

# Bedre immunfunktion efter laparoskopisk end efter åben kolorektal cancer-kirurgi

Mikail Gögenur, Sara Kehlet Watt & Ismail Gögenur

## STATUSARTIKEL

Kirurgisk Afdeling,  
Roskilde/Køge Sygehus

Ugeskr Læger  
2015;177:V12140763

Kolorektal cancer er blandt de hyppigste cancerformer i verden [1]. 25-30% af forventeligt kurativt kirurgisk behandlede patienter får recidiv inden for fem år efter operationen, på trods af at de præoperativt ikke havde tegn på metastaser [1]. Det kirurgiske indgreb og den ledsagende sygelighed kan have en afgørende betydning for udviklingen af recidiv efter kirurgi. Det systemiske stressrespons, som initieres af et kirurgisk indgreb, består primært af et endokrint-metabolisk respons, øget oxidativt stress og øget lokalt og systemisk immunrespons [2]. Det øgede immunrespons følges af en immunsupprimeret periode, der sammen med øget oxidativt stress er forbundet med en øget risiko for udvikling af metastaser [3].

I sammenligning med åben kolorektal kirurgi medfører laparoskopisk kolorektal kirurgi færre postoperative komplikationer i form af reduceret blødningstendens, færre smerter, færre infektioner og nedsat indlæggelsestid [4]. I enkelte studier har man også påvist, at den cancerrelaterede og recidivfrie overlevelse er bedre efter laparoskopisk kirurgi hos patienter med stadium 3-sygdom [5]. En af hypoteserne bag denne observerede forskel har været, at der er nedsat immunsuppression efter laparoskopisk kirurgi. Der foreligger efterhånden en del kliniske randomiserede kontrollerede studier, hvor man har undersøgt effekten af kirurgi på immunforsvaret efter laparoskopisk og åben coloncancerkirurgi. I denne artikel vil vi gennemgå studier, hvor man har undersøgt, om der er en forskel i immunsuppressionen efter laparoskopisk kirurgi og åben kolorektal cancer-kirurgi.

## IMMUNFORSVARET

Immunforsvaret kan inddeles i to dele: det medfødte (innate) immunsystem og det erhvervede (adaptive)

immunsystem. De to overordnede reaktioner, som det medfødte immunsystem initierer, er inflammation og bekæmpelse af patogener. Inflammationen initieres ved, at beskadiget væv frigiver kemiske faktorer, der forårsager dilatation af de omkringliggende kar, hvilket tiltrækker fagocytter, som udtrykker *pattern recognition receptors* (PRR), der genkender generelle strukturer på patogener. Hvis fagocytter aktiveres igennem deres PRR, vil de frigive inflammationsmediatorer, hvoraf de vigtigste er cytokiner, blandt andet interleukin (IL)-6, som initierer akut faserespons, hvor leveren frigiver akut fase-reaktanter, bl.a. C-reaktivt protein (CRP). Det er påvist, at IL-6 muligvis regulerer tumorcellers proliferation, migration og angiogenese ved forskellige cancertyper [6]. *Natural killer* (NK)-cellen tilhører også det medfødte immunforsvar, dens cytotoxiske effekt aktiveres og inhiberes via NK-celle-receptoren, som kroppens raske celler inhiberer gennem *major histocompatibility complex* (MHC)-molekyler på celleoverfladen. Evnen til at udtrykke MHC-molekyler hæmmes under den cellulære transformation til tumorceller, hvorfor tumorceller er ideelle mål for NK-celler [7, 8].

Humant leukocyt-antigen (HLA)-DR, det humane MHC, udtrykkes i overvejende grad på overfladen af antigenpræsenterende celler og er hjørnesten i det erhvervede immunsystem, hvor de præsenterer antigen til genkendelse for T-celler. I enkelte studier har man påvist, at HLA-DR-positive tumorer hos patienter med cancer er en prædikator for bedre prognose [9]. Overordnet inddeles T-celler i hjælper T-celler (CD4+) og cytotoxiske T-celler (CD8+). CD8+-T-cellers cytotoxiske effekt aktiveres igennem CD4+-T-celler. CD4+-T-celler kan yderligere inddeles i hjælper T-celletype 1 ( $T_H^1$ ) og hjælper T-celletype 2 ( $T_H^2$ ), hvor  $T_H^1$ -celler generelt inducerer et antitumorrespons, idet de frigiver interferon (IFN)- $\gamma$ , som medierer et celle-medieret respons.  $T_H^2$ -celler inducerer i overvejende grad et miljø, som er favorabelt for tumorproliferation igennem en frigivelse af IL-4, som medierer et respons mod ekstracellulære mikrober [10].

