



Fakultät für Medizin

Immunologische Phänomene der lokalen
Strahlentherapie bei Plattenepithelkarzinomen
im Kopf-Hals-Bereich

Michael Alois Linzer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Stephanie E. Combs
2. Prof. Dr. Barbara Wollenberg

Die Dissertation wurde am 02.12.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2020 angenommen.

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation die Sprachform des generischen Maskulinums angewendet. Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die ausschließliche Verwendung der männlichen Form geschlechtsunabhängig verstanden werden soll. Die Verwendung der männlichen Form soll jedoch keinesfalls eine Geschlechterdiskriminierung oder eine Verletzung des Gleichheitsgrundsatzes zum Ausdruck bringen.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Einleitung	8
2.1	Zielsetzung	10
3	Hintergrund.....	11
3.1	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	11
3.1.1	Übersicht.....	11
3.1.2	Epidemiologie.....	12
3.1.3	Ätiologie	12
3.1.4	Klassifikation und Stadieneinteilung.....	12
3.1.5	Symptome.....	15
3.1.6	Diagnostik.....	15
3.1.7	Therapie	15
3.2	Übersicht der zu erhebenden Blutparameter	17
3.2.1	LDH, CRP und großes Blutbild.....	17
3.2.2	Durchflusszytometrie.....	20
4	Material und Methoden	24
4.1	Studienkollektiv.....	24
4.1.1	Kontrollgruppe	24
4.1.2	Patientenkollektiv	25
4.1.3	Ausschlusskriterien.....	25
4.2	Patientenrekrutierung.....	26
4.3	Probenentnahme	26
4.4	Materialverarbeitung	26
4.4.1	Klinische Chemie	26
4.4.2	Durchflusszytometrie.....	26
4.5	Datenanalyse und Gating.....	29

4.6	Statistische Datenauswertung, Normalverteilungstests und Auswahl der anzuwendenden Testverfahren	34
5	Ergebnisse.....	36
5.1	Charakteristika des Patienten- und Kontrollkollektivs.....	36
5.2	Normalverteilungstests und Auswahl der anzuwendenden Testverfahren.....	38
5.3	Vergleich der Patientenparameter mit dem gesunden Kontrollkollektiv	40
5.4	Analyse der Patientenparameter im Verlauf.....	43
5.4.1	LDH, CRP und großes Blutbild.....	43
5.4.2	Parameter der Durchflusszytometrie	48
6	Diskussion	53
6.1	Vergleich der Patientenparameter mit dem Kontrollkollektiv	54
6.2	Analyse der Patientenparameter im Verlauf.....	57
6.2.1	Erythrozyten	57
6.2.2	Thrombozyten.....	58
6.2.3	C-Reaktives Protein.....	58
6.2.4	Neutrophile Granulozyten	59
6.2.5	Leukozytenzahl und Lymphozyten	59
6.2.6	B-Lymphozyten und NK-Zellen.....	60
6.3	Limitationen der Studie	61
6.4	Ausblick.....	63
7	Zusammenfassung	64
8	Literaturverzeichnis	66
9	Abbildungsverzeichnis	76
10	Tabellenverzeichnis	77
11	Anhang	78
12	Danksagung	82

1 Abkürzungsverzeichnis

SCCHN	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKG2D	Natural Killer Group 2D
NKG2DL	Natural Killer Group 2D Ligands
CRP	C-Reaktives Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
MCV	Mean Corpuscular Volume
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
MHC	Major Histocompatibility Complex
Tregs	Regulatorische T-Lymphozyten
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
CD	Cluster of Differentiation
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PTV	Planning Target Volume
FCS	Flow Cytometry Standard
MFI	Mean Fluorescence Intensity
Sig.	Signifikanz
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
FT	Friedmann's Test

Abkürzungsverzeichnis

IQR	Interquartilsabstand
FoxP3	Forkhead Box P3
PD-1	Programmed Death 1
CTL	C Typ Lektin Rezeptor
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns

2 Einleitung

Unter dem Begriff Kopf-Hals-Tumore werden verschiedene bösartige Tumorerkrankungen im Hals-, Mund-, Nasen- und Rachenraum zusammengefasst. Die Gruppe der Kopf-Hals-Tumore ist die sechsthäufigste Tumorentität weltweit. Circa 90% der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome (Parkin et al., 2005). Bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (SCCHN - eng.: Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck) wird eine starke Divergenz bezüglich Verlauf, Therapieansprechen und Outcome beobachtet. Da es oftmals keine Frühsymptome gibt, wird die Diagnose SCCHN häufig erst in lokal fortgeschrittenen Tumorstadien gestellt, die dann eine multimodale Therapie erfordern. (Adrien et al., 2014). Die drei Säulen der heutigen Therapie von SCCHN sind die chirurgische Behandlung, die Strahlentherapie und die Systemtherapie (Cooper et al., 2004; Howaldt et al., 1999). Der wichtigste Schritt der chirurgischen Behandlung ist die radikale Exstirpation des Primärtumors und oftmals verschiedener cervikaler Lymphknotenstationen, welche bei vielen Patienten einen sehr belastenden postoperativen Verlauf mit sich zieht. So erhalten zum Beispiel viele Patienten von Tumoren im Kehlkopfbereich ein Tracheostoma – ein Loch an der Halsvorderseite, welches nicht nur optisch sehr stigmatisiert und das Sprechen erschwert, sondern auch Komplikationen wie Infektionen im Brustbereich mit sich ziehen kann (Castling et al., 1994). Während der Strahlentherapie kommt es zu sehr schmerzhaften Entzündungsreaktionen im Mundrachenraum, da sich im Bestrahlungsfeld sehr viel Schleimhautgewebe und Speicheldrüsen befinden, welche sehr sensitiv auf die Bestrahlung reagieren. Zu den häufigen Nebenwirkungen der Chemotherapie zählen Haarverlust, Übelkeit, Abgeschlagenheit und Blutbildveränderungen (Tolentino et al., 2011).

Die Prognose für SCCHN bleibt verbesserungsbedürftig – über alle Tumorstadien gemittelt, lagen die 5-Jahres-Überlebensraten für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Pharynx lediglich bei 56% und bei 62% für den Larynx (Reyes-Gibby et al., 2014).

Das bisherige Behandlungskonzept wird zunehmend durch vielversprechende neue Therapieverfahren erweitert, wie beispielsweise die Immuntherapie, bei der die Interaktion zwischen Immun- und Krebszellen durch Medikamente moduliert wird, um körpereigene Abwehrreaktionen therapeutisch zu nutzen. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen einen tiefgreifenden Zusammenhang zwischen der Onkogenese von SCCHN und

Einleitung

dem Immunsystem bzw. immunologischen Defiziten (Economopoulou et al., 2016; Forster und Devlin, 2018). Accomando et al. beschreiben bei SCCHN-Patienten eine signifikant verringerte Aktivität von Natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen), welche Krebszellen angreifen und vernichten können (Accomando et al., 2012). Deren Liganden, die sogenannten NKG2DLs (Natural Killer Group 2D Ligands), werden von SCCHN überexprimiert und abgestoßen, was mit Aktivitätsminderungen von NK-Zellen und Krankheitsprogression in Verbindung gebracht wurde (Weil et al., 2017).

Einzelne Immuntherapeutika haben bereits einen festen Stellenwert in der Therapie von SCCHN: der Immun-Checkpoint-Inhibitor des PD-1/PD-L1-Mechanismus (Programmed Death 1) Nivolumab (Opdivo®) wird beispielweise in der Rezidivtherapie von SCCHN eingesetzt und verbessert signifikant das Outcome, sofern die PD-L1-Expression des Tumors 1% übersteigt (Ferris et al., 2018).

Die lokale Strahlentherapie wird bei zahlreichen Malignomen zum Zwecke einer kurativen oder palliativen Behandlung eingesetzt und besitzt bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich einen großen Stellenwert. Der Haupteffekt der Bestrahlung ist die direkte Zerstörung der Krebszellen durch ionisierende Strahlung. Ionisierende Strahlung schädigt die Erbsubstanz der im Bestrahlungsfeld liegenden Zellen; besonders die sich schnell teilenden Krebszellen werden so vorrangig durch DNA-Doppelstrangbrüche an der Zellteilung gehindert, wodurch die Krebszelle im Idealfall abstirbt und der Tumor sich verkleinert. Es ist jedoch unvermeidlich, dass auch gesundes Gewebe im Bestrahlungsvolumen zu Teilen mitgeschädigt wird. Zellen verfügen über Reparatursysteme, die DNA-Schäden am Erbgut bis zu einem gewissen Grad reparieren können. Allgemein funktionieren diese Reparaturvorgänge bei gesunden Zellen besser als bei Krebszellen. Diesen Mechanismus macht man sich zunutze, indem man die Gesamtstrahlendosis auf einzelne, in der Regel tägliche Sitzungen aufteilt („Fraktionierung“): Man gibt gesunden Zellen genug Zeit zur Regeneration, während Krebszellen nicht genug Zeit zur Reparatur haben und zu Grunde gehen. Zudem hat ionisierende Strahlung aber auch Auswirkungen auf immunologische Vorgänge (Sage et al., 2016; Sage et al., 2017).

Der Kopf-Hals-Bereich enthält ein komplexes und dichtes lymphatisches Netzwerk und ist Reservoir zahlreicher Lymphozyten, die sehr sensitiv auf ionisierende Strahlung reagieren (Verastegui et al., 2003). Der strahlentherapeutische Effekt speziell bei SCCHN ist bis dato wenig untersucht. Die genaue Kenntnis der immunologischen Veränderungen bei lokaler Strahlentherapie bildet die Grundlage zum Verständnis der Interaktion von

Einleitung

Radiotherapie und Immuntherapie und könnte Ansatzpunkte für eine synergistisch wirkende, radioimmunologische Kombinationstherapie liefern, die den Therapierfolg verbessern kann (Marciscano et al., 2018).

Deshalb sollen die Auswirkungen der lokalen Bestrahlung bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich auf verschiedene Zellreihen im peripheren Blut von Patienten vor, während und nach Strahlentherapie untersucht werden.

2.1 Zielsetzung

Es handelt sich um eine explorative prospektive Pilotstudie: zum Planungszeitpunkt gibt es zu den geplanten Untersuchungen nur wenige vergleichbare Studien und unzureichende Ergebnisse in der Literatur. Das Ziel einer Pilotstudie ist es, klinische Hypothesen statistisch zu konkretisieren und zu korrelieren. Hierfür sollen zum einen immunologische Auffälligkeiten bei Patienten mit SCCHN und im Speziellen auch die Auswirkungen der lokalen Strahlentherapie auf immunologische Phänomene untersucht werden.

Hierfür wird SCCHN Patienten sowohl vor, während, als auch nach der Strahlentherapie peripher Blut entnommen, welches anschließend im Labor aufgearbeitet wird. Mit einem Teil des Blutes werden die Entzündungsparameter C-Reaktives Protein (CRP) und Laktatdehydrogenase (LDH) sowie ein großes Blutbild erhoben. Das restliche Blut wird im Labor im Rahmen der Durchflusszytometrie aufgearbeitet, welche eine noch genauere Übersicht über verschiedene Lymphozytensubpopulationen liefert. Die Ergebnisse vor Bestrahlung werden mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen, um mögliche immunologische Veränderungen der Grunderkrankung darzustellen. Weiter werden die Ergebnisse des Patientenkollektivs im Verlauf der Bestrahlung und während der Nachsorgeperiode von 6 Monaten mit sich selbst verglichen, um Einflüsse der Strahlentherapie auf die Zelleigenschaften zu untersuchen.

3 Hintergrund

3.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

3.1.1 Übersicht

Als Kopf-Hals-Tumore wird eine Gruppe von bösartigen Neubildungen in der Mundhöhle, der Nase oder dem Hals-Rachenraum zusammengefasst. Über 90% dieser Neoplasien haben ihren Ursprung im unverhornten Plattenepithel der Schleimhaut und werden demnach als Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich bezeichnet. Die übrigen 10%, beispielweise Adenokarzinome, können von Zellen der Speicheldrüsen ausgehen (Spitz, 1994). Die Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich können weiter nach ihrer Lokalisation eingeteilt werden (Strutz et al., 2010). Hierzu gehören:

Mundhöhle: Die Mundhöhle wird ventral von den Lippen, kaudal vom Mundboden, kranial vom harten Gaumen und seitlich von der Wangenschleimhaut begrenzt. Auch Karzinome der vorderen 2/3 der Zunge werden zur Gruppe der Mundhöhlenkarzinome gezählt. Dorsal an der Schlundenge mündet die Mundhöhle in den Pharynx.

Pharynx: Der Rachen ist ein schlauchartiges Organ, welches in drei Abschnitte unterteilt wird. Er ist zur Seite und nach hinten hin durch Bindegewebe und Muskulatur begrenzt, besitzt nach vorne hin aber drei Öffnungen, anhand derer auch die weitere Einteilung vorgenommen wird:

Nasopharynx: Die Pars nasalis pharyngis ist mit der Nasenhöhle verbunden. Besonders hier befindet sich sehr viel lymphatisches Gewebe, wie zum Beispiel die Tonsillae pharyngealis oder die Tonsillae tubariae, weshalb dem Nasopharynx auch eine wichtige Rolle der Immunabwehr zugesprochen wird (Reiß, 2009). Kaudal erstreckt sie sich bis auf Höhe des Velum palatinum.

Oropharynx: Die Pars oralis pharyngis hat eine Verbindung zur Mundhöhle. Karzinome des hinteren Zungendrittels werden hierzu gezählt. Kaudal erstreckt sie sich bis zur Epiglottis.

Laryngopharynx (Hypopharynx): Die Pars laryngea pharyngis weist eine ventrale Verbindung mit dem Larynx und eine kaudale Verbindung mit dem Oesophagus auf. Kaudal erstreckt sie sich hinter dem Larynx bis zum Ringknorpel.

Larynx: Der Kehlkopf verbindet Pharynx und Trachea. Er enthält neben gelenkig miteinander verbundenen Knorpelanteilen wie zum Beispiel der Epiglottis, dem Schild-

Hintergrund

und Ringknorpel auch die Stimmlippen. Anhand der Lage zur Glottis lässt sich eine Einteilung in Stimmlippenkarzinom (= Glottiskarzinom, ca. 60%), Supraglottiskarzinom (ca. 40%) und Subglottiskarzinom (< 1%) vornehmen (Reiß, 2009).

Weitere, seltenere Lokalisationen von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich sind unter anderem die Nasen- und Nasennebenhöhlen oder die Speicheldrüsen. Die Arbeit fokussiert sich jedoch auf Tumore der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx, da sich das Patientenkollektiv aus diesen drei Entitäten zusammensetzt.

3.1.2 Epidemiologie

Kopf-Hals-Tumore sind weltweit betrachtet die sechsthäufigste Malignomerkkrankung. Histologisch handelt es sich bei circa 90% um Plattenepithelkarzinome (Parkin et al., 2005). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen 50 und 70 Jahren. Das Verhältnis von erkrankten Männern zu Frauen liegt bei etwa 3,24:1, wobei der Frauenanteil stetig zunimmt. Die häufigsten Tumorlokalisationen sind mit jeweils etwa einem Drittel Larynx und Mundhöhle gefolgt vom Pharynx mit circa 20% (Stoyanov et al., 2017).

3.1.3 Ätiologie

Nikotin- und Alkoholabusus stellen die beiden wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich dar, vor allem in den Bereichen Mundhöhle, Oro-/Laryngopharynx und Larynx (Gandini et al., 2008; Hashibe et al., 2007). Besonders die Kombination beider Noxen potenziert deren karzinogene Wirkung. Über 75% aller Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich werden allein durch Nikotin und/oder Alkohol ausgelöst (Blot et al., 1988; Hashibe et al., 2009; Tuyns et al., 1988). Die Infektion mit Humanen Papillomaviren, speziell dem High-risk Typen HPV 16, hat in den letzten Jahren sehr an Stellenwert als Risikofaktor für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms besonders im Oropharynx zugenommen (Adelstein et al., 2009; Gillison et al., 2000; Gillison et al., 2008; Kreimer et al., 2005). Wichtig ist dies besonders, weil die Inzidenz an durch Alkohol und Tabak ausgelösten Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich eher abnimmt, während die Inzidenz der durch HPV ausgelösten Karzinome zunimmt (Chaturvedi et al., 2011).

3.1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

Das TNM-System ist eine medizinische Einteilung zur Klassifikation maligner Tumore der Union internationale contre le cancer (UICC). Es handelt sich um ein Akronym – jeder Buchstabe repräsentiert ein Kriterium:

Hintergrund

T: Ausdehnung/das Verhalten des Primärtumors

M: Metastasierungsstatus

N: Nodus (Lymphoideus) und teilt die Lymphknotenmetastasierung ein.

Es gibt neben diesen drei Kategorien innerhalb des TMN-Systems noch weitere Kategorien, die Arbeit fokussiert sich aber auf die Klassifikation des Primärtumors und der Lymphknotenmetastasierung. Da es sich bei den Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich um eine Gruppe an Malignomen mit mehreren einzelnen Entitäten handelt und die TMN-Klassifikation für jeden Tumor leichte Unterschiede aufweist, wird die TMN-Klassifikation für die in der vorliegenden Arbeit relevanten Lokalisationen der Mundhöhlen-, Pharynx- und Larynxkarzinome näher dargestellt. (*Quelle: Quick Reference Guide to TNM Staging of Head and Neck Cancer and Neck Dissection Classification,*

https://www.entnet.org/sites/default/files/NeckDissection_QuickRefGuide_highresFINAL.pdf, Zugriff 09/2018).

