (2015) *Ki67 is a promising molecular target in the diagnostic of cancer* (review)
Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). Mol Med Rep. 2015 Mar;11(3):1566-72. doi: 10.3892/mmr.2014.2914. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25384676
- Lopez F., Belloc F., Lacombe F., Dumain P., Reiffers J., Bernard P., Boisseau MR (1991) *Modalities of synthesis of Ki-67 antigen during the stimulation of lymphocytes*

- Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*. 1991;12(1):42-9. doi: 10.1002/cyto.990120107. PMID: 1999122.
- Luo Y., Ren F., Liu Y., Shi Z., Tan Z., Xiong H., Dang Y., Chen G. (2015) *Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labelling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis*.
Luo Y, Ren F, Liu Y, Shi Z, Tan Z, Xiong H, Dang Y, Chen G. Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jul 15;8(7):10235-47. PMID: 26379815; PMCID: PMC4565198.
- Montgomery EA, Oshima K., Voltaggio L. (2017) *Pathology Survival Guides Series 1: Survival Guide to Gastrointestinal Mucosal Biopsies*, Innovative Pathology Press
- Moussata D., Boschetti G., Chauvenet M., Stroeymeyt K., Nancey S., Berger F., Lecomte T., Flourié B. (2015) *Endoscopic and histologic characteristics of serrated lesions*
Moussata D, Boschetti G, Chauvenet M, Stroeymeyt K, Nancey S, Berger F, Lecomte T, Flourié B. Endoscopic and histologic characteristics of serrated lesions. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 14;21(10):2896-904. doi: 10.3748/wjg.v21.i10.2896. PMID: 25780286; PMCID: PMC4356908.
- Pai RK(Rish), Mäkinen MJ, Rosty C. (2019) *Colorectal serrated lesions and polyps*, in WHO Classification of Tumours, 5.th Edition, Digestive System Tumours: 163-169
- Papailiou J, Bramis KJ, Gazouli M. et al. (2011): Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins.
Papailiou J, Bramis KJ, Gazouli M, Theodoropoulos G. Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins. *Int J Colorectal Dis*. 2011 Jan;26(1):1-11. doi: 10.1007/s00384-010-1022-6. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20680304.
- Pezzilli R., Partelli S., Cannizzaro R., Pagano N., Cripps S., Pagnanelli M., Falconi M. (2016) *Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNENs): a systematic review*
Pezzilli R, Partelli S, Cannizzaro R, Pagano N, Crippa S, Pagnanelli M, Falconi M. Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNENs): A systematic review. *Adv Med Sci*. 2016 Mar;61(1):147-53. doi: 10.1016/j.advms.2015.10.001. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26774266.
- Polydorides AD (2016) *Hyperplastic Polyps* in Diagnostic Pathology Gastrointestinal second edition by Greenson JK, Lauwers GD, Montgomery EA et al., Amirsys (Elsevier), S. 456 - 461
- Pschyrembel*, klinisches Wörterbuch (2020), De Gruyter, Berlin, Boston, 268. Auflage, S. 1409
- Pyo JD, Kang G., Sohn JH (2016) *Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis*.
Pyo JS, Kang G, Sohn JH. Ki-67 labeling index can be used as a prognostic marker in gastrointestinal stromal tumor: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 2016 May 28;31(2):e204-10. doi: 10.5301/jbm.5000183. PMID: 26616229.
- Ricci-Vitiani L., Fabrizi E., Palio E., De Maria R. (2009) *Colon Cancer stem cells*
Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De Maria R. Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Nov;87(11):1097-104. doi: 10.1007/s00109-009-0518-4. Epub 2009 Sep 2. PMID: 19727638.
- Richards-Taylor S., Ewings SM, Jaynes E., Tilley C., Ellis SG, Armstrong T., Pearce N., Cave J. (2015) *The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis*
Richards-Taylor S, Ewings SM, Jaynes E, Tilley C, Ellis SG, Armstrong T, Pearce N, Cave J. The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol*. 2016 Jul;69(7):612-8. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203340. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26680267.

S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2.1 Langversion, (Ausgabe Januar 2019), Hrsg: Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe, Koordination & Redaktion: Prof. Dr. Wolff Schmiegel (Bochum) und PD Dr. Christian Pox (Bremen)

Sandmeier D., Seelentag W., Bouzourene H. (2007) *Serrated polyps of the colorectum: is sessile serrated adenoma distinguishable from hyperplastic polyp in daily practice?*

Sandmeier D, Seelentag W, Bouzourene H. Serrated polyps of the colorectum: is sessile serrated adenoma distinguishable from hyperplastic polyp in a daily practice? *Virchows Arch.* 2007 Jun;450(6):613-8. doi: 10.1007/s00428-007-0413-8. Epub 2007 Apr 21. PMID: 17450379.

Schmidt MHH, Broll R., Bruch HP, Finniss S., Bögl O., Duchrow M. (2004) *Proliferation marker Ki-67 occurs in different isoforms with various cellular effects*

Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Finniss S, Bögl O, Duchrow M. Proliferation marker pKi-67 occurs in different isoforms with various cellular effects. *J Cell Biochem.* 2004 Apr 15;91(6):1280-92. doi: 10.1002/jcb.20016. PMID: 15048881.

Shinya H, Wolff WI (1979) *Morphology, Anatomic Distribution and Cancer potential of Colonic polyps*, *Annals of Surgery*, Volume 190

Shinya H, Wolff WI. Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg.* 1979 Dec;190(6):679-83. doi: 10.1097/00000658-197912000-00001. PMID: 518167; PMCID: PMC1345622.