## Immunsystemet efter laparoskopisk versus åben kirurgi

I flere studier har man undersøgt, hvorledes IL-6-niveauet bliver påvirket postoperativt efter laparo-



## FAKTABOKS

Åben kolorektal cancer-kirurgi inducerer et større inflammatorisk respons end laparoskopisk kirurgi.

Den perioperative periode er karakteriseret af en immunsupprimeret periode, som kan inducere øget tumormetastasing.

Øget aktivering af det medfødte immunforsvar er forbundet med øget tumorproliferation.

Opregulering af det cellulære immunforsvar i den perioperative periode har vist lovende resultater.

skopisk versus åben kirurgi. I enkelte studier er det påvist, at der ikke var en signifikant forskel på IL-6-niveauet i den laparoskopisk opererede gruppe og den åbent opererede gruppe [11], mens man i en del studier har påvist en forskel. *Veenhof et al* påviste i sit studie med 79 patienter, der var blevet opereret for ikkemetastaserende kolorektal cancer og randomiseret til åben eller laparoskopisk kirurgi i et accelereret perioperativt forløb eller konventionel behandling, at IL-6-niveauet steg i alle grupper i en 72-timers observationsperiode. Stigningen var dog signifikant højst i den gruppe, der blev opereret ved åben kirurgi [12]. I et lignende studie indgik der 163 patienter med ikkemetastatisk kolorektal cancer. Her blev det ligeledes fundet, at IL-6-niveauet var højere postoperativt end præoperativt i begge grupper, men signifikant højere i den åbent opererede gruppe fra postoperativ dag (POD)1 frem til POD5 [13]. Forløbet for CRP har også i et andet studie været undersøgt som udtryk for den postoperative inflammation. Her påviste man, at CRP-niveauet på POD1, POD3 og POD5 steg i begge grupper, men stigningen var størst i den åbent opererede gruppe [14]. Dette fund blev også gjort i et andet prospektivt randomiseret studie med 30 laparoskopiske og 30 åbne kolorektalresektioner [15]. I tre studier har man dog ikke målt nogen forskel i CRP i hhv. den åbent og den laparoskopisk opererede gruppe [16-18].

Antallet af NK-celler blev undersøgt i et ikke-randomiseret studie, hvor der blev målt et generelt fald efter kirurgi, men i gruppen af laparoskopisk opererede var der et signifikant mindre fald på POD1 og POD5 end i gruppen, der blev opereret ved åben kirurgi [14].

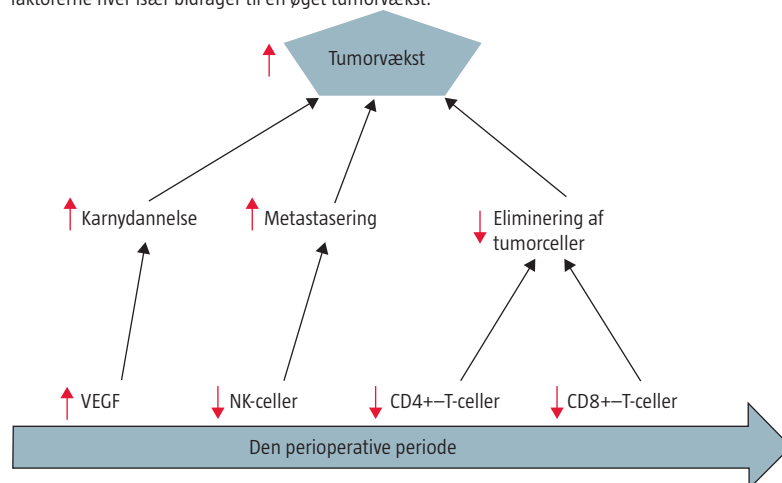
I flere studier har man undersøgt, hvorvidt specifikke T-cellepopulationer ændres ved kolorektal cancer-kirurgi, og om der er forskel på resultaterne, alt efter om der blev anvendt laparoskopisk eller åben kirurgi. I et studie, hvor 170 patienter med ikkemetastaseret coloncancer blev randomiseret til åben eller laparoskopisk kirurgi i et *fast-track* eller traditionelt perioperativt forløb, fandt man, at CD4+-niveauet faldt signifikant mindre efter laparoskopisk kirurgi, mens der ingen forskel var i CD8+-niveauet, således at CD4-/CD8-ratioen var signifikant højere i den laparoskopisk opererede gruppe [13]. I et andet randomiseret studie, hvor der indgik 68 patienter med ikkemetastaseret cancer, fandt man, at CD4+ i begge grupper var faldet efter kirurgi, og at der på POD4 var en signifikant forskel imellem laparoskopisk og åben operation. Man fandt også, at CD8+-niveauet i begge grupper var faldet efter kirurgi, hvor der ligeledes var en signifikant forskel imellem laparoskopisk og åben kirurgi på POD4 [17].

