

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät für Medizin
Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie
des Klinikums rechts der Isar

Immunologische Phänomene lokaler Strahlentherapie

-

Veränderungen der peripheren Lymphozyten und ihrer
Subpopulationen in Brustkrebs-Patientinnen und Prostatakrebs-
Patienten

Eva Katharina Sage

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med. sci.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Dirk Busch

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Hans Geinitz
2. Priv.-Doz. Dr. Thomas E. Schmid
3. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 26.10.2017 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 30.05.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. EINLEITUNG.....	2
1.1 Mamma-Karzinom.....	2
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Stadiengerechte Therapieoptionen und Rolle der Strahlentherapie	2
1.2 Prostatakarzinom	4
1.2.1 Epidemiologie	4
1.2.2 Stadiengerechte Therapieoptionen und Rolle der Strahlentherapie	4
1.3 Moderne Strahlentherapiekonzepte	8
1.3.1 3D-Konformale Bestrahlungstechnik und IMRT	8
1.3.2 Risikoorgan	9
1.3.3 Zielvolumenkonz	10
1.3.4 3D-konformale Bestrahlungsplanung und Simulation	11
1.4. Lymphozytensubpopulationen	12
1.5 Zielsetzung der Studie	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Rekrutierung der Patienten	14
2.1.1 Mamma-Karzinom	14
2.1.2 Prostatakarzinom	14
2.2 Patienteneigenschaften	15
2.2.1 Mamma-Karzinom	15
2.2.2 Prostatakarzinom	16
2.3 Ablauf der Studie	18
2.4 FACS-Analyse.....	19
2.5 Statistische Auswertung.....	24
3. DISKUSSION	25
4. SCHLUSSFOLGERUNG	28
Literaturverzeichnis	29
Anhang	
Beispiel-CRF: Mamma	39
Beispiel-CRF: Prostata	58
Zusammenfassung der Publikationen	
Publikation 1.....	81
Publikation 2	86
Danksagung	94

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACOSOG	American College of Surgeons Oncology Group
APC	Allophycocyanin
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BET	brusterhaltende Therapie
BIOP	Biomarker bei Prostatakarzinom-Studie
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTCAE	Common Terminology Criteria of Adverse Events
CTV	Clinical Target Volume – klinisches Zielvolumen
DCIS	duktales carcinoma in situ
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FACS	Flourescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GTV	Gross Tumor Volume – Tumolvolumen
Gy	Gray
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurement
IGRT	image-guided radiotherapy; bildgeführte Strahlentherapie
IMEP	Immunologische und epigenetische Phänomene
IMRT	intensity-modulated radiotherapy – Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
LDH	Lactatdehydrogenase
LDRB	Low-Dose-Rate-Brachytherapie
LHRH	luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
PBS	Phosphate-buffered saline – Phosphat gepufferte Salzsäure
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTV	Planning Target Volume – Planungszielvolumen
SIB	simultan integrierter Boost
SNLB	Sentinellymphknoten-Biopsie
Treg	regulatory T cells – regulatorische T-Zellen

1. EINLEITUNG

1.1 Mamma-Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist mit rund 25% der Krebsfälle weltweit die weit häufigste Tumorentität der Frau. Jährlich kommt es zu etwa 1,7 Millionen Neuerkrankungen. Bei der Frau liegt das Mamma-Karzinom mit 14,7% auf Platz eins der krebsbedingten Todesursachen, dicht gefolgt von Lungenkrebs (in einigen Regionen bereits an erster Stelle) und Darmkrebs [Ferlay 2015]. Durch das vermehrte Mammographie-Screening kommt es zur steigenden Inzidenz vor allem früher Stadien des Brustkrebs, ohne dass es zum Anstieg der Mortalität kommt [Harding 2015]. In Deutschland kam es über die letzten Jahrzehnte durch verbesserte Früherkennung und Therapie zu einer kontinuierlich besseren Prognose des Mamma-Karzinoms mit verlängertem Gesamtüberlebens [Holleczek 2011].

1.1.2 Stadiengerechte Therapieoptionen und Rolle der Strahlentherapie

Die Therapie des Mamma-Karzinoms hängt neben dem Tumorstadium, dem Alter der Patientin, möglichen Begleiterkrankungen auch von Eigenschaften des Tumors (Östrogen- und Progesteronrezeptoren bzw. HER2/neu) ab. Auf der einen Seite stehen lokale Therapien wie die Operation oder die lokale Strahlentherapie zur Verfügung, während andererseits systemische Behandlungen wie eine Chemotherapie oder eine antihormonelle Therapie mögliche Therapieoptionen darstellen. Häufig werden die verschiedenen Therapien miteinander kombiniert und können sowohl parallel als auch hintereinander gegeben werden. In Deutschland richtet sich die Therapie unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren nach den aktuellen Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mamma-Karzinoms – AWMF-Register [AWMF 2012]).

Beim Brustkrebs im präinvasives Stadium (DCIS) wird der Tumor lokal, in der Regel brusterhaltend, operativ entfernt, während der tumorfreie Resektionsrand prognostisch entscheidend ist [Dunne 2009]. Eine adjuvante lokale Nachbestrahlung wird empfohlen und verringert das Rezidivrisiko, ohne das Gesamtüberleben nachweislich zu verlängern [Bijker 2006].

Im Allgemeinen wird der Tumor im lokalisierten, nicht fortgeschrittenen Stadium primär operativ entfernt. Ziel ist es den Tumor bei tumorfreiem Resektionsrand (R0) und ausreichend Sicherheitsabstand brusterhaltend zu entfernen [Buchholz 2014]. Die postoperative lokale Strahlentherapie nach

brusterhaltenden Therapie (BET) wirkt sich sowohl positiv auf die lokale Kontrolle als auch auf das Gesamtüberleben aus [Corradini 2015]. So ist die BET mit anschließender Radiotherapie bezüglich des Überlebens gleichwertig zur radikalen Mastektomie [Veronesi 2002]. Das Zielvolumen dieser perkutanen, adjuvanten Strahlentherapie sollte sowohl die komplette verbleibende Brustdrüse, als auch die Thoraxwand umfassen [Darby 2011]. Die applizierte Dosis sollte ca. 50 Gy in einer konventionellen Fraktionierung von 5 x 1,8 - 2,0 Gy pro Woche betragen [Clarke 2005] oder alternativ hypofraktioniert mit 15 x 2,67 Gy in fünf Fraktionen pro Woche analog des START-B Protokolls erfolgen [Haviland 2013]. Eine lokale Dosisaufsättigung kann in Form einer Boost-Bestrahlung erreicht werden. Die Dosis des Boosts sollte 10-16 Gy betragen und konventionell fraktioniert mit 5 x 2,0 Gy pro Woche appliziert werden [Vrieling 2017].

Im Falle einer notwendigen Mastektomie senkt eine lokale Strahlentherapie der Brustwand das Risiko eines lokoregionären Rezidivs. Bei Patientinnen mit erhöhtem Rezidivrisiko (wie T3/T4, Alter <50 Jahre, R1/R2, G3, Lymphgefäßinvasion, pN+ mit > 3 befallenen Lymphknoten u.a.) wirkt sie sich zusätzlich positiv auf das Gesamtüberleben aus [Clarke 2005, Floyd 2009, Kunkler 2010, Rowell 2009].

Zur Bestimmung des histologischen Nodalstatus (pN-Status) wird im Rahmen der operativen Therapie des Mamma-Karzinoms der Sentinellymphknoten entfernt (SNLB) [Kuehn 2005]. Da die SNLB in Hinblick auf lokale Kontrolle der Axilladisektion bei SLN-negativen Patientinnen in nichts nach steht und ihr hinsichtlich der Morbidität deutlich überlegen ist [Fleissig 2006, Krag 2010], ist die Axilladisektion nach der ACOSOG-Z0011-Studie nur noch in ausgewählten Fällen bei positiven SLN-Status indiziert [Gatzemeier 2013]. Ab einem Nodalstatus von >pN2a (>3 befallende Lymphknoten) und bei Befall des Level III der Achselhöhle ist eine Bestrahlung der paraclavikulären Lymphabflusswege mit ca. 50 Gy in konventioneller Fraktionierung (5 x 1,8 - 2,0 Gy pro Woche) zu empfehlen, um die lokale Kontrolle zu verbessern [Strom 2005, Tai 2007, Wang 2007]. Die Bestrahlung der Lymphabflusswege ist nach S3-Leitlinie auch bei 1-3 befallenen Lymphknoten optional möglich [AWMF 2012].

Beim primär inoperablen und lokal fortgeschrittenen bzw. beim inflammatorischen Mammakarzinom ist eine neoadjuvante systemische Therapie mit anschließender Operation und adjuvanter Nachbestrahlung die Therapie der Wahl. Sollte durch die primäre systemische Therapie keine Operabilität erzielt werden, kann eine Strahlentherapie, eventuell mit simultaner Systemtherapie, indiziert sein [Criscitiello 2016, Kaufmann 2007, Singh 2017].

Die zeitliche Abfolge der Applikation einer Chemo-, Antikörper- oder endokrinen Therapie - deren Indikation von der individuellen Beschaffenheit des Tumors abhängt - ist abhängig vom Rezidivrisiko. Dabei kann die Antikörper- und endokrine Therapie grundsätzlich simultan, d.h. parallel, oder sequentiell, also im zeitlichen Intervall zur Radiotherapie verabreicht werden, während die Chemotherapie sequentiell vor oder nach der Operation und vor der Radiotherapie gegeben wird. [Balduzzi 2010, Hickey 2006]

1.2 Prostatakarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Beim Mann steht das Prostatakarzinom mit 22,8% in Europa an erster Stelle der bösartigen Neubildungen und ist nach Lungenkrebs und Darmkrebs die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache des Mannes [Ferlay 2013]. Analog zum Brustkrebs kam es auch beim Prostatakarzinom in den letzten Jahren in Europa zu einem Anstieg der Inzidenz, was auf das weit verbreitete Screening des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) zur Früherkennung des Prostatakarzinoms zurückzuführen ist. Hierdurch kommt es zu einer steigenden Anzahl an Neuerkrankungen, wobei vor allem die Zahl der niedrigen Tumorstadien steigt und vermehrt jüngere Patienten diagnostiziert werden [Neppl-Huber 2012].

Eine Besonderheit des Prostatakarzinoms ist, dass erst sehr spät im Krankheitsverlauf durch lokales Tumorwachstum und Fernmetastasen (v.a. Knochenmetastasen) Symptome auftreten, da der Tumor meist eher langsam wächst. Dadurch würden sich einige der nach dem PSA-Screening diagnostizierten Tumore vermutlich zu Lebzeiten des Patienten nicht klinisch manifestieren. Diese Tatsache macht es besonders wichtig die Therapieoptionen des Prostatakarzinoms gründlich abzuwägen, um dem Patienten mögliche Nebenwirkungen einer eventuell unnötigen Therapie zu ersparen. So fließt neben dem Tumorstadium und bestehenden Begleiterkrankungen auch die Lebenserwartung des Patienten in die Therapiewahl mit ein.

1.2.2 Stadiengerechte Therapieoptionen und Rolle der Strahlentherapie

Die Therapie des Prostatakarzinoms richtet sich nach der Einteilung in drei Risikogruppen: niedriges (cT1-2a N0 M0, PSA \leq 10 ng/ml und Gleason-Score \leq 6), intermediäres Risiko (cT2b, PSA 10 - 20 ng/ml und Gleason-Score 7) – wobei eines oder mehrere der Faktoren zutreffen, aber kein Hochrisikofaktor vorliegt – und hohes Risiko (cT2c-T3 oder PSA $>$ 20 ng/ml oder Gleason-Score \geq 8) [D'Amico 1998]. Die Wahl und Ausführung der Therapie ist nach

der interdisziplinären S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms gerichtet [AWMF 2016].

Frühe Stadien des Prostatakarzinoms

Bei Patienten der niedrigen Risikogruppe oder Patienten die eine Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren haben bietet sich die Therapieoption der aktiven Überwachung (*active surveillance*) an. Hierbei wird durch regelmäßige PSA-Kontrollen, die PSA-Verdopplungszeit und digital rektale Untersuchung die Erkrankung überwacht. Wird der Verdacht auf Tumorprogression durch die Entnahme von Stanzbiopsien bestätigt, werden dem Patienten kurative Therapieoptionen wie die Operation oder eine lokale Strahlentherapie angeboten. Auf diese Weise wird versucht, dem Patienten möglichst lange die Nebenwirkungen der Therapie zu ersparen [Klotz 2017, Weissbach 2009]. Beim *watchful waiting* werden Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom in niedrigem Stadium mit geringer Lebenserwartung primär nur beobachtet. Erst beim Auftreten von klinischen Symptomen werden palliative, symptomorientierte Therapiemaßnahmen eingeleitet [Heidenreich 2014].

Lokal begrenztes, nicht fortgeschrittenes Prostatakarzinom

Patienten mit lokal begrenztem, nicht metastasiertem Prostatakarzinom aller Risikogruppen mit einer Lebenserwartung von mehr als zehn Jahren sollten als kurative Therapieoptionen die folgenden angeboten werden: Zum einen bietet sich bei kleiner Tumorgroße und guter Operabilität die radikale retropubische oder perineale Prostatovesikulektomie an, also die operative Entfernung der Prostata inklusive der Samenblasen [Bill-Axelson 2014, Heidenreich 2014]. Der Lymphknotenbefall ist entscheidend für die Wahl einer möglichen adjuvanten Therapie. Bei erhöhtem Risiko für Lymphknotenmetastasen sollten auch die angrenzenden Lymphabflusswege durch retroperitoneale Lymphadenektomie mit entfernt werden [Bader 2003, Cagiannos 2003]. Ab einem klinischen Stadium cT3 empfiehlt sich die präoperative erweiterte pelvine Lymphadenektomie [Heidenreich 2002]. Ziel der Prostatektomie ist die Resektion des Tumors im Gesunden (R0-Resektion), möglichst nervenschonend operiert, und dadurch unter Erhalt von Harnkontinenz und Erektionsfähigkeit – sofern der Tumor dies zulässt [Ceylan 2016, Srougi 2017].

Auf der anderen Seite bietet die Strahlentherapie eine gleichwertige Alternative unter den kurativen Therapieansätzen. So sind bereits die perkutane 3D-konformale Strahlentherapie, und -bei Patienten mit niedrigem Risikoprofil- die alleinige Low-Dose-Rate-Brachytherapie (LDRB) in Bezug auf das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben gegenüber der radikalen Prostatektomie gleichwertige primäre Therapieoptionen für Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom im Stadium cT1 und cT2 [Hamdy

2016, Kupelian 2004]. Die Durchführung der perkutanen Strahlentherapie in Form der intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT), in Kombination mit der bildgeführten Strahlentherapie (IGRT) ist heutzutage Standard. Die Gesamtdosis der lokalen perkutanen Strahlentherapie sollte dabei mindestens 74 Gy betragen und in der Standardfraktionierung von 1,8 - 2,0 Gy in 5 Fraktionen pro Woche appliziert werden [Al-Mamgani 2011, Viani 2009]. Alternativ kann die Bestrahlung auch hypofraktioniert mit 20 Fraktionen á 3 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy durchgeführt werden [Dearnaley 2016]. Auch bei älteren Patienten (≥ 75 Jahre) ist die definitive perkutane Strahlentherapie gut einsetzbar, da sie verglichen mit Patienten < 75 Jahren hinsichtlich Nebenwirkungen und des Auftretens von biochemischen Rezidiven keine Nachteile birgt [Geinitz 2005]. Bei Patienten der niedrigen Risikogruppe konnten Beyer und Brachman für die perkutane Strahlentherapie und die Brachytherapie (LDRB), bei der radioaktive Seeds in die Prostata gebracht werden und dort verbleiben, vergleichbar geringe Rezidivraten nachweisen [Beyer 2000].

Lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom

Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom (T2b-T3 cN0 cM0, PSA > 10 ng/ml oder Gleason > 7) profitieren, unter sorgfältigem Abwägen der erhöhten Toxizität, von einer Dosisescalation, die zu einer besseren lokalen Kontrolle und weniger biochemischen Rezidiven führt [Kuban 2011]. Zusätzlich können die Heilungschancen beim Prostatakarzinom in fortgeschrittenen Stadien durch eine Kombination aus lokaler Strahlentherapie und anti-Androgener Therapie erhöht werden [D'Amico 2008, Denham 2011]. So wird nach S3-Leitlinie bei Patienten der intermediären Risikogruppe die parallele Strahlen- und Hormontherapie mit Fortführung über sechs Monate und bei Patienten mit hohem Risikoprofil eine 2-3-jährige Hormontherapie kombiniert mit der Strahlentherapie empfohlen [AWMF 2016]. Auch im lokal fortgeschrittenen Stadium des Prostatakarzinoms sollte eine radikale Prostatektomie als kurativer Therapieansatz in Erwägung gezogen werden. Ab einem pT3-Stadium wird durch eine postoperative adjuvante lokale Strahlentherapie (ca. 60-66 Gy Gesamtdosis) das Überleben ohne biochemisches Rezidiv verlängert [Bolla 2005, Thompson 2009].

Biochemisches Rezidiv

Beim biochemischen, beziehungsweise PSA-Rezidiv handelt es sich um einen erneuten PSA-Anstieg: nach radikaler Prostatektomie – je nach Definition – auf $> 0,2$ bis $0,4$ ng / dl in zwei Messungen, nachdem durch eine primäre Therapie ein PSA-Nadir (-Nullwert) erreicht wurde [Freedland 2003, Stephenson 2006], bzw. nach definitiver Strahlentherapie bei einem Anstieg von $\geq 2,0$ ng/ml über den Nadir [Roach 2006].

Leider kommt es sehr häufig (je nach Tumorpathologie bei bis zu 60% der Patienten) nach primärer Therapie zu einem derartigen Rezidiv [Herrera 2016]. Die Therapie richtet sich nun, in Abhängigkeit von Alter, Begleiterkrankungen, PSA-Wert und -Anstiegszeit vor allem nach der vorangegangenen Therapie. So besteht beim Auftreten eines solchen Rezidivs nach Prostatektomie die Option der sekundären Strahlentherapie in Form einer Salvage-Strahlentherapie der Prostataloge mit einer Gesamtdosis von bis zu 70 Gy, die möglichst rasch nach dem Anstieg begonnen werden sollte [Geinitz 2012, King 2016, Loeb 2008, Morlacco 2016]. Andererseits kommt beim Auftreten eines biochemischen Rezidivs nach vorangegangener definitiver perkutaner Radiotherapie bzw. Brachytherapie eine Salvage-Operation in Frage. Diese sollte von einem erfahrenen Operateur durchgeführt werden und birgt dennoch ein höheres Risiko der Schädigung von Nerven und der daraus resultierenden Harninkontinenz und Erektile Dysfunktion und anderer Nebenwirkungen [Nguyen 2007].

N+ Prostatakarzinom

Swanson et al. befasste sich 2006 mit den verschiedenen Therapieoptionen des Prostatakarzinoms mit positiven Lymphknotenstatus. Meist werden die oben genannten Ansätze der operativen, der Strahlen- und der Anti-Androgentherapie miteinander kombiniert, wobei keine Therapie signifikante Vorzüge gegenüber einer anderen aufweist [Baker 2015, Lawrentschuk 2010, Swanson 2006].

Metastasiertes Prostatakarzinom

Bei Patienten mit symptomatischen, metastasierten Prostatakarzinom sollte eine medikamentöse oder operative Hormondeprivationstherapie eingesetzt werden [Boustead 2007, Nair 2002].

Da es bei Fernmetastasierung des Prostatakarzinoms häufig zu Knochenmetastasen kommt, beinhaltet eine symptomatische palliative Therapie meist eine Schmerzbehandlung, die Therapie mit Bisphosphonaten, die palliative Bestrahlung oder die operative Intervention von ossären Metastasen [Fizazi 2011]. Bei lokalisierten, schmerzhaften ossären Metastasen ist die lokale hypofraktionierte Strahlentherapie, beim Fehlen von Kontraindikationen in Kombination mit der Bisphosphonat-Gabe, Therapie der Wahl.

Beim hormonsensitiven Prostatakarzinom kann die primäre Androgen-Deprivation entweder durch chirurgische (subkapsuläre Orchiectomie) oder durch eine medikamentöse Kastration durch Gabe von LHRH-Analoga oder GnRH-Antagonisten erfolgen, wobei ein früheres Erreichen des PSA-Nadirs einen Überlebensvorteil darstellt [Choueiri 2009]. In der Regel kommt es nach einem primären Therapieansprechen auf die antihormonelle Therapie nach einem Zeitintervall von 6-36 Monaten häufig durch das Androgen-

unabhängige Wachstum zu einem erneuten PSA-Anstieg – man spricht auch vom kastrations-resistenten Prostatakarzinom. Da weiterhin eine Androgen-Rezeptor-Abhängigkeit besteht, ist die frühere Bezeichnung des Hormon-refraktären Prostatakarzinoms veraltet [Miller 2011]. Durch die sogenannte sekundäre Hormonmanipulation, das heißt die zusätzliche Gabe eines Antiandrogens (Bicalutamid, Flutamid, Nilutamid) kann dann eine erneute biochemische Regression erreicht werden [Lam 2006]. 2012 konnte in der AFFIRM-Studie ein signifikanter Überlebensvorteil durch Enzalutamid (einem neueren Androgen-Rezeptor-Blocker) in Patienten mit metastasiertem, kastrations-resistentem Prostatakarzinom nach Chemotherapie zeigen [Beer 2014]. Auch im Einsatz vor Chemotherapie brachte Enzalutamid eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens beim metastasierten Prostatakarzinom (PREVAIL-Studie) [Scher 2012]. Aktuelle Studien zeigen eine signifikante Verlängerung sowohl des progressionsfreien Überlebens als auch des Gesamtüberlebens durch die zusätzliche Gabe von Abiraterone (ein Arzneimittel aus der Gruppe der Steroide) in Kombination mit Prednisolon, zusätzlich zur Androgen-Deprivations-Therapie in Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem sowie kastrations-resistentem Prostatakarzinom (STAMPEDE und LATITUDE) [Fizazi 2017, James 2017]. Zwei große Studien (CHAARTED und STAMPEDE) konnten außerdem beim fortgeschrittenen bzw. metastasierten Prostatakarzinom einen Überlebensvorteil durch eine möglichst frühe Chemotherapie-Gabe (Docetaxel) parallel zur antihormonellen Therapie nachweisen [Dediu 2016, Shenoy 2016]. Beim Progress unter Docetaxel-Therapie kann Cabazitaxel in Kombination mit Prednisolon als Zweitlinientherapie eingesetzt werden und verlängert das Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem, kastrations-resistentem Prostatakarzinom (TROPIC) [de Bono 2010]. Im Vergleich zu Docetaxel bringt Cabazitaxel keinen signifikanten Überlebensvorteil in der Erstlinien-Chemotherapie, das Nebenwirkungsprofil der Substanzen unterscheidet sich jedoch etwas (FIRSTANA) [Oudard 2017].

1.3 Moderne Strahlentherapiekonzepte

1.3.1 3D-Konformale Bestrahlungstechnik und IMRT *nach Sauer: „Bestrahlungsplanung“ [Sauer 2010]*

Heute ist die konformale Strahlentherapie das Standardverfahren sowohl der primären, als auch der postoperativen Strahlentherapie. Ziel ist es die Tumorregion möglichst genau zu bestrahlen und dabei das umliegende gesunde Gewebe bestmöglich zu schonen. Die Zielregion wird dabei in der Überschneidungszone (Isozentrum) der Achse mehrerer Strahlen positioniert, die aus verschiedenen Richtungen auf die Tumorregion einwirken. Durch Bleiblenen und Anpassung der Blenden des Multileafkollimators (MLC) werden die Strahlen der Zielkontur genau angepasst. Die Bestrahlungsfelder können zusätzlich durch Keilfilter moduliert und an unterschiedliche

Gewebedicken angepasst werden, wodurch die Dosisverteilung im Zielvolumen homogenisiert werden.