Mundhöhle:

T1: Tumorausdehnung kleiner/gleich 2 cm

T2: Tumorausdehnung zwischen 2 und 4 cm

T3: Tumorausdehnung über 4cm

T4a: Moderat fortgeschrittener Lokalbefund

Der Tumor infiltriert die angrenzenden Knochen, den N. alveolaris inferior, den Mundboden, tiefe Zungenmuskeln oder Gesichtshaut

T4b: Sehr fortgeschrittener Lokalbefund

Der Tumor infiltriert den Mastikatorraum, die pterygoide Platte, die Schädelbasis und/oder die A. carotis interna

Pharynx:

T1: Tumorausdehnung kleiner/gleich 2 cm

T2: Tumorausdehnung zwischen 2 und 4 cm

T3: Tumorausdehnung über 4cm

T4a: Moderat fortgeschrittenes Lokalstadium

Der Tumor infiltriert den Larynx, tiefe Zungenmuskeln, den M. pterygoideus medialis, den harten Gaumen oder den Unterkiefer

Hintergrund

T4b: Sehr fortgeschrittener Lokalbefund

Der Tumor infiltriert den M. pterygoideus lateralis, den lateralen Nasopharynx, die Schädelbasis, oder eine A. carotis

Larynx:

T1: Der Tumor beschränkt sich auf einen Bezirk (Supraglottis, Glottis oder Subglottis), die Stimmlippen sind normal beweglich

T2: Der Tumor befällt mehr als einen Bezirk; die Stimmlippenbeweglichkeit kann eingeschränkt sein

T3: Der Tumor ist noch auf den Larynx beschränkt; die Stimmlippen sind nicht mehr Beweglich

T4: Der Tumor überschreitet die Organgrenzen

T4a: Der Tumor infiltriert den Schildknorpel, die Trachea, die äußere Zungenmuskulatur,

die Schilddrüse oder den Ösophagus

T4b: Der Tumor infiltriert die prävertebrale Faszie, das Mediastinum oder die A. carotis interna

Die Metastaseneinteilung ist nicht aufgeführt, da alle eingeschlossenen Patienten keine Fernmetastasen aufweisen.

Die Einteilung von Lymphknotenmetastasen lässt sich für die Bereiche Mundhöhle, Pharynx und Larynx wie folgt vereinheitlichen:

N0: Kein Lymphknotenbefall nachweisbar

N1: Ein solitärer ipsilateraler Lymphknoten nachweisbar; < 3cm

N2: Multiple ipsilaterale oder kontralaterale Lymphknoten nachweisbar und/oder Größe 3-6 cm

N3 Lymphknoten > 6cm

Bei der dargestellten Einteilung handelt es sich um die siebte Auflage der UICC TNM-Klassifikation für SCCHN, mit welcher zum Zeitpunkt der Patientenrekrutierung gearbeitet wird. Zwischenzeitlich wurde diese in einer achten Auflage überarbeitet - die im Kontext der vorliegenden Arbeit relevanten Änderungen werden kurz zusammengefasst:

Hintergrund

Bei Mundhöhlenkarzinomen wird nun eine Unterscheidung zwischen HPV p16 positiven und negativen Malignomen getroffen, um die Unterschiede in Tumorbiologie und Therapieansprechen der beiden Entitäten herauszustellen. Außerdem finden sich geringe Änderungen in der jeweiligen T- und N-Klassifikation für Nasopharynxkarzinome (Huang und O'Sullivan, 2017).

3.1.5 Symptome

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich verursachen insgesamt so gut wie keine Frühsymptome, weshalb die Diagnose häufig erst in fortgeschrittenem Krankheitsstadium gestellt wird (Adrien et al., 2014). Einzige Ausnahme stellt das Stimmlippenkarzinom dar, welches schon früh durch Heiserkeit symptomatisch wird; bei anderen Tumorlokalisationen zeigt Heiserkeit eher ein späteres Tumorstadium an. Weitere Symptome können Dysphagie, Dyspnoe oder ein Fremdkörpergefühl sein. Im Bereich der Mundhöhle können Läsionen der Schleimhaut oder Schwellungen auffallen. Patienten mit Pharynx- oder Larynxkarzinomen können weiterhin über Schmerzen beim Schlucken, Kopfschmerzen oder Ohrenscherzen klagen (Reiß, 2009).

3.1.6 Diagnostik

Neben der Anamnese (insbesondere auch Noxen- und Berufsanamnese) und der körperlichen Untersuchung (besonders der Mundhöhle) stellt die Endoskopie mit Biopsie den wichtigsten diagnostischen Schritt dar. Weiterhin kann mittels Sonografie und Schnittbildverfahren wie der Computertomographie oder der Magnetresonanztomographie des Kopf-Hals-Bereiches die Ausdehnung und eventuelle Metastasierung des Primärtumors beurteilt werden. Bei gesicherter Diagnose wird in der Regel ein Röntgenthorax zum Ausschluss von Lungenmetastasen und ein CT-Abdomen oder Abdomensonographie zum Ausschluss von Metastasen der Abdominalorgane durchgeführt (Strutz et al., 2010).

3.1.7 Therapie

Ein wichtiger Schritt ist die operative radikale Entfernung des Primärtumors (Dovšak et al., 2018). Radikale Operationen im Kopf-Hals-Bereich ziehen allerdings in der Regel eine große Einschränkung der Lebensqualität (z.B. durch Narbenbildung oder Behinderung der Sprech- und/oder Schluckfunktion) mit sich, weshalb immer mit Rücksprache des Patienten ein Kompromiss zwischen Ausmaß der operativen Radikalität und Gewebe- und Funktionserhalt gefunden werden muss. Wenn möglich wird bei Tumoren im Rachen- und Kehlkopfbereich immer ein Erhalt der Stimmlippenfunktion

Hintergrund

und der Schluckfunktion angestrebt. Chirurgisch stehen mehrere Optionen zur Wahl: Neben klassischen Verfahren können Tumore beispielsweise mittels CO₂-Laser behandelt werden. Oftmals werden im Rahmen einer sogenannten Neck-Dissection bis zu sämtliche Lymphknotenstationen zwischen Thoraxapertur und Schädelbasis sowie Nerven, Gefäße und Muskeln in diesem Bereich entfernt. Während bei (den seltenen) frühen Stadien von SCCHN die operative Therapie unter bestimmten Umständen unimodal erfolgen kann, wird bei der Mehrzahl der Kopfhals Tumore (welche in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden) eine Kombination aus operativer Behandlung sowie Strahlentherapie und/oder Systemtherapie eingesetzt (Cooper et al., 2004; Howaldt et al., 1999). Bei der Strahlentherapie wird hochenergetische, ionisierende Strahlung zur Schädigung von Tumorgewebe eingesetzt. Zunächst wird zusammen mit einem Medizinphysik-Experten anhand eines Computertomogramms, in welches die Tumormasse und umgebende Risikoorgane eingezeichnet werden, für jeden Patienten ein individueller Bestrahlungsplan erstellt. Der Bestrahlungsplan wird schließlich im CT-Gerät am Patienten simuliert. Um zu verifizieren, dass der Patient bei jedem Bestrahlungstermin vergleichbar gelagert ist, werden beim Simulationstermin Markierungen auf der Haut des Patienten angebracht und SCCHN-Patienten erhalten zusätzlich eine individuell geformte Gesichtsmaske, die Kopf und Hals in einer festgelegten Position fixiert. Im Fall von SCCHN erfolgt die Bestrahlung intensitätsmoduliert perkutan mittels hochenergetischer Photonen. Um benachbarte Organe zu schonen und deren Bestrahlungsdosis (gemessen in Grey, Gy) zu minimieren, werden aus verschiedenen Einstrahlwinkeln mit der Tumormasse als Isozentrum Teildosen verabreicht. Die Absorption dieser ionisierenden Strahlung im Gewebe schädigt die Erbsubstanz der bestrahlten Zellen. DNA-Doppelstrangbrüche (entweder direkt induziert durch ionisierende Strahlung oder indirekt über Sauerstoffradikale (Reaktive Sauerstoffspezies, ROS)) führen so durch Apoptose und Nekrose zum Zelltod. Die durch die Bestrahlung entstandenen Schäden im Erbgut lassen sich zu gewissen Teilen durch zelleigene Reparaturmechanismen wiederherstellen, wobei diese Reparaturmechanismen bei gesunden Zellen im Allgemeinen besser und schneller funktionieren als bei Tumorzellen. Indem man die zur Tumorvernichtung benötigte Gesamtstrahlendosis in kleinere Einzeldosen fraktioniert, lässt sich die von gesundem Gewebe tolerierte Maximaldosis deutlich steigern und der Schaden an gesundem Gewebe so minimieren (Hall und Giaccia, 2012). Die verwendeten Gesamt- und Teildosen sind abhängig von der jeweiligen Tumorentität, der Lokalisation oder den umgebenden Risikoorganen. Für SCCHN werden Gesamtdosen zwischen 50-70 Gy in täglichen

Hintergrund

Fraktionen von 1,5-2,25 Gy/Fraktion eingesetzt (Ko und Citrin, 2009). Die Strahlentherapie hat dabei einen besonders hohen Stellenwert im Therapiekonzept von SCCHN, da es sich, insbesondere bei den HPV-positiven Entitäten, um sehr radiosensible Tumore handelt (Vozenin et al., 2010). Die Systemtherapie beinhaltet neben der klassischen Chemotherapie (z.B. mit Cisplatin oder 5-Fluoruracil) auch neue Behandlungsformen wie die Target Therapy (beispielweise wachstumshemmende Antikörper) oder die Immuntherapie (z.B. Immun-Checkpoint-Inhibitoren). Eine Chemotherapie kann zum Beispiel eingesetzt werden, um metastasierte Tumorzellen, welche von der chirurgischen Therapie oder Bestrahlung nicht erfasst werden, zu bekämpfen. Weiter lassen sich durch die gleichzeitige Anwendung von Radiotherapie und Chemotherapie in Form einer Radiochemotherapie synergistische Effekte erzielen, welche die beiden jeweiligen Behandlungsformen verstärken (Fietkau R., 2012). Die kombinierte Radiochemotherapie stellt so besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien von SCCHN eine wirksame Behandlungsoption dar; bisher konnte kein Überlebensvorteil durch die chirurgische Therapie im Vergleich zur kombinierten Radiochemotherapie bei lokal fortgeschrittenen SCCHN gezeigt werden (Semrau, 2017).

3.2 Übersicht der zu erhebenden Blutparameter

Im Folgenden sollen die aus dem Patienten- und Kontrollblut erhobenen Parameter kurz dargestellt werden und ihre klinische Relevanz erläutert werden.

3.2.1 LDH, CRP und großes Blutbild

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches in Form verschiedener Isoenzyme in fast allen Körperzellen zu finden ist. Es wird bei Zelluntergang freigesetzt. Als stabiles Molekül akkumuliert es in der Blutbahn und seine Aktivität kann labordiagnostisch gemessen werden. Hohe Werte deuten auf verstärkten Zellzerfall hin. Zwar können durch Kenntnis der genauen Isoenzyme und in Zusammenschau mit dem Patientenbild, z.B. bei einem Herzinfarkt, Rückschlüsse auf den Ursprung einer Enzymerhöhung geschlossen werden, jedoch ist LDH als ubiquitäres Enzym nicht organspezifisch (Neumeister und Böhm, 2015; Thomas, 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann ein Anstieg zum Beispiel durch den Zerfall von Tumorgewebe oder von Erythrozyten, welche eine hohe Menge an LDH intrazellulär aufweisen, erwartet werden.

Das in der Leber synthetisierte C-Reaktive Protein (CRP) ist Teil der Gruppe der Akute-Phase-Proteine. Akute Phase Proteine werden im Rahmen der sogenannten Akute-Phase-Reaktion vermehrt gebildet. Die Akute-Phase-Reaktion ist eine unspezifische

Hintergrund

Immunreaktion aufgrund von Gewebeschädigungen unterschiedlicher Genese wie zum Beispiel bakterielle Infektionen oder Verletzungen. Die Konzentration der Akute-Phase-Proteine steigt mit einer Latenz von etwa 6-48 h nach dem auslösenden Ereignis auf ein Vielfaches im Blut an. Physiologisch sollen die Akute-Phase-Proteine den Entzündungsherd lokalisieren und das Immunsystem unterstützen. CRP ist damit ein Teil des Immunsystems; weiter kann es das Komplementsystem aktivieren (Neumeister und Böhm, 2015; Thomas, 2012). Durch Bestimmung des C-Reaktiven Proteins kann z.B. eine durch Bestrahlung ausgelöste Inflammation korreliert werden.

Das „große Blutbild“ gibt eine Übersicht über quantitative und qualitative Eigenschaften der sich im Blut befindlichen zellulären Bestandteile. Dazu zählen Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen). Im Unterschied zum „kleinen Blutbild“ enthält das „große Blutbild“ zusätzlich eine morphologische Differenzierung der großen Leukozytensubpopulationen.

Erythrozyten sind unter anderem für den Sauerstofftransport zu den Organen zuständig. Ihr Volumenanteil in Prozent am gesamten Blut wird als sogenannter Hämatokrit angegeben. Der Hämatokrit hängt sowohl vom Blutvolumen als auch der Menge der Erythrozyten ab. Erythrozyten enthalten Hämoglobin, welches in der Lunge Sauerstoff bindet und in der Peripherie wieder abgibt. Es werden das durchschnittliche Erythrozytenvolumen (engl.: Mean Corpuscular Volume, MCV), die durchschnittliche Menge an Hämoglobin pro Erythrozyt (engl.: Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH) und deren Quotient sowie die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (engl.: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, MCHC) bestimmt. Anhand dieser Parameter lassen sich mögliche Veränderungen der Erythrozyten genau klassifizieren.

Als wichtiger Teil der Hämostase wird die Anzahl der Thrombozyten bestimmt.

Die Leukozyten sind Teil des Immunsystems und wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Sie lassen sich in weitere Subpopulationen unterteilen, wobei jeder Untergruppe bestimmte Funktionen der Immunabwehr zugesprochen werden. Aufgrund verschiedener Vorläuferzellen lassen sich die Lymphozyten von der myeloiden Reihe unterscheiden, aus deren Vorläufern auch die Erythrozyten und die Thrombozyten hervorgehen, welche selbst aber nicht Teil der Leukozyten sind. Neben dendritischen Zellen und Mastzellen (welche im Rahmen der Arbeit nicht analysiert werden) besteht die myeloide Reihe aus Monozyten und Granulozyten. Beide sind Teil des angeborenen, erregerunspezifischen Immunsystems. Das angeborene Immunsystem besteht aus mechanischen Barrieren wie

Hintergrund

der Haut sowie zellulären und humoralen Komponenten. Ein wichtiger Unterschied zum erworbenen Immunsystem ist dabei, dass die Immunantwort zwar sehr schnell, aber erregerspezifisch ausgelöst wird – das angeborene Immunsystem erkennt mithilfe bestimmter Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors) bestimmte Oberflächenproteine auf körperfremden Zellen, sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), und vernichtet diese Zellen zum Beispiel durch Phagozytose oder Lyse (Holländer und Barthlott, 2006). Durch Antigenpräsentation, Chemotaxis und Phagozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen kommuniziert es mit dem erworbenen Immunsystem.

Für das bessere Verständnis soll kurz der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: Major Histocompatibility Complex, MHC) erläutert werden. Es handelt sich bei dem Haupthistokompatibilitätskomplex um einen Mechanismus, mit dem Zellen Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, welche wiederum von Immunzellen kontrolliert und gebunden werden können. Man unterscheidet zwei MHC-Klassen: Der MHC Klasse I ist auf fast allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers zu finden. Mithilfe des MHC-Klasse I Mechanismus präsentieren Zellen Peptide aus dem eigenen Zytoplasma an zytotoxische T-Zellen. Werden die präsentierten Peptide als körperfremd eingestuft, beispielweise durch Infiltration eines Virus oder maligne Entartung der Zelle, wird die Zelle zerstört. Der MHC Klasse II ist nur auf spezialisierten Zellen des Immunsystems, den sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen, zu finden. Hierzu gehören beispielweise Monozyten/Makrophagen oder B-Lymphozyten. Im Unterschied zum MHC-Klasse I werden beim MHC Klasse II nicht zelleigene, sondern extern aufgenommene Peptide, zum Beispiel von Bakterien, präsentiert (Parham und Janeway, 2015).

Monozyten sind Vorläuferzellen der Makrophagen, welche im Zuge der leukozytären Diapedese aus den Blutgefäßen in das Gewebe auswandern und am Entzündungsort körperfremde Zellen phagozytieren. Sie können aufgenommene Zellbestandteile verarbeiten und im Rahmen des MHC-II-Systems an der Zelloberfläche präsentieren und somit eine spezifische Immunreaktion triggern. Die MHC-II-vermittelte Immunreaktion regt die Proliferation von T-Helferzellen und B-Zellen in lymphatischen Organen an und induziert die Selektion der B-Lymphozyten und deren Umwandlung zu Plasmazellen in den Lymphorganen (spezifische Immunantwort).

Granulozyten lassen sich histologisch anhand ihrer Kernmorphologie in drei Untergruppen gliedern: Neutrophile Granulozyten wandern genau wie Monozyten bzw. Makrophagen zum Entzündungsherd aus und sind zur Phagozytose und

Hintergrund

Antigenpräsentation befähigt. Eosinophilen Granulozyten wird eine wichtige Rolle in der Parasitenabwehr zugesprochen. Basophilen Granulozyten sind bei der Entstehung von Allergiereaktionen des Körpers beteiligt (Neumeister und Böhm, 2015; Zucker-Franklin).

Im Rahmen der morphologischen Differenzierung wird auch der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten bestimmt. Lymphozyten lassen sich grob in B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen unterteilen. Ihre Vorläuferzellen werden im Knochenmark gebildet und reifen dort und im Thymus zu B-Zellen und T-Zellen heran. Anschließend wandern sie in die sekundären lymphatischen Organe wie zum Beispiel Lymphknoten aus. Lymphozyten sind als Teil des erworbenen Immunsystems (B- und T-Zellen) und des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen) zentraler Bestandteil der Immunabwehr und werden im Rahmen der Durchflusszytometrie genauer untersucht.