HLA-DR-niveauet blev undersøgt i et prospektivt randomiseret studie med 26 patienter, som gennemgik enten åben eller laparoskopisk kolorektal kirurgi. Her blev der målt et fald i HLA-DR-niveauet efter operationen, men der sås ingen signifikant forskel imellem grupperne [18]. HLA-DR-niveauet var ligeledes reduceret efter operation i et andet ikke-randomiseret studie med 74 patienter, som blev opereret med enten åben eller laparoskopisk kirurgi. I dette studie fandt man et mindre fald i HLA-DR-niveauet i laparoskopigruppen på POD5 [16]. I to studier af *Veenhof et al*, det ene med 79 patienter, som blev randomiseret til åben eller laparoskopisk kirurgi i en accelereret og traditionel perioperativ behandling, og et andet med 40 patienter, hvor forskelle imellem laparoskopisk og konventionel total mesorektal excision blev undersøgt, blev det påvist, at HLA-DR-niveauet faldt efter kirurgi. I begge studier var faldet igen signifikant lavere i laparoskopigruppen end i gruppen af åbent opererede [12, 19].

Det er rapporteret fra flere studier, at tumorproliferationen øges efter kolorektal cancer-kirurgi. Både i tumorceller i lokalrecidiver og i fjernmetastaser ses der nedsat apoptose og øget proliferation sammenlignet med den primære tumor [20]. I flere studier har man påvist en sammenhæng imellem serum-IL-6-niveauet og niveauet af serum-vascular endothelial growth factor (VEGF) hos patienter med kolorektal cancer [21] (**Figur 1**). VEGF er en vækstfaktor, der er nødvendig for karydannelse, og i et randomiseret studie [22] undersøgte man VEGF-niveauet i både peritonealvæsken og serum i en firedages undersø-

FIGUR 1

Røde pile angiver effekt af kirurgi. I den perioperative periode ændres en del faktorer af kirurgi, hvor faktorerne hver især bidrager til en øget tumorvækst.



NK = natural killer; VEGF = vascular endothelial growth factor.

TABEL 1

Oversigt over studier af immunsystemet efter laparoskopisk versus åben kirurgi.

Reference	Design	n	Time-points	Outcome	Væsentlige resultater
Han et al [16]	Ikkerandomiseret studie	Lap.: 35 Åben: 39	Præ-OP 1 d., 5 d. post-OP	CRP, TNF-alfa, HLA-DR, CD4, CD8	CRP → TNF-alfa → HLA-DR ↑ (lap.) CD4 → CD8 →
Pascual et al [23]	Randomiseret studie	Lap.: 60 Åben: 60	Præ-OP 4 t., 12 t., 24 t., 48 t., 4 d. post-OP Serum og peritonealt	IL-6, VEGF	IL-6 ↓ (lap. 4 t.) VEGF ↓ (lap. 2 d., 4 d.)
Wang et al [13]	Randomiseret studie	FT Lap.: 42 Åben: 42  Normal Lap.: 42 Åben: 44	Præ-OP 1 d., 3 d., 5 d. post-OP	CRP, IL-6, CD4, CD8, CD4/CD8-ratio	CRP og IL-6 ↓ (FT lap. 1 d., 3 d., 5 d.) CD4 og CD4/CD8-ratio ↑ (FT lap. 1 d., 3 d., 5 d.)
Veenhof et al [19]	Randomiseret studie	FT Lap.: 19 Åben: 17  Normal Lap.: 23 Åben: 20	Præ-OP 1 t., 2t., 24 t., 72 t. post-OP	HLA-DR, CRP, IL-6	HLA-DR ↑ (lap.) IL-6 ↑ (åben) CRP ↑ (åben)
Veenhof et al [12]	Prospektivt randomiseret studie	Lap.: 22 Åben: 18	Præ-OP 2 t., 24 t., 72 t. post-OP	CRP, IL-6, IL-8, HLA-DR,	IL-6 ↓ (lap. 2 t.) HLA-DR ↓ (åben 2 t.)
Wu et al [18]	Prospektivt randomiseret studie	Lap.: 12 Åben: 14	Præ-OP 2t., 1 d., 4 d. post-OP	IL-6, TNF-alfa, CRP, HLA-DR, CD4, CD8, NK, CD4/CD8-ratio	IL-6 ↑ (åben 2 t.) CD4 ↓ (åben og lap. 2 t., 1 d., 4 d. ift. præ-OP) CD4/CD8-ratio → CRP →
Schwenk et al [15]	Prospektivt randomiseret studie	Lap.: 30 Åben: 30	Præ-OP 1 t., 4 t., 1 d., 2 d., 4 d., 7 d. post-OP	IL-1RA, IL-6, IL-10, CRP	IL-6 ↑ (åben) CRP ↑ (åben)
Huang et al [17]	Ikkerandomiseret studie	Lap.: 35 Åben: 33	Præ-OP 1 d., 4 d., 7 d. post-OP	Lymfocyt, CRP, CD3, CD4, CD8, NK	CD4 ↑ (lap. 4 d.) CD8 ↑ (lap. 4 d.) CRP →