Bei der intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) wird neben der Feldbegrenzung auch die Intensität der Strahlung innerhalb des Strahlungsfeldes moduliert. Die notwendige Dosis im Zielbereich und die Toleranzdosen der umliegenden Strukturen werden im Vorfeld mit Hilfe von Dosisbeschränkungen und –Zielen (dose constraints and objectives) ganz genau definiert. Durch zusätzliche Planungsprogramme werden nun die verschiedenen Strahlungsfelder in der sogenannten inversen Bestrahlungsplanung genau berechnet und festgelegt. So können besonders komplexe Zielvolumina optimal erfasst und genau bestrahlt werden, um das umliegende, gesunde Gewebe möglichst gut zu schonen. Durch die inverse Bestrahlungsplanung werden bei vorgegebener Dosisverteilung die Intensitäten eines äußeren Strahlungsfeldes im Vorfeld so bestimmt, dass bei der Bestrahlung die gewünschte Dosis im Feld erzielt wird.

Die Tomotherapie bezeichnet ein Behandlungsverfahren bei dem die Strahlung – ähnlich wie bei der Computertomographie – von allen Seiten auf das Zielvolumen gerichtet ist. Dafür rotiert die Strahlungsquelle um den Patienten. Durch einen in das Gerät integrierten Computertomographen, wird die Lage des Tumors kontinuierlich kontrolliert, um so Nebenwirkungen zu verringern.

1.3.2 Risikoorgane

nach Wannemacher et al.: Allgemeine Grundlagen [Wannemacher 2013]

Die zu schützenden, gesunden Organe, die direkt an die Tumorregion angrenzen und durch die Strahlentherapie geschädigt werden können, nennt man Risikoorgane. Die Schädigung dieser Risikoorgane kann zu strahlenbedingten Nebenwirkungen führen, in Einzelfällen kann auch das Überleben des Patienten beeinträchtigt werden. Die notwendige Schonung dieser Organe kann eine Reduktion der Dosis erfordern und dadurch im Extremfall einen kurativen Ansatz unmöglich machen. Jedes Organ hat eigene Toleranzdosen, die es einzuhalten gilt. Nachdem meist nur ein Teil eines Risikoorgans direkt im Behandlungsfeld liegt und der Effekt vor allem von der Fraktionierung, der Gesamtdosis und der räumlichen Dosisverteilung abhängt, muss das Risiko individuell mit Hilfe von Dosis-Volumen-Histogrammen abgeschätzt werden. Ein besonders genaues und für jeden Patienten individuelles Abwägen von Wirkung und Nebenwirkung wird dadurch unerlässlich.

Beim Prostatakarzinom liegen vor allem Teile der Harnblase, des Rektums und in manchen Fällen auch des Dünndarms im Bestrahlungsgebiet und müssen bei der Zielvolumenplanung bestmöglich geschont werden. Bei der Strahlentherapie der Prostataloge nach radikaler Prostatektomie sind die Risikoorgane noch schlechter vom Zielvolumen abzugrenzen, das sie sich in die Loge vorwölben.

Die besten Ergebnisse zur Schonung der Risikoorgane werden bei gefüllter Blase erzielt.

Bei der Strahlentherapie des Mamma-Karzinom gelten vor allem Lunge und Herz bzw. die kontralaterale Mamma als Risikostrukturen, die es zu schonen gilt. Zur besseren Schonung dieser Strukturen kann ein Atemgating in Betracht gezogen werden.

1.3.3 Zielvolumenkonzepte

Nach dem ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurement) Report-50 „Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy“ von 1993 und der Deutschen Norm „Begriffe und Benennungen in der radiologischen Technik“ (DIN 6814-8 von 1998) sind zur Vermeidung von Missverständnissen die Begriffe zur Bestrahlungsplanung genau definiert und festgelegt. Dabei enthält das Tumervolumen (GTV = Gross Tumor Volume) nur den makroskopischen, das heißt den sichtbaren oder tastbaren Tumor, der durch diagnostische oder operative Methoden nachgewiesen wurde, während das klinische Zielvolumen (CTV = Clinical Target Volume) zusätzlich zum GTV den Teil enthält, bei dem davon ausgegangen werden muss, dass Tumorzellen enthalten sind, auch wenn diese nicht nachweisbar sind bzw. nicht nachgewiesen wurden. Das CTV kann somit am Rand des GTV liegen, oder auch Absiedlungen (z.B. regionale Lymphknoten) enthalten, die keine Verbindung zum GTV haben (CTV I., II. oder III. Ordnung) [Sauer 2010].

Zusätzlich zur Unsicherheit des Tumorgewebes, müssen aber auch Ungenauigkeiten und Verschiebungen des Zielvolumens durch die Position und Bewegung des Patienten mit eingerechnet werden. So kommt es zum einen durch Lagerungsungenauigkeiten, aber auch durch Verschiebungen bzw. Bewegungen des Patienten während der einzelnen Fraktion, sowie durch Atemexkursion und Darmperistaltik oder auch unterschiedliche Füllungszustände von Hohlorganen zu Größenveränderungen und Verschiebungen von Organen zu Ungenauigkeiten des Zielvolumens. Diese Unsicherheiten werden im Planungszielvolumen (PTV = Planning Target Volume bzw. im ITV = Internal Target Volume) mit einkalkuliert. Abhängig von der Bestrahlungstechnik kann durch Festlegung der Bestrahlungsfelder durch das PTV das Erzielen der verordneten Dosis im CTV gewährleistet werden [Richter 2003].

1.3.4 3D-konformale Bestrahlungsplanung und Simulation

Zur Bestrahlungsplanung wird bei jedem Patienten eine Planungscomputertomographie (-CT) angefertigt. Hierzu wird der Patient bereits in der Position der der Bestrahlung mit Hilfe von im Raum fest installierten Laserkoordinaten gelagert. Diese Markierungen werden auf die Haut gemalt oder tätowiert und gegebenenfalls mit Folie überklebt und bei Bedarf nachgezeichnet, da sie über den gesamten Behandlungszeitraum erhalten bleiben müssen, um die Reproduzierbarkeit der Lagerung bestmöglich zu gewährleisten. Durch Markierungen auf der Haut werden dann die Zielpunkte bzw. „Isozentren“ durch radioopake Marker auf der Haut markiert und sind dann im CT sichtbar (virtuelle bzw. CT-Simulation). Die Bedingungen, also auch die Position des Patienten und beispielsweise die Blasenfüllung, müssen dabei genau wie bei der Simulation und bei der Bestrahlung sein, um die Zielvolumina möglichst genau einhalten zu können. Zur Immobilisation des Patienten während der Bestrahlung werden zusätzlich Lagerungshilfen und Fixierungen angebracht, falls dies notwendig ist. Auf den CT-Aufnahmen werden nun im Planungsprogramm die Zielvolumina und Risikoorgane konturiert und dreidimensional dargestellt. Bei der postoperativen Strahlentherapie können Narbengewebe oder Operationsclips hilfreiche Orientierungspunkte liefern oder zusätzlich Aufnahmen vom Zeitpunkt vor der Operation für die genaue Lage des entfernten Tumors zur Hilfe gezogen werden. Nun werden mit Hilfe der Medizinphysiker und Dosimetristen unter bestmöglicher Schonung der Risikostrukturen unter Einhaltung verschiedener Toleranzdosen ein entsprechender Bestrahlungsplan und gegebenenfalls Alternativ-Pläne erstellt, bei denen das PTV mit mindestens 95% der Dosis (ICRU 50 Report) erfasst wird.

Es wird der überzeugendste Bestrahlungsplan ausgewählt und elektronisch an die Steuerung des Bestrahlungsgerätes versandt. Im Anschluss wird die Bestrahlung am Linearbeschleuniger durchgeführt, wobei die Bestrahlungsparameter (Monitorunits, Gantry-, Leaf- und Kollimatorpositionen, etc.) aus dem Bestrahlungsplan abgerufen werden. Um auch im Laufe der Behandlung die Lage der Zielvolumina korrekt zu erfassen und dieses mit der verschriebenen Dosis zu behandeln, werden regelmäßige Aufnahmen zur Feldkontrolle angefertigt. Die Aufnahmen werden dann mit der Bildgebung der Simulation bzw. mit den digital rekonstruierten Radiogrammen (DRR) der Planungs-CT verglichen und die Lage des Patienten wenn nötig entsprechend korrigiert. Bei der sogenannten bildgeführten Strahlentherapie (image-guided radiotherapy; IGRT) kann direkt am Bestrahlungsgerät durch zum Beispiel Sonographie, konventionelles 2D-Röntgen, sowie durch Computertomographie die Patienten- und Tumorposition kontrolliert werden und eine direkte Positionsanpassung

erfolgen. Dies ist beispielsweise bei Gewichtsverlust unter der Behandlung oder Tumorschrumpfung von Bedeutung aber auch bei der Behandlung des Prostatakarzinoms.

Die Strahlentherapie sowohl bei Mamma-Karzinom-Patientinnen als auch bei Prostata-Karzinom-Patienten erstreckt sich über einen Behandlungszeitraum von mehreren Wochen, in denen von Montag bis Freitag jeweils eine Fraktion appliziert wird, während am Wochenende die Strahlentherapie pausiert wird. Weitere Unterbrechungen (zum Beispiel aufgrund von Feiertagen oder Gerätewartungen) sollten möglichst vermieden werden, um den Effekt der Strahlentherapie zu maximieren. In der Regel kann die Behandlung ambulant durchgeführt werden.

1.4. Lymphozytensubpopulationen

nach Lydyard et Grossi „Zellen der Immunantwort“ [Lydyard 1991]

Die pluripotenten Stammzellen, aus der alle Zellen des Immunsystems abstammen, differenzieren sich in zwei Hauptlinien: die lymphatische Zellreihe (Entstehung von Lymphozyten) und die myeloische Zellreihe (Entstehung von Phagozyten wie Monozyten und Granulozyten). Lymphatische Zellen werden in den primären lymphatischen Organen (reifes Knochenmark und Thymus) gebildet und reifen dann zum Teil im sekundären lymphatischen Gewebe (z.B. Milz oder Lymphknoten) zu reifen Lymphozyten heran. Diese messen dann eine Größe von 6-10µm und weisen ein heterogenes Aussehen auf.

T-Zellen werden je nach Oberflächenmolekülen nochmal unterteilt in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Diese Oberflächenmarker bestimmen die Funktion der T-Zellen und vereinfacht kann man sagen, dass die CD4⁺ T-Zellen sogenannte T-Helfer-Zellen darstellen und beispielsweise nach Antigenerkennung Zytokine ausschütten und durch Aktivierung von B-Zellen eine Immunantwort auslösen oder die Funktion der CD8⁺ T-Zellen induzieren. Die CD8⁺ T-Zellen dagegen entsprechen den zytotoxischen T-Zellen und besitzen selbst zytotoxische Eigenschaften. Sie lösen nach Aktivierung und folgender Sekretion verschiedener Proteine die Apoptose aus und bilden so einen Teil der zellulären spezifischen Immunreaktion.

B-Zellen bilden nach Antigenreiz Antikörper und sind so für die adaptive Immunreaktion verantwortlich. Ausgereifte, antikörperproduzierende B-Lymphozyten nennt man Plasmazellen. Ein Teil der aktivierten B-Zellen differenziert sich zu B-Gedächtniszellen und speichert die Antigenformation für eine schnellere Immunantwort beim zweiten Kontakt.

Eine dritte wichtige Zellreihe, stellen die NK-Zellen dar. Sie sind etwas größer als B- und T-Zellen und besitzen zytotoxische Eigenschaften und besitzen die

Fähigkeit in bestimmten Zielzellen die Apoptose auszulösen. Sie verfügen allerdings über keine spezifischen Antigenrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche und besitzen kein immunologisches Gedächtnis.

1.5 Zielsetzung der Studie

Über die letzten Jahre steht die Untersuchung immunologischer Phänomene durch lokale Strahlentherapie mehr und mehr im Fokus der Aufmerksamkeit. Neben dem direkten, zerstörenden Effekt ionisierender Strahlen durch Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS von Tumorzellen, führt auch eine Reihe weiterer indirekter Einflüsse zum Zelltod und somit zur Zerstörung des Tumors. So werden beispielsweise verschiedene Cytokine ausgeschüttet, die über eine Kaskade auf das Immunsystem Einfluss nehmen und Immunzellen aktivieren und Tumorzellen über Entzündungsmarker angreifbar machen [Schau 2012a]. Beim Zelltod von Krebszellen durch ionisierende Strahlung kommt es zur Freisetzung von Antigenen, die wiederum die Aktivierung von Immunzellen zur Folge hat. Man spricht von einer gezielten anti-Tumor Immunreaktion [Demaria 2015].

Auch Lymphozyten, als Teil des Immunsystems, werden von der Strahlentherapie beeinflusst. Bereits in den 1970er Jahren wurden andauernde Veränderungen in der Anzahl von Lymphozyten nach Strahlentherapie beschrieben und konnten zum Teil mit dem klinischen Outcome der Patienten korreliert werden [Heier 1978, Hoppe 1977, Stjernsward 1972].

Ein besseres Verständnis der Auswirkungen von Strahlentherapie auf das Immunsystem kann die Behandlung von Krebserkrankungen beispielweise durch die Kombination von Strahlentherapie mit Immuntherapie weiter verbessern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Rekrutierung der Patienten

Die IMEP-Studie zur Untersuchung immunologischer und epigenetischer Phänomene der lokalen Strahlentherapie wurde durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin des Klinikums rechts der Isar anerkannt und genehmigt. Alle Patienten wurden ausführlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.1.1 Mamma-Karzinom

Im Zeitraum von August 2012 bis Mai 2013 wurden insgesamt 42 Brustkrebspatientinnen in die Studie eingeschlossen, die bei invasivem Mamma-Karzinom in der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie des Klinikums rechts der Isar eine adjuvante Strahlentherapie der Brustdüse nach Brusterhaltener Therapie erhielten. Ausschlusskriterien waren beidseitiges Mamma-Karzinom, eine neoadjuvante Chemotherapie vor der Operation, das Vorliegen von Fernmetastasen oder Zeittumoren in inkompletter Remission und eine vorangegangene Strahlenbehandlung, zum Beispiel aufgrund von einer früheren Tumorerkrankung. Auch Patienten mit regelmäßiger Einnahme immunsuppressiver Substanzen wurden nicht in die Studie eingeschlossen. 31 Frauen, bei denen die Einschlusskriterien erfüllt waren, wollten aus persönlichen Gründen nicht an der Studie teilnehmen oder es bestand eine zu große sprachliche Barriere. Zwei der primär in die Studie eingeschlossenen Patientinnen wollten im Laufe der Behandlung aus persönlichen Gründen nicht mehr an der Studie teilnehmen und wurden daher ausgeschlossen. Zur Auswertung waren es somit 40 Patientinnen. Der Beobachtungszeitraum der Brustkrebspatientinnen belief sich auf August 2012 bis Juli 2014.

2.1.2 Prostatakarzinom

Das Patientenkollektiv der insgesamt 35 Prostatakarzinompatienten setzt sich aus zwei Studien der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie des Klinikums rechts der Isar zusammen.

Während der Rekrutierungsphase von Dezember 2012 bis September 2013 wurden insgesamt 20 Männer mit lokaler Strahlentherapie bei Prostatakarzinom (davon zehn mit definitiver Strahlentherapie, sieben mit Strahlentherapie nach biochemischem Rezidiv und drei mit adjuvanter Strahlentherapie) in die Studie eingeschlossen. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis November 2014. Auch hier waren das Vorliegen von

Fernmetastasen oder Zweittumoren in inkompletter Remission, eine frühere Radiotherapie oder die regelmäßige Einnahme immunsuppressiver Substanzen sowie eine begleitende Chemotherapie parallel zur Bestrahlung Ausschlusskriterien. 38 formal passende Patienten stimmten der Aufnahme in die Studie nicht zu. Ein Patient (mit adjuvanter Strahlentherapie) wurde im Verlauf der Behandlung nach eigenem Wunsch aus der Studie ausgeschlossen, wodurch 19 Patienten zur finalen Auswertung blieben. Zusätzlich zu den 19 Patienten, die im Rahmen der IMEP-Studie rekrutiert wurden, konnten die Daten von 16 Patienten der BIOP-Biomarker-Studie mit lokaler Strahlentherapie bei biochemischem Rezidiv des Prostatakarzinoms verwendet werden, da die Einschlusskriterien übereinstimmten. Diese Studie erstreckte sich über den Zeitraum von Dezember 2011 bis April 2015.

2.2 Patienteneigenschaften

2.2.1 Mamma-Karzinom

Neun der in die Studie aufgenommenen Patientinnen erhielt zwischen der Operation und der adjuvanten perkutanen Strahlentherapie der Brustdrüse eine adjuvante Chemotherapie, während 31 der Patientinnen mit einer alleinigen adjuvanten Strahlentherapie nach Brustrethalterer Therapie behandelt wurden. Des Weiteren bekamen 16 Patientinnen vor der bzw. begleitend zur Strahlentherapie eine zusätzliche antihormonelle Therapie, bei 22 Frauen wurde die Hormontherapie erst nach Abschluss der Strahlentherapie begonnen, während zwei Patientinnen keine Hormontherapie erhielten. Nur bei einer Patientin war der Her2-neu Satus nach DAKO 3-fach positiv, so dass sie mit einer zusätzlichen Antikörpertherapie behandelt wurde. Der Altersdurchschnitt betrug zu Beginn der Strahlenbehandlung 58,4 Jahre (Range 33-83 Jahre). 29 Patientinnen erhielten inklusive Boost eine Gesamtdosis von 60 Gy, während neun Patientinnen insgesamt 66 Gy Gesamtdosis – appliziert in Einzelfractionen von 2 Gy pro Tag, 5 mal pro Woche. Bei 39 der Patientinnen wurden über tangential Felder (Keilfilter-Technik) eines Linearbeschleunigers die gesamte Brust behandelt, während eine Patientin mit einem Tomo-Therapie-Gerät (ohne tangential Felder) behandelt wurde. Der Boost wurde bei allen Patientinnen jeweils über ein Elektronenfeld auf die ehemalige Tumorregion appliziert. Zwei der Patientinnen bekamen im Rahmen einer Studie eine hypofraktionierte Strahlentherapie mit 16 x 2,5 Gy auf die gesamte Brustdrüse und einem simultan integrierten Boost (SIB) auf das Tumorbett mit 16 x 3 Gy. Eine Patientin erhielt analog zur START-B Studie eine hypofraktionierte Strahlentherapie ohne Boost mit einer Dosis von 15 x 2,67 Gy. Die histologischen Eigenschaften der Tumore sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Größe des Tumors (cm)	n	%
<1	15	37,5
1-2	21	52,5
>2	4	10
pTNM		
T1(a-c)	34	85
T2	6	15
N0	35	87,5
N1	5	12,5
M0	40	100
Grading		
G1	8	20
G2	29	72,5
G3	3	7,5
Hormonrezeptorstatus		
Östrogenrezeptor positiv (ER+)	40	100
Progesteronrezeptor positiv (PR+)	39	97,5

Tabelle 1: Mamma-Karzinom – histologische Eigenschaften

2.2.2 Prostatakarzinom

Zwei der insgesamt 35 Patienten erhielten eine adjuvante Strahlentherapie im Anschluss an die Prostatektomie und wurden, um das Patientenkollektiv auf nur zwei Subgruppen aufteilen zu können, bei der Darstellung der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Die verbleibenden 33 Prostatakrebspatienten teilen sich bezüglich der Behandlung wie folgt auf: zehn Patienten erhielten eine primär definitive Strahlentherapie bei Prostatakarzinom, während 23 der Patienten bei biochemischem Rezidiv nach radikaler Prostatektomie mit einer sekundären Strahlentherapie behandelt wurden. Die Zeitspanne zwischen der Operation und dem Beginn der Strahlentherapie variierte zwischen sieben Monaten und zehn Jahren. Das Alter der Patienten variiert zwischen 53 und 85 Jahren, mit einem Altersdurchschnitt von 69 Jahren. Zehn der Patienten – acht Patienten mit definitiver und zwei Patienten mit Salvage-Strahlentherapie – erhielten vor Beginn der Strahlenbehandlung eine Hormontherapie (durchschnittlich 4,8 Monate neoadjuvant). Bei 6 der Patienten wurde die Hormontherapie während und nach der Strahlentherapie fortgeführt. Die Gesamtdosis betrug bei den Patienten mit definitiver Strahlentherapie

zwischen 70 und 74 Gy, während bei der Salvage-Strahlentherapie zwischen 60 und 66 Gy als Gesamtdosis appliziert wurden. Bei allen Patienten wurde die Dosis in der Fraktionierung von 1,8 - 2,0 Gy pro Tag, 5 mal pro Woche appliziert. Bei fünf der Patienten – davon drei Patienten mit definitiver und zwei Patienten mit Salvage-Strahlentherapie – wurde ein simultan integrierter Boost (SIB) bis zu einer Gesamtdosis von 76 Gy auf den makroskopischen Tumor beziehungsweise auf das Tumorbett gegeben. Die histologischen Eigenschaften und die PSA-Werte zu Beginn der Strahlentherapie sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Gleason Score	n	%
<4	0	0,0
4	1	3,0
5	0	0,0
6	6	18,2
7	18	54,5
davon 7a	12	
7b	6	
8	3	9,1
9	5	15,2

pTNM		
T1(a-c)	2	6,1
T2(a-c)	23	70,7
T3(a/b)	8	24,2
N0	28	84,8
N1	2	6,1
Nx	3	9,1
M0	30	90,1
Mx	3	9,1

Grading		
G1	4	12,1
G2	12	36,4
G3	17	51,5

PSA-Wert vor Beginn der Strahlentherapie		
≤ 0,1	3	9,1
0,2-0,5	15	45,5
0,5-1,0	7	21,2
1,1-2,0	5	15,2

2,1-3,0	0	0,0
3,1-4,0	1	3,0
>4	2	6,1

Tabelle 2: Prostatakarzinom – histologische Eigenschaften

2.3 Ablauf der Studie

Den Studienpatienten wurde zu sechs festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen (15ml EDTA Vollblut, 15ml Serum). Die Zeitpunkte waren 1. vor der ersten Bestrahlung (t0), wobei hier entweder bereits nach dem Planungs-CT (etwa eine Woche vor Beginn der Behandlung) die erste Probe entnommen wurde, oder am Tag der ersten Behandlung unmittelbar vor Applikation der ersten Fraktion. 2. etwa in der Mitte des Behandlungszeitraums, bei einer Dosis von 30 Gy (t1). 3. am letzten Tag der Behandlung (t2) und 4. bei der ersten Nachsorgeuntersuchung ca. 6 Wochen nach Ende der Strahlentherapie (t3). Der 5. Termin fand ca. 6 Monate nach Ende der Strahlentherapie (t4) und der 6. Zeitpunkt der Follow-up-Termin ein Jahr nach Ende der Strahlentherapie (t5) statt. Da die Zeitpunkte bei den Patienten der BIOP-Studie etwas abwichen, wurden in der Darstellung der Ergebnisse der Prostatakrebspatienten nur die vier gemeinsamen Untersuchungstermine (t0, t2, t3 und t5) berücksichtigt. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurde ein Fragebogen ausgefüllt, der neben persönlichen Daten wie Alter, Gewicht, Konsum von Alkohol bzw. Rauchen, Einnahme von Medikamenten, Begleiterkrankungen, auch Angaben zur Operation, zur Tumorpathologie, zur Chemo- bzw. Hormontherapie und schließlich zur durchgeführten Strahlentherapie enthielt. Außerdem wurde von den Patienten jeweils ein Fragebogen zur Lebensqualität ausgefüllt (EORTC Quality of Life Questionnaire QLQ-C30 und BR-23 bzw. PR-25). Daneben wurden mittels standardisierter Common Toxicity Criteria (CTC; CTCAE Version 4.0; https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf) Fragebögen der Adverse Events ab dem Untersuchungszeitpunkt während der Strahlentherapie auch mögliche akute unerwünschte Ereignisse und ab 6 Monate nach Ende der Strahlentherapie auch Spät-Nebenwirkungen erfasst. Bei den Prostatakrebspatienten wurde zusätzlich zu jedem Termin anhand von Fragebögen die Toxizität der Behandlung gezielt in Bezug auf Stuhl- und Harnkontinenz und Erektionsfähigkeit festgehalten (Jorge / Wexner, rektale Toxizität, Harninkontinenz und Bother Score). Siehe CRF-Bogen ab Seite 38.