3.2.2 Durchflusszytometrie

3.2.2.1 Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie

Bei der hier verwendeten Form der Durchflusszytometrie (engl.: Fluorescence activated cell sorting oder FACS) werden Zellen mit speziellen fluoreszierenden Antikörpern inkubiert. Es steht eine Vielzahl von verschiedenen Antikörpern zur Verfügung. Durch die Kenntnis der speziellen Oberflächenantigene bestimmter Zellreihen können so Zellpopulationen selektiv markiert werden. In einer Suspension gelöst fließen die Zellen in hoher Geschwindigkeit einzeln an einem Laserstrahl vorbei. Es kommen dabei mehrere Laser und Filter zum Einsatz. Zum einen wird das Licht von der Zelloberfläche abgelenkt und es entsteht Streulicht; zum anderen werden die gebundenen Antikörper durch den Laser zur Fluoreszenz angeregt. Der Grad der Lichtstreuung hängt von den physikalischen Eigenschaften der Zelle ab; hierzu zählen Zellgröße und -form, Zellmembran, Zellkern sowie granuläre Zellkomponenten wie z.B. die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum oder der Golgi-Apparat. Es entstehen zwei Arten von Streulicht: das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter oder FSC) und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter oder SSC). Das FSC ist dabei proportional zur Zelloberfläche, das SSC ist proportional zur internen Komplexität der Zelle. Durch die gleichzeitige Messung von FSC und SSC kann eine Immunophänotypisierung der Zelle vorgenommen werden. Außerdem wird die Fluoreszenz der zugegebenen Antikörper gemessen. Die Antikörper binden spezielle Glykoproteine an der Zelloberfläche, sogenannte Cluster of Differentiation (CD). Verschiedene CD Moleküle sind dabei spezifisch für jeweils eine oder mehrere Zellpopulationen und erfüllen meist spezielle Aufgaben. Einige fungieren beispielweise als Rezeptor, übertragen Signale oder haben enzymatische Funktion. Allen

Hintergrund

gemeinsam ist, dass sie einen wichtigen Bestandteil der interzellulären Kommunikation darstellen. Durch Analyse dieser gebundenen Antikörper können im Rahmen der Durchflusszytometrie die Expressionseigenschaften der jeweiligen CD-Moleküle auf bestimmten Zellreihen ausgewertet werden (Immunphänotypisierung). Die Lichtsignale der Zellen werden von Detektoren, in der Regel sog. Photomultipliern, welche die Lichtsignale verstärken, erfasst. Die Daten werden von der Gerätesoftware anschließend graphisch dargestellt. Der Benutzer selektiert innerhalb dieser Diagramme durch das Setzen bestimmter Regionen/Fenster nun einzelne Zellpopulationen (sog. Gaten, siehe 4.5) und wertet Messereignisse aus (Picot et al., 2012).

3.2.2.2 B-Lymphozyten

B-Zellen sind für die humorale Komponente des erworbenen Immunsystems verantwortlich. Native B-Zellen können spezifische körperfremde Strukturen binden und als Plasmazellen gezielt Antikörper gegen gebundene Antigene herstellen. Sie arbeiten dabei nicht alleine – in der Regel benötigen sie neben der direkten Bindung von Antigenen noch costimulatorische Signale in Form von Zytokinen, welche sie von T-Helferzellen erhalten. Die B-Lymphozyten nehmen hierzu die Antigene auf, prozessieren sie im Rahmen des MHC-II-Mechanismus und präsentieren sie auf ihrer Oberfläche zur Bindung einer passenden T-Helferzelle, welche die B-Zelle durch Zytokinausschüttung stimuliert. Findet sich eine passende T-Helferzelle wandert die B-Zelle in Lymphknoten oder Milz aus, wo sie sich in sogenannten Keimzentren zu einer Plasmazelle differenziert und monoklonale Antikörper herstellt, welche genau gegen den aufgenommenen Antikörper gerichtet sind. B-Lymphozyten erfüllen also eine zentrale Rolle des erworbenen Immunsystems. Sie besitzen den Oberflächenmarker CD19, nicht jedoch CD3, denn CD3 ist T-Zell-spezifisch. In der Durchflusszytometrie entsprechen sie also den CD3-/CD19+ Zellen. Der B-Lymphozytenrezeptor CD19 senkt die Aktivierungsschwelle von B-Lymphozyten (Engel et al., 1995).

3.2.2.3 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind für die zelluläre Komponente des erworbenen Immunsystems verantwortlich. Neben CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen sind viele verschiedene Subpopulationen von T-Lymphozyten bekannt. CD4+ T-Helferzellen lassen sich nochmals in Typ I und Typ II unterteilen; ihnen gemeinsam ist, dass sie MHC Klasse II Moleküle binden und durch die Freisetzung von Zytokinen und Interleukinen sowohl die humorale Immunantwort über die Aktivierung von B-Zellen, als auch die zelluläre Immunantwort über die Aktivierung von CD8+ zytotoxischen T-Zellen und

Hintergrund

Makrophagen stimulieren. CD4+ T-Helferzellen sind für eine langanhaltende und effiziente Immunantwort unerlässlich.

CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten sind in der Lage MHC Klasse I Moleküle zu erkennen und zu binden. Präsentiert eine Zelle zum Beispiel durch Infiltration eines Virus oder maligne Entartung ein körperfremdes MHC Klasse I Peptid auf seine Zelloberfläche wird dieses von CD8+ T-Lymphozyten erkannt, welche die Apoptose der Zelle induzieren.

T-Lymphozyten werden in der Durchflusszytometrie über den T-Zell-spezifischen Rezeptor CD3 nachgewiesen; untersucht werden CD3+/CD56- und CD3+/CD69+ T-Lymphozyten.

Eine weitere wichtige Untergruppe der T-Lymphozyten stellen die regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) dar. Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Zellreihen des Immunsystems, welche die Immunantwort des Körpers aktivieren, besitzen Tregs die Fähigkeit, die Immunantwort zu unterdrücken. Somit spielen sie physiologisch eine zentrale Rolle für die Selbsttoleranz des eigenen Körpers (Schwartz, 2005). Tregs sind Gegenstand der aktuellen Forschung und ihre Funktionsweise ist noch nicht abschließend geklärt. Man unterscheidet verschiedene Untergruppen der Tregs; im Rahmen der Arbeit sind die sogenannten CD4+-CD25+-Treg Zellen von besonderem Interesse, da sie die Aktivität von T-Zellen herunterregulieren und vermehrt in Tumorgeweben nachgewiesen wurden. Somit schwächen sie möglicherweise die Immunantwort des Körpers auf Tumore (Schaefer et al., 2005; Sun et al., 2018). Treg Zellen werden über den spezifischen Marker FoxP3 nachgewiesen.

3.2.2.4 NK-Zellen

Die dritte Subpopulation der Lymphozyten sind die Natürlichen Killerzellen oder kurz NK-Zellen. Im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten sind die NK-Zellen Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen somit keine spezifischen Antigenrezeptoren. Ähnlich wie CD8+ zytotoxische Killerzellen treten NK-Zellen mit MHC Klasse I Molekülen in Kontakt und können so viral infizierte oder maligne entartete Körperzellen durch induzierte Apoptose vernichten. Sie besitzen dazu eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren, welche entweder aktivierend oder hemmend auf die NK-Zelle wirken und deren Aktivität steuern. Einen besonderen Stellenwert haben die NK-Zellen bei Krebserkrankungen: Verschiedene Tumore manipulieren das MHC Klasse I System und können sich somit vor der Erkennung und Vernichtung durch zytotoxische

Hintergrund

Killerzellen tarnen. Nach der Missing-Self-Hypothese werden NK-Zellen aber im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen auch durch ein Fehlen verschiedener MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche maligner Zellen zur Zerstörung dieser fehlerhaften Zelle angeregt (Karre, 2002). NK-Zellen benötigen dabei kein Priming, können also Zellen schon beim Erstkontakt vernichten. Weiterhin können NK-Zellen durch die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen und stehen in engem Kontakt mit anderen Immunzellen wie zum Beispiel dendritische Zellen oder Granulozyten (Kalinski et al., 2005). NK-Zellen spielen also eine ganz zentrale Rolle in der Immunüberwachung von Tumorzellen. Die Forschung setzt große Stücke auf NK-Zellen als mögliche Vermittler einer Autoimmuntherapie bei Krebserkrankungen (Wu und Lanier, 2003). Hierfür ist ein besseres Verständnis von NK-Zellen und deren Eigenschaften bei Krebserkrankungen vonnöten, weshalb NK-Zellen auch einen substantiellen Teil der Arbeit ausmachen.

NK-Zellen können in der Immunphänotypisierung durch die Anwesenheit des Markers CD56 bei gleichzeitiger Abwesenheit des T-Zellrezeptors CD3 identifiziert werden. Es sind eine Vielzahl an unterschiedlichen NK-Zell-Rezeptoren bekannt. Im Speziellen sollen die Rezeptoren CD56, CD69, CD94, NKG2D, NKp30 und NKp40 näher untersucht werden. CD56, auch Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM), ist ein Rezeptor, welcher unter anderem auch auf T-Zellen zu finden ist und dem ein starker immunostimulatorischer Effekt zugesprochen wird. Genau wie CD69 wird CD56 als Maß für die Zytotoxizität der Immunzellen herangenommen (van Acker et al., 2017). CD94 und NKG2D gehören zur sogenannten CD94/NKG2 C Typ Lektin Rezeptorfamilie. Beide Rezeptoren sind als aktivierende Rezeptoren einzustufen, wobei NKG2D zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Bindung an MHC Klasse I Moleküle besitzt (Borrego et al., 2006). NKp30 und NKp46 gehören zur NK-Zellen aktivierenden Gruppe der sogenannten Natural Cytotoxy Receptors (NCRs), welche eine wichtige Rolle bei der Entlarvung und Erkennung von Tumorzellen spielen, indem sie bestimmte Oberflächenproteine der Tumorzellen binden (Hecht et al., 2009).

4 Material und Methoden

4.1 Studienkollektiv

Im Rahmen der Studie soll zum einen untersucht werden, ob SCCHN-Patienten Auffälligkeiten bezüglich verschiedener Blut- und Immunparameter aufweisen, welche sich auf die Grunderkrankung SCCHN zurückführen lassen. Zum anderen sollen Einflüsse einer Strahlentherapie auf diese Parameter im Verlauf gemessen werden.

Das Studienkollektiv setzt sich demnach aus einer möglichst homogen verteilten Patientengruppe mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich und einem gesunden Kontrollkollektiv zusammen. Die Patienten werden über Ziele, Durchführung und Risiken der Studie aufgeklärt und bestätigen ihre Teilnahme schriftlich in der Datenschutzerklärung und Patienteneinwilligungserklärung (vgl. Anhang 1, S.78). Diese wird anschließend der Hauptprüferin, Frau Dr. Marciana-Nona Duma vorgelegt. Die Studie wird von der lokalen Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München geprüft und genehmigt (vgl. Anhang 2, S.80). Die Daten werden anonymisiert verarbeitet.

Vor Beginn der Strahlentherapie werden Blut- und Immunparameter der Patienten mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen. Anschließend werden die Parameter der Patientengruppe prospektiv im Verlauf der Strahlentherapie untersucht.

4.1.1 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe besteht aus 20 gesunden Mitarbeitern des Klinikums rechts der Isar München und des Labors des Helmholtz Zentrum (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)) München. Prinzipiell gelten die gleichen Ausschlusskriterien wie für das Patientenkollektiv (siehe 4.1.3); es wird darauf geachtet, dass die Kontrollteilnehmer keine immunsupprimierenden Substanzen einnehmen und zum Entnahmezeitpunkt keinen fieberhaften Infekt aufweisen. Die Spender spenden freiwillig jeweils 8,1 ml EDTA Blut. Dieses wird anonymisiert im Rahmen der Durchflusszytometrie (siehe 4.4.2) analog zum Probenmaterial des Patientenkollektivs von Kollegen aus dem Helmholtz Zentrum analysiert (Fremddaten). Freundlicherweise werden diese Daten für den Vergleich mit dem Patientenkollektiv dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Das Alter der Kontrollteilnehmer ist in Tabelle 1 (siehe 4.1.2) zusammengefasst.

4.1.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus HNSCC-Patienten, die in der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar in München bestrahlt wurden.

Zu Beginn der Studie sollten lediglich SCCHN-Patienten in die Studie eingeschlossen werden, die eine „definitive Strahlentherapie“ erhalten, d.h. welche sich keiner zusätzlichen chirurgischen oder chemotherapeutischen Therapie unterziehen und nur im Rahmen einer Strahlentherapie behandelt werden. Es zeigt sich jedoch schnell, dass sich im Rekrutierungszeitraum 2015-2016 zu wenige SCCHN-Patienten rekrutieren ließen, die alleinig definitiv strahlentherapeutisch behandelt wurden. Daraufhin wird sowohl SCCHN-Patienten mit definitiver als auch mit adjuvanter Radio(chemo)therapie die Teilnahme an der Studie angeboten. Die Ausschlusskriterien sind in 4.1.3 dargestellt.

Die Teilnehmer werden mit einer Standarddosis von 50 Gy in täglichen Fraktionen von 2 Gy am sog. Planning Target Volume (PTV) bestrahlt. In der Strahlentherapie unterscheidet man verschiedene zu definierende Volumina: neben dem makroskopischen Tumolvolumen (Gross Tumor Volume) definiert man das klinische Zielvolumen (Clinical Target Volume). Das klinische Zielvolumen bezieht zusätzlich zum makroskopischen Tumolvolumen Randbereiche wie z.B. Lymphabflusswege mit ein, in denen mikroskopische Tumormanifestationen vorhanden sein könnten. Das PTV erweitert das klinische Zielvolumen um einen Sicherheitssaum, welcher Setup- oder Lagerungsungenauigkeiten ausgleichen soll. Weiterhin erhielten die Patienten eine Boost Bestrahlung von 14 – 20 Gy. Unter einer Boost Bestrahlung versteht man eine der Standarddosis nachfolgende sequentielle kleinvolumige Dosisaufsättigung im Tumor bzw. Tumorbett, welche z.B. das Lokalrezidivrisiko senken soll.

4.1.3 Ausschlusskriterien

Die Ausschlusskriterien für Patienten- und Kontrollkollektiv sind:

- Fernmetastasierung
- Zweittumore, die nicht in kompletter Remission sind
- Einnahme immunsuppressiver Substanzen (z.B. Azathioprin, hochdosiert Cortison (> 10 mg Prednisolonäquivalent), Cyclosporin, Tacrolimus, Rituximab, Infliximab, Adalimumab, Interferone, Fingolimod)
- Die Langzeittherapie mit hochdosierten COX-Inhibitoren
- Ein fieberhafter Infekt zum Zeitpunkt der Blutentnahme

4.2 Patientenrekrutierung

Die Rekrutierung geeigneter Patienten erfolgt zu deren Simulations-/Planungstermin, welcher i.d.R. ein bis zwei Wochen vor Beginn der Bestrahlung liegt. In 2015 und 2016 können 25 Patienten rekrutiert werden. Die Rekrutierung gestaltet sich aus folgenden Gründen teilweise schwierig: Viele Patienten wollen neben der bereits nebenwirkungsreichen Therapie keine zusätzlichen Blutentnahmen auf sich nehmen; zumal die Studie keinen direkten Vorteil für die Teilnehmer erbringt. Weiterhin nehmen viele Patienten die Bestrahlungs- und Nachsorgetermine nicht zuverlässig wahr. Einige Teilnehmer versterben leider bereits während der Therapie- und Nachsorgeperiode. Daraus ergibt sich für manche Patienten ein unvollständiger Datensatz - nach sorgfältiger Überlegung werden deshalb nur 16 Patienten der 25 rekrutierten Patienten in die Studiauswertung aufgenommen.

4.3 Probenentnahme

Den Teilnehmern wird zu fünf Zeitpunkten fachgerecht Blut entnommen:

T0: Vor Strahlentherapie (am Planungstermin)

T1: Zur Mitte der Bestrahlung bei 30 Gray (ca. einen Monat nach T0)

T2: Am letzten Tag der Bestrahlung (ca. zwei Monate nach T0)

T3: Beim ersten Nachsorgetermin ca. sechs Wochen nach Abschluss der Bestrahlung

T4: Beim zweiten Nachsorgetermin ca. sechs Monate nach Abschluss der Bestrahlung

Es werden jeweils drei 2,7 ml EDTA-Röhrchen und ein 7,5 ml Serum-Röhrchen entnommen.

4.4 Materialverarbeitung

4.4.1 Klinische Chemie

Ein EDTA- und das Serum-Röhrchen werden der Klinischen Chemie des Klinikums zur Bestimmung von LDH, CRP und des großen Blutbildes übergeben.

4.4.2 Durchflusszytometrie

Die beiden verbleibenden EDTA Röhrchen werden im Labor des Helmholtz Zentrums im Rahmen der Durchflusszytometrie aufgearbeitet.

4.4.2.1 Aufarbeitung im Labor

Es werden 14 Reagenzröhrchen (im Nachfolgenden „Tubes“) durchnummeriert und mit jeweils 100 Mikroliter des EDTA-Vollbluts befüllt. Anschließend werden verschiedene

Material und Methoden

Antikörper nach festem Schema zupipettiert (vgl. Tabelle 1 Antikörperkombinationen) und die Tubes mehrmals über ein Metallgitter gezogen („aufgeratscht“) um Blut und Antikörper zu mischen.

Spezifität	Antikörper	Hersteller		Katalognr.	Volumen (µl)
Kontrolle	IgG1-FITC	BD		345815	5
	IgG1-PE	BD		345816	5
	IgG1-PerCP	BD		345817	5
	IgG1-APC	Caltag/Inv.		MF105	1
T/NK	CD94-FITC	BD		555888	5
	CD56-PE	BD		345811	5
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD45-APC	Caltag/Inv.		MHCD 4505	1
B/T/NK	CD56-FITC	BD		345811	5
	CD19-PE	BD		555413	20
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD45-APC	Caltag/Inv.		MHCD 4505	1
T/NK	CD56-FITC	BD		34811	5
	CD16-PE	BD		555407	10
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD45-APC	Caltag/Inv.		MHCD 4505	1
T/NK	CD56-FITC	BD		34811	5
	NKG2D-PE	R&D		FAB139P	10
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD69-APC	BD		340560	5
T/NK	CD56-FITC	BD		34811	5
	NKp30-PE	BC		PN IM 3709	10
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD69-APC	BD		340560	5
T/NK	CD56-FITC	BD		34811	5
	NKp46-PE	CD		PN IM 3711	10
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD69-APC	BD		340560	5
T/NK	CD94-FITC	BD		555888	5

Material und Methoden

	NKG2D-PE	R&D		FAB139P	10
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD56-APC	BD		555518	10
T/NK	CD94-FITC	BD		555888	5
	NKp30-PE	BC		PN IM 3709	10
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD56-APC	BD		555518	10
T/NK	CD94-FITC	BD		555888	5
	NKp46-PE	BC		PN IM 3711	10
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD56-APC	BD		555518	10
CD4/CD8 T	CD4-FITC	BD		555346	20
	CD8-PE	BD		555366	20
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD45-APC	Caltag/Inv.		MHCD 4505	1
Kontrolle	IgG1-FITC	BD		345815	5
	IgG1-PE	BD		345816	5
	IgG1-PerCP	BD		345817	5
	IgG1-APC	Caltag/Inv		MG 105	1
CD4 Treg	CD4-FITC	BD		555346	20
	FoxP3-PE	BD		560046	20
	CD3-PerCP	BD		345766	10
	CD25-APC	BD		340907	5

Tabelle 1 Antikörperkombinationen

Abkürzungen: BD = Becton Dickinson Biosciences, BC = Beckmann Coulter, Caltag/Inv. = Caltag/Invitrogen

Anschließend werden die Tubes 15 Minuten lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Antikörper werden durch Zugabe von 2 ml einer FACS-Pufferlösung (9 Teile „Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline“ (Sigma D8527) und 1 Teil hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Sigma F7524)) ausgewaschen. Die Tubes werden bei 500 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgeschüttet und das Pellet durch Aufratschen resuspendiert. Um die roten Blutkörperchen zu lysieren, werden in

Material und Methoden

jedes Tube 2ml einer Lyse-Puffer-Lösung bestehend aus neun Teilen Wasser und einem Teil „BD FACS Lysis Solution“ (BD 349202) zugegeben. Die Tubes werden sanft gevortext (< 1 Sek.) und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (500 g, 5 Minuten), Überstand-Abschüttung und Aufratschen wird jeweils 3 ml FACS-Puffer (10%) zugegeben. Es folgt erneutes Zentrifugieren (500 g, 5 Minuten), Abkippen und Aufratschen.