↑ = højere koncentration → = ingen forskel imellem grupper ↓ = lavere koncentration. Parenteser ved siden af pile angiver i hvilken gruppe ændringen er.

CD = cluster of differentiation; CRP = C-reaktivt protein; FT = fast-track; HLA = humant leukocyt-antigen; IL = interleukin; lap. = laparoskopisk; NK = natural killer; OP = operativt; RA = receptorantagonist; TNF = tumornekrosefaktor; VEGF = vascular endothelial growth factor.

gelsesperiode og fandt ingen forskel imellem gruppen, som var opereret ved åben kirurgi, og gruppen, som var laparoskopisk opereret, men i serum var VEGF-niveaulet lavere hos laparoskopigruppen end hos den åbne gruppe på POD2 og POD4 [22]. Serum-niveaulet af VEGF kan dog have været misvisende, da det kan have været kunstigt forhøjet, idet VEGF i forbindelse med traumatet kan frigives fra granulocytters og trombocytters granula. Plasmaniveaulet er derfor mere korrekt at måle. I flere studier er der påvist en sammenhæng imellem øget VEGF-niveau og dårligere prognose hos patienter med kolorektal cancer [23]. Årsagen er, at VEGF medierer øget tumorangiogenese [24], og dette indikerer dermed, at laparosko-

pisk kolorektal cancer-kirurgi muligvis medfører en reduktion i den øgede tumorproliferation i forhold til åben kirurgi.

I Tabel 1 ses en oversigt over disse undersøgelser.

## DISKUSSION

I de gennemgåede studier er det blevet påvist, at der er evidens for, at immunforsvaret bliver hæmmet ved kirurgi. Resultaterne af de undersøgte studier viste, at immunsystemet generelt blev signifikant mindre hæmmet ved den laparoskopiske end ved den åbne tilgang. I de fleste studier har man fokuseret på IL6 og CRP som indikatorer for immunforsvaret, og det er

velkendt, at niveauerne af disse også er forhøjede ved immunologisk sygdom, hvorfor de kan udgøre en fejlkilde. I alle de kliniske studier, vi har studeret, har immunologisk sygdom været et eksklusionskriterie fraset i studiet af Pascual *et al* [22], hvor især VEGF-niveaulet og en eventuel forskel på laparoskopisk og åben kirurgi er undersøgt.

Det cellemedierede immunsystem genkender tumorceller igennem antigener, og genkendelsen af antigener sker igennem HLA-DR-molekyler på overfladen af antigenpræsenterende celler. Efter genkendelsen af antigener vil CD4<sup>+</sup>- og CD8<sup>+</sup>-T-celler modnes og initiere responset. De gennemgåede studier viste, at den laparoskopiske tilgang medførte et mindre fald i niveaulet af HLA-DR og CD4<sup>+</sup>-T-celler, end åben kirurgi gjorde. CD4<sup>+</sup>-T-celler er afgørende for, at CD8<sup>+</sup>-T-cellerne kan identificere og eliminere cancerceller. Desuden producerer CD4<sup>+</sup>-T-celler IFN- $\gamma$ , som er en vigtig del af givelsen af bl.a. makrofager og NK-celler. Det er derudover fundet, at patienter med kolorektal cancer, hvor der er fundet tumorinfiltrerende CD8<sup>+</sup>-T-celler, har en bedre prognose end patienter, hos hvem disse er ikke fundet [25]. Det høje antal CD8<sup>+</sup>-T-celler korrelerer med niveaulet af T<sub>H</sub><sup>1</sup>-celler, hvilket ligeledes viser, at niveaulet af CD4<sup>+</sup>-T-celler er afgørende for en god prognose [10].