Neben der Bestimmung der Lymphozyten mittels der unten beschriebenen FACS-Analyse, wurden auch Blutproben in das Labor der Klinischen Chemie des Klinikums rechts der Isar gebracht, wo mittels standardisierter

Analysemethoden aus Serum weitere Parameter wie LDH und CRP, sowie aus EDTA- Vollblut das Blutbild inklusive morphologischer Differenzierung bestimmt wurden. So konnte der absolute Wert der Lymphozyten (% Lymphozyten der absoluten Leukozyten) bestimmt werden. Bei Prostatakrebspatienten wurde außerdem der PSA-Wert bestimmt.

Die gesamten Daten wurden jeweils in einer digitalen Excel-Datenbank zusammengefasst und festgehalten.

Zusätzlich wurden nach Zentrifugieren der Serum- und EDTA-Blut-Röhrchen, um die Erythrozyten abzutrennen, Serum- und Plasmaproben in Portionen von 100-200µl aufgeteilt und bei -80°C eingefroren. Diese Proben können zur Durchführung weiterer Tests und Analysen, wie beispielsweise des Serum-Hsp70-Wertes mittels ELISA, verwendet werden.

2.4 FACS-Analyse

Mittels der Durchflusszytometrie (FACSCalibur; BD Biosciences) werden Zellen durch Antikörper (mit den fluoreszierenden Proteinen FITS, PE, PerCP und APC versetzt) markiert und können dadurch in verschiedene Zellgruppen aufgeteilt werden. In unserer Studie wurden so aus Vollblut die verschiedenen Lymphozyten-Subpopulation mit Antikörpern markiert und getrennt gemessen bzw. gezählt.

Dazu wurden für jede Patientenprobe in 14 Glasröhrchen (Tubes) mit jeweils 100µl Blut die jeweiligen Antikörper-Kombinationen (siehe Tabelle 3) hinzu pipettiert. Für die Messung der regulatorischen T-Zellen müssen vor der PE-Antikörper-Zugabe die Zellen erst fixiert und permeabilisiert werden, so dass er hier erst später hinzu gegeben wird. Alle Arbeitsschritte erfolgen bei Raumtemperatur.

	Antikörper	Volumen [in µl]	Verdünnung
Tube 1	IgG1-FITC	5	pur
	IgG1-PE	5	pur
	IgG1-PerCP	5	pur
	IgG1-APC	1	pur
Tube 2	CD94-FITC	5	pur
	CD56-PE	5	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD45-APC	1	pur
Tube 3	CD56-FITC	5	pur
	CD19-PE	20	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD45-APC	1	pur
Tube 4	CD56-FITC	5	pur
	CD16-PE	10	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD45-APC	1	pur
Tube 5	CD56-FITC	5	pur
	NKG2D-PE	10	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD69-APC	5	pur
Tube 6	CD56-FITC	5	pur
	NKp30-PE	10	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD69-APC	5	pur
Tube 7	CD56-FITC	5	pur
	NKp46-PE	10	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD69-APC	5	pur
Tube 8	CD94-FITC	5	pur
	NKG2D-PE	10	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD56-APC	10	pur
Tube 9	CD94-FITC	5	pur
	NKp30-PE	10	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD56-APC	10	pur
Tube 10	CD94-FITC	5	pur
	NKp46-PE	10	pur
	CD3-PerCP	10	pur
	CD56-APC	10	pur
Tube 11	CD4-FITC	20	pur
	CD8-PE	20	pur

	CD3-PerCP	10	pur
	CD45-APC	1	pur
Tube 12	IgG1-FITC	5	pur
	PE-Antikörper nach Fixierung		
	IgG1-PerCP	5	pur
	IgG1-APC	1	pur
Tube 13	CD4-FITC	20	pur
	PE-Antikörper nach Fixierung		
	CD3-PerCP	10	pur
	CD25-APC	5	pur
Tube 14	CD8-FITC	20	pur
	PE-Antikörper nach Fixierung		
	CD3-PerCP	10	pur
	CD25-APC	5	pur

Tabelle 3: Antikörper-Kombinationen der 14 Röhren

Antikörper	Katalognummer	Firma
IgG1-FITC	345815	BD
IgG1-PE	345816	BD
IgG1-PerCP	345817	BD
IgG1-APC	MG 105	Caltag
CD3-PerCp	345766	BD
CD4-FITC	555346	BD
CD8-FITC	555366	BD
CD8-PE	555367	BD
CD14-PerCP	345786	BD
CD16-PE	555407	BD Pharmingen
CD19-PE	555413	BD Pharmingen
CD25-APC	340907	BD
CD45-APC	MHCD 45 05	Caltag
CD56-FITC	345811	BD
CD56-PE	345812	BD
CD56-APC	555518	BD
CD69-APC	340560	BD
CD94-FITC	555888	BD Pharmingen
AntiNKp30-PE	PN IM 3709	Beckmann Coulter
AntiNKp46-PE	PN IM 3711	Beckmann Coulter
NKG2D-PE	FAB 139P	R&D-Systems
FoxP3-PE	560046	BD
Human FoxP3 Buffer Set	560098	BD

Tabelle 4: Hersteller und Katalognummern der verwendeten Antikörper

Nach Zugabe der Antikörper wird das Blutgemisch durchgemischt und danach für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wird aus PBS (Phosphat-gepufferte Salzsäure) und 10% FCS (Fetales Kälber-Serum;

Sigma F7524) der FACS-Puffer hergestellt. Dieser Puffer dient zum waschen der Proben. Dazu werden je 2ml Puffer pro Tube zum Blut-Antikörper-Gemisch gegeben und anschließend die Tubes bei 500g (1500rpm = Umdrehungen pro Minute) für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird abgeschüttet und das Pellet aufgelockert. Nach diesem ersten Wasch-Schritt werden pro Tube 2ml frisch angesetzter Lyse-Puffer-Lösung (BD Lysing Solution, Katalognummer 349202; 1:9 Verdünnung mit Wasser) hinzu gegeben. Durch kurzes, sanftes vortexen wird das Pellet resuspendiert und die Lösung gut durchmischt, bevor die Tubes 10 Minuten im Dunkeln inkubiert werden. Nun werden die Röhrchen wieder für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und das Pellet aufgelockert. Durch die Lyse werden die Erythrozyten zerstört und können danach durch Abschütten des Überstandes entfernt werden. Durch erneutes Waschen, wie oben beschrieben, werden die verbliebenen Zellen nochmals gereinigt und können nach Abschütten des Überstandes nun analysiert werden (Röhrchen 1-11). Für die Messung werden die Zellen mit jeweils 300µl FACS-Puffer gelöst und im FACS-Gerät (FACSCalibur, BD Biosciences) analysiert. Für jedes Tube werden 50.000-100.000 Events, das heißt einzelne Zellen, gezählt und je nach Antikörpermarkierung auf die verschiedenen Zellgruppen aufgeteilt. Lymphozyten sind im Feld R1 dargestellt (siehe Abbildung 1).

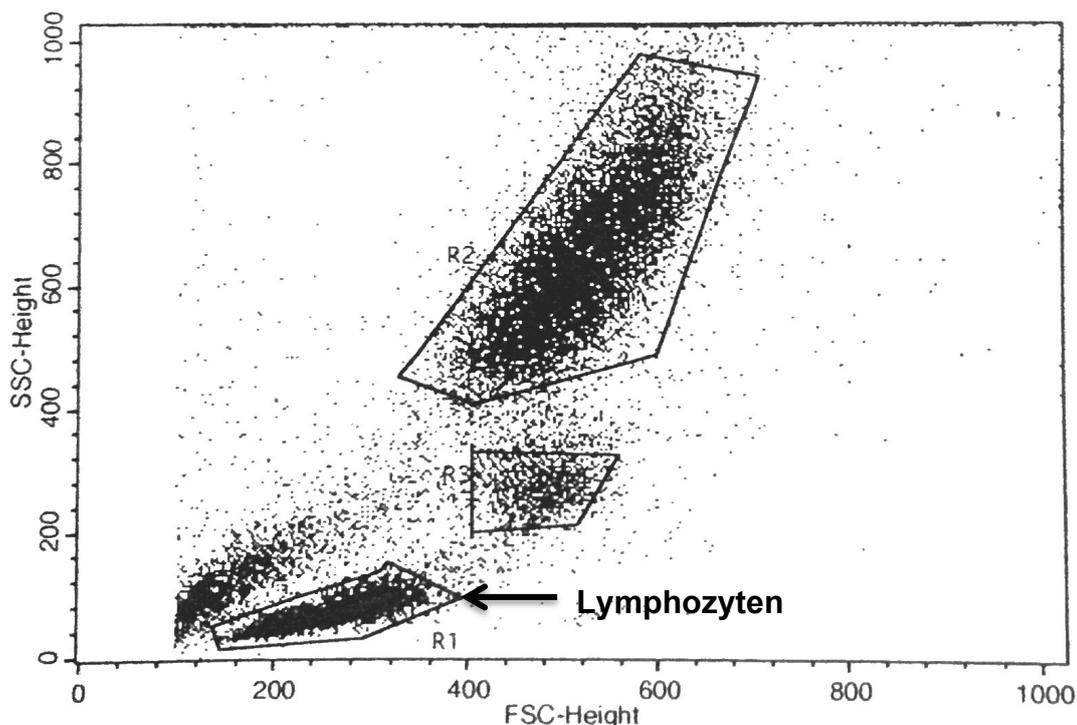


Abbildung 1: Zellwolken – Lymphozyten in R1

Mittels der Markierung der Zellen durch Antikörper lassen sich diese nun auf die verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen aufteilen. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die Aufteilung in B-, T- und NK-Zellen und einer ihrer Subgruppen.

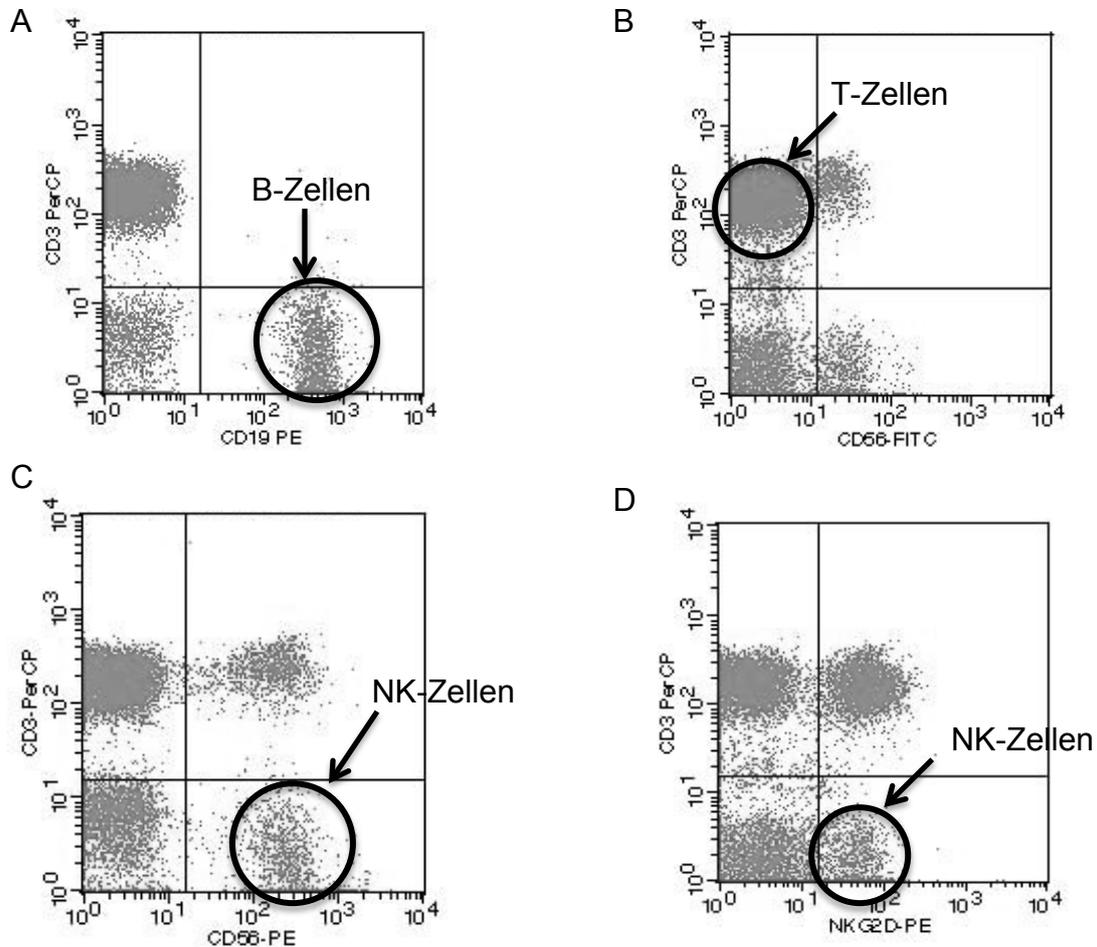


Abbildung 2: **A:** CD19⁺/CD3⁻ B-Zellen; **B:** CD3⁺/CD56⁻ T-Zellen; **C:** CD56⁺/CD3⁻ NK-Zellen; **D:** NKG2D⁺/CD3⁻ NK-Zellen

Für die Treg-Färbung in Röhrchen 12-14 werden weitere Puffer benötigt. Puffer A enthält Komponente A (BD 51-9005451), 1:10 in Wasser verdünnt, während Puffer C aus Komponente B (BD 51-9005450), 1:50 in Puffer A verdünnt, besteht. Für die Fixierung der Zellen werden jeweils 2ml Puffer A in die Tubes gegeben und diese nach zehnmütiger Inkubation im Dunkeln für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes erfolgt ein weiterer Wasch-Schritt wie oben beschrieben. Der Überstand wird wiederum entfernt und die Zellen mit Zugabe von jeweils 500µl Puffer C in einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln permeabilisiert. Nachdem die Zellen ein weiteres Mal gewaschen wurden, wird nun für die Färbung der

PE-Antikörper (der mit Phycoerythrin markierte Antikörper) in die Tubes gegeben (siehe Tabelle 4). Nach Ablauf der Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgt ein letzter Wasch-Schritt, der Überstand wird abgeschüttet und nach Zugabe von 300µl FACS-Puffern sind die Tubes 12-14 für die Messung bereit (siehe oben).

	Antikörper	Volumen [in µl]	Verdünnung
Tube 12	IgG1-PE	5	pur
Tube 13	FoxP3-PE	20	pur
Tube 14	FoxP3-PE	20	pur

Tabelle 4: PE-Antikörper für die Treg-Färbung in Tube 12-14 nach Fixierung der Zellen

2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden der gepaarte oder ungepaarte Students-T-Test zum Vergleich der jeweiligen Gruppen verwendet. Unterschiede wurden ab einem p-Wert von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3. DISKUSSION

Ziel der Studie war es den Effekt der lokalen Strahlentherapie auf die Gesamtzahl der Lymphozyten und auf die Aufteilung der Lymphozyten-Subgruppen zu untersuchen. Bereits vor der Strahlentherapie waren die absoluten Werte der Gesamt-Lymphozyten der Patienten signifikant niedriger im Vergleich zu Normalwerten bei gesunden Personen. Dies konnten wir sowohl bei Brustkrebspatientinnen mit oder ohne adjuvanter Chemotherapie, sowie bei Patienten mit primärem oder biochemisch rezidiviertem Prostatakarzinom beobachten, was auf eine immunsuppressive Wirkung des Tumors hindeuten könnte. Während der Strahlentherapie fielen die absoluten Werte der Lymphozyten bei allen vier Kollektiven weiter signifikant ab. Warum die Lymphozyten während der lokalen Strahlentherapie so stark absinken ist noch nicht geklärt. Bereits im Jahr 2001 untersuchten Geinitz et. al. in einer Studie Veränderungen im Blutbild bei adjuvanter Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms und kamen zu den gleichen Ergebnissen. Der Abfall der Lymphozyten war dabei unabhängig vom Bestrahlungsvolumen und vom Volumen des bestrahlten Knochenmarks [Geinitz 2001]. Niedrige Lymphozytenzahlen und ein geschwächtes Immunsystem fördern Tumorrezidive und wurden mit einem schlechteren Outcome bei Krebspatienten in Verbindung gebracht [Gaipl 2014, Stjernsward 1972]. Bei Prostatakarzinompatienten könnte eine niedrige Gesamt-Lymphozytenzahl im peripheren Blut als Diagnose- und Prognosemarker dienen und durch den leichten Zugangsweg zusammen mit anderen Parametern die Diagnostik und Verlaufskontrolle vereinfachen [Cihan 2013].

B-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und können als Teil der humoralen Immunreaktion Antigene präsentieren. So tragen sie auch zur Anti-Tumor-Immunantwort bei. Außerdem können sie zu Plasmazellen reifen und sind so an der Produktion und Freisetzung von Antikörpern beteiligt [Chapel 2014]. Bei Prostatakrebspatienten konnten wir verglichen mit dem Beginn der Strahlentherapie einen signifikanten Abfall der B-Zellen sowohl am Ende der definitiven, als auch am Ende der Salvage-Strahlentherapie beobachten. Den gleichen mindernden Effekt auf die B-Zellen hat auch die adjuvante Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen ohne vorangegangene Chemotherapie. Die B-Zellen waren in unserer Studie unter den Lymphozyten die Subgruppe, die am empfindlichsten auf die lokale Strahlentherapie reagierte. Diese Beobachtung passt gut zu den Ergebnissen früherer Studien [Belka 1999]. Dagegen wiesen Mamma-Karzinom-Patientinnen nach adjuvanter Chemotherapie ein sehr niedriges B-Zell-Level auf, was mit der Literatur in Einklang ist [Wijayahadi 2007]. Im Verlauf der Strahlentherapie stiegen die B-Zellen wieder langsam an, was uns darauf schließen lässt, dass der Effekt der lokalen Strahlentherapie auf die B-Zellen weniger stark ausgeprägt ist als der Effekt der Chemotherapie. Sechs Wochen, bzw. sechs

Monate nach Ende der Strahlentherapie sind die B-Zellen noch nicht wieder auf den Ausgangswert gestiegen, was auf einen langwierigen Erholungsprozess durch heranreifenden B-Zellen hindeutet.

NK-Zellen bilden einen wichtigen Teil der primären Immunreaktion, da sie auch ohne vorherige Stimulation durch Antigen-Präsentation gezielt Zellen vernichten können [Chapel 2014]. Die Gruppe der NK-Zellen reagierte bei Brust- und Prostatakrebspatienten unterschiedlich auf die lokale Strahlentherapie. So war während und nach der definitiven sowie der Salvage-Strahlentherapie des Prostatakarzinoms keine signifikante Veränderung in der Population der NK-Zellen festzustellen. Dagegen kam es bei den Brustkrebspatientinnen in beiden Kollektiven zu einem signifikanten Abfall der NK-Zellen während der Bestrahlung. Dies bestätigt die Ergebnisse vorangegangener Studien zur Untersuchung der Veränderungen von NK-Zellen unter der Behandlung bei Brustkrebspatienten [Mozaffari 2009]. Beim Follow-up sechs Monate nach Ende der Bestrahlung hatten die NK-Zellen den Ausgangswert wieder erreicht. Der, verglichen mit den B-Zellen, geringere Abfall während der Strahlentherapie und die kürzere Regenerationsdauer der NK-Zellen nach Ende der Behandlung könnte mit dem höheren Level an intrazellulärem Glutathion zusammenhängen. Dadurch sind die NK-Zellen dazu befugt ihre Zell-Homöostase aufrecht zu erhalten und so besser auf den Zellstress der lokalen Strahlentherapie reagieren zu können und sie dadurch auch weniger strahlensensitiv macht [Multhoff 1995]. Warum die NK-Zellen beim Prostatakarzinom strahlungsresistenter sind als beim Mammakarzinom ist nicht geklärt.

Auch bei den T-Zellen gab es Unterschiede in der Reaktion auf die lokale Strahlentherapie zwischen Brust- und Prostatakrebspatienten. Wie die anderen Lymphozyten stammen auch T-Zellen aus dem Knochenmark ab, reifen und vermehren sich im Thymus und können sich dann in CD4⁺-T-Helferzellen oder zytotoxische CD8⁺-T-Killerzellen differenzieren. Ausdifferenzierte T-Zellen sind in der Lage Zytokine zu sezernieren oder direkt an Zellen zu binden und diese gezielt zu zerstören [Chapel 2014]. Beim Anteil aller T-Zellen (CD3⁺) kam es bei Brustkrebspatientinnen ohne vorangegangene Chemotherapie zu einem signifikanten Anstieg am Ende der Strahlentherapie, während bei Patientinnen mit vorheriger Chemotherapie keine signifikanten Veränderungen zu beobachten waren. Auch in beiden Kollektiven der Prostatakarzinompatienten kam es zu keinen signifikanten Veränderungen vom Beginn zum Ende der Strahlentherapie. Beim Follow-up ein Jahr nach Ende der Behandlung waren die Werte der T-Zellen jedoch im Vergleich zum letzten Tag der Strahlentherapie signifikant erniedrigt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die reaktiv vermehrte Produktion anderer Lymphozyten, zum Beispiel B-Zellen, sein, die dann zu einer Verschiebung der prozentualen Anteile der Lymphozyten führt. Außerdem verschiebt sich

das Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. So steigt bei Brustkrebspatienten ohne vorherige Chemotherapie während der Strahlentherapie der Anteil der CD4⁺ T-Zellen signifikant, während er bei Prostatakrebspatienten nach definitiver Strahlentherapie absinkt und dafür der Anteil der CD8⁺ T-Zellen ansteigt. Nachdem tumorinfiltrierende CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten als Biomarker für die Vorhersage des Gesamt- und rezidivfreien Überlebens eingesetzt werden [Nardone 2016, Ness 2014], wäre es interessant herauszufinden, ob auch die Lymphozytenwerte im peripheren Blut eine Aussage über das Outcome erlauben. Beim Nasopharynxkarzinom wird beispielsweise ein höherer CD4⁺/CD8⁺-Quotient nach Strahlentherapie mit einem besseren Fernmetastasen-freien Überleben in Verbindung gebracht [Tao 2016].

Eine Sonderform der CD4⁺-T-Zellen sind die sogenannten regulatorischen T-Zellen (Treg), die zusätzlich den Interleukin 2 (IL2) alpha Rezeptor CD25 und den Transkriptionsfaktor FoxP3 an ihrer Oberfläche tragen. Diese Zellen verfügen über die Fähigkeit durch die Freisetzung von immunsuppressiven Mediatoren eine unkontrollierte, überschießende Immunreaktion zu hemmen oder zu kontrollieren. So kann zwar einerseits die Schädigung körpereigener, gesunder Zellen verhindert werden, auf der anderen Seite können Treg so Tumorzellen vor dem zytotoxischen Angriff durch CD8⁺-Killer-T-Zellen bewahren [Schaue 2012b]. Lange Zeit ging man davon aus, dass vor allem die Treg eine entscheidende Rolle bei der Anti-Tumor-Immunantwort spielen und Krebspatienten erhöhte Treg-Werte aufweisen [Liyanage 2002]. In alle unseren Patientengruppen haben wir einen Anstieg der Treg zum Ende der Strahlentherapie festgestellt, welcher allerdings nur bei Brustkrebspatientinnen ohne vorangegangene Chemotherapie statistisch signifikant war. Der Anstieg der Treg nach Strahlentherapie wurde bereits von Qu et al. 2010 in einem Mausmodell beschrieben [Qu 2010]. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Treg entweder weniger strahlensensibel sind als andere Lymphozyten, oder durch die Zerstörung von Tumorzellen während der Bestrahlung die Produktion von Treg angeregt wird. Beim Prostatakarzinom wurden erhöhte Treg-Werte im peripheren Blut der Patienten unabhängig von der Strahlentherapie beschrieben [Sotosek 2011]. Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen wären notwendig, um die Veränderungen der unterschiedlichen T-Zellen zu bestätigen und besser zu verstehen.