Den Tubes 1-11 werden jeweils 300 µl FACS-Puffer (10 %) zugegeben und sie werden innerhalb einer Stunde im FACS-Gerät analysiert. (Siehe 4.5)

Die Tubes 12-14 dienen der Analyse der regulatorischen T-Zellen (Tregs) und müssen weiter aufbereitet werden, bevor sie im Gerät analysiert werden können. Es werden zwei Pufferlösungen angesetzt: Puffer A (BD Pharmingen Human FoxP3 Buffer A (Cat: 51-9005451) 1:10 in H₂O verdünnt – für drei Tubes also 0,8 ml FoxP3 Buffer A und 8,1 ml H₂O) und Puffer C (BD Pharmingen Human FoxP3 Buffer B (Cat: 51-9005450) 1:50 in Puffer A verdünnt – es werden also 2 ml der vorher angesetzten Puffer A Lösung mit 40 µl FoxP3 Buffer B versetzt). Die Zellen in den Tubes 12-14 werden durch Zugabe von je 2 ml Puffer A mit anschließendem Vortexen und 10-minütiger Inkubation fixiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (500 g, 5 Minuten) (mit anschließendem Abgießen und Aufratschen) und einem weiteren Waschschrift (Zugabe von 3 ml FACS-Puffer, Zentrifugation (500 g, 5 Minuten), Abgießen und Aufratschen) wird in jedes Tube 0,5 ml Puffer C zugegeben, um die Zellen zu permeabilisieren. Die Tubes werden gevortext und 30 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften (Zugabe von 2ml FACS-Puffer, Zentrifugieren (500 g, 5 Minuten), Abgießen und Aufratschen) werden zur Anfärbung der Tregs Antikörper hinzugegeben (vgl. Tabelle 1 Antikörperkombinationen). Die Tubes werden kurz gevortext und 30 Minuten inkubiert. Es folgen zwei Waschschriften (Zugabe von 2 ml FACS-Puffer, Zentrifugieren (500 g, 5 Minuten), Abgießen und Aufratschen) und die Zugabe von 300 µl FACS-Puffer bevor auch diese Tubes am FACS-Gerät analysiert werden.

4.5 Datenanalyse und Gating

Die Auswertung erfolgt an einem FACSCalibur (BDScience) Gerät; hierzu werden die Tubes nacheinander in das Gerät gesteckt. In der Analyse werden verschiedene Parameter erhoben: Die beiden Streulichter FSC und SCC sowie spezifische Antikörper-Floreszenzen FL1, FL2 etc.. Pro Tube werden 50.000 solcher Ereignisse erfasst. Die Geräteeinstellung ist repräsentativ in Anhang 3 (siehe S.81) zusammengefasst. Die

Durchflusszytometrie-Daten werden gemäß dem Standardformat „Flow Cytometry Standard“ (FCS) als sogenannte listmode Dateien abgespeichert. Diese listmode Dateien werden anschließend mit dem BD CellQuest™ Pro (Version 6.0) graphisch dargestellt und ausgewertet. Es stehen mehrere Möglichkeiten zur graphischen Darstellung von Zellpopulationen zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit werden sowohl Punktwolkendiagramme (Dot Plots) als auch Histogramme benutzt.

Bei der FACS-Analyse einer Vollblutprobe werden Messereignisse zu vielen verschiedenen im Vollblut enthaltenen Zellpopulationen erfasst. Möchte man nun die Eigenschaften einer bestimmten Zellpopulation analysieren, kann mit der Computermouse ein Fenster (sog. Region) um eine Teilmenge der Messergebnisse gezogen werden, um dann nur diese Teilmenge für eine weitere Analyse zu definieren. Umgangssprachlich wird diese Region oft mit dem Begriff „Gate“ gleichgesetzt und der Prozess der Teilmengendefinition als „Gating“ bezeichnet. Genaugenommen kann die Region allerdings nur unter bestimmten Umständen als Gate bezeichnet werden; häufig können auch mehrere Messeigenschaften und Regionen ein Gate definieren.

Anhand des ersten Analyseschrittes wird das Gaten beispielhaft dargestellt. In einer Punktwolkendarstellung wurden die Streulichter FSC und SSC der Proben gegeneinander aufgetragen (Abbildung 1). Es sind 3 Messcluster zu erkennen, welche verschiedene Zellreihen repräsentieren. Die Regionen/Gates R1, R2 und R3 wurden als Grenzbereiche

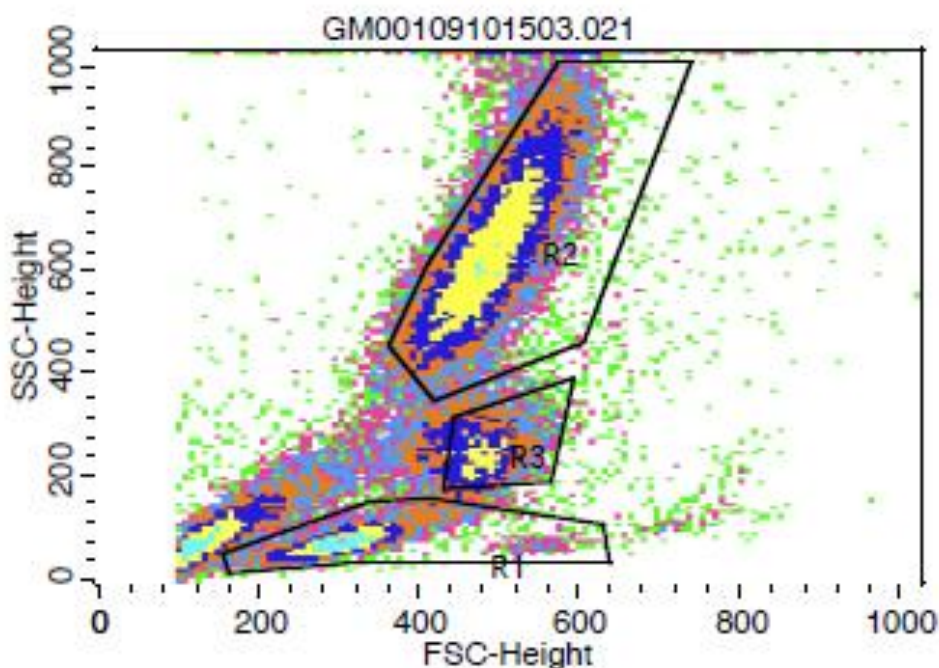


Abbildung 1 Streulicht Dot-Plot eines Patientenröhrchens

Material und Methoden

um die Messcluster gezogen, um diese Zellgruppe für die nachfolgende Analyse zu isolieren. R2 bildet die Neutrophilen Granulozyten ab, welche relativ groß sind und viele Granula enthalten. R3 repräsentiert die Monozyten, welche zwar groß sind, aber verhältnismäßig wenige intrazelluläre Granula aufweisen. R1 entspricht den Lymphozyten, welche bei kleiner Zellgröße gleichzeitig wenig Granula aufweisen. Sie sind für diese Arbeit von besonderem Interesse. Da diese Regionen/Gates von Hand gezogen werden und maßgeblich das Untersuchungsergebnis beeinflussen, ist die Analyse der FACS-Daten sehr untersucherabhängig und sollte wenn möglich immer von derselben Person durchgeführt werden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Messereignisse im Lymphozytengate werden dann in verschiedenen weiteren Plots dargestellt und weiter analysiert.

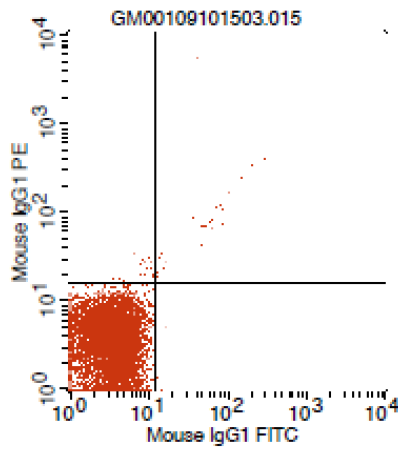
Betrachtet wird dabei der prozentuale Anteil verschiedener Lymphozytensubpopulationen im Lymphozytengate, d.h. anteilig an den Gesamtlymphozyten – man spricht deswegen auch von „Gated %“.

Außerdem wird die „Mean Fluorescence Intensity“ (im Nachfolgenden häufig mit „MFI“ abgekürzt) analysiert, welche die Expressionsdichte eines jeweiligen Oberflächenmarkers auf einer Zelle repräsentiert. Mit den Gated-%-Werten lassen sich Aussagen über die Menge der einzelnen Zellpopulationen treffen. Die MFI zeigt das Expressionsmuster eines Markers auf der Zelloberfläche einer Zellpopulation. Weist eine Zelle z.B. einen hohen Mean Fluorescence Intensity Wert für einen aktivierenden Zellmarker auf, wird dieser auf der Zelle in hohem Maße exprimiert und es lassen sich Rückschlüsse auf die Zellaktivität ziehen.

Die 12 Tubes werden einzeln nacheinander analysiert; wie in 4.4.2 nachzulesen ist, werden in jede Tube jeweils vier verschiedene fluoreszierende Antikörper pipettiert. Zwei dieser vier Antikörperfluoreszenzsignale werden im nächsten Analyseschritt in sechs Punktwolkendiagrammen gegeneinander aufgetragen.

Material und Methoden

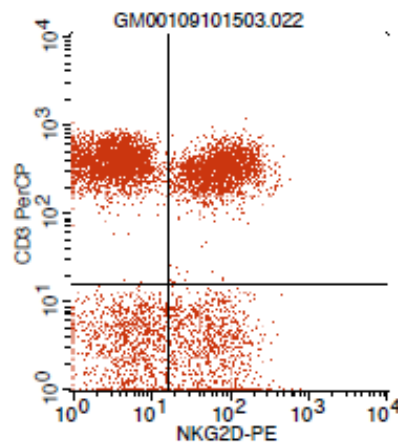
Repräsentativ sind nachfolgend zwei dieser Punktwolkendiagramme dargestellt; bei Abbildung 2 handelt es sich um eine Antikörper-Isotypenkontrolle (Negativkontrolle), in Abbildung 3 sind CD3 (Y-Achse) und NKG2D (X-Achse) gegeneinander aufgetragen.



File: GM00109101503.015 Tube: IgG1-FITC/PE/PerCP/APC
Gate: G1 Gated Events: 7179
Total Events: 50000 Quad Location: 12, 16

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	16	0.22	0.03	7.93	22.72
UR	23	0.32	0.05	71.79	326.10
LL	7137	99.41	14.27	3.86	3.96
LR	3	0.04	0.01	14.55	2.47

Abbildung 2 Punktwolkendarstellung eines Kontrollprobenröhrchens



File: GM00109101503.022 Tube: CD94/NKG2D/3/56
Gate: G1 Gated Events: 7340
Total Events: 50000 Quad Location: 18, 15

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	2861	38.98	5.72	3.80	376.91
UR	2537	34.56	5.07	91.01	306.78
LL	1005	13.69	2.01	6.04	4.06
LR	937	12.77	1.87	79.50	3.85

Abbildung 3 Punktwolkendarstellung der Oberflächenmarker CD3 und NKG2D eines Patientenröhrchens

Jeder Punkt repräsentiert ein Messereignis. Außerdem enthält der Dot Plot einen Quadrantenmarker, der das Diagramm in 4 Abschnitte unterteilt: Oben links (Upper Left, UL), oben rechts (Upper Right, UR), unten links (Lower Left, LL) und unten rechts (Lower Right, LR). Der untere links Quadrant (LL) zeigt Ereignisse, die für beide Parameter negativ sind. In den Quadranten oben links (UL) und unten rechts (LR) befinden sich einfach positive Ereignisse. Die Ereignisse in UL sind dabei für den Parameter auf der Y-Achse positiv; jene in LR für den Parameter auf der X-Achse. Im oberen rechten Quadranten (UR) befinden sich doppelt positive Ereignisse. Der Quadrantenmarker wird anhand der Negativkontrolle vor der eigentlichen Auswertung der übrigen Tubes gesetzt. Er soll zum einen möglichst viele Kontrollereignisse im Quadranten LL erfassen, zum anderen aber auch möglichst eng an dem Kontrollcluster anliegen. Unter den Dot Plots befindet sich eine Quadranten-Statistik, in der die Ereignisse für die jeweiligen Quadranten ausgelesen werden können. Möchte man nun in Abbildung 3 z.B. den Anteil der CD3-/NKG2D+ NK-Zellen an den Lymphozyten auslesen, kann man entweder die Events aus dem Quadranten LR (937) durch die Gated

Material und Methoden

Events (7340) teilen oder den Wert direkt in der Zeile „LR“ in der Spalte „% Gated“ ablesen.

Neben der Auswertung mit Dot Plots wurden die Ereignisse auch mithilfe von Histogrammen ausgewertet. Im Gegensatz zum Dot Plot, in dem zwei Parameter gleichzeitig analysiert werden, ist ein Histogramm eine einparametrische Darstellung. Genau wie beim Definieren des Quadrantenmarkers, wird beim Histogramm ebenfalls eine Negativmessung benötigt, um den Histogrammmarker zu setzen. Die Ereignisse links von M1 umfassen die Negativereignisse, M1 selbst repräsentiert die Positivereignisse. Simultan zu den Dot Plots können die Messwerte aus der Histogramm-Statistik abgelesen oder errechnet werden (vgl. Abbildung 4).

Die Histogramm-Daten können z.B. als Eigenkontrolle für das korrekte Einzeichnen der Quadrantenmarker im Dot-Plot sein: Abbildung 3 und Abbildung 4 entstammen derselben Messung und bilden beide den Oberflächenmarker CD3 ab. Wurden die Quadranten- und Histogramm-Marker korrekt gesetzt, sollten die CD3+ Ereignisse im Histogramm ungefähr der Summe von UL und UR aus der Punktwolkendarstellung entsprechen.

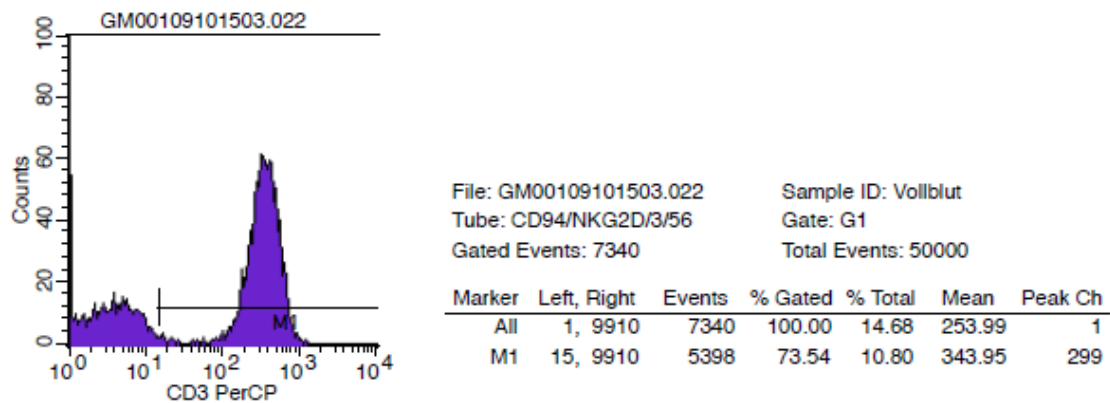


Abbildung 4 Histogrammdarstellung des Parameters CD3 eines Patientenröhrchens

4.6 Statistische Datenauswertung, Normalverteilungstests und Auswahl der anzuwendenden Testverfahren

Die statistischen Auswertungen werden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 24.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Metrische Variablen werden als Mittelwerte und Mediane dargestellt, während die Streumaße als Standardabweichungen und Quartile angegeben werden. Die kategorisierten bzw. nominalen Daten werden als absolute und relative Häufigkeit angegeben.

Mittels des Shapiro-Wilk-Tests werden die metrischen Variablen hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Normalverteilungstests überprüfen die Verteilungsform von stetigen Zahlen einer Stichprobe. Die Durchführung von Normalverteilungstests erfolgt meist mit dem Kolmogorov-Smirnow-Test. Beträgt die Gesamtzahl der Stichprobe wie in dieser Arbeit < 50 , so sollte man auf den Shapiro-Wilk-Test zurückgreifen. Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung besteht bei $p < 0,05$; in diesem Fall werden für die betreffende Variablen nichtparametrische Tests benutzt. Die Analyse der Ergebnisse zeigt, dass die Signifikanzen einiger Variablen nur zum Teil $p > 0,05$ sind, also ein Teil der Stichproben der Variablen normalverteilt ist, während andere Stichproben nicht normalverteilt sind. Es ist sinnvoll, für jeweils eine Variable entweder parametrische oder nichtparametrische Verfahren zu verwenden. Man sollte also festlegen, welche Verteilungsform vorliegt. Zeigt sich, dass bei den getesteten Variablen zumindest einzelne Parameter ohne Normalverteilung sind, werden nachfolgend in diesen Fällen durchgehend Tests mit nichtparametrischen Verfahren gewählt.