Den perioperative periode er karakteriseret ved, at en del antiinflammatoriske mediatorer, bl.a. *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ), IL-10 og IL-1-receptorantagonist, bliver frigivet, hvilket bidrager til immunsupprimeringen hos patienterne [26]. Desuden har man i flere studier fundet, at perioden også præges af et øget antal cirkulerende tumorceller, og at disse korrelerer til dårlig prognose og øget risiko for metastaser [26]. Det er derfor undersøgt, hvorvidt det er muligt at opregulere immunsystemet i denne periode for at hindre metastasering. I et eksperimentelt studie blev effekten af præoperativt injiceret IFN- $\gamma$  undersøgt, og det viste sig, at et øget niveau af makrofager og NK-celler, som blev induceret af IFN- $\gamma$ , beskyttede mod udviklingen af metastaser ved at eliminere cirkulerende tumorceller [27]. I et andet dyrestudie, hvor mus blev opdelt i en kontrolgruppe, en åbent opereret og en laparoskopisk opereret gruppe, var NK-cellecytotoxiciteten 96 timer postoperativt reduceret signifikant i den åbent opererede gruppe i forhold til den laparoskopisk opererede gruppe [28]. I et studie blev der givet influenzavaccine perioperativt, hvilket førte til en opregulering af NK-celleantallet [29]. Dette kunne danne fundamentet for en ny måde at optimere immunresponset på hos patienter, der skal opereres. Immunsystemet er komplekst og skal ses i en funktionsammenhæng, som i sin helhed ikke er fuldt belyst i relation til kirurgi. Derfor vil det

ikke være tilstrækkeligt bare at fokusere på enkelte delelementer i immunresponset. Man bør se på både funktionen af immunsystemet og antallet af celler eller koncentrationen af cytokiner. Med fokus på sidstnævnte tyder de fleste studier dog på, at laparoskopisk kirurgi påvirker patientens immunforsvar mindre end åben kirurgi i den umiddelbart postoperative periode.

## KONKLUSION

Både konventionel og laparoskopisk kirurgi påvirker patienternes immunforsvar. Der er efterhånden solid evidens for, at laparoskopisk kirurgi medfører en bedre prognose end konventionel kirurgi for patienter med kolorektal cancer, hvilket har flere årsager. Hvorvidt det også skyldes et mindre immuntraume, er endnu ikke fuldt klarlagt, og det bør i fremtiden undersøges, hvordan delfunktioner af immunresponset påvirkes af kirurgi. Samtidig har man i enkelte studier påvist, at laparoskopisk kirurgi medfører en bedre prognose for patienter med kolorektal cancer. Det må afklares i fremtidige studier, om perioperativ optimering af patienternes immunrespons kan bedre både korttids- og langtidsprognosen.

## SUMMARY

Mikail Gögenur, Sara Kehlet Watt & Ismail Gögenur:

Improved immunologic response after laparoscopic versus open colorectal cancer surgery

Ugeskr Læger 2015;177:V12140763

Laparoscopic colorectal cancer surgery results in a reduced impact on the immune system compared with open surgery. This is important when taken into consideration that the immune system may have an instrumental role in the advancement of cancer in the perioperative period. Several studies have shown that the perioperative period is characterized by an immune incompetent period, which is believed to favour tumour metastasis. In this paper factors associated with the cellular and innate immune response in relation to laparoscopic and open colorectal cancer surgery are reviewed.