4. SCHLUSSFOLGERUNG

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Anzahl der Gesamtlymphozyten bereits vor Beginn der Strahlentherapie in allen untersuchten Kollektiven signifikant von gesunden Probanden unterscheidet und diese durch die Strahlentherapie weiter absinkt. Außerdem ist der Effekt der Strahlentherapie auf die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen unterschiedlich und die B-Zellen reagieren hier deutlich sensibler als T- und NK-Zellen. Dieser Effekt ist bei der adjuvanten, lokalen Strahlentherapie des Mammakarzinoms sowie der Salvage-Strahlentherapie nach biochemischen Rezidiv des Prostatakarzinoms vergleichbar. Selbst eine definitive Strahlentherapie eines Prostatakarzinoms ruft ähnliche Effekte hervor. Eine vorangegangene Chemotherapie beim Mammakarzinom hat hingegen einen deutlich stärkeren Einfluss auf die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen, insbesondere auf die B-Zellen, so dass sich hier der Effekt der Strahlentherapie von den anderen Kollektiven unterscheidet.

Die weitere Aufschlüsselung der einzelnen Zellen, deren genauere Differenzierung und ein besseres Verständnis der strahlentherapie-induzierten anti-tumor Immunantwort könnten die Basis für eine gezielte Immuntherapie parallel zur Strahlentherapie bilden.

Literaturverzeichnis

1. Al-Mamgani, A., van Putten, W.L., van der Wielen, G.J., Levendag, P.C., Incrocci, L. Dose escalation and quality of life in patients with localized prostate cancer treated with radiotherapy: long-term results of the Dutch randomized dose-escalation trial (CKTO 96-10 trial). *International journal of radiation oncology, biology, physics* 79 (2011) 1004-1012
2. AWMF, o. (2012) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0450Lk_S3_Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf
3. AWMF, o. (2016) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-0220Lk_S3_Prostatakarzinom_2016-12.pdf
4. Bader, P., Burkhard, F.C., Markwalder, R., Studer, U.E. Disease progression and survival of patients with positive lymph nodes after radical prostatectomy. Is there a chance of cure? *The Journal of urology* 169 (2003) 849-854
5. Baker, B.R., Mohiuddin, J.J., Chen, R.C. The role of radiotherapy in node-positive prostate cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 29 (2015) 108-114, 116
6. Balduzzi, A., Leonardi, M.C., Cardillo, A., Orecchia, R., Dellapasqua, S., Iorfida, M., Goldhirsch, A., Colleoni, M. Timing of adjuvant systemic therapy and radiotherapy after breast-conserving surgery and mastectomy. *Cancer treatment reviews* 36 (2010) 443-450
7. Beer, T.M., Tombal, B. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England journal of medicine* 371 (2014) 1755-1756
8. Belka, C., Ottinger, H., Kreuzfelder, E., Weinmann, M., Lindemann, M., Lepple-Wienhues, A., Budach, W., Grosse-Wilde, H., Bamberg, M. Impact of localized radiotherapy on blood immune cells counts and function in humans. *Radiotherapy and Oncology* 50 (1999) 199-204
9. Beyer, D.C., Brachman, D.G. Failure free survival following brachytherapy alone for prostate cancer: comparison with external beam radiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 57 (2000) 263-267
10. Bijker, N., Meijnen, P., Peterse, J.L., Bogaerts, J., Van Hoorebeeck, I., Julien, J.P., Gennaro, M., Rouanet, P., Avril, A., Fentiman, I.S., Bartelink, H., Rutgers, E.J. Breast-conserving treatment with or without radiotherapy in ductal carcinoma-in-situ: ten-year results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized phase III trial 10853--a study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (2006) 3381-3387
11. Bill-Axelsson, A., Holmberg, L., Garmo, H., Rider, J.R., Taari, K., Busch, C., Nordling, S., Häggman, M., Andersson, S.-O., Spångberg, A., Andrén, O., Palmgren, J., Steineck, G., Adami, H.-O., Johansson, J.-E. Radical

- Prostatectomy or Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* 370 (2014) 932-942
12. Bolla, M., van Poppel, H., Collette, L., van Cangh, P., Vekemans, K., Da Pozzo, L., de Reijke, T.M., Verbaeys, A., Bosset, J.F., van Velthoven, R., Marechal, J.M., Scalliet, P., Haustermans, K., Pierart, M. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy: a randomised controlled trial (EORTC trial 22911). *Lancet (London, England)* 366 (2005) 572-578
 13. Boustead, G., Edwards, S.J. Systematic review of early vs deferred hormonal treatment of locally advanced prostate cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BJU international* 99 (2007) 1383-1389
 14. Buchholz, T.A., Somerfield, M.R., Griggs, J.J., El-Eid, S., Hammond, M.E., Lyman, G.H., Mason, G., Newman, L.A. Margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stage I and II invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology endorsement of the Society of Surgical Oncology/American Society for Radiation Oncology consensus guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (2014) 1502-1506
 15. Cagiannos, I., Karakiewicz, P., Eastham, J.A., Ohori, M., Rabbani, F., Gerigk, C., Reuter, V., Graefen, M., Hammerer, P.G., Erbersdobler, A., Huland, H., Kupelian, P., Klein, E., Quinn, D.I., Henshall, S.M., Grygiel, J.J., Sutherland, R.L., Stricker, P.D., Morash, C.G., Scardino, P.T., Kattan, M.W. A preoperative nomogram identifying decreased risk of positive pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer. *The Journal of urology* 170 (2003) 1798-1803
 16. Ceylan, C., Tonyali, S., Keles, I. Impact of positive surgical margin on biochemical recurrence following radical prostatectomy in locally advanced prostate cancer. *The Kaohsiung journal of medical sciences* 32 (2016) 514-517
 17. Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S., Snowden, N. "Essentials of Clinical Immunology" Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, 2014
 18. Choueiri, T.K., Xie, W., D'Amico, A.V., Ross, R.W., Hu, J.C., Pomerantz, M., Regan, M.M., Taplin, M.E., Kantoff, P.W., Sartor, O., Oh, W.K. Time to prostate-specific antigen nadir independently predicts overall survival in patients who have metastatic hormone-sensitive prostate cancer treated with androgen-deprivation therapy. *Cancer* 115 (2009) 981-987
 19. Cihan, Y.B., Arslan, A., Ergul, M.A. Subtypes of white blood cells in patients with prostate cancer or benign prostatic hyperplasia and healthy individuals. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 14 (2013) 4779-4783
 20. Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, V., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., MacKinnon, E., McGale, P., McHugh, T., Peto, R., Taylor, C., Wang, Y. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)* 366 (2005) 2087-2106
 21. Corradini, S., Niyazi, M., Niemoeller, O.M., Li, M., Roeder, F., Eckel, R., Schubert-Fritschle, G., Scheithauer, H.R., Harbeck, N., Engel, J., Belka, C. Adjuvant radiotherapy after breast conserving surgery - a comparative effectiveness research study. *Radiotherapy and oncology : journal of the*

- European Society for Therapeutic Radiology and Oncology 114 (2015) 28-34
22. Criscitiello, C., Curigliano, G., Burstein, H.J., Wong, S., Esposito, A., Viale, G., Giuliano, M., Veronesi, U., Santangelo, M., Golshan, M. Breast conservation following neoadjuvant therapy for breast cancer in the modern era: Are we losing the opportunity? *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 42 (2016) 1780-1786
 23. D'Amico, A.V., Chen, M.H., Renshaw, A.A., Loffredo, M., Kantoff, P.W. Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer: a randomized trial. *Jama* 299 (2008) 289-295
 24. D'Amico, A.V., Whittington, R., Malkowicz, S.B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G.A., Tomaszewski, J.E., Renshaw, A.A., Kaplan, I., Beard, C.J., Wein, A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama* 280 (1998) 969-974
 25. Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., Clarke, M., Cutter, D., Davies, C., Ewertz, M., Godwin, J., Gray, R., Pierce, L., Whelan, T., Wang, Y., Peto, R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet (London, England)* 378 (2011) 1707-1716
 26. de Bono, J.S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J.P., Kocak, I., Gravis, G., Bodrogi, I., Mackenzie, M.J., Shen, L., Roessner, M., Gupta, S., Sartor, A.O. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet (London, England)* 376 (2010) 1147-1154
 27. Dearnaley, D., Syndikus, I., Mossop, H., Khoo, V., Birtle, A., Bloomfield, D., Graham, J., Kirkbride, P., Logue, J., Malik, Z., Money-Kyrle, J., O'Sullivan, J.M., Panades, M., Parker, C., Patterson, H., Scrase, C., Staffurth, J., Stockdale, A., Tremlett, J., Bidmead, M., Mayles, H., Naismith, O., South, C., Gao, A., Cruickshank, C., Hassan, S., Pugh, J., Griffin, C., Hall, E. Conventional versus hypofractionated high-dose intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer: 5-year outcomes of the randomised, non-inferiority, phase 3 CHHiP trial. *The Lancet. Oncology* 17 (2016) 1047-1060
 28. Dediu, M., Bratu, F., Amarandei, M., Fejer, E. Docetaxel in the treatment of castrate resistant advanced prostate cancer: a paradigm in change. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 21 (2016) 1379-1382
 29. Demaria, S., Golden, E.B., Formenti, S.C. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA oncology* 1 (2015) 1325-1332
 30. Denham, J.W., Steigler, A., Lamb, D.S., Joseph, D., Turner, S., Matthews, J., Atkinson, C., North, J., Christie, D., Spry, N.A., Tai, K.H., Wynne, C., D'Este, C. Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial. *The Lancet. Oncology* 12 (2011) 451-459
 31. Dunne, C., Burke, J.P., Morrow, M., Kell, M.R. Effect of margin status on local recurrence after breast conservation and radiation therapy for

- ductal carcinoma in situ. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (2009) 1615-1620
32. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 136 (2015) E359-386
 33. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49 (2013) 1374-1403
 34. Fizazi, K., Carducci, M., Smith, M., Damiao, R., Brown, J., Karsh, L., Milecki, P., Shore, N., Rader, M., Wang, H., Jiang, Q., Tadros, S., Dansey, R., Goessl, C. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet (London, England)* 377 (2011) 813-822
 35. Fizazi, K., Tran, N., Fein, L., Matsubara, N., Rodriguez-Antolin, A., Alekseev, B.Y., Ozguroglu, M., Ye, D., Feyerabend, S., Protheroe, A., De Porre, P., Kheoh, T., Park, Y.C., Todd, M.B., Chi, K.N. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine* 377 (2017) 352-360
 36. Fleissig, A., Fallowfield, L.J., Langridge, C.I., Johnson, L., Newcombe, R.G., Dixon, J.M., Kissin, M., Mansel, R.E. Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 95 (2006) 279-293
 37. Floyd, S.R., Taghian, A.G. Post-mastectomy radiation in large node-negative breast tumors: does size really matter? *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 91 (2009) 33-37
 38. Freedland, S.J., Sutter, M.E., Dorey, F., Aronson, W.J. Defining the ideal cutpoint for determining PSA recurrence after radical prostatectomy. *Prostate-specific antigen. Urology* 61 (2003) 365-369
 39. Gaipl, U.S., Multhoff, G., Scheithauer, H., Lauber, K., Hehlhans, S., Frey, B., Rodel, F. Kill and spread the word: stimulation of antitumor immune responses in the context of radiotherapy. *Immunotherapy* 6 (2014) 597-610
 40. Gatzemeier, W., Mann, G.B. Which sentinel lymph-node (SLN) positive breast cancer patient needs an axillary lymph-node dissection (ALND)--ACOSOG Z0011 results and beyond. *Breast (Edinburgh, Scotland)* 22 (2013) 211-216
 41. Geinitz, H., Riegel, M.G., Thamm, R., Astner, S.T., Lewerenz, C., Zimmermann, F., Molls, M., Nieder, C. Outcome after conformal salvage radiotherapy in patients with rising prostate-specific antigen levels after radical prostatectomy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 82 (2012) 1930-1937
 42. Geinitz, H., Zimmermann, F.B., Stoll, P., Thamm, R., Kaffenberger, W., Ansorg, K., Keller, M., Busch, R., van Beuningen, D., Molls, M. Fatigue, serum cytokine levels, and blood cell counts during radiotherapy of

- patients with breast cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 51 (2001) 691-698
43. Geinitz, H., Zimmermann, F.B., Thamm, R., Schumertl, A., Busch, R., Molls, M. 3D conformal radiation therapy for prostate cancer in elderly patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 76 (2005) 27-34
 44. Hamdy, F.C., Donovan, J.L., Lane, J.A., Mason, M., Metcalfe, C., Holding, P., Davis, M., Peters, T.J., Turner, E.L., Martin, R.M., Oxley, J., Robinson, M., Staffurth, J., Walsh, E., Bollina, P., Catto, J., Doble, A., Doherty, A., Gillatt, D., Kockelbergh, R., Kynaston, H., Paul, A., Powell, P., Prescott, S., Rosario, D.J., Rowe, E., Neal, D.E. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *The New England journal of medicine* 375 (2016) 1415-1424
 45. Harding, C., Pompei, F., Burmistrov, D., Welch, H.G., Abebe, R., Wilson, R. Breast Cancer Screening, Incidence, and Mortality Across US Counties. *JAMA internal medicine* 175 (2015) 1483-1489
 46. Haviland, J.S., Owen, J.R., Dewar, J.A., Agrawal, R.K., Barrett, J., Barrett-Lee, P.J., Dobbs, H.J., Hopwood, P., Lawton, P.A., Magee, B.J., Mills, J., Simmons, S., Sydenham, M.A., Venables, K., Bliss, J.M., Yarnold, J.R. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. *The Lancet. Oncology* 14 (2013) 1086-1094
 47. Heidenreich, A., Bastian, P.J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., van der Kwast, T., Mason, M., Matveev, V., Wiegand, T., Zattoni, F., Mottet, N. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *European urology* 65 (2014) 124-137
 48. Heidenreich, A., Varga, Z., Von Knobloch, R. Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. *The Journal of urology* 167 (2002) 1681-1686
 49. Heier, H.E. The influence of therapeutic irradiation of blood and peripheral lymphocytes. *Lymphology* 11 (1978) 238-242
 50. Herrera, F.G., Berthold, D.R. Radiation Therapy after Radical Prostatectomy: Implications for Clinicians. *Frontiers in oncology* 6 (2016) 117
 51. Hickey, B.E., Francis, D., Lehman, M.H. Sequencing of chemotherapy and radiation therapy for early breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* (2006) Cd005212
 52. Holleccek, B., Arndt, V., Stegmaier, C., Brenner, H. Trends in breast cancer survival in Germany from 1976 to 2008--a period analysis by age and stage. *Cancer epidemiology* 35 (2011) 399-406
 53. Hoppe, R.T., Fuks, Z.Y., Strober, S., Kaplan, H.S. The long term effects of radiation of T and B lymphocytes in the peripheral blood after regional irradiation. *Cancer* 40 (1977) 2071-2078
 54. James, N.D., de Bono, J.S., Spears, M.R., Clarke, N.W., Mason, M.D., Dearnaley, D.P., Ritchie, A.W.S., Amos, C.L., Gilson, C., Jones, R.J., Matheson, D., Millman, R., Attard, G., Chowdhury, S., Cross, W.R., Gillissen, S., Parker,

- C.C., Russell, J.M., Berthold, D.R., Brawley, C., Adab, F., Aung, S., Birtle, A.J., Bowen, J., Brock, S., Chakraborti, P., Ferguson, C., Gale, J., Gray, E., Hingorani, M., Hoskin, P.J., Lester, J.F., Malik, Z.I., McKinna, F., McPhail, N., Money-Kyrle, J., O'Sullivan, J., Parikh, O., Protheroe, A., Robinson, A., Srihari, N.N., Thomas, C., Wagstaff, J., Wylie, J., Zarkar, A., Parmar, M.K.B., Sydes, M.R. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *The New England journal of medicine* 377 (2017) 338-351
55. Kaufmann, M., von Minckwitz, G., Bear, H.D., Buzdar, A., McGale, P., Bonnefoi, H., Colleoni, M., Denkert, C., Eiermann, W., Jackesz, R., Makris, A., Miller, W., Pierga, J.Y., Semiglazov, V., Schneeweiss, A., Souchon, R., Stearns, V., Untch, M., Loibl, S. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 18 (2007) 1927-1934
 56. King, C.R. The dose-response of salvage radiotherapy following radical prostatectomy: A systematic review and meta-analysis. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 121 (2016) 199-203
 57. Klotz, L. Active surveillance for low-risk prostate cancer. *Current opinion in urology* 27 (2017) 225-230
 58. Krag, D.N., Anderson, S.J., Julian, T.B., Brown, A.M., Harlow, S.P., Costantino, J.P., Ashikaga, T., Weaver, D.L., Mamounas, E.P., Jalovec, L.M., Frazier, T.G., Noyes, R.D., Robidoux, A., Scarth, H.M., Wolmark, N. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 11 (2010) 927-933
 59. Kuban, D.A., Levy, L.B., Cheung, M.R., Lee, A.K., Choi, S., Frank, S., Pollack, A. Long-term failure patterns and survival in a randomized dose-escalation trial for prostate cancer. Who dies of disease? *International journal of radiation oncology, biology, physics* 79 (2011) 1310-1317
 60. Kuehn, T., Bembenek, A., Decker, T., Munz, D.L., Sautter-Bihl, M.L., Untch, M., Wallwiener, D. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 103 (2005) 451-461
 61. Kunkler, I. Adjuvant chest wall radiotherapy for breast cancer: black, white and shades of grey. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 36 (2010) 331-334
 62. Kupelian, P.A., Potters, L., Khuntia, D., Ciezki, J.P., Reddy, C.A., Reuther, A.M., Carlson, T.P., Klein, E.A. Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58 (2004) 25-33

63. Lam, J.S., Leppert, J.T., Vemulapalli, S.N., Shvarts, O., Belldegrun, A.S. Secondary hormonal therapy for advanced prostate cancer. *The Journal of urology* 175 (2006) 27-34
64. Lawrentschuk, N., Trottier, G., Kuk, C., Zlotta, A.R. Role of surgery in high-risk localized prostate cancer. *Current oncology (Toronto, Ont.)* 17 Suppl 2 (2010) S25-32
65. Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., Linehan, D.C. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (2002) 2756-2761
66. Loeb, S., Roehl, K.A., Viprakasit, D.P., Catalona, W.J. Long-term rates of undetectable PSA with initial observation and delayed salvage radiotherapy after radical prostatectomy. *European urology* 54 (2008) 88-94
67. Lydyard, P., Grossi, C. Zellen der Immunantwort. (1991) In: "Kurzes Lehrbuch der Immunologie", Roitt IM, Brostoff J, Male DK (eds) Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1991, vol,
68. Miller, K. [Castration resistant prostate cancer 2011]. *Aktuelle Urologie* 42 (2011) 95-102
69. Morlacco, A., Karnes, R.J. Early salvage radiation therapy post-prostatectomy: key considerations. *Future oncology (London, England)* (2016)
70. Mozaffari, F., Lindemalm, C., Choudhury, A., Granstam-Bjorneklett, H., Lekander, M., Nilsson, B., Ojutkangas, M.L., Osterborg, A., Bergkvist, L., Mellstedt, H. Systemic immune effects of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide and/or radiotherapy in breast cancer: a longitudinal study. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 58 (2009) 111-120
71. Multhoff, G., Meier, T., Botzler, C., Wiesnet, M., Allenbacher, A., Wilmanns, W., Issels, R.D. Differential effects of ifosfamide on the capacity of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells to lyse their target cells correlate with intracellular glutathione levels. *Blood* 85 (1995) 2124-2131
72. Nair, B., Wilt, T., MacDonald, R., Rutks, I. Early versus deferred androgen suppression in the treatment of advanced prostatic cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* (2002) Cd003506
73. Nardone, V., Botta, C., Caraglia, M., Martino, E.C., Ambrosio, M.R., Carfagno, T., Tini, P., Semeraro, L., Misso, G., Grimaldi, A., Boccellino, M., Facchini, G., Berretta, M., Vischi, G., Rocca, B.J., Barone, A., Tassone, P., Tagliaferri, P., Del Vecchio, M.T., Pirtoli, L., Correale, P. Tumor infiltrating T lymphocytes expressing FoxP3, CCR7 or PD-1 predict the outcome of prostate cancer patients subjected to salvage radiotherapy after biochemical relapse. *Cancer biology & therapy* (2016) 0
74. Neppl-Huber, C., Zappa, M., Coebergh, J.W., Rapiti, E., Rachtan, J., Hollecsek, B., Rosso, S., Aareleid, T., Brenner, H., Gondos, A. Changes in incidence, survival and mortality of prostate cancer in Europe and the United States in the PSA era: additional diagnoses and avoided deaths.

- Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 23 (2012) 1325-1334
75. Ness, N., Andersen, S., Valkov, A., Nordby, Y., Donnem, T., Al-Saad, S., Busund, L.T., Bremnes, R.M., Richardsen, E. Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. *The Prostate* 74 (2014) 1452-1461
 76. Nguyen, P.L., D'Amico, A.V., Lee, A.K., Suh, W.W. Patient selection, cancer control, and complications after salvage local therapy for postradiation prostate-specific antigen failure: a systematic review of the literature. *Cancer* 110 (2007) 1417-1428
 77. Oudard, S., Fizazi, K., Sengelov, L., Daugaard, G., Saad, F., Hansen, S., Hjalmeriksson, M., Jassem, J., Thiery-Vuillemin, A., Caffo, O., Castellano, D., Mainwaring, P.N., Bernard, J., Shen, L., Chadjaa, M., Sartor, O. Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial-FIRSTANA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* (2017) Jco2016721068
 78. Qu, Y., Jin, S., Zhang, A., Zhang, B., Shi, X., Wang, J., Zhao, Y. Gamma-ray resistance of regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T cells in mice. *Radiation research* 173 (2010) 148-157
 79. Richter, J. "Radiokologie Band 1 Grundlagen" W. Zuckerschwerdt Verlag, München-Wien-New York, 2003
 80. Roach, M., 3rd, Hanks, G., Thames, H., Jr., Schellhammer, P., Shipley, W.U., Sokol, G.H., Sandler, H. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 65 (2006) 965-974
 81. Rowell, N.P. Radiotherapy to the chest wall following mastectomy for node-negative breast cancer: a systematic review. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 91 (2009) 23-32
 82. Sauer, R. "Strahlentherapie und Onkologie" Urban und Fischer Verlag der Elsevier GmbH, München, München, 2010
 83. Schaeue, D., Kachikwu, E.L., McBride, W.H. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiation research* 178 (2012a) 505-523
 84. Schaeue, D., Xie, M.W., Ratican, J.A., McBride, W.H. Regulatory T cells in radiotherapeutic responses. *Frontiers in oncology* 2 (2012b) 90
 85. Scher, H.I., Fizazi, K., Saad, F., Taplin, M.E., Sternberg, C.N., Miller, K., de Wit, R., Mulders, P., Chi, K.N., Shore, N.D., Armstrong, A.J., Flaig, T.W., Flechon, A., Mainwaring, P., Fleming, M., Hainsworth, J.D., Hirmand, M., Selby, B., Seely, L., de Bono, J.S. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *The New England journal of medicine* 367 (2012) 1187-1197
 86. Shenoy, N., Kohli, M. Role of systemic chemotherapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India* 32 (2016) 257-261
 87. Singh, J.C., Mamtani, A., Barrio, A., Morrow, M., Sugarman, S., Jones, L.W., Yu, A.F., Argolo, D., Smyth, L.M., Modi, S., Schweber, S., Boaf, C., Patil, S.,

- Norton, L., Baselga, J., Hudis, C.A., Dang, C. Pathologic Complete Response with Neoadjuvant Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel with Trastuzumab and Pertuzumab in Patients with HER2-Positive Early Stage Breast Cancer: A Single Center Experience. *The oncologist* 22 (2017) 139-143
88. Sotosek, S., Sotosek Tokmadzic, V., Mrakovcic-Sutic, I., Tomas, M.I., Dominovic, M., Tulic, V., Sutic, I., Maricic, A., Sokolic, J., Sustic, A. Comparative study of frequency of different lymphocytes subpopulation in peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Wiener klinische Wochenschrift* 123 (2011) 718-725
 89. Srougi, V., Bessa, J., Jr., Baghdadi, M., Nunes-Silva, I., da Costa, J.B., Garcia-Barreras, S., Barret, E., Rozet, F., Galiano, M., Sanchez-Salas, R., Cathelineau, X. Surgical method influences specimen margins and biochemical recurrence during radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *World journal of urology* (2017)
 90. Stephenson, A.J., Kattan, M.W., Eastham, J.A., Dotan, Z.A., Bianco, F.J., Jr., Lilja, H., Scardino, P.T. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (2006) 3973-3978
 91. Stjernsward, J., Jondal, M., Vanky, F., Wigzell, H., Sealy, R. Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet (London, England)* 1 (1972) 1352-1356
 92. Strom, E.A., Woodward, W.A., Katz, A., Buchholz, T.A., Perkins, G.H., Jhingran, A., Theriault, R., Singletary, E., Sahin, A., McNeese, M.D. Clinical investigation: regional nodal failure patterns in breast cancer patients treated with mastectomy without radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 63 (2005) 1508-1513
 93. Swanson, G.P., Thompson, I.M., Basler, J. Treatment options in lymph node-positive prostate cancer. *Cancer* 106 (2006) 2531-2539
 94. Tai, P., Joseph, K., Sadikov, E., Mahmood, S., Lien, F., Yu, E. Nodal ratios in node-positive breast cancer--long-term study to clarify discrepancy of role of supraclavicular and axillary regional radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 68 (2007) 662-666
 95. Tao, C.J., Chen, Y.Y., Jiang, F., Feng, X.L., Jin, Q.F., Jin, T., Piao, Y.F., Chen, X.Z. A prognostic model combining CD4/CD8 ratio and N stage predicts the risk of distant metastasis for patients with nasopharyngeal carcinoma treated by intensity modulated radiotherapy. *Oncotarget* 7 (2016) 46653-46661
 96. Thompson, I.M., Tangen, C.M., Paradelo, J., Lucia, M.S., Miller, G., Troyer, D., Messing, E., Forman, J., Chin, J., Swanson, G., Canby-Hagino, E., Crawford, E.D. Adjuvant radiotherapy for pathological T3N0M0 prostate cancer significantly reduces risk of metastases and improves survival: long-term followup of a randomized clinical trial. *The Journal of urology* 181 (2009) 956-962
 97. Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., Aguilar, M., Marubini, E. Twenty-year follow-up of a randomized study

- comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England journal of medicine* 347 (2002) 1227-1232
98. Viani, G.A., Stefano, E.J., Afonso, S.L. Higher-than-conventional radiation doses in localized prostate cancer treatment: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 74 (2009) 1405-1418
 99. Vrieling, C., van Werkhoven, E., Maingon, P., Poortmans, P., Weltens, C., Fourquet, A., Schinagl, D., Oei, B., Rodenhuis, C.C., Horiot, J.C., Struikmans, H., Van Limbergen, E., Kirova, Y., Elkhuizen, P., Bongartz, R., Miralbell, R., Morgan, D.A., Dubois, J.B., Remouchamps, V., Mirimanoff, R.O., Hart, G., Collette, S., Collette, L., Bartelink, H. Prognostic Factors for Local Control in Breast Cancer After Long-term Follow-up in the EORTC Boost vs No Boost Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology* 3 (2017) 42-48
 100. Wang, C.W., Kuo, W.H., Chang, K.J., Huang, C.S., Cheng, J.C. Should adjuvant radiotherapy to the supraclavicular fossa be routinely given in patients with breast conservative treatment? *Journal of surgical oncology* 96 (2007) 144-150
 101. Wannemacher, M., Wenz, F., Debus, J. "Strahlentherapie" Springer Berlin Heidelberg 2013
 102. Weissbach, L., Altwein, J. Active surveillance or active treatment in localized prostate cancer? *Deutsches Arzteblatt international* 106 (2009) 371-376
 103. Wijayahadi, N., Haron, M.R., Stanslas, J., Yusuf, Z. Changes in Cellular Immunity during Chemotherapy for Primary Breast Cancer with Anthracycline Regimens. *Journal of Chemotherapy* 19 (2007) 716-723

ST-IMEP

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Case Report Form

Patienten-ID

S	T	-	I	M	E	P	-						
---	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S | T | - | I | M | E | P | - | | | | | | | | | |
Patienten-ID

Begleiterkrankungen vor RT

Wenn ja, welche Therapie?

Hypertonie

ja nein

Koronare Herzerkrankung

ja nein

pAVK

ja nein

Herzinsuffizienz

ja nein

Diabetes mellitus

ja nein

Chronische Darmerkrankung

ja nein

Chronische Lungenerkrankung

ja nein

Erkrankungen am Skelett

ja nein

Depression

ja nein

Autoimmunerkrankung (z.B. Hashimoto, M. Basedow, Rheumatoide Arthritis)

ja nein

Wenn ja, welche? _____

Andere Tumorerkrankungen

ja nein

Wenn ja, welche? _____

Zeitpunkt der Erstdiagnose: _____ Stadium: _____

Therapie? _____

Andere Erkrankungen

ja nein

Fieberhafter Infekt

ja nein

Derzeitige Medikation:

Datum

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

| | | | | 2 | 0 | 1 | |

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S | T | - | I | M | E | P | - | | | | | | | | | |
Patienten-ID

Lebensqualität vor RT

EORTC QLQ - BR23

Über-
haupt
nicht Wenig Mäßig Sehr

Während der letzten Woche:

31. Hatten Sie einen trockenen Mund?	1	2	3	4
32. War Ihr Geschmackempfinden beim Essen oder Trinken verändert?	1	2	3	4
33. Schmerzten Ihre Augen, waren diese gereizt oder trännten sie?	1	2	3	4
34. Haben Sie Haarausfall?	1	2	3	4
35. Nur bei Haarausfall ausfüllen: Hat Sie der Haarausfall belastet?	1	2	3	4
36. Fühlten Sie sich krank oder unwohl?	1	2	3	4
37. Hatten Sie Hitzewallungen?	1	2	3	4
38. Hatten Sie Kopfschmerzen?	1	2	3	4
39. Fühlten Sie sich wegen Ihrer Erkrankung oder Behandlung körperlich weniger anziehend?	1	2	3	4
40. Fühlten Sie sich wegen Ihrer Erkrankung oder Behandlung weniger weiblich?	1	2	3	4
41. Fanden Sie es schwierig, sich nackt anzusehen?	1	2	3	4
42. Waren Sie mit Ihrem Körper unzufrieden?	1	2	3	4
43. Waren Sie wegen Ihres zukünftigen Gesundheitszustandes besorgt?	1	2	3	4
44. Hatten Sie Schmerzen in Arm oder Schulter?	1	2	3	4
45. War Ihr Arm oder Ihre Hand geschwollen?	1	2	3	4
46. War das Heben oder Seitwärtsbewegen des Arms erschwert?	1	2	3	4

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S | T | - | I | M | E | P | - | | | | | | | | | |
Patienten-ID

	Überhaupt nicht	Wenig	Mäßig	Sehr
47. Hatten Sie im Bereich der betroffenen Brust Schmerzen?	1	2	3	4
48. War der Bereich Ihrer betroffenen Brust angeschwollen?	1	2	3	4
49. War der Bereich der betroffenen Brust überempfindlich?	1	2	3	4
50. Hatten Sie Hautprobleme im Bereich der betroffenen Brust (z.B. juckende, trockene oder schuppene Haut)?	1	2	3	4
Während der letzten <u>vier</u> Wochen:				
51. Wie sehr waren Sie an Sex interessiert?	1	2	3	4
52. Wie sehr waren Sie sexuell aktiv? (mit oder ohne Geschlechtsverkehr)?	1	2	3	4
53. Nur ausfüllen, wenn Sie sexuell aktiv waren: Wie weit hatten Sie Freude an Sex?	1	2	3	4

© Copyright 1994 EORTC Study Group on Quality of Life. Alle Rechte vorbehalten. Version 1.0

Datum

| | | | | 2 | 0 | 1 | |

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Laboruntersuchungen vor RT (klin. Chemie)

Hämatologie:			pathologisch?			pathologisch?
Leukozyten:	_____	G/l	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Segm.kern.:	_____	% <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Erythrozyten:	_____	T/l	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Lymphozyten:	_____	% <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Hämoglobin:	_____	g/dl	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Monozyten:	_____	% <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Hämatokrit:	_____	%	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Eosinophile:	_____	% <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
MCH:	_____	pg	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Basophile:	_____	% <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
MCV:	_____	fl	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein			
MCHC:	_____	g/dl	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein			
Thrombozyten:	_____	G/l	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein			

Serumchemie:			pathologisch?
CRP:	_____	g/dl	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
LDH:	_____	g/dl	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein

Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Abschluss der Strahlentherapie (letzter Tag der RT)

Adverse Events

Adverse Events CTC

System organ class (C)
Term (T)
Specify, if applicable (S)

**Highest grade (0-5)
Per time periode**

Fill in „0“, if an AE is not present
during a certain time periode

**Relation to
treatment**

- 1 = Unrelated
- 2 = Unlikely
- 3 = Possible
- 4 = Probable
- 5 = Definite

	0-5	1-5
Pain	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Itching	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Loss of appetite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Difficulty in swallowing	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dry skin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Radiation dermatitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Radiation mastitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brachial plexopathy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Localized edema	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Radiation pneumonitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Leukopenia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Thrombopenia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fatigue	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Abschluss der Strahlentherapie (letzter Tag der RT)

Adverse Events

Adverse Events CTC

System organ class (C)

Term (T)

Specify, if applicable (S)

Highest grade (0-5)

Per time periode

Fill in „0“, if an AE is not present during a certain time periode

Relation to treatment

- 1 = Unrelated
- 2 = Unlikely
- 3 = Possible
- 4 = Probable
- 5 = Definite

C: _____

T: _____

S: _____

0-5

1-5

C: _____

T: _____

S: _____

0-5

1-5

C: _____

T: _____

S: _____

0-5

1-5

If there are more AEs, please fill in additional copies of this page and complete the page numbers above correspondingly.

Supportive Medication

Did the patient take analgetics?

yes
 no

Did the patient take gastric protection drugs?

yes
 no

Did the patient take antiemetics?

yes
 no

Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Abschluss der Strahlentherapie (letzter Tag der RT)

Adverse Events

Adverse Events CTC

System organ class (C)

Term (T)

Specify, if applicable (S)

Highest grade (0-5)

Per time periode

Fill in „0“, if an AE is not present during a certain time periode

Relation to treatment

1 = Unrelated

2 = Unlikely

3 = Possible

4 = Probable

5 = Definite

C: _____

0-5

1-5

T: _____

S: _____

If there are more AEs, please fill in additional copies of this page and complete the page numbers above correspondingly.

Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Follow-up IV (1 Jahr nach Strahlentherapie)

Anamnestische Angaben

Wenn ja, Datum:

Welche Therapie?

Lokalrezidiv

ja nein

Fernmetastasen

ja nein

Lokalisation: _____

Lymphknotenmetastasen

ja nein

Lokalisation: _____

Kontralateraler Brusttumor

ja nein

Invasives CA ja nein

Dcis ja nein

Hormontherapie: ja nein

Parallel zur RT Nach der RT

Präparat: _____

Dauer von _____ bis _____

Chemotherapie nach RT:

Präparat: _____

Dauer von _____ bis _____

Zyklusanzahl: _____

Datum

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Adjuvante Strahlentherapie des Mamma-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Follow-up IV (1 Jahr nach Strahlentherapie)

Adverse Events

Adverse Events CTC

System organ class (C)

Term (T)

Specify, if applicable (S)

Highest grade (0-5)

Per time periode

Fill in „0“, if an AE is not present during a certain time periode

Relation to treatment

- 1 = Unrelated
- 2 = Unlikely
- 3 = Possible
- 4 = Probable
- 5 = Definite

C: _____

0-5

1-5

T: _____

S: _____

C: _____

0-5

1-5

T: _____

S: _____

C: _____

0-5

1-5

T: _____

S: _____

If there are more AEs, please fill in additional copies of this page and complete the page numbers above correspondingly.

Supportive Medication

Did the patient take analgetics?

yes
 no

Did the patient take gastric protection drugs?

yes
 no

Did the patient take antiemetics?

yes
 no

Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

ST-IMEP

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Case Report Form

Patienten-ID

S	T	-	I	M	E	P	-						
---	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--

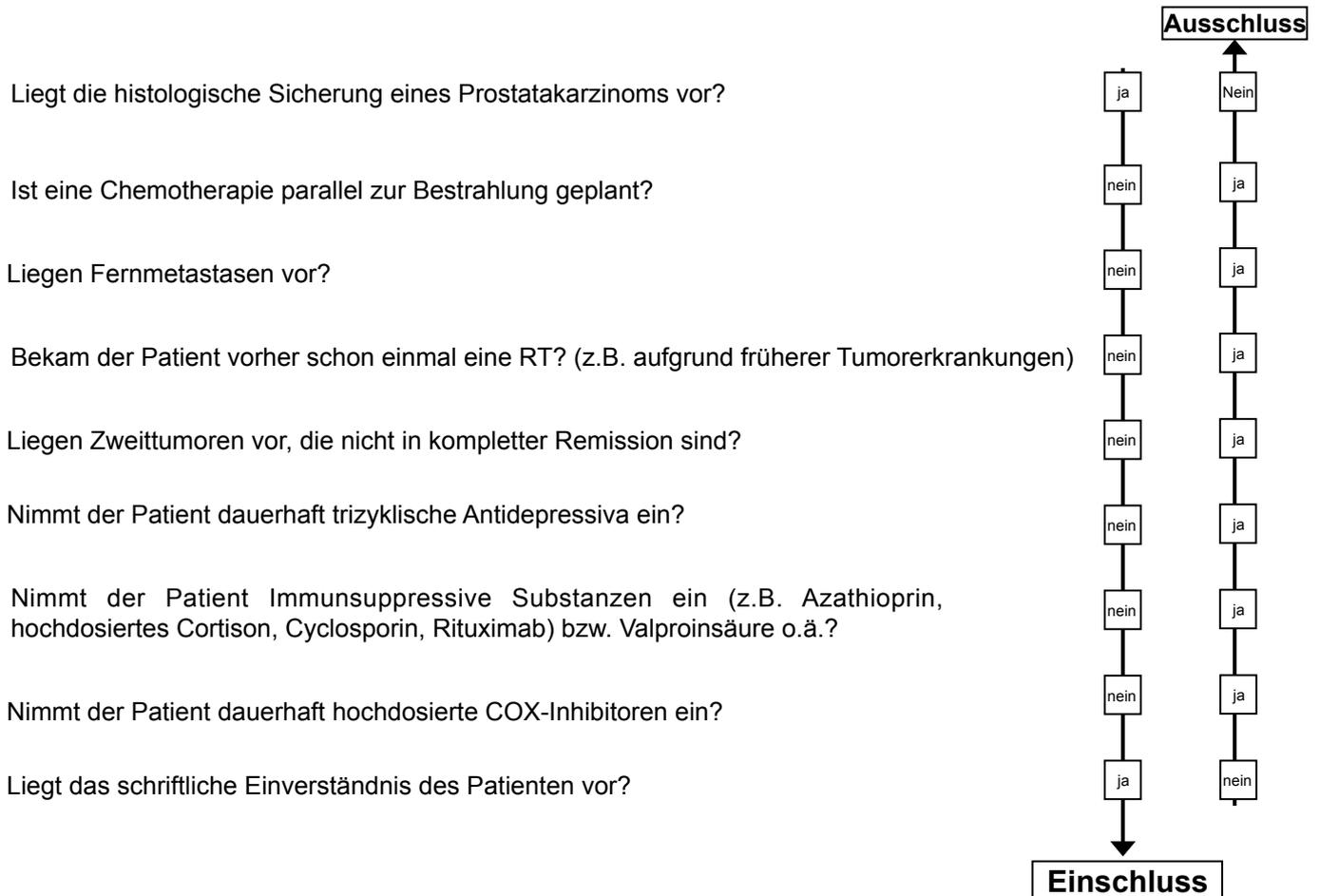
Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Lokale Strahlentherapie des Prostata-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Einschlusskriterien / Ausschlusskriterien



Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Lokale Strahlentherapie des Prostata-Karzinoms

S | T | - | I | M | E | P | - | | | | | | | | | |
Patienten-ID

Über-
haupt
nicht Wenig Mäßig Sehr

Während der letzten vier Wochen:

47. Empfanden Sie die Gewichts abnahme als Problem?	1	2	3	4
48. Empfanden Sie die Gewichts zunahme als Problem?	1	2	3	4
49. Haben Sie sich aufgrund Ihrer Krankheit oder der Behandlung weniger männlich gefühlt?	1	2	3	4
50. Hatten Sie Interesse an Sex?	1	2	3	4
51. Waren Sie sexuell aktiv (mit oder ohne Geschlechtsverkehr)?	1	2	3	4

BEANTWORTEN SIE DIE NÄCHSTEN VIER FRAGEN BITTE NUR, WENN SIE WÄHREND DER LETZTEN 4 WOCHEN SEXUELL AKTIV WAREN

52. Konnten Sie Sex genießen?	1	2	3	4
53. Hatten Sie Schwierigkeiten, eine Erektion zu bekommen oder aufrechtzuerhalten?	1	2	3	4
54. Hatten Sie Probleme mit dem Samenerguss (z.B. trockene Ejakulation)?	1	2	3	4
55. War Ihnen bei sexueller Intimität oder dem Gedanken an sexuelle Intimität unwohl?	1	2	3	4

© Copyright 1999 EORTC Quality of Life Group, Alle Rechte vorbehalten (phase IV module)

Datum

| | | | | 2 | 0 | 1 | |

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Lokale Strahlentherapie des Prostata-Karzinoms

S | T | - | I | M | E | P | - | | | | | | | | | | | |
Patienten-ID

1. Untersuchung vor RT

ausgefüllt

Fragebogen - Begleiterkrankungen

ja nein

Wenn nein, warum nicht:

ausgefüllt

Fragebogen –Toxizität

ja nein

Wenn nein, warum nicht:

ausgefüllt

Fragebogen – Lebensqualität
EORTC QLQ-C30 (version 3.0)

ja nein

Wenn nein, warum nicht:

ausgefüllt

Fragebogen – Lebensqualität
EORTC QLQ-PR25

ja nein

Wenn nein, warum nicht:

Datum

| | | | | 2 | 0 | 1 | |

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Lokale Strahlentherapie des Prostata-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

Laboruntersuchungen vor RT (klin. Chemie)

Hämatologie: pathologisch?

Leukozyten:	_____	G/l		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Erythrozyten:	_____	T/l		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Hämoglobin:	_____	g/dl		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Hämatokrit:	_____	%		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
MCH:	_____	pg		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
MCV:	_____	fl		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
MCHC:	_____	g/dl		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Thrombozyten:	_____	G/l		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

Morph. Diff.: pathologisch?

Segm.kern.:	_____	%		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Lymphozyten:	_____	%		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Monozyten:	_____	%		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Eosinophile:	_____	%		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Basophile:	_____	%		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

Serumchemie: pathologisch?

CRP:	_____	g/dl		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
LDH:	_____	g/dl		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein

Immunologie / Tumormarker:

PSA:	_____	ng/ml		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
------	-------	-------	--	-----------------------------	-------------------------------

Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Lokale Strahlentherapie des Prostata-Karzinoms

S
T
-
I
M
E
P
-

Patienten-ID

2. Untersuchung bei 30 Gy

Adverse Events

Adverse Events CTC
System organ class (C)
Term (T)
Specify, if applicable (S)

Highest grade (0-5)
Per time periode
Fill in „0“, if an AE is not present
during a certain time periode

Relation to treatment
1 = Unrelated
2 = Unlikely
3 = Possible
4 = Probable
5 = Definite

C: _____
T: _____
S: _____

0-5

1-5

If there are more AEs, please fill in additional copies of this page and complete the page numbers above correspondingly.

Datum

2
0
1

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Patientenfragebogen
Lokale Strahlentherapie des Prostata-Karzinoms

S | T | - | I | M | E | P | - | | | | | | | | | |
Patienten-ID

Abschluss der Bestrahlungstherapie (bei der letzten RT)

Angaben zur Strahlentherapie

Beginn der Strahlentherapie | | | | | | | | | | Ende der Strahlentherapie | | | | | | | | | |

Behandlungsunterbrechung ja nein Anzahl der Tage _____

Grund _____

Gesamt Dosis _____, ___ Gy

Simultan integrierter Boost (SIB): ja nein

Einzeldosis _____, ___ Gy

Gesamt Dosis im SIB: _____, ___ Gy

Anzahl d. Fraktionen _____

Einzeldosis im SIB: _____, ___ Gy

Behandlungstechnik: 3D IMRT Tomotherapie RapidArc

Boost ab _____, ___ Gy

Datum

Name Prüfer (Druckbuchstaben)

Unterschrift Prüfer

| | | | | | 2 | 0 | 1 | |

Zusammenfassung der Publikationen

In der 2012 begonnenen IMEP-Studie zur Untersuchung immunologischer und epigenetischer Phänomene bei lokaler Strahlentherapie wurde die jeweils weltweit häufigste Tumorentität der Frau bzw. des Mannes als Patientenkollektiv gewählt.

Die Strahlentherapie stellt neben der Operation und der Systemtherapie eine der wichtigsten Säulen der Therapieoptionen in beiden Tumorentitäten dar.

Es ist bekannt, dass die Strahlentherapie neben dem direkten zytotoxischen Effekt auf die Krebszellen auch einen indirekten Einfluss auf die Zerstörung des Tumors hat und das Immunsystem beeinflusst. So werden beispielsweise die Lymphozyten, als wichtiger Teil der direkten Immunantwort, durch die Strahlentherapie auch langfristig in ihrer Anzahl reduziert. Wir analysierten die Veränderungen an Gesamtlmphozyten und ihrer Subpopulationen vor, während und nach der Strahlentherapie in Brustkrebspatientinnen mit und ohne vorangegangene Chemotherapie im Vergleich. Zudem wurden Prostatakrebs-Patienten mit definitiver Strahlentherapie sowie mit Salvage-Strahlentherapie bei biochemischem Rezidiv in die Studie eingeschlossen, untersucht und verglichen. Es wurde zu 6 verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen und die Lymphozytenwerte analysiert.

Die Gesamtzahl der Lymphozyten der Brustkrebs-Patientinnen war sowohl vor, als auch im Verlauf und bis ein Jahr nach Ende der Strahlentherapie, in allen Patientinnen signifikant niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe. Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen, sowie der regulatorischen T-Zellen, stieg während der Strahlentherapie in Patientinnen ohne Chemotherapie signifikant an, während sich gleichzeitig der Anteil der B-Zellen unter der Bestrahlung signifikant verringerte. In Patientinnen mit vorheriger Chemotherapie war dagegen der Anteil der B-Zellen vor Beginn der Strahlentherapie sehr stark reduziert und stieg während Bestrahlung bereits wieder an. In beiden Kollektiven wurden die prozentualen Ausgangswerte 6 Monate nach Ende der Strahlentherapie erreicht.