Bei den Gruppenvergleichen der vorliegenden Stichproben liegen im ersten Teil, in dem die Patientenparameter mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen werden, unabhängige Stichproben vor. Das heißt, dass die Werte in keinem direkten Zusammenhang stehen. Im Gegensatz dazu haben die Messungen innerhalb des Patientenkollektivs, vor, während und nach Therapie, eine direkte Verbindung. Im zweiten Teil der Auswertung, in dem die Patientenparameter im Verlauf analysiert werden, liegen verbundene Stichproben vor. Bei unabhängigen und verbundenen Stichproben kommen unterschiedliche Testverfahren zum Einsatz.

Prinzipiell werden folgende Testverfahren verwendet:

Beim Vergleich von 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben wird der t-Test verwendet, beim Vergleich von mehr als 2 Stichproben die einfaktorielle ANOVA.

Material und Methoden

Beim Vergleich von 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wird der Mann-Whitney-U-Test verwendet, bei mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben der H-Test nach Kruskal und Wallis.

Beim Vergleich von 2 verbundenen, normalverteilten Stichproben wird der t-Test für gepaarte Stichproben verwendet, beim Vergleich von mehr als 2 normalverteilten, verbundenen Stichproben das allgemeine lineare Modell mit Messwiederholungen.

Beim Vergleich von 2 verbundenen, nicht normalverteilten Stichproben wird der Wilcoxon-Test verwendet, beim Vergleich von mehr als 2 verbundenen, nicht normalverteilten Stichproben der Friedman-Test.

Beim Vergleich von 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben wird der t-Test verwendet. Dabei wird vorher mittels des Levene-Tests die Homogenität der Varianzen geprüft. Bei nachgewiesener Homogenität der Varianzen wird der Student t-Test durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Stichproben wird der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrisches Verfahren angewendet.

Beim Vergleich von mehr als 2 verbundenen, normalverteilten Stichproben wird das allgemeine lineare Modell mit Messwiederholungen verwendet, beim Vergleich von mehr als 2 verbundenen, nicht normalverteilten Stichproben der Friedman-Test.

Bei allen durchgeführten Tests erfolgt eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wird.

Die graphischen Darstellungen werden ebenfalls mit SPSS erstellt. Es werden zur Veranschaulichung der Mittelwerte bei normalverteilten Stichproben Fehlerbalken verwendet, wobei als Streumaß aufgrund der großen Streubreite die Standardfehler verwendet werden.

Zur Veranschaulichung der Mediane und Quartilsabstände bei nicht normalverteilten Stichproben werden Boxplots verwendet. Während in den Boxen der Median sowie die 25.-75. Perzentile dargestellt sind, entsprechen die T-Balken dem kleinsten und größten Wert (Minimum und Maximum), sofern diese keine Ausreißer bzw. Extremwerte sind. Als Ausreißer sind Werte definiert, die zwischen $1\frac{1}{2}$ - 3 Boxlängen außerhalb der Box liegen. Sie sind in den Grafiken als Kreise dargestellt. Extremwerte liegen mehr als 3 Boxlängen außerhalb der Box und sind als Kreuze aufgetragen. Die nominalen Werte werden in Kreisdiagrammen dargestellt, während die Altersverteilung in einem Histogramm aufgetragen wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Charakteristika des Patienten- und Kontrollkollektivs

Das Patientenkollektiv (n = 16) besteht zu 75% (n = 12) aus Männern und zu 25% (n = 4) aus Frauen bei einem Altersmittelwert von 62 Jahren.

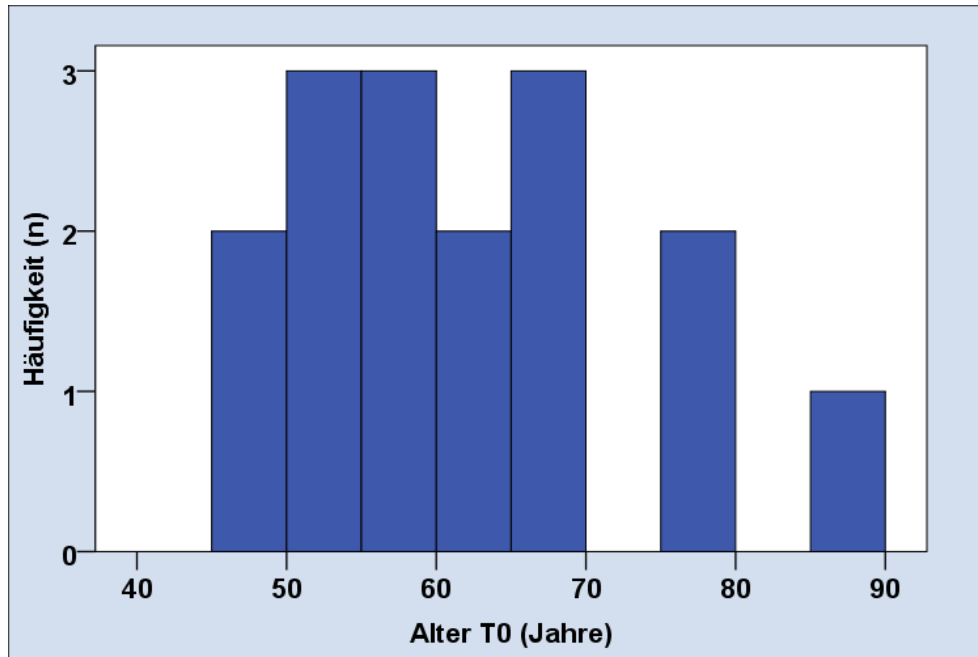


Abbildung 5 Verteilung des Patientenalters

n = 16

Insgesamt werden 3 Patienten mittels definitiver Radio- oder Radiochemotherapie behandelt. Die restlichen 13 Patienten erhalten eine adjuvante Radio- oder Radiochemotherapie. Aus beiden Gruppen (Adjuvant und Definitiv) werden jeweils 2 Patienten zusätzlich mit Cisplatin therapiert. Das bedeutet, dass insgesamt 4 der 16 Patienten zusätzlich zur Bestrahlung eine Chemotherapie erhalten.

6 Patienten (38%) sind an einem Mundhöhlenkarzinom und jeweils 5 Patienten (je 31%) an einem Pharynx- oder Larynxkarzinom erkrankt.

Abbildung 6 und Abbildung 7 zeigen die Verteilung der T und N Stadien des TMN Systems für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich. Da Fernmetastasen zu den

Ergebnisse

Ausschlusskriterien der Studie zählen und alle Patienten somit einen Status „M0“ haben, ist das M Stadium nicht abgebildet.

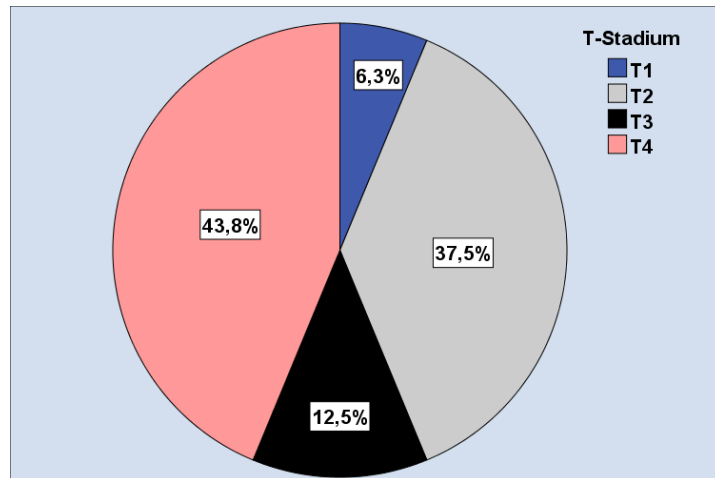


Abbildung 6 Verteilung der T-Stadien innerhalb des Patientenkollektivs

$n = 16$

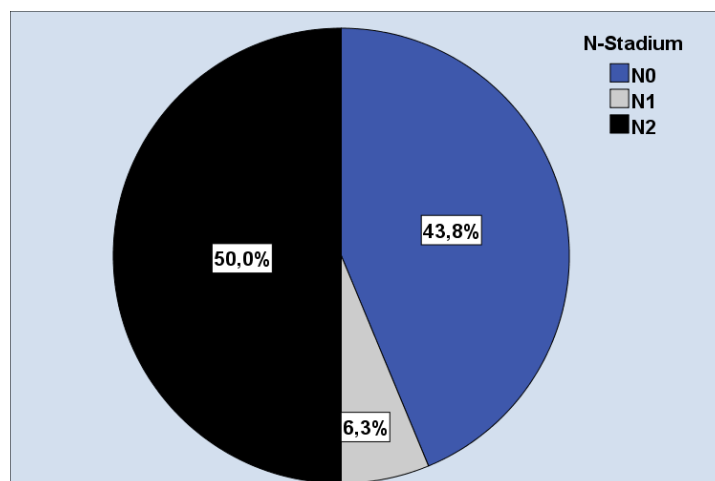


Abbildung 7 Verteilung der N-Stadien innerhalb des Patientenkollektivs

$n = 16$

Tabelle 2 fasst die Charakteristika der Patienten- und der Kontrollgruppe ($n=20$) noch einmal zusammen.

	Patienten		Kontrollgruppe	
Charakteristika	n	%	n	
	16		20	
Geschlecht				
Männlich	12	75		
Weiblich	4	25		

Ergebnisse

Alter in Jahren			
20-30	0	0	2
40-49	2	13	1
50-59	6	38	6
60-69	5	31	6
70-79	2	13	5
80-89	1	8	0
Therapieform			
Definitiv	3	19	
Adjuvant	13	81	
Region			
Mundhöhle	6	38	
Pharynx	5	31	
Larynx	5	31	
TMN			
T1	1	6	
T2	6	38	
T3	2	13	
T4	7	44	
N0	7	44	
N1	1	6	
N2	8	50	

Tabelle 2 Charakteristika der Patienten- und Kontrollgruppe

Abkürzungen: T = Tumorstadium, N = Lymphknotenstatus; für eine genaue Erläuterung der TMN Klassifikation siehe 3.1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

5.2 Normalverteilungstests und Auswahl der anzuwendenden Testverfahren

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse des in 4.6 erläuterten Shapiro-Wilk-Tests zur Bestimmung der Normalverteilung der metrischen Variablen abgebildet. Das Signifikanzniveau beträgt $p < 0,05$, wobei signifikante und damit nicht normalverteilte Ergebnisse in Rot hervorgehoben werden. Ist mindestens eine Variable eines Parameters im Verlauf (also T0, T1, T2, T3 oder T4) nicht normal verteilt, wird die gesamte Gruppe mit nicht-parametrischen Tests geprüft.

Ergebnisse

	df	Sig.		df	Sig.		df	Sig.
LDH T0 (U/l)	15	,000	Neutrophile T0 (%)	15	,602	CD3-/CD56+ (%) T0	36	,499
LDH T1 (U/l)	16	,952	Neutrophile T1 (%)	14	,102	CD3-/CD56+ (%) T1	16	,221
LDH T2 (U/l)	14	,172	Neutrophile T2 (%)	14	,494	CD3-/CD56+ (%) T2	14	,174
LDH T3 (U/l)	10	,410	Neutrophile T3 (%)	10	,854	CD3-/CD56+ (%) T3	10	,259
LDH T4 (U/l)	8	,944	Neutrophile T4 (%)	8	,029	CD3-/CD56+ (%) T4	7	,471
CRP T0 (mg/dl)	15	,005	Lymphozyten T0 (%)	15	,999	CD3-/CD56+ Mean T0	36	,464
CRP T1 (mg/dl)	16	,046	Lymphozyten T1 (%)	14	,122	CD3-/CD56+ Mean T1	16	,011
CRP T2 (mg/dl)	15	,513	Lymphozyten T2 (%)	14	,090	CD3-/CD56+ Mean T2	14	,288
CRP T3 (mg/dl)	10	,002	Lymphozyten T3 (%)	10	,183	CD3-/CD56+ Mean T3	10	,372
CRP T4 (mg/dl)	8	,000	Lymphozyten T4 (%)	8	,035	CD3-/CD56+ Mean T4	7	,283
Leukozyten T0 (G/l)	16	,083	Monozyten T0 (%)	15	,015	CD56+/CD69+ (%) T0	36	,000
Leukozyten T1 (G/l)	16	,194	Monozyten T1 (%)	14	,436	CD56+/CD69+ (%) T1	16	,016
Leukozyten T2 (G/l)	15	,275	Monozyten T2 (%)	14	,289	CD56+/CD69+ (%) T2	14	,000
Leukozyten T3 (G/l)	10	,040	Monozyten T3 (%)	10	,688	CD56+/CD69+ (%) T3	10	,140
Leukozyten T4 (G/l)	8	,476	Monozyten T4 (%)	8	,501	CD56+/CD69+ (%) T4	7	,493
Erythrozyten T0 (T/l)	16	,309	Eosinophile T0 (%)	15	,012	CD3-/CD69+ Mean T0	36	,007
Erythrozyten T1 (T/l)	16	,677	Eosinophile T1 (%)	14	,232	CD3-/CD69+ Mean T1	16	,160
Erythrozyten T2 (T/l)	15	,491	Eosinophile T2 (%)	14	,216	CD3-/CD69+ Mean T2	14	,924
Erythrozyten T3 (T/l)	10	,378	Eosinophile T3 (%)	10	,042	CD3-/CD69+ Mean T3	10	,712
Erythrozyten T4 (T/l)	8	,318	Eosinophile T4 (%)	8	,010	CD3-/CD69+ Mean T4	7	,804
Hämoglobin T0 (g/dl)	16	,798	Basophile T0 (%)	14	,000	CD3-/NKG2D+ (%) T0	36	,995
Hämoglobin T1 (g/dl)	16	,010	Basophile T1 (%)	14	,000	CD3-/NKG2D+ (%) T1	16	,215
Hämoglobin T2 (g/dl)	15	,623	Basophile T2 (%)	13	,000	CD3-/NKG2D+ (%) T2	14	,095
Hämoglobin T3 (g/dl)	10	,903	Basophile T3 (%)	9	,000	CD3-/NKG2D+ (%) T3	10	,473
Hämoglobin T4 (g/dl)	8	,578	Basophile T4 (%)	7	,001	CD3-/NKG2D+ (%) T4	7	,014
Hämatokrit T0 (%)	16	,853	CD3-/CD19+ (%) T0	36	,457	CD3-/NKG2D+ Mean T0	36	,107
Hämatokrit T1 (%)	16	,554	CD3-/CD19+ (%) T1	16	,095	CD3-/NKG2D+ Mean T1	16	,025
Hämatokrit T2 (%)	15	,718	CD3-/CD19+ (%) T2	14	,013	CD3-/NKG2D+ Mean T2	14	,000
Hämatokrit T3 (%)	10	,848	CD3-/CD19+ (%) T3	10	,064	CD3-/NKG2D+ Mean T3	10	,123
Hämatokrit T4 (%)	8	,608	CD3-/CD19+ (%) T4	7	,260	CD3-/NKG2D+ Mean T4	7	,821
MCH T0 (pg)	16	,279	CD3+/CD56- (%) T0	36	,409	CD3-/NKp30+ (%) T0	36	,212
MCH T1 (pg)	16	,718	CD3+/CD56- (%) T1	16	,223	CD3-/NKp30+ (%) T1	16	,006
MCH T2 (pg)	15	,478	CD3+/CD56- (%) T2	14	,425	CD3-/NKp30+ (%) T2	14	,006
MCH T3 (pg)	10	,794	CD3+/CD56- (%) T3	10	,648	CD3-/NKp30+ (%) T3	10	,321
MCH T4 (pg)	8	,002	CD3+/CD56- (%) T4	7	,290	CD3-/NKp30+ (%) T4	7	,061
MCV T0 (fl)	16	,265	CD3+/CD69+ (%) T0	36	,000	CD3-/NKp30+ Mean T0	36	,000
MCV T1 (fl)	16	,988	CD3+/CD69+ (%) T1	16	,000	CD3-/NKp30+ Mean T1	16	,022
MCV T2 (fl)	15	,587	CD3+/CD69+ (%) T2	14	,000	CD3-/NKp30+ Mean T2	14	,640
MCV T3 (fl)	10	,434	CD3+/CD69+ (%) T3	10	,176	CD3-/NKp30+ Mean T3	10	,067
MCV T4 (fl)	8	,092	CD3+/CD69+ (%) T4	7	,022	CD3-/NKp30+ Mean T4	7	,841
MCHC T0 (g/dl)	16	,764	CD3-/CD94+ (%) T0	36	,165	CD3-/NKp46+ (%) T0	36	,390
MCHC T1 (g/dl)	16	,063	CD3-/CD94+ (%) T1	16	,050	CD3-/NKp46+ (%) T1	16	,160
MCHC T2 (g/dl)	15	,417	CD3-/CD94+ (%) T2	14	,996	CD3-/NKp46+ (%) T2	14	,108
MCHC T3 (g/dl)	10	,045	CD3-/CD94+ (%) T3	10	,694	CD3-/NKp46+ (%) T3	10	,318
MCHC T4 (g/dl)	8	,117	CD3-/CD94+ (%) T4	7	,017	CD3-/NKp46+ (%) T4	7	,339
Thrombozyten T0 (G/l)	16	,376	CD3-/CD94+ Mean T0	36	,410	CD3-/NKp46+ Mean T0	36	,051
Thrombozyten T1 (G/l)	16	,796	CD3-/CD94+ Mean T1	16	,139	CD3-/NKp46+ Mean T1	16	,001
Thrombozyten T2 (G/l)	15	,304	CD3-/CD94+ Mean T2	14	,536	CD3-/NKp46+ Mean T2	14	,473
Thrombozyten T3 (G/l)	10	,615	CD3-/CD94+ Mean T3	10	,222	CD3-/NKp46+ Mean T3	10	,271
Thrombozyten T4 (G/l)	8	,901	CD3-/CD94+ Mean T4	7	,370	CD3-/NKp46+ Mean T4	7	,445
						Tregs (%) T0	36	,608
						Tregs (%) T1	14	,923
						Tregs (%) T2	14	,003
						Tregs (%) T3	10	,405
						Tregs (%) T4	9	,437

Tabelle 3 Normalverteilungstests der Variablen

Die Testung aller erhobenen Parameter auf Normalverteilung erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests; das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$, signifikante Werte sind in Rot hervorgehoben; Abkürzungen: df = Freiheitsgrade, Sig. = Signifikanzniveau

5.3 Vergleich der Patientenparameter mit dem gesunden Kontrollkollektiv

Als erstes wurden die in der Durchflusszytometrie erhobenen Patientendaten zum Zeitpunkt T0 mit einem Datensatz des Kontrollkollektivs verglichen. Es wurden jeweils die Gated % (in den Tabellen und Abbildungen mit dem Suffix „%“ oder „Prozent“ gekennzeichnet), also die prozentuellen Anteile verschiedener Lymphozytensubpopulationen an den Gesamtlmphozyten, sowie die Mean Fluorescence Intensity (Suffix „MFI“ oder „Mean“) verschiedener Oberflächenmarker, verglichen.