**KORRESPONDANCE:** Mikail Gögenur, Kirurgisk Afdeling, Roskilde/Køge Sygehus, Lykkebækvej 1, 4600 Køge. E-mail: mikailgogenur@gmail.com

**ANTAGET:** 18. marts 2015

**PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK:** 13. juli 2015

**INTERESSEKONFLIKTER:** Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

## LITTERATUR

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11-30.
2. Choileain NN, Redmond HP. Cell response to surgery. *Arch Surg* 2006;141:1132-40.
3. Søndergaard ES, Gögenur I. Oxidativt stress kan være en mulig årsag til metastasering hos patienter med kolorektal cancer. *Ugeskr Læger* 2014;176:V09130561.
4. Kuhry E, Schwenk W, Gaupset R *et al*. Long-term results of laparoscopic colorectal cancer resection. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;2:CD003432.
5. Lacy A, Delgado S, Castells A *et al*. The long-term results of a randomized clin-

- ical trial of laparoscopy-assisted versus open surgery for colon cancer. *Ann Surg* 2008;248:1-7.
6. Santer F, Malinowska K, Culiq Z et al. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:241-53.
  7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic immunology*. Saunders, 2012.
  8. Wu J, Lanier L. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003;90:127-56.
  9. Løvig T, Andersen S, Thorstensen L et al. Strong HLA-DR expression in microsatellite stable carcinomas of the large bowel is associated with good prognosis. *Br J Cancer* 2002;87:756-62.
  10. Fridman W, Pages F, Sautes-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298-306.
  11. Tsamis D, Theodoropoulos G, Stamopoulos P et al. Systemic inflammatory response after laparoscopic and conventional colectomy for cancer: a matched case-control study. *Surg Endosc* 2012;26:1436-43.
  12. Veenhof AA, Sietes C, von Blomberg BM et al. The surgical stress response and postoperative immune function after laparoscopic or conventional total mesorectal excision in rectal cancer: a randomized trial. *Int J Colorectal Dis* 2011;26:53-9.
  13. Wang G, Jiang Z, Zhao K et al. Immunologic response after laparoscopic colon cancer operation within an enhanced recovery program. *J Gastrointest Surg* 2012;16:1379-88.
  14. Wichmann MW, Hüttl TP, Winter H et al. Immunological effects of laparoscopic vs open colorectal surgery. *Arch Surg* 2005;140:692-7.
  15. Schwenk W, Jacobi C, Mansmann U et al. Inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections – results of a prospective randomized trial. *Langenbeck's Arch Surg* 2000;385:2-9.
  16. Han SA, Lee WY, Park CM et al. Comparison of immunologic outcomes of laparoscopic vs open approaches in clinical stage III colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010;25:631-8.
  17. Huang C, Huang R, Jiang T et al. Laparoscopic and open resection for colorectal cancer: an evaluation of cellular immunity. *BMC Gastroenterology* 2010;10:127.
  18. Wu FP, Sietes C, von Blomberg BM et al. Systemic and peritoneal inflammatory response after laparoscopic or conventional colon resection in cancer patients. *Dis Colon Rectum* 2003;46:149-55.
  19. Veenhof AA, Vlug MS, van der Pas MH et al. Surgical stress response and postoperative immune function after laparoscopy or open surgery with fast track or standard perioperative care. *Ann Surg* 2012;255:216-21.
  20. Peeters C, de Waal RM, Wobbes T et al. Outgrowth of human liver metastases after resection of the primary colorectal tumor: a shift in the balance between apoptosis and proliferation. *Int J Cancer* 2006;119:1249-53.
  21. Pera M, Nelson H, Rajkumar S et al. Influence of postoperative acute-phase response on angiogenesis and tumor growth: open vs. laparoscopic-assisted surgery in mice. *J Gastrointest Surg* 2003;7:783-90.
  22. Pascual M, Alonso S, Parés D et al. Randomized clinical trial comparing inflammatory and angiogenic response after open versus laparoscopic curative resection for colonic cancer. *Br J Surg* 2011;98:50-9.
  23. Cascinu S, Staccioli M, Gasparini G et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2803-7.
  24. Byrne A, Bouchier-Hayes D, Harmey J. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777-94.
  25. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-4.
  26. van der Bij GJ, Oosterling SJ, Beelen RH et al. The perioperative period is an underutilized window of therapeutic opportunity in patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 2009;249:727-34.
  27. Rushfeldt C, Sveinbjörnsson B, Seljelid S et al. Early events of hepatic metastasis formation in mice: role of Kupffer and NK-cells in natural and interferon-gamma-stimulated defense. *J Surg Res* 1999;82:209-15.
  28. da Costa ML, Redmond H, Bouchier-Hayes D. The effect of laparotomy and laparoscopy on the establishment of spontaneous tumor metastasis. *Surgery* 1998;124:516-25.
  29. Tai LH, Zang J, Scott KJ et al. Perioperative influenza vaccination reduces postoperative metastatic disease by reversing surgery-induced dysfunction in natural killer cells. *Clin Cancer Res* 2013;19:5104-15.