Auch bei den Prostatakrebspatienten war die Gesamtzahl der Lymphozyten bereits vor Beginn der Strahlentherapie im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant verringert. In beiden Patientengruppen fiel die Anzahl der Gesamtlmphozyten am Ende der Strahlentherapie signifikant ab und erreichte selbst ein Jahr nach Abschluss der Bestrahlung den Ausgangswert nicht. Die B-Zellen waren sowohl in Patienten mit definitiver als auch mit Salvage-Strahlentherapie am Abschluss der Strahlentherapie verglichen mit den Ausgangswerten signifikant niedriger, erreichten jedoch in beiden Kollektiven ein Jahr nach Ende der Bestrahlung wieder den Ursprungswert. NK- und T-Zellen veränderten sich im Verlauf der Strahlentherapie nicht

signifikant. Ein Jahr nach Abschluss der Bestrahlung fielen die T-Zellen jedoch im Vergleich zum Ausgangswert vor Beginn der Strahlentherapie in beiden Patientengruppen signifikant ab.

Zusammenfassend können wir sagen, dass Chemotherapie und Strahlentherapie unterschiedlichen Einfluss auf die Gesamtzahl und die prozentualen Anteile der Lymphozyten in Brustkrebspatientinnen haben. Der Einfluss der Strahlentherapie in Prostatakrebspatienten unterscheidet sich jedoch nicht signifikant zwischen definitiver und Salvage-Strahlentherapie bei biochemischem Rezidiv. Außerdem unterscheidet sich die Reaktion der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen auf die Strahlentherapie.

Im Vorfeld erstellte ich die notwendigen CRF-Fragebögen für die jeweiligen Untersuchungszeitpunkte und eine Datenbank zur Speicherung und Auswertung der Daten.

Teil meines Aufgabenbereiches war es dann neben der Rekrutierung der Brustkrebspatientinnen sowie der Prostatakrebspatienten, die Untersuchungstermine während und zum Abschluss der Strahlentherapie sowie die Nachsorgeuntersuchungen in der Ambulanz zu koordinieren. Zu allen sechs Zeitpunkten füllte ich jeweils die entsprechenden Fragebögen (CRFs) zusammen mit den Patienten aus und nahm die nötigen Blutproben ab. In möglichst geringem zeitlichen Abstand wurde im Anschluss darauf durch mich an den entnommenen EDTA-Vollblut-Proben die FACS-Analyse zur Lymphozyten-Separation durchgeführt und die übrigen Proben für die Aufbewahrung zur Durchführung weiterer Versuche aufbereitet und bei -80°C eingefroren.

Im Verlauf wurden die Daten zusammengetragen, statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Gemeinsam mit den Co-Autoren, die mir mit ihrer Erfahrung durch zahlreiche Hinweise und Anmerkungen unterstützend zur Seite standen, wurden vorerst die Ergebnisse der Untersuchung der Mammakarzinom-Patientinnen in einem Manuskript zusammengefasst und schließlich publiziert. In einer zweiten Publikation wurden später die Ergebnisse der Prostatakrebs-Patienten ebenso dargestellt und veröffentlicht.



Breast cancer radiotherapy

Comparative analysis of the effects of radiotherapy versus radiotherapy after adjuvant chemotherapy on the composition of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients



Eva K. Sage^{a,1}, Thomas E. Schmid^{a,b,c,1}, Michael Sedelmayr^a, Mathias Gehrman^a, Hans Geinitz^d, Marciana N. Duma^{a,b}, Stephanie E. Combs^{a,b,c}, Gabriele Multhoff^{a,b,c,*}

^aDepartment of Radiation Oncology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München (TUM); ^bHelmholtzZentrum München, Department of Radiation Sciences (DRS), Institute of Innovative Radiotherapy (iRT); ^cDeutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Partner Site Munich, Germany; and ^dDepartment of Radiation Oncology, Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern and Medical Faculty, Johannes Kepler University Linz, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2015
Received in revised form 11 November 2015
Accepted 16 November 2015
Available online 9 December 2015

Keywords:

Breast cancer
Radiotherapy
Chemotherapy
Lymphocyte subpopulations

ABSTRACT

Background: Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and surgery, radiotherapy (RT) and chemotherapy (ChT) are frequently used to treat this cancer. Adjuvant RT has been shown to cause long-term changes in lymphocyte counts in the peripheral blood. Herein, the time course of changes in lymphocyte subpopulations upon RT was studied in patients with and without adjuvant ChT in order to explore its potential clinical impact.

Materials and methods: Total lymphocyte counts and the composition of lymphocyte subpopulations before RT (t0), after 30 Gy (t1), at the end of RT (t2), and 6 weeks (t3), 6 months (t4), and 1 year (t5) after RT were studied by flow cytometry.

Results: Absolute lymphocyte counts were significantly lower in all breast cancer patients ($n = 40$) before and also 1 year after RT compared to healthy controls. The percentage of CD3⁺/CD4⁺ helper T cells and FoxP3⁺ regulatory T cells increased significantly in patients without adjuvant ChT. Different NK cell subpopulations dropped during RT in patients with and without ChT, but recovered to initial levels 6 months after RT (t4). During RT (t0–t2) the percentage of CD19⁺ B cells significantly dropped in patients without ChT, but gradually increased in patients with adjuvant ChT. Both patient groups reached initial levels 6 months after RT (t4).

Conclusion: Different lymphocyte subpopulations respond differently to RT with and without adjuvant ChT. CD4⁺ T cells increase during RT, whereas NK cells and B cells decrease in patients without ChT, but recover within 6 months after RT. Treg cells gradually increase in patients without ChT from t0 to t5, but not in patients with adjuvant ChT.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. Radiotherapy and Oncology 118 (2016) 176–180

Breast cancer is the most common cancer in females worldwide with approximately 1.7 million newly diagnosed cases in 2012 (World Cancer Research Fund). Postoperative radiotherapy (RT) that is given to abolish remaining tumor stem cells after surgical resection is one of the most important treatment options to improve local tumor control and overall survival in breast cancer patients [1]. Although the main effect of RT is the direct killing of tumor cells, non-targeted radiation effects that can modulate antitumor immune responses may also affect clinical outcome. Different mechanisms are presently discussed that impair white

blood cell counts and affect the composition of lymphocyte subpopulations. Stjernsward et al. [2] described long-term changes in lymphocyte counts induced by RT of breast cancer patients and related those to tumor responses. Immune effects have been shown to influence clinical outcome and prognosis [3]. Cho et al. claim that the nadir of lymphocyte counts has prognostic value in patients with head and neck cancer [4], while others have shown that white blood cell counts and serum markers did not correlate with prognosis in breast cancer patients treated with surgery, RT and ChT [5]. Varying numbers of dendritic cells (DCs), regulatory T cells, and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in patients suffering from head and neck [6] or colorectal cancer [7] have been described to have prognostic value and a correlation of these cell types and tumor stage was found in gastric or colorectal carcinoma patients [8,9].

* Corresponding author at: Experimental Radiation Oncology/Biology, Department of Radiation Oncology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München (TUM), Ismaningerstr. 22, 81675 Munich, Germany.

E-mail address: gabriele.multhoff@tum.de (G. Multhoff).

¹ Both authors contributed equally.

Although a highly suppressive microenvironment which impairs cellular immune responses has been shown to support tumor progression and metastatic spread [10,11], little is known about how cancer therapies directly impact on immune cells. A potential augmentation of antitumor immunity through chemotherapy [12] and radiotherapy [13] has been described. For a better understanding of frequently used tumor therapies on immune cells we investigated the effects of local RT and adjuvant ChT on lymphocyte composition in two breast cancer patient cohorts before, during and after RT.

Material and methods

Study collective

Female patients with unilateral invasive breast cancer, who received breast-conserving surgery, were recruited into the study which was approved by the local ethics committee of the Medical Faculty at TUM. Patients with distant metastasis, neoadjuvant ChT, mastectomy, previous RT, and secondary tumors were excluded. All patients ($n = 40$) received standard tangential chestwall RT with a median total dose of 60 Gy in daily 2 Gy fractions to the planning target volume (PTV). Nine patients received additional adjuvant ChT (5-fluorouracil (5-FU), epirubicin, cyclophosphamide, FEC) before RT. ChT was completed two to six weeks prior initiation of RT (Table 1). Blood (9.5 ml EDTA blood) was collected at six different time points: before RT (t0), after 30 Gy (t1), after RT (t2), 6 weeks (t3), 6 months (t4), and 1 year (t5) after the end of RT. Blood samples of twenty healthy female blood donors with a median age of 61.5 years (range: 41–77 years) were collected as a control collective.

Flow cytometry

Lymphocyte subpopulations (T cells, regulatory T cells, NK cells, B cells) were analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). A representative instrument setting of the FACSCalibur for the analysis of lymphocyte subpopulations is summarized in Supplementary Table 1A. Briefly, 100 μ l of EDTA-blood was mixed with the fluorescence-labeled, undiluted antibody combinations (Supplementary Table 1B) and incubated for 15 min in the dark. After washing in Flow-Cytometry buffer (PBS buffer with 10% heat-inactivated fetal calf serum, Sigma F7524) and lysis (BD, 349202) 50,000 to 100,000, CD45 positively-gated cells were analyzed. Regulatory T cells were determined in the CD4⁺CD25⁺ T cell population using FoxP3-PE-antibody after fixation (BD51-9005451) and permeabilization (BD51-9005450). The respective percentage of lymphocyte subpopulations is defined as the proportion of cells within the lymphocyte gate.

Statistics

Statistical differences between sets of data were evaluated by using either the two-sided or one-sample student's t-test where the samples followed a normal distribution according to SigmaPlot software (Systat GmbH, Erkrath, Germany) using the Shapiro–Wilk test. Where the samples did not follow a normal distribution the Mann–Whitney Rank Sum Test was used. Data sets were considered as statistically significantly different at a $p \leq 0.05$.

Results

Kinetics of lymphocyte counts and subpopulation composition before, during and after RT

As shown in Fig. 1, breast cancer patients with (ChT+) and without (ChT-) adjuvant chemotherapy had significantly lower

Table 1
Patient characteristics.

Characteristics	N	%
Age (years)		
30–39	1	2.5
40–49	9	22.5
50–59	11	27.5
60–69	13	32.5
≥ 70	6	15
Chemotherapy		
Yes	9	22.5
No	31	77.5
Hormone therapy		
Beginning before RT	16	40.0
Beginning after RT	22	55.0
No hormone therapy	2	5.0
Antibody therapy		
Yes	1	2.5
No	39	97.5
Size of tumor (cm)		
<1	15	37.5
1–2	21	52.5
>2	4	10
pTNM		
T1(a–c)	34	85
T2	6	15
N0	35	87.5
N1	5	12.5
M0	40	100
G1	8	20
G2	29	72.5
G3	3	7.5
Hormone receptor status		
Estrogen receptor positive	40	100
Progesterone receptor positive	39	97.5
Her2-neu (DAKO 3+)	1	2.5
Total dose (Gy)		
40*	3	7.5
60	29	72.5
66	8	20
Total dose of boost (Gy)		
10	29	72.5
16	8	20

Abbreviations: TNB, tumor, nodes, metastases; T1a = ≤ 0.5 cm (including micro-invasion); T1b = 0.5 cm and ≤ 1 cm; T1c = 1 cm and ≤ 2 cm; T2 = 2 cm and ≤ 5 cm.

* Two patients were participants in a hypofractionation study and received 16×2.5 Gy to the whole breast and a simultaneously integrated boost (SIB) to the tumor bed (16×3 Gy). One patient was treated with hypofractionated radiotherapy of 15×2.67 Gy without a subsequent boost analog to the START-B trial.

absolute lymphocyte counts compared to healthy controls ($***p \leq 0.001$), before RT (t0) and after RT (t2–t5). This finding is in line with published data [14]. Patients with ChT (ChT+) revealed significantly lower lymphocyte counts than patients without ChT (ChT–, $***p \leq 0.001$; Supplementary Fig. 1). With respect to major lymphocyte subpopulations the most striking drop was observed with respect to CD19⁺ B cells in patients after adjuvant ChT ($***p \leq 0.001$; Supplementary Fig. 2). In patients without ChT (ChT–) lymphocyte counts dropped significantly after RT from 1.6 ± 0.2 G/l (t0) to 1.1 ± 0.1 G/l (t2) ($***p \leq 0.001$, Fig. 1), but returned to initial levels 6 months after RT (t4). In patients with adjuvant ChT (ChT+), RT did not decrease lymphocyte counts further and lymphocyte counts remained nearly unaltered during the whole therapy (Fig. 1).

The percentage of CD3⁺ T cells significantly increased in patients without ChT (ChT–, t0 vs t2: $68.4 \pm 1.2\%$ vs $71.9 \pm 1.4\%$, $p \leq 0.05$), whereas no significant change was observed in patients with ChT (ChT+, Fig. 2A). A subpopulation analysis revealed an

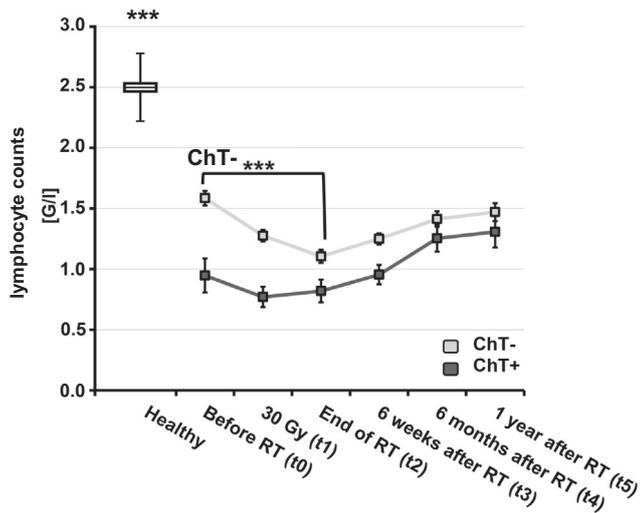


Fig. 1. Absolute lymphocyte counts as Giga (10^9) per liter (G/l) of healthy human donors (box plot) ($n = 20$) and breast cancer patients without chemotherapy (ChT-, light gray line) and with adjuvant chemotherapy (ChT+, dark gray line) before, during and after radiotherapy (RT). Healthy human donors had significantly higher lymphocyte counts than tumor patients with and without ChT. Patients without ChT (ChT-) showed a significant drop in lymphocyte counts during RT (t0 versus t2); *t*-test, *** $p \leq 0.001$.

increase in $CD3^+/CD4^+$ T cells from t0 to t3 and a decrease in $CD3^+/CD8^+$ cytotoxic T cells from t0 to t3, t4 and t5 in patients without ChT (ChT-, Table 2A). The percentage of regulatory T cells gradually increased in these patients without previous ChT from t0 to t5 ($2.5 \pm 0.2\%$ vs $3.6 \pm 0.2\%$, *** $p \leq 0.001$, Fig. 2B). With respect to NK cell subpopulations, patients without ChT (ChT-) showed a significant drop in NK cells carrying the activatory receptor NKG2D (Table 2A).

T cell subpopulations of patients with adjuvant ChT (ChT+) remained nearly unchanged during the course of RT (t2) up to 1 year after RT (t5), whereas the percentage of $CD56^+$ and $CD94^+$ NK cell subpopulations dropped during RT (t0 vs t2/t3: $15.6 \pm 0.8\%$ vs $9.5 \pm 0.4\%$, * $p \leq 0.05$ and $10.7 \pm 3.9\%$ vs $6.6 \pm 1.8\%$, * $p \leq 0.05$) and returned to initial levels 6 months after RT (t4) (Table 2B, Fig. 2C).

The percentage of B cells differed significantly in both patient groups. In patients with ChT (ChT+), the percentage of B cells was significantly lower at t0 ($0.9 \pm 0.2\%$) than in those patients without ChT (ChT-), but gradually increased during RT to $6.0 \pm 0.5\%$ between t0 and t2 (ChT+, ** $p \leq 0.01$). In contrast, the percentage of B cells in patients without adjuvant ChT (ChT-) decreased during RT from $12.2 \pm 1.1\%$ to $8.1 \pm 0.8\%$ (t2; *** $p \leq 0.001$, Fig. 2D), but then did not change until 1 year after RT (t5).

Discussion

Breast cancer patients with and without adjuvant ChT have significantly lower lymphocyte counts than age-matched, healthy human individuals. This may be caused by an immunosuppressive activity of the tumor. A compromised immune system supports tumor recurrence [15], and low lymphocyte counts have been correlated with an impaired outcome in cancer patients [16,2].

B cells, major members of the humoral immune response can act as non-professional antigen presenting cells in secondary lymphoid organs and thus contribute to antitumor immune responses [17]. Adjuvant ChT results in a dramatic drop in B cells. This is in

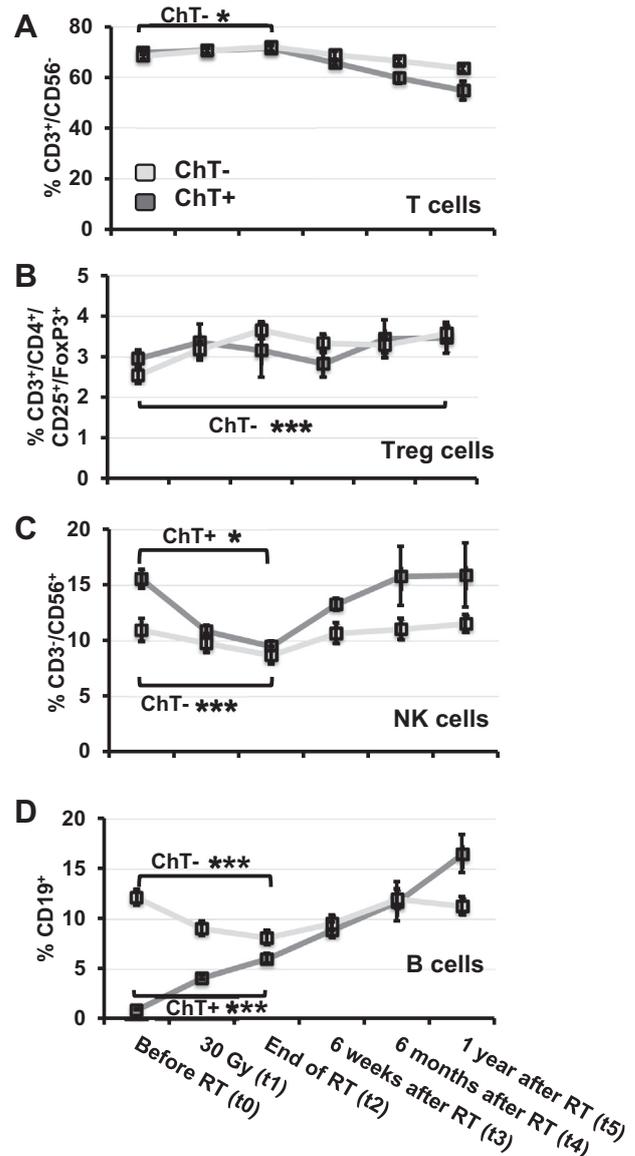


Fig. 2. Percentages of major lymphocytes subpopulations related to total lymphocyte counts: (A) $CD3^+/CD56^+$ T cells; (B) $CD3^+/CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ Treg; (C) $CD3^-/CD56^+$ NK cells; (D) $CD19^+$ B cells before, during and after RT in breast cancer patients without chemotherapy (light gray line) and with adjuvant chemotherapy (dark gray line). Significantly different values are marked; Mann-Whitney Rank Sum Test, * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$.

line with the finding that adriamycin given in primary breast cancer patients also causes a massive B cell depletion [18]. Mature B cells are also vulnerable to RT as they can undergo radiation-induced apoptosis [19,20]. These findings correspond well with our results suggesting that patients who are not pre-treated with ChT show a severe depletion in circulating B lymphocytes during fractionated irradiation. After completion of RT, a gradual recovery of this pool is observed, possibly by B cell precursors which originate from the non-irradiated bone marrow.

T cells also originating from the bone marrow, mature and multiply in the thymus and differentiate into $CD4^+$ helper T, $CD8^+$ cytotoxic T and $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ regulatory T cells. They either secrete cytokines, specifically kill tumor cells or control immune reactions [17]. Of the many immune escape mechanisms that have been proposed for cancer, regulatory T cells have long been suspected as being a major force regulating antitumor immunity

Table 2A

Composition of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients without adjuvant ChT (ChT⁻) before (t0), at 30 Gy (t1), after RT (t2), 6 weeks after (t3), 6 months after (t4) and 1 year after RT (t5). Significantly different values (t0 vs tx) are indicated in bold ($p \leq 0.05$).

Time	ChT ⁻					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
	% Positively stained cells					
T cells						
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	50.4 ± 8.2	55.8 ± 8.4	54.5 ± 7.4*	52.94 ± 9.0*	48.7 ± 13.5	44.5 ± 12.2
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	21.3 ± 5.4	19.65 ± 5.8	22.0 ± 5.9	15.60 ± 6.1*	14.5 ± 7.4*	14.6 ± 7.8*
NK cells						
CD3 ⁻ /CD56 ⁺	11.0 ± 5.8	9.79 ± 4.7	8.7 ± 4.4	10.67 ± 5.2	11.05 ± 5.4	11.53 ± 4.5
CD3 ⁻ /CD94 ⁺	6.6 ± 3.9	5.9 ± 2.8	5.5 ± 2.9	7.62 ± 3.2	7.60 ± 3.2	7.99 ± 3.6
CD3 ⁻ /NKG2D ⁺	13.1 ± 6.0	10.62 ± 4.7	9.6 ± 5.4*	11.86 ± 5.3	12.02 ± 5.2	12.11 ± 4.3
CD3 ⁻ /NKp30 ⁺	7.9 ± 4.9	6.71 ± 3.9	6.4 ± 3.8	7.35 ± 3.6	7.45 ± 3.9	7.34 ± 3.54
CD3 ⁻ /NKp46 ⁺	11.1 ± 5.7	9.63 ± 4.6	8.8 ± 4.6	10.52 ± 5.0	11.23 ± 5.3	11.00 ± 4.6

Table 2B

Composition of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with adjuvant ChT (ChT⁺) before (t0), at 30 Gy (t1), after RT (t2), 6 weeks after (t3), 6 months after (t4) and 1 year after RT (t5). Significantly different values (t0 vs tx) are indicated in bold ($p \leq 0.05$).

Time	ChT ⁺					
	t0	t1	t2	t3	t4	t5
	% Positively stained cells					
T cells						
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	45.9 ± 9.5	50.6 ± 11.2	50.2 ± 9.7	50.9 ± 12.4	45.6 ± 7.1	41.7 ± 8.4
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	31.2 ± 9.3	19.1 ± 6.9	28.8 ± 9.0	23.6 ± 10.7	19.8 ± 5.0	17.2 ± 4.0
NK cells						
CD3 ⁻ /CD56 ⁺	15.6 ± 6.7	10.85 ± 1.6*	9.5 ± 3.5*	13.27 ± 1.6	15.80 ± 7.9	15.88 ± 8.6
CD3 ⁻ /CD94 ⁺	10.7 ± 3.9	8.4 ± 3.3	6.9 ± 2.0*	6.6 ± 1.8*	9.8 ± 2.0	10.5 ± 3.9
CD3 ⁻ /NKG2D ⁺	12.9 ± 3.0	12.31 ± 2.0	10.4 ± 5.8	13.87 ± 1.9	16.86 ± 8.8	15.65 ± 8.4
CD3 ⁻ /NKp30 ⁺	11.8 ± 7.6	8.35 ± 1.7	7.4 ± 3.7	9.99 ± 2.3	11.01 ± 7.7	10.30 ± 6.9
CD3 ⁻ /NKp46 ⁺	15.8 ± 8.0	11.23 ± 1.8	9.7 ± 3.7	14.36 ± 1.8	16.53 ± 9.6	15.41 ± 8.4

[21]. Regulatory T cells are major players in preventing excessive damage to self by exerting homeostatic control over inflammation through release of immunosuppressive cytokines [22]. Up to now the effects of cancer therapies on regulatory T cells are not well understood. A subpopulation analysis of lymphocytes in patients after RT without adjuvant ChT revealed a gradual increase in CD3⁺/CD4⁺ T cells and regulatory T cells. Similar findings were described in a previous study comparing patients with cervix cancer with concurrent RT and RT alone [23]. Qu et al. observed an increase in regulatory T cells after RT while other lymphocyte subpopulations were found to be decreased which indicates that regulatory T cells might be less radiosensitive compared to other T cell subpopulations [24].