Tabelle 4 fasst die Vergleichsergebnisse zusammen; getestet wird die Nullhypothese, dass sich die Verteilungen des jeweiligen Patienten- und Kontrollparameters nicht unterscheiden. Das Signifikanzniveau beträgt $p < 0,05$.

Parameter	Kontrolle	Patient T0	Testverfahren	Signifikanz
CD3-/CD19+ %	9,38 ± 2,71	7,88 ± 3,93	t-Test	p = ,185
CD3+/CD56- %	68,23 ± 6,06	66,61 ± 6,07	t-Test	p = ,432
CD3+/CD69+ %	3,29 ± 1,64	4,31 ± 2,92	M-W-U-Test	p = ,408
CD3-/CD94+ %	7,58 ± 3,12	9,05 ± 3,97	t-Test	p = ,221
CD3-/CD94+ Mean	60,55 ± 16,83	57,22 ± 14,10	t-Test	p = ,531
CD3-/CD56+ %	11,79 ± 4,92	12,47 ± 4,39	t-Test	p = ,667
CD3-/CD56 + Mean	51,89 ± 11,55	45,59 ± 12,97	t-Test	p = ,133
CD56+/CD69+ %	2,05 ± 1,38	6,26 ± 3,41	M-W-U-Test	p < ,000
CD3-/CD69+ Mean	94,09 ± 29,01	84,68 ± 29,51	M-W-U-Test	p = ,504
CD3-/NKG2D+ %	12,63 ± 4,72	13,21 ± 4,43	t-Test	p = ,708
CD3-/NKG2D+ Mean	79,51 ± 19,74	54,64 ± 18,04	t-Test	p < 0,001
CD3-/NKp30+ %	8,13 ± 4,35	10,34 ± 4,03	t-Test	p = ,127
CD3-/NKp30+ Mean	64,42 ± 18,54	72,66 ± 36,04	M-W-U-Test	p = ,975
CD3-/NKp46+ %	11,48 ± 5,01	13,18 ± 4,46	t-Test	p = ,295
CD3-/NKp46+ Mean	152,99 ± 47,60	154,68 ± 61,19	t-Test	p = ,926
Tregs %	5,62 ± 1,26	5,93 ± 1,42	t-Test	p = ,495

Tabelle 4 Vergleich von Patienten- und Kontrollparameter

Analysiert werden Unterschiede der Patientenparameter zum Zeitpunkt T0 gegenüber dem Kontrollkollektiv $p < 0,05$; Abkürzungen: % = Gated %, Mean = MFI, MWU-Test = Mann-Whitney-U-Test

Betrachtet man den Verlauf der Gated % der NK-Zellreihen (CD3-/CD94+, CD3-/CD56+, CD56+/CD69+, CD3-/NKG2D+, CD3-/NKp30+, CD3-/NKp46+), fällt im Trend auf, dass die Patientenwerte tendenziell höher sind. Für die Zellreihe CD56+/CD69+ kann dieses Ergebnis signifikant nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Abbildung 8 und Tabelle 5 zeigen den Vergleich dieser CD56+/CD69+ Zellen (Gated %), bei dem die Patienten signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe aufweisen ($6,26 \pm 3,41$ vs. $2,05 \pm 1,38$).

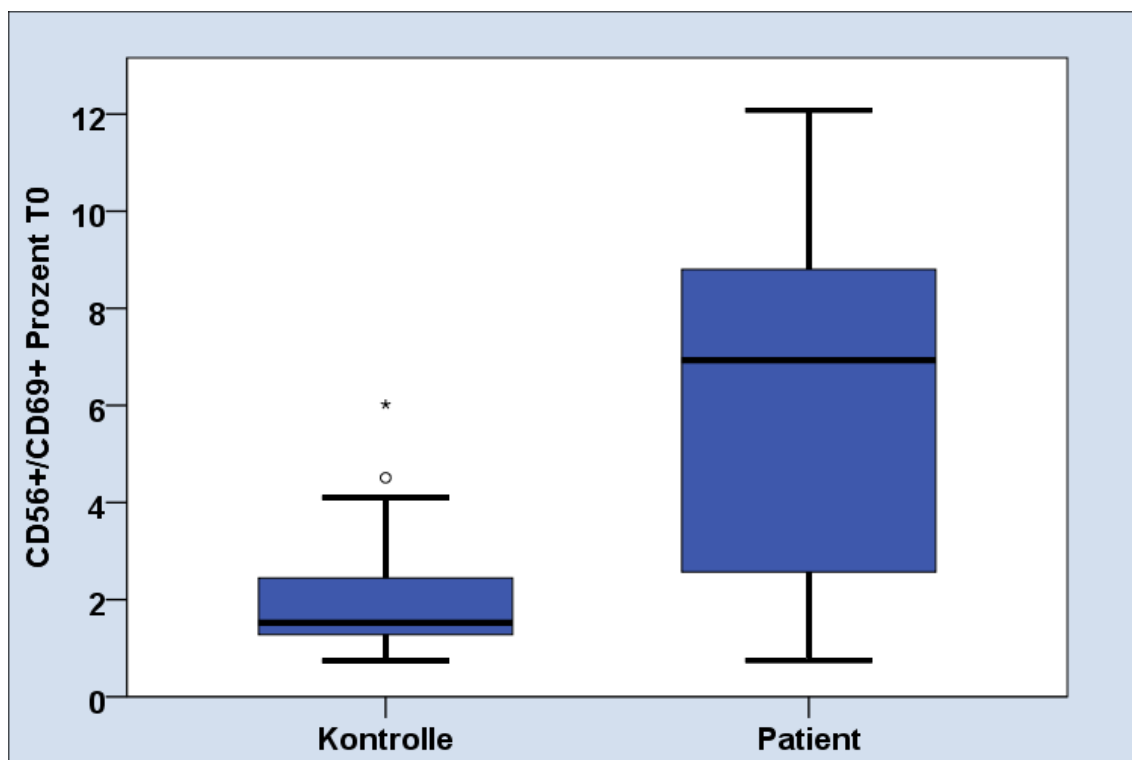


Abbildung 8 Vergleich der Gated % von CD56+/CD69+ NK Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe

Die Daten sind nicht normalverteilt; die Box repräsentiert die 25-75% Perzentile, der Strich in der Box zeigt den Median, die beiden Whiskers jeweils den höchsten und niedrigsten Wert und sie sind bei 1,5 Interquartilsabständen (IQR) abgeschnitten. Ausreisser (1,5-3 IQR außerhalb der Box) sind als Kreise dargestellt, Extremwerte (> 3 IQR außerhalb der Box) als Sternchen; Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,000$

	CD56+/CD69+ (%) T0		
	Gruppe		
	Kontrolle	Patient	gesamt
Mittelwert	2,05	6,26	3,92
Standardabweichung	1,38	3,41	3,24
Perzentil 25	1,28	2,57	1,46
Median	1,53	6,93	2,37
Perzentil 75	2,45	8,80	6,09
Minimum	,74	,75	,74
Maximum	6,02	12,08	12,08
Anzahl	20	16	36

Tabelle 5 Vergleich der Gated % von CD56+/CD69+ NK Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe

Die Daten sind nicht normalverteilt; Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,000$

Ergebnisse

Die MFI-Werte verschiedener NK-Zellrezeptoren der Patientengruppe zum Zeitpunkt T0 sind im Vergleich zum Kontrollkollektiv tendenziell verringert (CD94+, CD56+, CD69+, NKG2D). Die Patientengruppe weist signifikant niedrigere MFI-Werte ($54,64 \pm 18,04$ vs. $79,51 \pm 19,74$) des NKG2D Rezeptors auf CD3- Zellen auf.

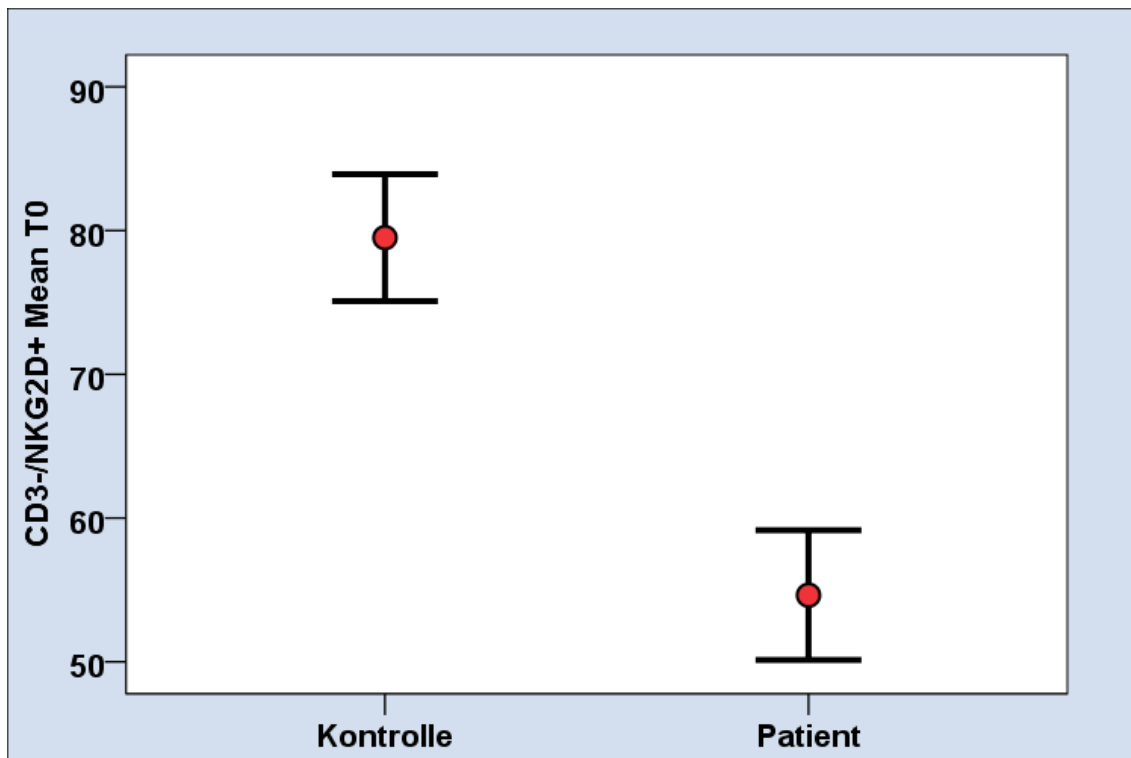


Abbildung 9 Vergleich der Expressionsdichte von NKG2D auf NK-Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe

Die Daten sind normalverteilt; der rote Punkt zeigt den Mittelwert, die beiden Antennen stellen den Standardfehler dar; t-Test, $p < 0,001$

	CD3-/NKG2D+ Mean T0		
	Gruppe		
	Kontrolle	Patient	gesamt
Mittelwert	79,51	54,64	68,45
Standardabweichung	19,74	18,04	22,54
Standardfehler des Mittelwerts	4,41	4,51	3,76
Perzentil 25	64,75	39,69	50,90
Median	72,54	47,56	66,00
Perzentil 75	91,24	62,78	82,23
Minimum	59,45	36,76	36,76
Maximum	128,50	90,91	128,50
Anzahl	20	16	36

Tabelle 6 Vergleich der Expressionsdichte von NKG2D auf NK-Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe

Die Daten sind normalverteilt; t-Test, $p < 0,001$

5.4 Analyse der Patientenparameter im Verlauf

Die Auswertung der Patientenparameter im Verlauf wird aufgeteilt dargestellt: der erste Teil zeigt die Ergebnisse der Parameter LDH, CRP und des großen Blutbildes; der zweite die Parameter der Durchflusszytometrie. Getestet wird jeweils die Nullhypothese, dass die Verteilungen des jeweiligen Parameters zum Zeitpunkt T0, T1, T2, T3 und T4 identisch sind, welche bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ abgelehnt wird.

5.4.1 LDH, CRP und großes Blutbild

Tabelle 7 fasst den Verlauf der Parameter zusammen; lediglich bei den Leukozyten kann eine signifikante Veränderung im Verlauf beobachtet werden. Um die Werte besser in einen Kontext setzen zu können, sind in Tabelle 8 die Normalwerte der Parameter des Klinikums rechts der Isar München dargestellt.

Zeitpunkt		T0	T1	T2	T3	T4	Test	Sig.
n	Gültig	16	16	15	10	8		
	Fehlend	0	0	1	6	8		
LDH (U/l)		182 ± 84,08	168 ± 32,23	159,5 ± 54,23	197,5 ± 42,90	163,5 ± 18,83	FT	0,434
CRP (U/l)		0,4 ± 0,67	0,65 ± 0,86	2,3 ± 1,63	0,45 ± 2,30	0,2 ± 1,71	FT	0,420
Leukozyten (G/l)		6,57 ± 2,09	5,54 ± 1,56	4,31 ± 2,69	5,38 ± 2,43	4,96 ± 0,72	FT	0,023
Erythrozyten (T/l)		4,38 ± ,085	4,33 ± ,133	4,26 ± 0,20	4,47 ± 0,22	4,56 ± 0,22	ALM	0,526
Hämoglobin (g/dl)		12,6 ± 0,91	12,6 ± 1,96	12,5 ± 1,84	12,5 ± 1,55	13,85 ± 1,49	FT	0,126
Hämatokrit (%)		37,96 ± 0,67	37,02 ± 0,98	35,88 ± 1,49	38,12 ± 1,56	39,213 ± 1,59	ALM	0,29
MCH (pg)		29,5 ± 2,06	29 ± 1,7	28 ± 1,92	28,5 ± 2,32	31 ± 1,89	FT	0,641
MCV (fl)		87,13 ± 1,15	86,13 ± 1,06	84,67 ± 1,05	85,7 ± 1,59	86,75 ± 1,60	ALM	0,423
MCHC (g/dl)		33,3 ± 0,83	33,9 ± 0,84	33,5 ± 1,16	33,35 ± 1,14	34,25 ± 0,80	FT	0,343
Thrombozyten (G/l)		276,19 ± 18,12	236,5 ± 20,54	240,2 ± 22,63	235,1 ± 19,88	223,88 ± 18,07	ALM	0,319
Neutrophile (%)		61,47 ± 2,85	73,36 ± 2,54	67,86 ± 3,25	67,8 ± 3,49	64,13 ± 3,92	ALM	0,537
Lymphozyten (%)		25 ± 9,47	11,5 ± 5,64	10 ± 7,29	15,5 ± 7,13	16 ± 8,11	FT	0,406
Monozyten (%)		9 ± 3,02	11 ± 3,41	13,5 ± 5,53	12,5 ± 3,64	12 ± 2,29	FT	0,123
Eosinophile (%)		2 ± 1,94	2 ± 2,21	3 ± 2,43	2 ± 3,01	1,5 ± 4,05	FT	0,632
Basophile (%)		1 ± 0,49	0,5 ± 0,51	1 ± 0,50	0 ± 0,50	0 ± 0,54	FT	0,406

Tabelle 7 Analyse der Patientenparameter LDH, CRP und des großen Blutbilds im Verlauf

T0 = vor Bestrahlung (RT), T1 = während RT bei 30 Gy, T2 = letzter Tag der RT, T3 = 6 Wochen nach RT, T4 = 6 Monate nach RT; Abkürzungen: Sig. = Signifikanz, FT = Friedmann's Test, ALM = Allgemein Lineares Modell

Ergebnisse

Parameter	Normalwerte Klinikum rechts der Isar München
LDH (U/l)	< 244
CRP (U/l)	< 0,5
Leukozyten (G/l)	4.0 - 9.0
Erythrozyten (T/l)	4.5 – 6.0
Hämoglobin (g/dl)	14 – 18 (Männer); 12,3 - 15,3 (Frauen)
Hämatokrit (%)	40 - 48 (Männer); 37 – 45 (Frauen)
MCH (pg)	27 – 32
MCV (fl)	82 - 92
MCHC (g/dl)	32 – 36
Thrombozyten (G/l)	150 – 450
Neutrophile (%)	40 – 70
Lymphozyten (%)	24 – 40
Monozyten (%)	4 - 10
Eosinophile (%)	< 4
Basophile (%)	0 - 1

Tabelle 8 Normalwerte der Blutbildparameter im Klinikum rechts der Isar München; Stand 2017

Auf einige klinisch besonders wichtige und aussagekräftige Parameter wird im folgenden genauer eingegangen:

Abbildung 10 und Tabelle 9 zeigen den Verlauf des Entzündungsparameters CRP (U/l), welcher während der Bestrahlung tendentiell steigt ($0,4 \pm 0,67$ (T0); $0,65 \pm 0,86$ (T1); $2,3 \pm 1,63$ (T2)) und in den anschließenden Nachuntersuchungen wieder abfällt ($0,45 \pm 2,30$ (T3); $0,2 \pm 1,71$ (T4)). Zum Zeitpunkt T1 und T2 befinden sich die CRP-Werte oberhalb des physiologischen Grenzwertes.