Shirendeb U., Hishikawa Y., Moriyama et al. (2009) *Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia and Myanmar*

Shirendeb U, Hishikawa Y, Moriyama S, Win N, Thu MM, Mar KS, Khatanbaatar G, Masuzaki H, Koji T. Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar. *Acta Histochem Cytochem.* 2009 Dec 29;42(6):181-90. doi: 10.1267/ahc.09030. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20126571; PMCID: PMC2808501.

Siegmund-Schultze N. (2017) *Kolorektale Karzinome: Die Lage des Primarius zählt*, *Deutsches Ärzteblatt*

<https://www.aerzteblatt.de/archiv/186159/Kolorektale-Karzinome-Die-Lage-des-Primarius-zaehlt>

Snover DC, Ahnen DJ, Burt RW, Odze RD (2010) *Serrated Polyps of the Colon and Rectum and Serrated Polypoidosis* in Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (2010) *WHO Classification of Tumours of the Digestive System* 4. edition, IARC Press, 160 – 165

Sobecki M. (2016), zitiert nach Sun X und Kaufmann PD (2018) *Ki-67: More than a proliferation marker*. *Chromosoma* 2018;127:175-186

Sobecki M., Mrouj K., Loline J., Gerbe F., Jay P., Krasinska L., Dulic V., Fisher D. (2017) *Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels*

Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res.* 2017 May 15;77(10):2722-2734. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0707. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28283655.

Sun X., Kaufman PD (2018) *Ki-67: More than a proliferation marker*

Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018 Jun;127(2):175-186. doi: 10.1007/s00412-018-0659-8. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29322240; PMCID: PMC5945335

Tannapfel A., Neid M., Aust D., Baretton G. (2010), *Entstehung kolorektaler Karzinome, Unterschiedliche Wege und Vorstufen - differenzierte Nomenklatur*,

- Deutsches Ärzteblatt (Dtsch Arztebl Int 2010; 107(43): 760-6; DOI: 10.3238/arztebl.2010.0760)
- Tischoff I, Tannapfel A (2013) Precancerous colorectal tumours
Tischoff I, Tannapfel A. Präkanzerosen im Kolon [Precancerous colorectal tumors]. Internist (Berl). 2013 Jun;54(6):691-8. German. doi: 10.1007/s00108-012-3213-4. PMID: 23677564.
- Tischoff I., Tannapfel A. (2021) *Pathohistologie von Polypen des Gastrointestinaltraktes*, Der Internist Nr. 62, S. 123-132, <https://doi.org/10.1007/s00108-020-00900-2>
- Truninger K. (2008) *Nachsorge bei kolorektalen Polypen und Karzinomen – Risikostratifizierung und aktuelle Empfehlungen*, TMJ
https://www.rosenfluh.ch/rosenfluh/stories/publikationen/tmj/2008-01/14_Nachsorge_1.08.pdf
- Van Hooser AA, YUH P, HEALD R. (2005) *The perichromosomal Layer*
Van Hooser AA, Yuh P, Heald R. The perichromosomal layer. Chromosoma. 2005 Dec;114(6):377-88. doi: 10.1007/s00412-005-0021-9. Epub 2005 Nov 15. PMID: 16136320.
- Vaiopoulos AG., Kostakis ID., Koutsilieris A., Papavassiliou AG. (2012) *Colorectal Cancer Stem Cells*
Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal cancer stem cells. Stem Cells. 2012 Mar;30(3):363-71. doi: 10.1002/stem.1031. PMID: 22232074.
- Vries RG., Huch M., Clevers H..(2010) *Stem cells and cancer of the stomach and intestine*
Vries RG, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. Mol Oncol. 2010 Oct;4(5):373-84. doi: 10.1016/j.molonc.2010.05.001. Epub 2010 Jun 8. PMID: 20598659; PMCID: PMC5527927.
- WHO classification of tumours of the Digestive System, (2010) WHO Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 3, 2010 edited by Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND
- WHO classification of tumours - Digestive System Tumours, 5.Auflage, Volume 1, 2019, edited by the WHO Classification of Tumours Editorial Board
- Yerushalmi R., Woods R., Ravdin PM et al. (2010) *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential*. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. Lancet Oncol. 2010 Feb;11(2):174-83. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70262-1. PMID: 20152769.
- Zeki SS, Graham TA, Wright NA (2011) *Stem cells and their implications for colorectal Cancer*
Zeki, S., Graham, T. & Wright, N. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 90–100 (2011).
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.211>
- Zentrum für Krebsregisterdaten, 2019, Robert-Koch-Institut
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html

Danksagung

Mein Dank gilt allen nachstehen genannten Personen, die mich bei der Bearbeitung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Professor Kubitz für die Betreuung dieser Arbeit und seine wissenschaftliche Expertise.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie Moers, insbesondere Monika Culemann, Birgit Übleiß und Natali Schäfer, danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die kompetente Hilfe.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Dr. med. M.-L. Mlynek-Kersjes und Gerhard Kersjes, die mir nach meiner Ausbildung zur medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben, immer an mich glauben und mich stets auf meinem Weg unterstützt haben. Ihnen ist diese Doktorarbeit gewidmet.

Darüber hinaus danke ich meiner Schwester Ricarda Kersjes für ihre unermüdliche Hilfe und den moralischen Beistand, die weit über diese Doktorarbeit hinaus gehen.

Danken möchte ich außerdem meinem Ehemann Niklas Adelhardt für sein Vertrauen, seine Unterstützung und das offene Ohr zu jeder Tages- und Nachtzeit.