NK cells, the first line of defense, can eliminate tumor cells even without prior antigen stimulation [17]. The percentage of NK cells was found to be decreased significantly during RT in both patient groups. These results are in line with a study of Mozaffari et al. [25], who described lower NK cell levels after treatment of breast cancer patients with ChT and RT in a longitudinal study. A subpopulation analysis indicated that the percentage of NK cells carrying the activatory C-type lectin receptor NKG2D decreased significantly in patients without ChT, whereas patients with adjuvant ChT showed a significant drop in CD56⁺ and CD94⁺ NK cell subpopulations. This differential reduction of distinct NK cell subpopulations by RT and ChT can drastically impact the patient's antitumor immune response. All NK cells reached initial levels within a follow-up period of 6 months. This recovery might be due to high intracellular glutathione levels that help to maintain redox homeostasis in NK cells [26].

Conclusion

Clear differences in the effects of RT in breast cancer patients with and without adjuvant ChT were shown on lymphocyte counts

and the composition of lymphocyte subpopulations. The most striking effect was a chemotherapy-induced drop in B cells. During RT, CD4⁺ T cells significantly increased in patients without adjuvant ChT. Whether these CD4⁺ T cells partly reflect immunosuppressive regulatory T cells has to be determined, but targeting of regulatory T cells by ChT might be beneficial to avoid immuno-suppression. RT and ChT differentially affect different NK cell subpopulations that might influence antitumor immunity.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Wilhelm Sander-Stiftung (2012.078.1), EU-CELLEUROPE (315963); BMBF (Strahlenkompetenz, 02NUK007E; 02NUK031B; Innovative Therapies, 01GU0823; NSCLC, 16GW0030; m⁴ - Leading Edge Cluster, 16EX1021C; 02NUKL038A), German Cancer Consortium Radiation Oncology Group, Munich (DKTK-ROG); the DFG Cluster of Excellence: Munich Centre for Advanced Photonics (MAP); DFG SFB 824/2; INST 95/980-1 FUGG; INST 411/37-1 FUGG irradiation devices. The authors thank Bernhard Haller for support with statistical analysis of the data.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2015.11.016>.

References

- [1] Corradini S, Niyazi M, Niemoeller OM, Li M, Roeder F, Eckel R, et al. Adjuvant radiotherapy after breast conserving surgery – a comparative effectiveness research study. *Radiother Oncol* 2015;114:28–34.
- [2] Stjernsward J, Jondal M, Vanky F, Wigzell H, Sealy R. Lymphopenia and change in distribution of human B and T lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet* 1972;1(7765):1352–6.
- [3] Demaria S, Formenti SC. Sensors of ionizing radiation effects on the immunological microenvironment of cancer. *Int J Radiat Biol* 2007;83:819–25.
- [4] Cho O, Oh YT, Chun M, Noh OK, Hoe JS, Kim H. Minimum absolute lymphocyte count during radiotherapy as a new prognostic factor for nasopharyngeal cancer. *Head Neck* 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/hed.24158> (Epub ahead).
- [5] Cihan YB, Arslan A, Cetindag MF, Mutlu H. Lack of prognostic value of blood parameters in patients receiving adjuvant radiotherapy for breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:4225–31.
- [6] Schuler PJ, Borger V, Bolke E, Habermehl D, Matuschek C, Wild CA, et al. Dendritic cell generation and CD4+ CD25high FOXP3+ regulatory t cells in human head and neck carcinoma during radio-chemotherapy. *Eur J Med Res* 2011;16:57–62.
- [7] Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, Singh B, Mortensen NJ, George BD, et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol* 2007;7:7.
- [8] Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, Grabenbauer GG, Niedobitek G, Distel LV. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol* 2009;9:65.
- [9] Salama P, Phillips M, Griew F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:186–92.
- [10] Rangwala S, Tsai K. Roles of the immune system in skin cancer. *Br J Dermatol* 2011;165:953–65.
- [11] Charbonneau B, Goode EL, Kalli KR, Knutson KL, DeRycke MS. The immune system in the pathogenesis of ovarian cancer. *Crit Rev Immunol* 2013;33:137–64.
- [12] Emens LA, Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res* 2015;3:436–43.
- [13] Demaria S, Golden EB, Formenti SC. Role of local radiation therapy in cancer immunotherapy. *JAMA Oncol* 2015.
- [14] MacClatchey KD. *Clinical laboratory medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
- [15] Gaip US, Multhoff G, Scheithauer H, Lauber K, Hehlhans S, Frey B, et al. Kill and spread the word: stimulation of antitumor immune responses in the context of radiotherapy. *Immunotherapy* 2014;6:597–610.
- [16] Balaram P, Pillai MR, Padmanabhan TK, Abraham T, Hareendran NK, Nair MK. Immune function in malignant cervical neoplasia: a multiparameter analysis. *Gynecol Oncol* 1988;31:409–23.
- [17] Chapel H, Snowden N, Misbah SA, Haeney M. *Essentials of clinical immunology*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2014.
- [18] Wijayahadi N, Haron MR, Stanslas J, Yusuf Z. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *J Chemother* 2007;19:716–23.
- [19] Belka C, Ottinger H, Kreuzfelder E, Weinmann M, Lindemann M, Lepple-Wienhues A, et al. Impact of localized radiotherapy on blood immune cells counts and function in humans. *Radiother Oncol* 1999;50:199–204.
- [20] Geinitz H, Zimmermann FB, Stoll P, Thamm R, Kaffenberger W, Ansorg K, et al. Fatigue, serum cytokine levels, and blood cell counts during radiotherapy of patients with breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:691–8.
- [21] Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756–61.
- [22] Muthana M, Multhoff G, Pockley AG. Tumour infiltrating host cells and their significance for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2010;26:247–55.
- [23] Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Roman J, Pecorelli S, et al. Effects of concurrent cisplatin administration during radiotherapy vs. radiotherapy alone on the immune function of patients with cancer of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:997–1006.
- [24] Qu Y, Jin S, Zhang A, Zhang B, Shi X, Wang J, et al. Gamma-ray resistance of regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells in mice. *Radiat Res* 2010;173:148–57.
- [25] Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, Granstam-Bjorneklett H, Lekander M, Nilsson B, et al. Systemic immune effects of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide and/or radiotherapy in breast cancer: a longitudinal study. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:111–20.
- [26] Multhoff G, Meier T, Botzler C, Wiesnet M, Allenbacher A, Wilmanns W, et al. Differential effects of ifosfamide on the capacity of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells to lyse their target cells correlate with intracellular glutathione levels. *Blood* 1995;85:2124–31.

Effects of definitive and salvage radiotherapy on the distribution of lymphocyte subpopulations in prostate cancer patients

Eva K. Sage¹ · Thomas E. Schmid^{1,2,3} · Hans Geinitz⁴ · Mathias Gehrman¹ · Michael Sedelmayr¹ · Marciana N. Duma^{1,2} · Stephanie E. Combs^{1,2,3} · Gabriele Multhoff^{1,2,3}

Received: 2 February 2017 / Accepted: 20 April 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract

Background Radiotherapy (RT) is an established treatment for patients with primary and recurrent prostate cancer. Herein, the effects of definitive and salvage RT on the composition of lymphocyte subpopulations were investigated in patients with prostate cancer to study potential immune effects.

Patients and methods A total of 33 prostate cancer patients were treated with definitive ($n = 10$) or salvage RT ($n = 23$) after biochemical relapse. The absolute number of lymphocytes and the distribution of lymphocyte subpopulations were analyzed by multiparameter flow cytometry before RT, at the end of RT, and in the follow-up period.

Results Absolute lymphocyte counts decreased significantly after RT in both patient groups and a significant drop was observed in the percentage of B cells directly after RT from 10.1 ± 1.3 to $6.0 \pm 0.7\%$ in patients with definitive RT and from 9.2 ± 0.8 to $5.8 \pm 0.7\%$ in patients with salvage RT. In contrast, the percentages of T and

natural killer (NK) cells remained unaltered directly after RT in both patient groups. However, 1 year after RT, the percentage of CD3⁺ T cells was significantly lower in patients with definitive and salvage RT. The percentage of regulatory T cells was slightly upregulated in primary prostate cancer patients after definitive RT, but not after salvage RT.

Conclusion Definitive and salvage RT exert similar effects on the composition of lymphocyte subpopulations in prostate cancer patients. Total lymphocyte counts are lower in both patient groups compared to healthy controls and further decreased after RT. B cells are more sensitive to definitive and salvage RT than T and NK cells.

Keywords B lymphocytes · T lymphocytes · Natural killer cells · Anti-tumor Immunity · Prostatectomy

Auswirkungen von definitiver und Salvage-Strahlentherapie auf die Verteilung von Lymphozytensubpopulationen bei Prostatakarzinompatienten

Zusammenfassung

Hintergrund Die Strahlentherapie (RT) ist eine bewährte Behandlung beim primären und rezidierten Prostatakarzinom. In dieser Studie wurde der Einfluss einer definitiven und Salvage RT auf die Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen verglichen, um potenzielle Immuneffekte einer RT zu analysieren.

Patienten und Methoden In die Studie wurden 33 Prostatakarzinompatienten eingeschlossen. Mit definitiver RT wurden 10 Patienten mit primärem Prostatakarzinom behandelt; 23 Patienten erhielten eine Salvage-RT nach biochemischem Rezidiv. Die absoluten Lymphozytenzahlen

Electronic supplementary material The online version of this article (doi: 10.1007/s00066-017-1144-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gabriele Multhoff
Gabriele.multhoff@tum.de

¹ Department of Radiation Oncology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München (TUM), Munich, Germany

² Department of Radiation Sciences (DRS), Institute of Innovate Radiotherapy (iRT), HelmholtzZentrum München, Munich, Germany

³ Partner Site Munich, Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Munich, Germany

⁴ Department of Radiation Oncology, Ordensklinikum Linz, Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern and Medical Faculty, Johannes Kepler University, Linz, Austria

sowie die der Subpopulationen wurden vor RT, am Ende der RT und während des Follow-ups mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Ergebnisse Die absoluten Lymphozytenzahlen gingen in beiden Gruppen signifikant zurück. Direkt nach RT zeigte sich ein signifikanter Abfall der B-Lymphozyten von $10,1 \pm 1,3\%$ auf $6,0 \pm 0,7\%$ bei Patienten mit definitiver RT und von $9,2 \pm 0,8\%$ auf $5,8 \pm 0,7\%$ bei Patienten mit Salvage-RT. Im Gegensatz dazu blieb der Anteil von T- und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) direkt nach RT in beiden Gruppen unverändert. Ein Jahr nach definitiver und Salvage-RT zeigte sich jedoch ein signifikanter Abfall der CD3⁺-T-Zellen. Der Anteil regulatorischer T-Zellen war bei Patienten mit primärem Prostatakarzinom nach definitiver RT leicht erhöht, nicht jedoch nach Salvage-RT.

Schlussfolgerung Die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen nach definitiver oder Salvage-RT unterscheidet sich nicht signifikant in den Patientengruppen. Beide Gruppen weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigte Gesamtlymphozytenwerte auf, die nach RT noch weiter absinken. B-Zellen verhalten sich gegenüber einer definitiven und Salvage-RT sensibler als T- und NK-Zellen.

Schlüsselwörter B-Lymphozyten · T-Lymphozyten · Natürliche Killerzellen · Antitumor Immunität · Prostatektomie

Prostate cancer, the most common malignant cancer in males, is the third leading cause of cancer-related death after lung and colorectal cancer in Europe, and the second after lung cancer in the United States [1, 2]. Apart from active surveillance, hormonal therapy, and surgery, RT plays an important role in the treatment of prostate cancer. To obtain optimal dose conformity, intensity-modulated radiotherapy (IMRT)—preferentially applied with image guidance—is presently the gold standard to treat prostate cancer [3]. In case of biochemical recurrence after radical prostatectomy [4], early salvage RT seems to have a positive impact on the outcome of the patients [5].

Definitive RT includes the whole prostate in the clinical target volume (CTV), while seminal vesicles and pelvic lymphatics are additionally treated according to institutional guidelines and prostate cancer risk groups [6]. As dose escalation improves biochemical/clinical failure-free survival [7], a total dose of 74–78 Gy should be applied in standard fractions of 1.8–2.0 Gy, 5 days a week [8].

In case of biochemical relapse (PSA > 0.2 ng/ml in two independent measurements [9]) after radical prostatectomy, external beam RT is the first treatment option [10, 11]. Best outcome is achieved when the treatment is started as soon as possible [12]. The recommended dose of salvage RT after radical prostatectomy ranges between 64 and 70 Gy [13], and is thus lower than in definitive RT. Furthermore, the

CTV includes the complete prostate bed, whilst radiosensitive normal tissues such as bladder and rectum are spared [14].

Apart from eliciting direct cytotoxic effects by inducing cell death via DNA double-strand breaks in tumor cells, ionizing radiation has been shown to induce the release of a complex cascade of cytokines that affect the immune system [15]. On the one hand, RT has been shown to enhance antitumor immunity by increasing the antigenic pool, which, in turn, can stimulate T cell-mediated protective immunity [16]. On the other hand, RT has also been found to stimulate the growth of regulatory T cells (Tregs), which play a key role in suppressing antitumor immune responses [15]. Therefore, targeting and killing of Tregs during RT has been shown to improve tumor control in a tumor mouse model [17].

A better understanding of the complex interactions of RT with the immune system could provide the basis for new treatment options that combine RT with other immunotherapies [18]. There is increasing evidence that the effect of RT alone is not sufficient to establish protective antitumor immunity, but it might be able to boost the effects of additional immunotherapies [19].

We have previously shown that RT alone or RT in combination with adjuvant chemotherapy exerts different effects on the composition of different lymphocyte subpopulations in breast cancer patients [20]. In the current study, we comparatively investigated the effects of definitive and salvage RT on the lymphocyte composition of prostate cancer patients.

Patients and methods

Study collective

A total of 33 prostate cancer patients who received local RT were included in the study. Of these patients, 23 had received radical prostatectomy and were then treated with RT when they suffered a biochemical (prostate specific antigen, PSA) relapse. Patient characteristics are shown in Table 1. The timeframe between surgery and the beginning of RT was between 7 months and 10 years. Definitive RT was received by 10 of the patients after biopsy-proven diagnosis of prostate cancer. Patients with distant metastasis, previous RT, secondary tumors, and combined chemoradiotherapy were excluded from the study. The study was approved by the local ethics committee of the Medical Faculty at the Technical University of Munich (TUM). Total doses varied from 70 to 74 Gy in patients with definitive RT and from 60 to 66 Gy in patients with salvage RT, applied in fractions of 2 Gy. A simultaneous integrated boost (SIB) up to 76 Gy was received by 3 of the patients with definitive and

Table 1 Characteristics of patients

Characteristic	No. of patients	%
<i>Age (years)</i>		
<60	4	12.1
60–69	12	36.4
70–79	14	42.4
≥80	3	9.1
<i>Hormone therapy before RT</i>		
Yes	10	30.3
No	23	70.7
<i>Gleason score</i>		
<4	0	0
4	1	3.0
5	0	0
6	6	18.2
7	18	54.5
8	3	9.1
9	5	15.2
<i>pTNM</i>		
T1(a–c)	2	6.1
T2(a–c)	23	70.7
T3(a/b)	8	24.2
N0	28	84.8
N1	2	6.1
Nx	3	9.1
M0	30	90.1
Mx	3	9.1
G1	4	12.1
G2	12	36.4
G3	17	51.5
<i>PSA value before RT (ng/ml)</i>		
≤0.1	3	9.1
0.2–0.5	15	45.5
0.5–1.0	7	21.2
1.1–2.0	5	15.2
2.1–3.0	0	0
3.1–4.0	1	3.0
>4	2	6.1
<i>Total dose (Gy)</i>		
60	1	3.0
64	19	57.6
66	2	6.1
70	4	12.1
74	7	21.2
<i>Simultaneous integrated boost (SIB)</i>		
Yes	5	15.2
No	28	84.8

RT radiotherapy, PSA prostate-specific antigen

2 with salvage RT. All patients received three-dimensional (3D) conformal intensity-modulated radiotherapy (IMRT). 3D conformal treatment planning is determined by covering the target volume in the most effective way, while protecting the normal tissue by adhering to defined tolerance doses. Of the 33 patients, 23 were not treated with hormone therapy previous to RT while 10 (8 with definitive and 2 with salvage RT) had received hormone therapy previously.

Tregs were analyzed in a subset of 19 patients, 10 of whom received definitive RT and 9 of whom were treated with local RT after a biochemical relapse.

During the examination period of 1 year, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) peripheral blood samples (9.5 ml EDTA blood) were collected from the patients at four different time points: before RT, at the end of RT, and 6 weeks and 1 year after RT. As a control, collective blood samples of 10 age-matched healthy donors were used. The average age of this group was 68.4 years.

Absolute leukocyte counts were determined by the Department of Clinical Chemistry at the Klinikum rechts der Isar using standard procedures. The lymphocyte counts are based on the percentage of lymphocytes in the full blood examination.

Flow cytometry

We characterized lymphocyte subpopulations (B cells, T cells, NK cells, and Tregs) by multiparametric flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For each sample, 100 µl of EDTA whole blood was mixed with a combination of undiluted fluorescent dye-labelled antibodies (see supplementary Table 1) in 5 ml tubes and incubated for 15 min in the dark. The cells were then washed in phosphate buffered saline (PBS) buffer with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma F7524; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and lysed for 10 min using 2 ml 10% BD FACS Lysing Solution (cat.no. 349202; 1:9 diluted in purified water) in the dark. After a final washing step, the cells were resuspended in buffer and measured by gating CD45-positive cells. In case the marker CD45 was not included in the panel, the data were determined on the basis of at least one additional marker that is in common with an antibody panel that contains the marker CD45. Before adding the FoxP3-PE antibody for the measurement of regulatory T cells, the cells were fixated by adding 2 ml of 1:10 diluted BD Human FoxP3 Buffer A (cat.no. 51-9005451) in purified water to each tube and incubated in the dark for 10 min. After washing the cells with buffer they were permeabilized by adding 0.5 ml of Buffer C (1:50 diluted BD Human FoxP3 Buffer B, cat.no. 51-9005450, in diluted Buffer A) and incubated in the dark for another 30 min. FoxP3-PE antibody was added after

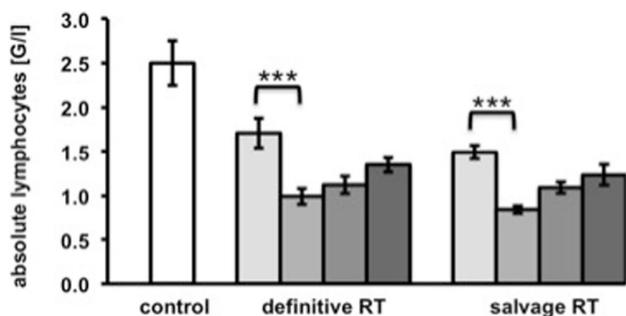


Fig. 1 Absolute number of lymphocytes shown in gigaparticles (10^9) per liter (G/l) in patients with definitive radiotherapy (RT) and salvage RT after biochemical relapse; in the course before RT, at the end of RT, and 6 weeks and 1 year after RT (progressing from light to dark grey) compared to the mean reference value of 2.5 ± 0.25 G/l [36] (white bar). *** $p \leq 0.001$. All values are shown as mean \pm standard deviation

two more washing steps. During counting, 50,000 events per sample were recorded in the lymphocyte gate.

Statistics

To evaluate statistical differences between the datasets, either one-sample or two-sided Student’s *t*-tests were per-

formed. Data were considered as statistically significantly different at $p \leq 0.05$.

Results

Effects of RT on absolute lymphocyte counts

Compared to healthy controls, prostate cancer patients had significantly lower lymphocyte counts before, after, and even during the follow-up period of 1 year after definitive and salvage RT (Fig. 1). As compared to pre-RT levels, a significant drop in the absolute number of lymphocytes was observed in both patient groups directly after RT: 1.7 ± 0.6 G/l before RT vs. 1.0 ± 0.3 G/l at the end of RT in patients with definitive RT and 1.5 ± 0.4 G/l vs. 0.9 ± 0.2 G/l in patients with salvage RT; values given as mean \pm standard deviation in gigaparticles (10^9) per liter (G/l). One year after RT the lymphocyte counts gradually increased up to 1.4 ± 0.3 G/l in patients with definitive RT and 1.2 ± 0.6 G/l in patients with salvage RT. However, these values did not reach the initial values in either patient group (Fig. 1).

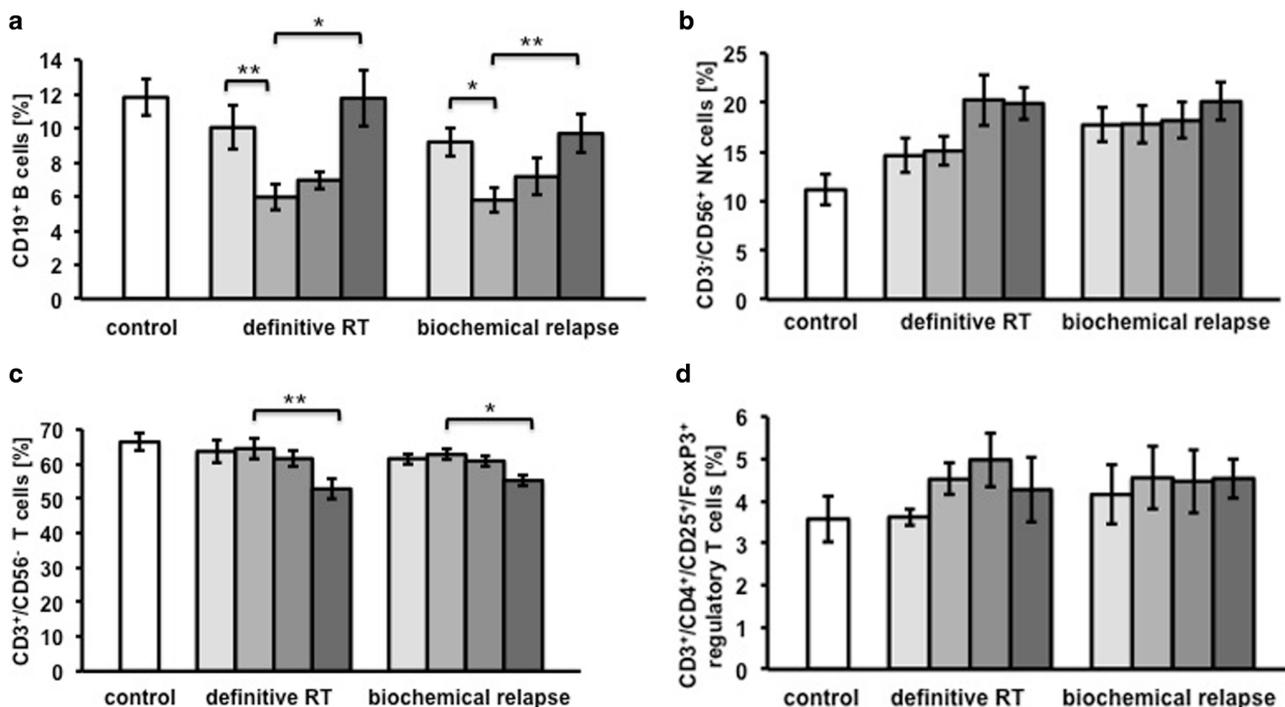


Fig. 2 Percentages of major lymphocyte subpopulations related to total numbers **a** CD19⁺ B cells; **b** CD56⁺ NK cells; **c** CD3⁺ T cells; **d** CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ regulatory T cells in the time course before RT, at the end of RT, and 6 weeks and 1 year after RT (progressing from light to dark grey) comparing patients with definitive radiotherapy (RT) and patients with salvage RT after biochemical relapse to a group of healthy donors ($n = 5$) as a control (white bar). Values that differ significantly are marked; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. All values are shown as mean \pm standard deviation

Table 2 Kinetics of percentages of the T, NK, and NKT cell subpopulations in patients with definitive RT (A) and salvage RT after biochemical relapse (B)

	Before RT	End of RT	6 weeks after RT	1 year after RT
A Definitive RT				
<i>T cells (%)</i>				
CD3+	63.6 ± 10.4	64.4 ± 9.5*	61.5 ± 7.6	53.7 ± 9.2*
CD3+/CD4+	46.6 ± 5.0*	50.0 ± 5.0	38.8 ± 9.4	34.8 ± 7.6*
CD3+/CD8+	10.4 ± 5.0*	17.0 ± 8.5*	13.9 ± 8.1	17.4 ± 6.1*
<i>NKT cells (%)</i>				
CD3+/CD56+	1.9 ± 1.2	2.3 ± 1.4	2.6 ± 1.9	1.9 ± 1.2
<i>NK cells (%)</i>				
CD3-/CD56+	14.6 ± 5.7	15.1 ± 4.6	20.3 ± 8.4	19.9 ± 5.2
CD3-/CD94+	15.7 ± 5.2	15.2 ± 4.6	21.7 ± 8.1	21.4 ± 4.1
CD3-/NKG2D+	16.4 ± 6.1	16.6 ± 5.2	20.7 ± 8.1	22.2 ± 5.8
CD3-/NKp30+	11.2 ± 5.3	10.1 ± 4.7	14.5 ± 7.5	16.6 ± 4.1
CD3-/NKp46+	15.3 ± 6.2	14.6 ± 5.4	20.0 ± 9.0	19.9 ± 4.5
B Salvage RT				
<i>T cells (%)</i>				
CD3+	61.5 ± 7.8	62.7 ± 8.1*	60.8 ± 7.5	55.2 ± 7.6*
CD3+/CD4+	36.2 ± 12.7	37.7 ± 9.5	38.8 ± 9.0	35.7 ± 10.4
CD3+/CD8+	17.5 ± 8.1	17.8 ± 5.7	13.6 ± 7.2	20.5 ± 7.9
<i>NKT cells (%)</i>				
CD3+/CD56+	3.8 ± 3.2	4.0 ± 7.8	3.8 ± 2.3	4.0 ± 3.4
<i>NK cells (%)</i>				
CD3-/CD94+	12.5 ± 4.7	15.3 ± 5.3	14.8 ± 6.7	18.0 ± 4.9
CD3-/CD56+	17.8 ± 9.3	17.8 ± 10.2	17.9 ± 9.1	20.1 ± 10.5
CD3-/NKG2D+	19.9 ± 10.6	19.8 ± 9.4	20.5 ± 9.1	20.9 ± 9.2
CD3-/NKp30+	7.8 ± 5.2	6.2 ± 3.9	10.4 ± 6.7	9.4 ± 7.9
CD3-/NKp46+	10.4 ± 7.6	8.2 ± 5.8	13.8 ± 9.5	10.9 ± 9.3

All values are shown as mean ± standard deviation

RT radiotherapy, NK natural killer cells, NKT NK-like T cells

*Significantly different values ($p \leq 0.05$).