Ergebnisse

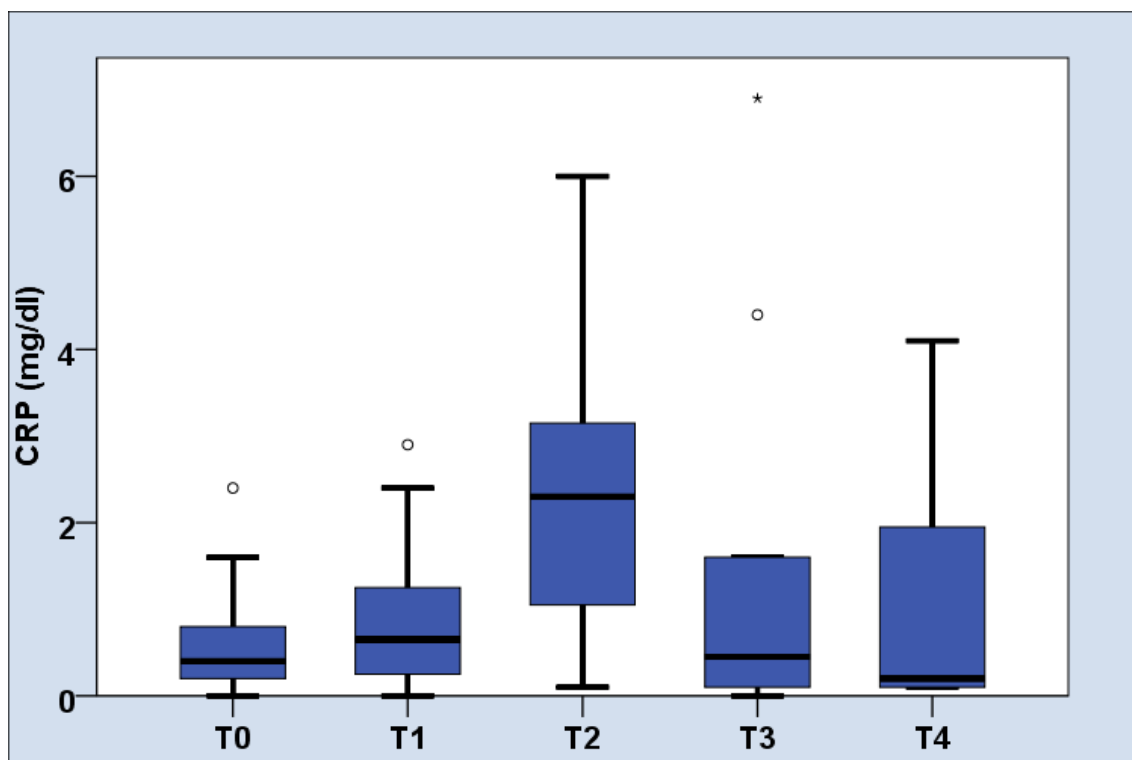


Abbildung 10 Verlauf des Entzündungsparameters CRP vor, während und nach Bestrahlung der Patienten

Die Daten sind nicht normalverteilt; die Box repräsentiert die 25-75% Perzentile, der Strich in der Box zeigt den Median, die beiden Whiskers jeweils den höchsten und niedrigsten Wert und sie sind bei 1,5 Interquartilsabständen (IQR) abgeschnitten. Ausreisser (1,5-3 IQR außerhalb der Box) sind als Kreise dargestellt, Extremwerte (> 3 IQR außerhalb der Box) als Sternchen; Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,000$

		CRP T0 (mg/dl)	CRP T1 (mg/dl)	CRP T2 (mg/dl)	CRP T3 (mg/dl)	CRP T4 (mg/dl)
n	Gültig	16	16	15	10	8
	Fehlend	0	0	1	6	8
Mittelwert		0,640	,900	2,220	1,570	1,088
Median		0,400	0,650	2,300	0,450	0,200
Standardabweichung		0,6685	0,8633	1,6280	2,3027	1,7117
Minimum		0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
Maximum		2,4	2,9	6,0	6,9	4,1
Perzentile	25	,200	,175	,800	,100	,100
	50	,400	,650	2,300	,450	,200
	75	1,000	1,275	3,300	2,300	2,775

Tabelle 9 Verlauf des Entzündungsparameters CRP vor, während und nach Bestrahlung der Patienten

Die Daten sind nicht normalverteilt; Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,000$

Die Verteilung der Leukozyten (G/l) verändert sich signifikant ($p = 0,023$) im Verlauf. Im Verlauf der Bestrahlung fallen die Leukozyten ($6,57 \pm 2,09$ (T0); $5,54 \pm 1,56$ (T1); $4,31 \pm 2,69$ (T2)). Es wird keine vollständige Erholung der Werte auf ihr ursprüngliches

Ergebnisse

Niveau bis 6 Monate nach der Bestrahlung beobachtet ($5,38 \pm 2,43$ (T3); $4,96 \pm 0,72$ (T4)).

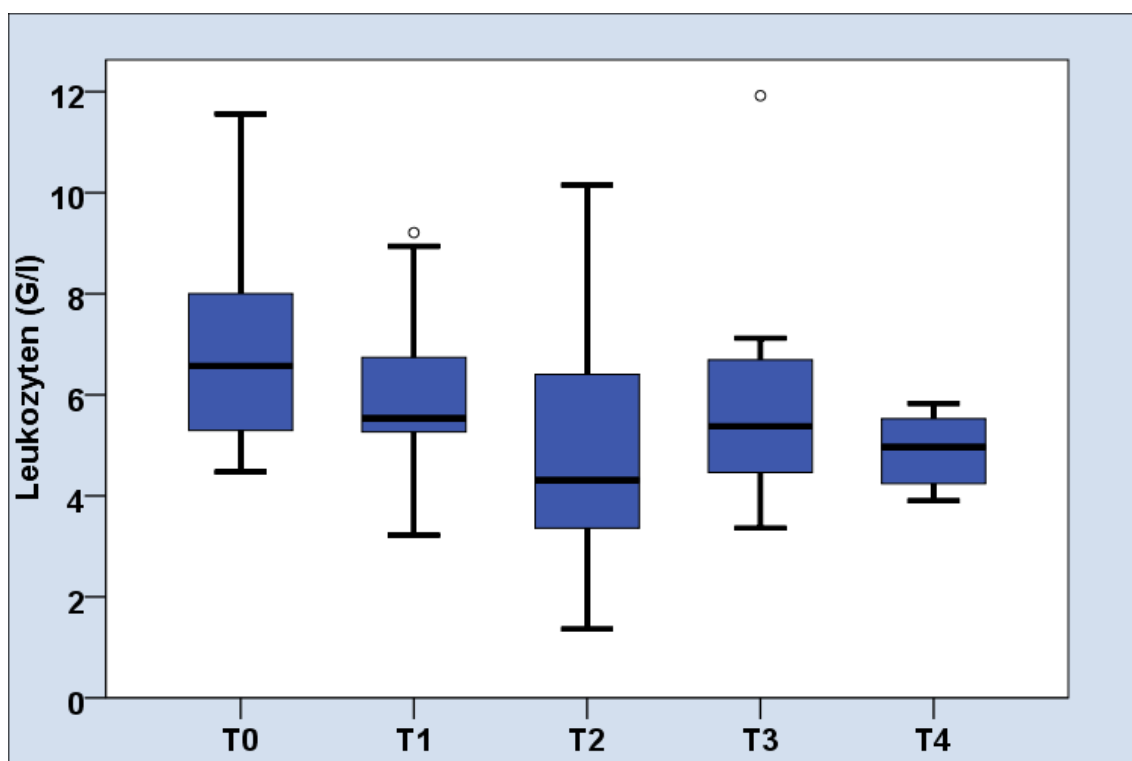


Abbildung 11 Verlauf der Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten

Die Daten sind nicht normalverteilt; die Box repräsentiert die 25-75% Perzentile, der Strich in der Box zeigt den Median, die beiden Whiskers jeweils den höchsten und niedrigsten Wert und sie sind bei 1,5 Interquartilsabständen (IQR) abgeschnitten. Ausreisser (1,5-3 IQR außerhalb der Box) sind als Kreise dargestellt, Extremwerte (> 3 IQR außerhalb der Box) als Sternchen; Friedmann's Test, $p = 0,023$

		Leukozyten T0 (G/l)	Leukozyten T1 (G/l)	Leukozyten T2 (G/l)	Leukozyten T3 (G/l)	Leukozyten T4 (G/l)
n	Gültig	16	16	15	10	8
	Fehlend	0	0	1	6	8
Mittelwert		6,9450	6,0962	4,8873	5,9110	4,8988
Median		6,5700	5,5350	4,3100	5,3750	4,9650
Standardabweichung		2,09030	1,55645	2,69304	2,43274	,71750
Minimum		4,47	3,22	1,36	3,36	3,90
Maximum		11,56	9,21	10,15	11,92	5,83
Perzentile	25	5,1525	5,2425	3,2200	4,2850	4,2250
	50	6,5700	5,5350	4,3100	5,3750	4,9650
	75	8,0800	6,7700	7,2900	6,7975	5,5275

Tabelle 10 Verlauf des Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten

Die Daten sind nicht normalverteilt; Friedmann's Test, $p = 0,023$

Ergebnisse

Ebenfalls näher dargestellt wird der Verlauf der Lymphozyten (%) (siehe Abbildung 12 und Tabelle 11), bei dem keine signifikante Änderung nachgewiesen wird ($p = 0,406$). Ähnlich wie bei den Leukozyten wird ein Abfall der Lymphozyten während der Bestrahlung beobachtet ($25 \pm 9,47$ (T0); $11,5 \pm 5,64$ (T1); $10 \pm 7,29$ (T2)), wobei die Werte in den beiden Nachsorgeuntersuchungen wieder leicht ansteigen ($15,5 \pm 7,13$ (T3); $16 \pm 8,11$ (T4)). Auch sie erreichten hierbei nicht wieder ihr Ausgangsniveau. Die Normalwerte des Klinikums rechts der Isar für Lymphozyten liegen bei 24 – 40 % (vgl. Tabelle 8, Seite 44). Bereits zum Zeitpunkt T0 befinden sich die Lymphozyten mit 25 % am unteren Grenzwert. Die Lymphozytenwerte für die Zeitpunkte T1-T4 liegen deutlich darunter und damit im lymphopenen Bereich.

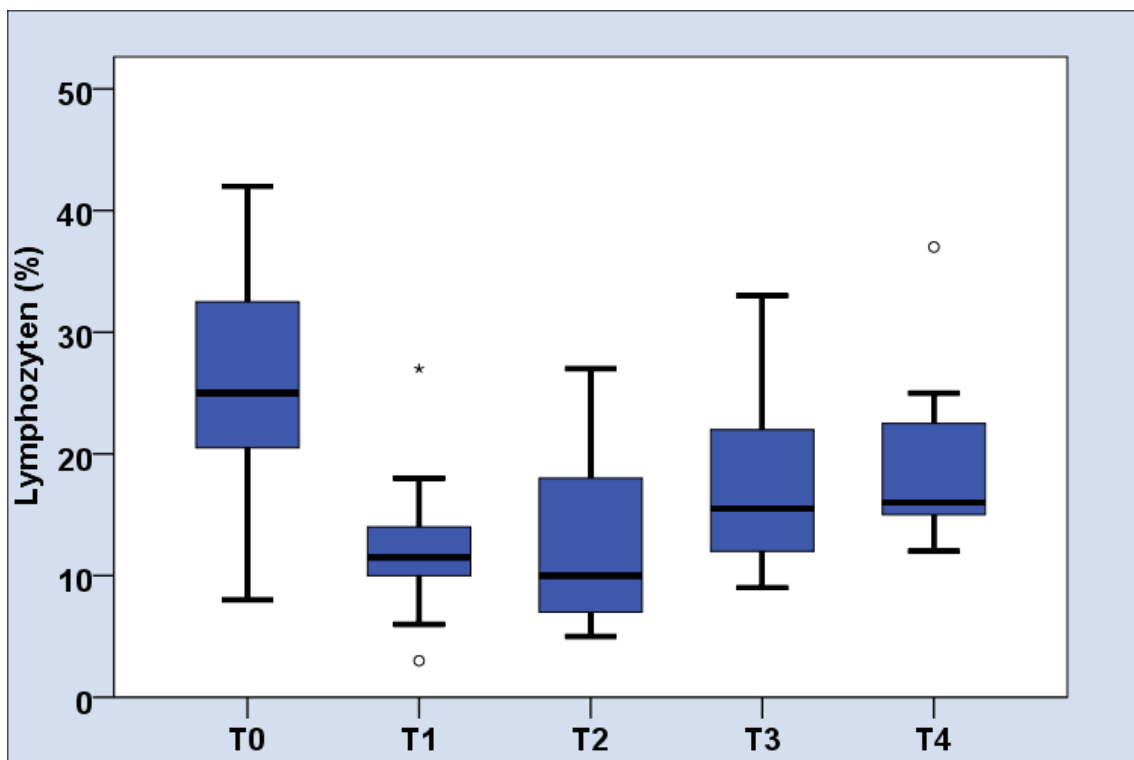


Abbildung 12 Verlauf der Lymphozyten anteilig an den Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten

Die Daten sind nicht normalverteilt; die Box repräsentiert die 25-75% Perzentile, der Strich in der Box zeigt den Median, die beiden Whiskers jeweils den höchsten und niedrigsten Wert und sie sind bei 1,5 Interquartilsabständen (IQR) abgeschnitten. Ausreisser (1,5-3 IQR außerhalb der Box) sind als Kreise dargestellt, Extremwerte (> 3 IQR außerhalb der Box) als Sternchen; Friedmann's Test, $p = 0,406$

Ergebnisse

		Lymphoz. T0 (%)	Lymphoz. T1 (%)	Lymphoz. T2 (%)	Lymphoz. T3 (%)	Lymphoz. T4 (%)
n	Gültig	15	14	14	10	8
	Fehlend	1	2	2	6	8
Mittelwert		25,87	12,14	13,36	17,30	19,50
Median		25,00	11,50	10,00	15,50	16,00
Standardabweichung		9,471	5,641	7,292	7,134	8,106
Minimum		8	3	5	9	12
Maximum		42	27	27	33	37
Perzentile	25	20,00	9,75	6,75	12,00	15,00
	50	25,00	11,50	10,00	15,50	16,00
	75	33,00	14,25	18,50	22,00	23,75

Tabelle 11 Verlauf der Lymphozyten anteilig an den Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten

Die Daten sind nicht normalverteilt; Friedmann's Test, $p = 0,406$

5.4.2 Parameter der Durchflusszytometrie

Aus den Gated % der nachfolgend dargestellten Zellreihen werden die absoluten Zellzahlen errechnet, welche auch anstatt der Gated % in Tabelle 12 und Tabelle 13 dargestellt sind. Grund hierfür ist, dass die Gated % lediglich den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellreihe an den Lymphozyten/Leukozyten darstellen. Das Patientenkollektiv zeigt aber signifikante Veränderungen der Leukozyten (vgl. 5.4.1), welche bei alleiniger Betrachtung der Gated % außer Acht gelassen werden und die Gated % so unter Umständen also nicht den tatsächlichen Verlauf der Zellreihe darstellen. Unter Kenntnis der Werte für Leuko- und Lymphozyten (vgl. Tabelle 7, S. 43) für die jeweiligen Messzeitpunkte können so mit der Formel

$$(\text{Gated \% (in Prozent)}) * (\text{Lymphozyten (in Prozent)}) * (\text{Leukozyten (G/l)})$$

die absoluten Zellzahlen errechnet werden.

Ergebnisse

Tabelle 12 zeigt den Verlauf der CD3-/CD19+ B-Zellen sowie die Veränderungen (sowohl Gated % als auch der MFI) verschiedener NK-Zellen und deren Rezeptoren (CD 56+, CD94+, NKG2D+, NKp30+ und NKp 46).

Zeitpunkt	T0	T1	T2	T3	T4	Test	Sig.
n gültig	16	16	15	10	8		
n fehlend	0	0	1	6	8		
CD3-/CD19+	127,70 ± 70,62	22,27 ± 24,28	20,11 ± 20,76	27,98 ± 40,02	72,68 ± 63,55	FT	0,126
CD3-/CD56+	243,68 ± 19,73	106,25 ± 14,03	96,53 ± 13,93	189,79 ± 22,28	220,44 ± 25,80	ALM	0,389
CD3-/CD56 Mean	57,22 ± 14,10	52,78 ± 16,75	62,14 ± 14,97	63,83 ± 17,41	55,90 ± 14,81	FT	0,042
CD3-/CD94+	188,58 ± 72,34	66,64 ± 48,35	55,73 ± 47,37	119,28 ± 54,64	136,09 ± 80,75	FT	0,231
CD3-/CD94+ Mean	57,22 ± 14,10	52,79 ± 16,75	62,15 ± 14,98	63,83 ± 17,42	55,89 ± 14,81	ALM	0,19
CD3-/NKG2D+	256,00 ± 79,59	106,78 ± 55,12	75,39 ± 58,26	178,36 ± 84,69	163,78 ± 80,45	FT	0,066
CD3-/NKG2D+ Mean	47,56 ± 18,04	51,84 ± 19,28	66,79 ± 79,44	50,26 ± 17,73	48,46 ± 9,76	FT	0,205
CD3-/NKp30+	188,58 ± 72,34	66,64 ± 48,35	55,73 ± 47,53	119,28 ± 54,64	136,09 ± 80,75	FT	0,092
CD3-/NKp30+ Mean	62,88 ± 36,04	68,25 ± 32,41	83,42 ± 40,87	56,69 ± 23,22	72,13 ± 21,63	FT	0,193
CD3-/NKp46+	236,79 ± 20,03	94,19 ± 14,17	84,45 ± 14,32	183,38 ± 22,30	188,56 ± 34,41	ALM	0,333
CD3-/NKp46+ Mean	136,63 ± 61,19	126,89 ± 83,24	177,42 ± 78,11	151,57 ± 71,83	170,84 ± 54,59	FT	0,042

Tabelle 12 Analyse der Durchflusszytometrieparameter von NK-Zellen der Patientengruppe im Verlauf

T0 = vor Bestrahlung (RT), T1 = während RT bei 30 Gy, T2 = letzter Tag der RT, T3 = 6 Wochen nach RT, T4 = 6 Monate nach RT; Abkürzungen: Sig. = Signifikanz, FT = Friedmann's Test, ALM = Allgemein Lineares Modell

Abbildung 13 zeigt graphisch den Verlauf der CD3-/CD19+ B-Zellen (Zellen/ μ l). Im Verlauf der Bestrahlung sinken die Zellzahlen stark ab (127,70 ± 70,62 (T0), 22,27 ± 24,28 (T1), 20,11 ± 20,76 (T2)). Während der ersten Nachsorgeuntersuchung, 3 Monate nach Bestrahlung, zeigen die Zellzahlen noch keine Veränderung (27,98 ± 40,02 (T3)) – erst 6 Monate nach Bestrahlung scheinen die Zellzahlen wieder leicht anzusteigen (72,68 ± 63,55 (T4)).