Effects of RT on the composition of lymphocyte subpopulations

The percentage of CD19⁺ B cells decreased significantly during RT from 10.1 ± 1.3% before to 6.0 ± 0.7% at the end of RT in patients with definitive RT. Similar effects were observed in patients with biochemical relapse after salvage RT (9.2 ± 0.8% before vs. 5.8 ± 0.7% at the end of RT). One year after the end of definitive and salvage RT, B cell counts recovered and increased up to 11.8 ± 1.6 and 9.7 ± 1.1%, respectively (Fig. 2a).

The percentage of CD56⁺ NK cells did not change significantly during the observation period in definitively treated patients and patients with salvage RT. However, it appeared that there was a slight, yet not significant increase in NK cells 6 weeks after definitive RT (Fig. 2b). An analysis of different NK cell subpopulations also revealed no significant changes throughout the whole investigation period (Table 2A and B). Similar results were observed for absolute numbers of CD3-/CD56⁺ NK cells and CD19⁺ B cells, whereas that of CD3+/CD56⁻ T cells dropped significantly

at the end of RT and partially recovered 1 year after RT (Table 3).

The percentage of CD3⁺ T cells did not significantly change up to 6 weeks after RT; however, 1 year after RT, the percentage of CD3⁺ T cells decreased significantly from 64.4 ± 3.0% at baseline to 52.7 ± 1.5% in patients with definitive RT and from 60.8 ± 1.6 to 55.2 ± 2.9% in patients with salvage RT (Fig. 2c). A detailed analysis of T cell subpopulations revealed a significant decrease in the percentage of CD4⁺ T cells from 46.6 ± 5.0 to 34.8 ± 7.6% in patients with definitive RT 1 year after RT after a slight increase of these cells during RT. At the same time, the percentage of cytotoxic CD8⁺ T cells increased from 10.4 ± 5.0% before RT to 17.0 ± 8.5% at the end of RT and up to 17.4 ± 6.1% 1 year after RT (Table 2A). In contrast, no statistically significant differences were observed in patients with salvage RT (Table 2B).

In the subpopulation of CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ Tregs, no statistically significant alterations were observed during and after RT in either patient group. However, there was a non-significant trend towards increasing Treg counts

Table 3 Absolute cell counts in G/l (gigaparticles per liter) of the T and NK cell subpopulations in patients with definitive RT (A) and salvage RT after biochemical relapse (B)

Count (G/l)	Before RT	End of RT	6 weeks after RT	1 year after RT
A Definitive RT				
<i>CD3+/CD56- T cells</i>	1.09 ± 0.11	0.64 ± 0.09*	0.69 ± 0.10	0.71 ± 0.09*
<i>CD3-/CD56+ NK cells</i>	0.26 ± 0.06	0.15 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.27 ± 0.10
<i>CD19+ B cells</i>	0.17 ± 0.06*	0.06 ± 0.02*	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.07*
B Salvage RT				
<i>CD3+/CD56- T cells</i>	0.92 ± 0.12	0.53 ± 0.09*	0.66 ± 0.10	0.68 ± 0.10*
<i>CD3-/CD56+ NK cells</i>	0.26 ± 0.10	0.15 ± 0.09	0.20 ± 0.09	0.25 ± 0.10
<i>CD19+ B cells</i>	0.14 ± 0.06*	0.05 ± 0.02*	0.08 ± 0.05	0.12 ± 0.07*

All values are shown as mean ± standard deviation

RT radiotherapy, NK natural killer cells

* $p < 0.05$

before vs. after definitive RT. This trend remained until 6 weeks after definitive RT (Fig. 2d).

Discussion

The aim of this study was to comparatively assess the impact of definitive and salvage RT on lymphocyte counts and peripheral subpopulations in prostate cancer patients. It was unexpected that absolute lymphocyte counts and percentages of lymphocyte subpopulations did not differ significantly between the two patient groups over the whole period of time. Despite different tumor volumes (“macroscopic” vs. “microscopic”) that are irradiated by definitive and salvage RT, similar effects were observed on the composition of the immune system. This might be explained by the fact that apart from direct cytotoxic effects induced by RT, indirect effects mediated by the tumor microenvironment might have an impact on the immune system. These effects are obviously independent of the magnitude of the tumor load. These rather complex effects were investigated in more detail only recently [16, 21, 22]. Among others, Frey et al. described immune cell-mediated abscopal anti-tumor effects, which are induced in tumor areas that were not exposed to radiation [23].

We found that peripheral blood lymphocyte counts were significantly lower in prostate cancer patients compared to healthy controls even before start of any therapy. This finding is in line with the study of Cihan et al., who suggested the use of peripheral white blood cell counts in the diagnosis of prostate cancer in combination with other parameters [24]. This result is not limited to prostate cancer patients and corresponds well with our findings in breast cancer patients, who also showed decreased lymphocyte counts compared to healthy human individuals [20].

The significant decrease in lymphocytes during RT is well in line with other studies and is suggested to be correlated with urinary and bowel toxicity [25]. The fact that parts of the pelvic bone and thereby parts of the hematopoietic stem and progenitor cell compartment in the bone marrow are also affected by local RT could be one reason for the decrease in peripheral lymphocyte counts. In a phantom study for local RT in prostate cancer patients, the mean total bone marrow doses ranged from 3.4 to 7.7 Gy [26]. As the tolerance dose of the partially irradiated bone marrow is 30 Gy, there should not be any permanent damage to the bone marrow [27]. This corresponds well to our findings that peripheral lymphocyte counts reach initial values within the time course of 1 year after radiotherapy.

B cells that belong to the innate immune system can act as non-professional antigen-presenting cells. Following differentiation into plasma cells they are responsible for the production and release of antibodies [28]. NK cells can eliminate target cells even without prior antigen stimulation and thus contribute to the primary immune response [28]. With respect to the sensitivity towards RT, B cells are significantly more radiosensitive than NK cells. This finding might be due to higher intracellular glutathione levels in NK cells, which enable them to maintain cellular homeostasis following irradiation stress [29]. Definitive as well as salvage RT resulted in a significant reduction of B cells in prostate cancer patients, which recovered to initial levels between 6 weeks and 1 year after RT. This finding is in accordance with our previously published data in breast cancer patients [20] and with a study described by Belka et al., who showed that B lymphocytes are most sensitive to local RT [30].

T cells that mature and multiply in the thymus and secondary lymphoid organs can be divided into two major subpopulations: the CD4⁺ T helper and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. As mature cells, they either directly bind and kill

transformed target cells or secrete cytokines [28]. A CD4⁺ T cell subpopulation that expresses the interleukin 2 (IL-2) alpha receptor CD25 and the transcription factor FOXP3 are termed Tregs. This subpopulation is able to inhibit and control immune responses and thus prevent autoimmunity. Although the overall percentage of CD3⁺ T cells did not change significantly during the two types of RT, there was a slight but non-significant increase in Tregs after definitive RT. One might speculate that the killing of tumor cells by RT might either change the tumor microenvironment, which could in turn induce the growth of Tregs, or that Tregs are less radioresistant than other T lymphocyte subpopulations.

Tregs are major players in preventing excessive damage to self by exerting homeostatic control over inflammation through release of immunosuppressive cytokines [15]. Under normal physiological conditions, the critical role of these cells is the maintenance of peripheral immune tolerance, which they execute by cell-to-cell contact mechanisms and release of cytokines [15]. In the case of tumors, Tregs have the capacity to protect tumors from the cytolytic attack mediated by killer T cells and NK cells. The trend toward an increase in the percentage of Tregs after definitive RT in prostate cancer patients is in line with the findings of a significant increase in Tregs in breast cancer patients following RT alone [20]. Future studies with larger patient numbers are necessary to answer the question of whether RT alone can exert stimulatory effects for the growth of Tregs.

In line with our findings, a study by Sotosek et al. also reported that patients with prostate cancer have higher numbers of Tregs in the peripheral blood but show no significant differences with respect to the percentage of T and NK cells. This study also showed a correlation between PSA value and the percentage of Tregs, which could provide a novel biomarker panel to diagnose prostate cancer [31].

Currently, the infiltration of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes into the tumor is also considered as a potential biomarker for the prediction of progression-free and overall survival in prostate cancer patients [32, 33]. Our study determined elevated levels of CD8⁺ T cells in the peripheral blood after definitive RT. Since peripheral blood can be sampled by minimally invasive techniques and also more frequently than tumor biopsies, the question arises as to whether the composition of the peripheral blood can be used as a predictive marker for tumor response in prostate cancer patients. In patients with nasopharyngeal carcinoma after whole-body irradiation, a higher CD4⁺/CD8⁺ ratio is associated with a better distant metastasis-free survival [34]. As radiation-induced apoptosis in CD8⁺ T lymphocytes is a predictive factor for survival in cervical carcinoma patients [35], it would be interesting to evaluate long-term results and survival of our study patients in the coming

years. Further investigations with larger patient cohorts are urgently needed to validate the role of the composition of peripheral blood lymphocytes as a predictive marker for therapy response and prognosis in prostate cancer.

Conclusion

Our study demonstrates that definitive RT and salvage RT after biochemical relapse have similar effects on the number and distribution of peripheral lymphocyte subpopulations in prostate cancer patients. However, one should keep in mind that the peripheral blood lymphocyte composition will not necessarily reflect the situation within the tumor. However, peripheral blood lymphocytes, which can be sampled by minimally invasive means, are much more easily accessible than those residing inside the tumor. The most striking effect is a significant drop in CD19⁺ B cells directly after definitive and salvage RT, which then didn't reach initial levels before 6 weeks after RT. In contrast, CD3⁺ T cells, which remained unaltered directly after RT, showed a significant drop after 1 year. In contrast, the percentage of Tregs increased slightly over time in both patient groups, although this did not reach statistical significance in our patient cohort. Targeting the immune-suppressive Tregs and enhancing the cytolytic activity of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by immune checkpoint inhibitor therapies might provide a promising strategy to enhance the immunostimulatory antitumor effects of definitive and salvage RT in patients with prostate cancer.

Acknowledgements The authors thank Bernhard Haller for support with statistical analysis of the data.

Funding This work was supported by EU-CELLEUROPE (315963); BMBF (Strahlenkompetenz, 02NUK038A; Innovative Therapies, 01GU0823; NSCLC, I6GW0030), German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG); the DFG Cluster of Excellence: Munich Centre for Advanced Photonics (MAP); DFG SFB 824/2; INST 95/980-1 FUGG; INST 411/37-1 FUGG irradiation devices. Eva Sage was supported by the Medical Faculty of TUM as a fellow of the doctoral program "Translationale Medizin." This work was supported by the German Research Foundation (DFG) and the Technische Universität München within the Open Access Publishing funding program.

Conflict of interest E.K. Sage, T.E. Schmid, H. Geinitz, M. Gehrman, M. Sedelmayr, M.N. Duma, S.E. Combs, and G. Multhoff declare that they have no competing interests.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66(1):7–30. doi:10.3322/caac.21332
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49(6):1374–1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027

3. Pinkawa M, Piroth MD, Holy R, Djukic V, Klotz J, Krenkel B, Eble MJ (2011) Combination of dose escalation with technological advances (intensity-modulated and image-guided radiotherapy) is not associated with increased morbidity for patients with prostate cancer. *Strahlenther Onkol* 187(8):479–484. doi:[10.1007/s00066-011-2249-z](https://doi.org/10.1007/s00066-011-2249-z)
4. Catton C, Milosevic M (2003) Salvage radiotherapy following radical prostatectomy. *World J Urol* 21(4):243–252. doi:[10.1007/s00345-003-0360-1](https://doi.org/10.1007/s00345-003-0360-1)
5. Trock BJ, Han M, Freedland SJ, Humphreys EB, DeWeese TL, Partin AW, Walsh PC (2008) Prostate cancer-specific survival following salvage radiotherapy vs observation in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* 299(23):2760–2769. doi:[10.1001/jama.299.23.2760](https://doi.org/10.1001/jama.299.23.2760)
6. Pinkawa M (2015) Recent advances in definitive radiotherapy for prostate cancer. *Eur Med J Oncol* 3(1):41–48
7. Budach W, Sachkerer I (2014) Dose escalation: an update on randomised clinical trials. In: Geinitz R III (ed) *Radiotherapy in prostate cancer*. Medical radiology. Springer, Berlin, pp 89–93
8. Hou Z, Li G, Bai S (2015) High dose versus conventional dose in external beam radiotherapy of prostate cancer: a meta-analysis of long-term follow-up. *J Cancer Res Clin Oncol* 141(6):1063–1071. doi:[10.1007/s00432-014-1813-1](https://doi.org/10.1007/s00432-014-1813-1)
9. Freedland SJ, Sutter ME, Dorey F, Aronson WJ (2003) Defining the ideal cutpoint for determining PSA recurrence after radical prostatectomy. Prostate-specific antigen. *Urology* 61(2):365–369
10. Geinitz H, Riegel MG, Thamm R, Astner ST, Lewerenz C, Zimmermann F, Molls M, Nieder C (2012) Outcome after conformal salvage radiotherapy in patients with rising prostate-specific antigen levels after radical prostatectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 82(5):1930–1937. doi:[10.1016/j.ijrobp.2011.03.003](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.03.003)
11. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R (2007) Evidence-based radiation oncology: definitive, adjuvant and salvage radiotherapy for non-metastatic prostate cancer. *Radiother Oncol* 84(2):197–215. doi:[10.1016/j.radonc.2007.04.013](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.04.013)
12. King CR (2012) The timing of salvage radiotherapy after radical prostatectomy: a systematic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 84(1):104–111. doi:[10.1016/j.ijrobp.2011.10.069](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.10.069)
13. Izawa JI (2009) Salvage radiotherapy after radical prostatectomy. *Can Urol Assoc J* 3(3):245–250
14. Malone S, Croke J, Roustan-Delattour N, Belanger E, Avruch L, Malone C, Morash C, Kayser C, Underhill K, Li Y, Malone K, Nyiri B, Spaans J (2012) Postoperative radiotherapy for prostate cancer: a comparison of four consensus guidelines and dosimetric evaluation of 3D-CRT versus tomotherapy IMRT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 84(3):725–732. doi:[10.1016/j.ijrobp.2011.12.081](https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.12.081)
15. Schaud D, Xie MW, Ratikan JA, McBride WH (2012) Regulatory T cells in radiotherapeutic responses. *Front Oncol* 2:90. doi:[10.3389/fonc.2012.00090](https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00090)
16. Demaria S, Golden EB, Formenti SC (2015) Role of local radiation therapy in cancer immunotherapy. *JAMA Oncol* 1(9):1325–1332. doi:[10.1001/jamaoncol.2015.2756](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2756)
17. Bos PD, Plitas G, Rudra D, Lee SY, Rudensky AY (2013) Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy. *J Exp Med* 210(11):2435–2466. doi:[10.1084/jem.20130762](https://doi.org/10.1084/jem.20130762)
18. Spiotto M, Fu YX, Weichselbaum RR (2016) The intersection of radiotherapy and immunotherapy: mechanisms and clinical implications. *Sci Immunol* 1(3). doi:[10.1126/sciimmunol.aag1266](https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag1266)
19. Formenti SC, Demaria S (2009) Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 10(7):718–726. doi:[10.1016/s1470-2045\(09\)70082-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70082-8)
20. Sage EK, Schmid TE, Sedelmayr M, Gehrman M, Geinitz H, Duma MN, Combs SE, Multhoff G (2016) Comparative analysis of the effects of radiotherapy versus radiotherapy after adjuvant chemotherapy on the composition of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients. *Radiother Oncol* 118(1):176–180. doi:[10.1016/j.radonc.2015.11.016](https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.11.016)
21. Deloch L, Derer A, Hartmann J, Frey B, Fietkau R, Gaipf US (2016) Modern radiotherapy concepts and the impact of radiation on immune activation. *Front Oncol* 6:141. doi:[10.3389/fonc.2016.00141](https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00141)
22. Multhoff G, Gaipf US, Niedermann G (2012) The role of radiotherapy in the induction of antitumor immune responses. *Strahlenther Onkol* 188(Suppl 3):312–315. doi:[10.1007/s00066-012-0206-0](https://doi.org/10.1007/s00066-012-0206-0)
23. Frey B, Rubner Y, Wunderlich R, Weiss EM, Pockley AG, Fietkau R, Gaipf US (2012) Induction of abscopal anti-tumor immunity and immunogenic tumor cell death by ionizing irradiation – implications for cancer therapies. *Curr Med Chem* 19(12):1751–1764
24. Cihan YB, Arslan A, Ergul MA (2013) Subtypes of white blood cells in patients with prostate cancer or benign prostatic hyperplasia and healthy individuals. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(8):4779–4783
25. Pinkawa M, Ribbing C, Djukic V, Klotz J, Holy R, Eble MJ (2015) Early hematologic changes during prostate cancer radiotherapy predictive for late urinary and bowel toxicity. *Strahlenther Onkol* 191(10):771–777. doi:[10.1007/s00066-015-0841-3](https://doi.org/10.1007/s00066-015-0841-3)
26. Gershkevitch E, Rosenberg I, Deamaley DP, Trott KR (1999) Bone marrow doses and leukaemia risk in radiotherapy of prostate cancer. *Radiother Oncol* 53(3):189–197
27. Stöver I, Feyer P (2010) *Praxismanual Strahlentherapie*. Springer, Berlin, p 31
28. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N (2014) *Essentials of clinical immunology*, 6th edn. Wiley-Blackwell, Chichester
29. Multhoff G, Meier T, Botzler C, Wiesnet M, Allenbacher A, Wilmanns W, Issels RD (1995) Differential effects of ifosfamide on the capacity of cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells to lyse their target cells correlate with intracellular glutathione levels. *Blood* 85(8):2124–2131
30. Belka C, Ottinger H, Kreuzfelder E, Weinmann M, Lindemann M, Lepple-Wienhues A, Budach W, Grosse-Wilde H, Bamberg M (1999) Impact of localized radiotherapy on blood immune cells counts and function in humans. *Radiother Oncol* 50(2):199–204
31. Sotosek S, Sotosek Tokmadzic V, Mrakovcic-Sutic I, Tomas MI, Dominovic M, Tulic V, Sutic I, Maricic A, Sokolic J, Sutic A (2011) Comparative study of frequency of different lymphocytes subpopulation in peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Wien Klin Wochenschr* 123(23–24):718–725. doi:[10.1007/s00508-011-0096-7](https://doi.org/10.1007/s00508-011-0096-7)
32. Nardone V, Botta C, Caraglia M, Martino EC, Ambrosio MR, Carfagno T, Tini P, Semeraro L, Misso G, Grimaldi A, Boccellino M, Facchini G, Berretta M, Vischi G, Rocca BJ, Barone A, Tassone P, Tagliaferri P, Del Vecchio MT, Pirtoli L, Correale P (2016) Tumor infiltrating T lymphocytes expressing FoxP3, CCR7 or PD-1 predict the outcome of prostate cancer patients subjected to salvage radiotherapy after biochemical relapse. *Cancer Biol Ther*. doi:[10.1080/15384047.2016.1235666](https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1235666)
33. Ness N, Andersen S, Valkov A, Nordby Y, Donnem T, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM, Richardsen E (2014) Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. *Prostate* 74(14):1452–1461. doi:[10.1002/pros.22862](https://doi.org/10.1002/pros.22862)
34. Tao CJ, Chen YY, Jiang F, Feng XL, Jin QF, Jin T, Piao YF, Chen XZ (2016) A prognostic model combining CD4/CD8 ratio and N stage predicts the risk of distant metastasis for patients with nasopharyngeal carcinoma treated by intensity modulated radiotherapy. *Oncotarget* 7(29):46653–46661. doi:[10.18632/oncotarget.9695](https://doi.org/10.18632/oncotarget.9695)
35. Ordóñez R, Henríquez-Hernández LA, Federico M, Valenciano A, Pinar B, Lloret M, Bordon E, Rodríguez-Gallego C, Lara PC (2014) Radio-induced apoptosis of peripheral blood CD8 T lymphocytes is a novel prognostic factor for survival in cervical carcinoma patients. *Strahlenther Onkol* 190(2):210–216. doi:[10.1007/s00066-013-0488-x](https://doi.org/10.1007/s00066-013-0488-x)
36. McClatchey KD (2002) *Clinical laboratory medicine*, 2nd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Geinitz danke ich für Möglichkeit, meine Dissertation im Rahmen des Promotionsprogrammes „Translationale Medizin“ der TU München an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und RadioOnkologie zu erstellen, außerdem für die Durchsicht und die vielen Hinweise zur Vollendung derselben.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. G. Multhoff, ihrer Arbeitsgruppe der experimentellen Strahlenbiologie der TU München und allen Co-Autoren der Publikationen für die intensive und langjährige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie bei der Veröffentlichung der Publikationen danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die Ermöglichung meines bisherigen Lebensweges und die vielen aufbauenden Worte während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gebührt außerdem Martin für seine Unterstützung in allen Bereichen.