Ergebnisse

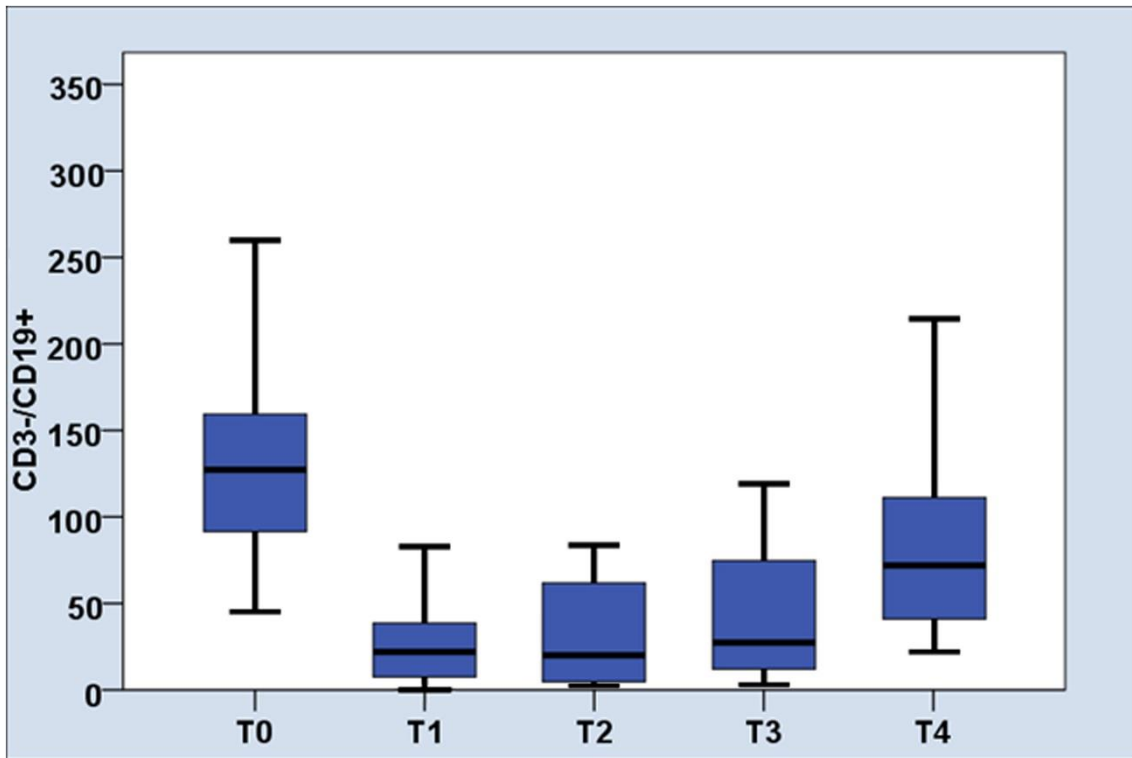
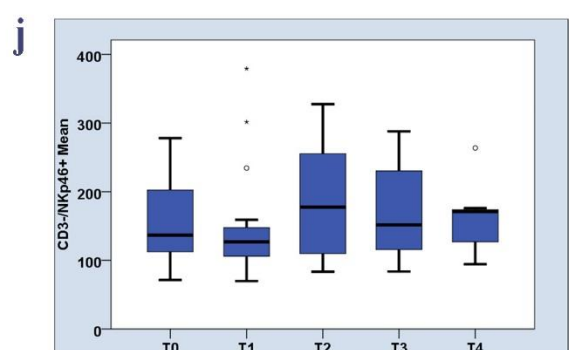
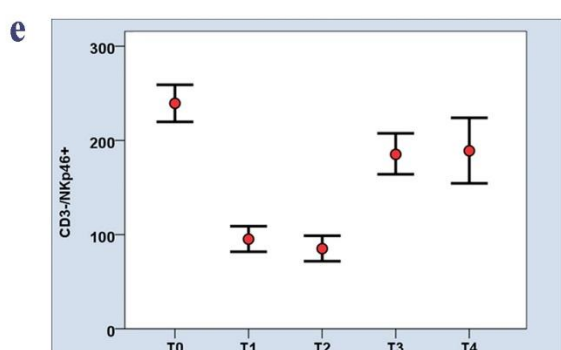
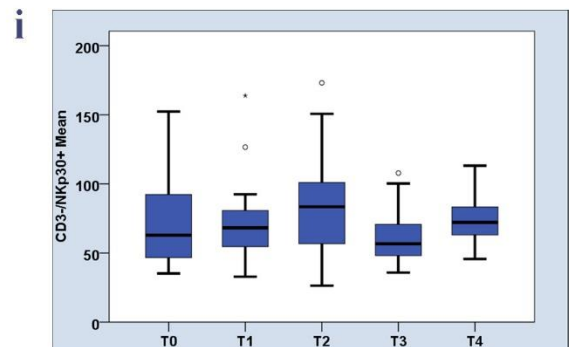
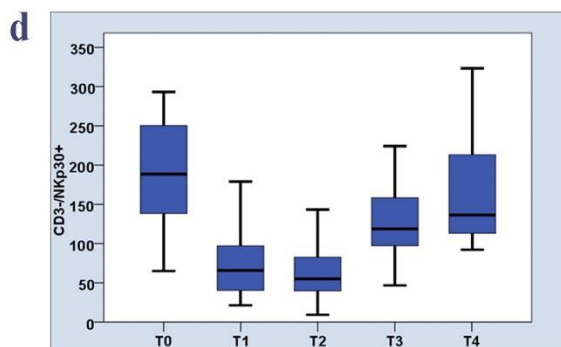
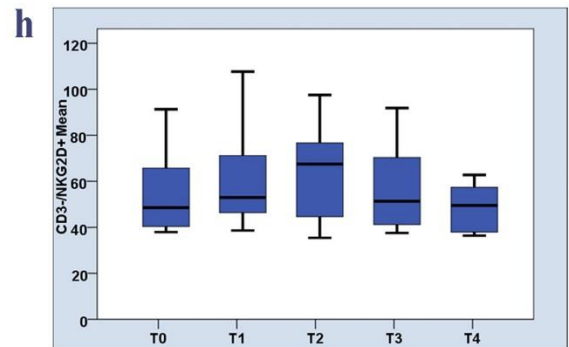
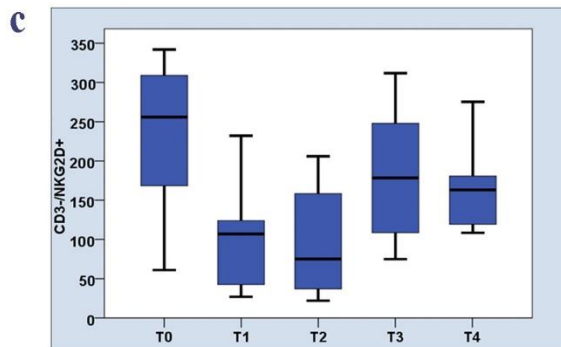
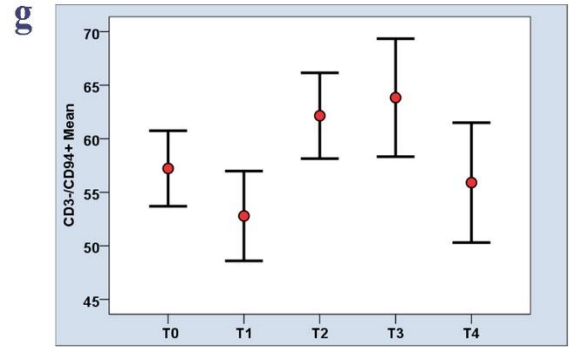
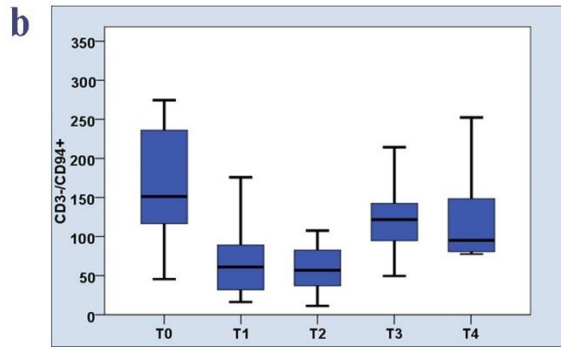
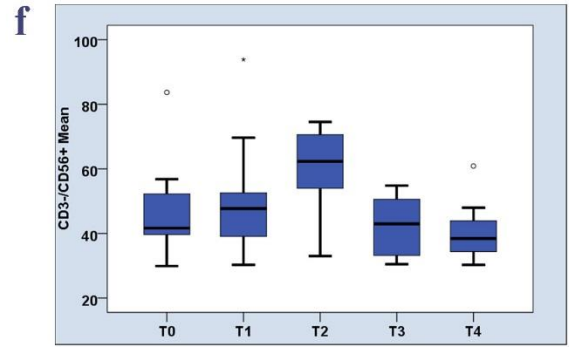
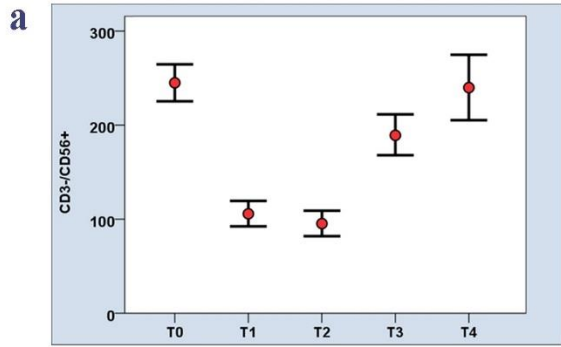


Abbildung 13 Verlauf der CD3-/CD19+ B-Lymphozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten

Die Daten sind nicht normalverteilt; die Box repräsentiert die 25-75% Perzentile, der Strich in der Box zeigt den Median, die beiden Whiskers jeweils den höchsten und niedrigsten Wert und sie sind bei 1,5 Interquartilsabständen (IQR) abgeschnitten. Ausreisser (1,5-3 IQR außerhalb der Box) sind als Kreise dargestellt, Extremwerte (> 3 IQR außerhalb der Box) als Sternchen; Friedmann's Test, $p = 0,126$

Abbildung 14 stellt den Verlauf der in Tabelle 13 gelisteten NK-Zell-Parameter dar. Betrachtet man den Trend von CD3-/CD94+, CD3-/NKG2D+, CD3-/NKp30+ and CD3-/NKp46+ NK Zellen fällt auf, dass die Zellzahlen aller Zellreihen während der Bestrahlung abnehmen, am Ende der Bestrahlung ein Minimum erreichen und bereits zum ersten Nachsorgetermin, 3 Monate nach Bestrahlung, wieder ansteigen. Die MFI der jeweiligen Oberflächenmarker scheint sich gegensätzlich zu verhalten - hier wird ein Anstieg im Verlauf der Bestrahlung beobachtet, welcher in einem Maximum zum Ende der Bestrahlung mündet und im Nachsorgezeitraum wieder abfällt. Für CD56 und NKp46 werden diese Veränderungen signifikant nachgewiesen.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 14 Verschiedene NK-Zellgruppen des Patientenkollektivs werden vor, während und nach Bestrahlung auf Veränderungen hinsichtlich ihrer Zellzahlen (a,b,c,d,e) und der Mean fluorescence intensity (mean) ihrer Oberflächenmarker (f,g,h,i,j) untersucht; genau wie in den vorherigen Abbildungen werden normalverteilte Variablen (a,e,g) mit Mittelwerten und Fehlerbalken und nicht normalverteilte Variablen (b,c,d,f,h,i,j) mit blauen Boxplots dargestellt.

- (a) CD3-/CD56+ (cells/ μ l); Allgemein lineares Modell, $p = 0,389$
 (b) CD3-/CD94+ (cells/ μ l); Friedmann's Test, $p = 0,231$
 (c) CD3-/NKG2D+ (cells/ μ l); Friedmann's Test, $p = 0,066$
 (d) CD3-/NKp30+ (cells/ μ l); Friedmann's Test, $p = 0,092$
 (e) CD3-/NKp46+ (cells/ μ l); Allgemein lineares Modell, $p = 0,333$
 (f) CD3-/CD56+ mean; Friedmann's Test, $p = 0,042$
 (g) CD3-/CD94+ mean; Allgemein lineares Modell, $p = 0,019$
 (h) CD3-/NKG2D+ mean; Friedmann's Test, $p = 0,205$
 (i) CD3-/NKp30+ mean; Friedmann's Test, $p = 0,193$
 (j) CD3-/NKp46+ mean; Friedmann's Test, $p = 0,042$

Tabelle 13 zeigt den Zellzahlverlauf der CD3+/CD56- und CD3+/CD69+ T-Zellen und CD56+/CD69+ NK-Zellen sowie die MFI der CD3-/CD69+ NK-Zellen und den Verlauf der Tregs.

Zeitpunkt	T0	T1	T2	T3	T4	Test	Sig.
n gültig	16	16	15	10	8		
n fehlend	0	0	1	6	8		
CD3+/CD56-	1196 \pm 27	482 \pm 18	417 \pm 20	644 \pm 28	513 \pm 40	ALM	0,404
CD3+/CD69+	60 \pm 52	29 \pm 84	49 \pm 94	100 \pm 34	34 \pm 25	FT	0,071
CD56+/CD69+	124 \pm 61	35 \pm 29	38 \pm 49	54 \pm 27	62 \pm 45	FT	0,606
CD3-/CD69+ Mean	84,35 \pm 29,51	86,84 \pm 43,42	105,27 \pm 54,77	93,62 \pm 29,00	96,98 \pm 26,77	FT	0,171
Tregs %	5,59 \pm 1,42	4,29 \pm 1,90	6,80 \pm 3,76	4,48 \pm 2,19	3,14 \pm 2,66	FT	0,434

Tabelle 13 Analyse der Durchflusszytometrieparameter von T-Lymphozyten, NK-Zellen und Tregs der Patientengruppe im Verlauf

T0 = vor Bestrahlung (RT), T1 = während RT bei 30 Gy, T2 = letzter Tag der RT, T3 = 6 Wochen nach RT, T4 = 6 Monate nach RT; Abkürzungen: Sig. = Signifikanz, FT = Friedmann's Test, ALM = Allgemein Lineares Modell

Die T-Zellen fallen im Verlauf der Bestrahlung ab, steigen zur ersten Nachsorgeuntersuchung wieder an und fallen zur letzten Nachsorgeuntersuchung wieder ab. Der Verlauf der Zellzahlen von CD56+/CD69+ NK-Zellen sowie die MFI der CD3-/CD69+ NK-Zellen folgt prinzipiell dem Verlauf der in Tabelle 12 dargestellten NK-Zell-Parameter. Der Verlauf der Treg Gated % lässt keinen eindeutigen Trend erkennen.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert als prospektive Pilotstudie explorativ immunologische Phänomene bei SCCHN Patienten vor, während und nach Strahlentherapie. Hierfür werden 25 Patienten, die in der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie des Klinikums rechts der Isar München bestrahlt worden sind, ca. 2 Wochen vor Bestrahlungsbeginn für die Studie rekrutiert. Ihnen werden zu festgelegten Zeitpunkten, vor, während und nach Strahlentherapie, Blut entnommen, das analysiert wird. Die Blutwerte des Patientenkollektivs vor Bestrahlung werden mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen, um immunologische Veränderungen, ausgelöst durch SCCHN, zu erforschen. Außerdem werden die Patientenparameter im Verlauf analysiert, um die Auswirkung der lokalen Strahlentherapie auf immunologische Veränderungen zu untersuchen.

6.1 Vergleich der Patientenparameter mit dem Kontrollkollektiv

Im ersten Schritt werden die Patientenparameter zum Zeitpunkt T0 mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen. B- und T-Lymphozyten zeigen allenfalls nur geringe Unterschiede, welche nicht ausreichen, um neue Informationen über deren Eigenschaften bei HNSCC-Patienten unter und nach Strahlentherapie zu gewinnen.

Bezüglich der CD4⁺-CD25⁺ Regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) sollen im Rahmen der Studie neue Erkenntnisse über diese Zellreihe bei HNSCC-Patienten gewonnen werden. Der Transkriptionsfaktor „Forkhead Box P3“ (FoxP3) ist von zentraler Wichtigkeit bei der Entwicklung und Funktion von Regulatorischen T-Lymphozyten (Hori et al., 2017). FoxP3 ist ein spezifischer Marker, mit dem Regulatorische T-Lymphozyten in der Immunphänotypisierung identifiziert werden können (Ang et al., 2010). Tregs sind unter anderem imstande, Immunantworten herunter zu regulieren. Im physiologischen Zustand spielen Tregs so eine wichtige Rolle für die Selbsttoleranz des Immunsystems im menschlichen Körper – sie wirken zum Beispiel Autoimmunkrankheiten entgegen (Christoffersson und Herrath, 2019). In den letzten Jahren haben Regulatorische T-Lymphozyten einen hohen Stellenwert in der Onkologie erlangt, weil sie mit Immunabwehrstrategien von Tumoren in Zusammenhang gebracht worden sind. Prinzipiell sind Zellen des menschlichen Immunsystems imstande, maligne transformierte Zellen zum Beispiel über den MCH Klasse I Mechanismus zu erkennen und zu vernichten. In vivo ist dies allerdings oft nicht der Fall, weil Tumore verschiedene Tumorescapemechanismen entwickelt haben, um der Kontrolle der Immunzellen zu entkommen. Regulatorische T-Lymphozyten können zu dieser Tumorummunität beitragen, indem sie die Aktivität anderer Immunzellen runterregulieren und so eine Antwort des Immunsystems auf die Krebszellen unterdrücken (Casares et al., 2003; Nishikawa et al., 2005; Prasad et al., 2005). Verschiedene Studien beschrieben erhöhte Werte von Tregs im Blut von Krebspatienten (Sasada et al., 2003; Viguier et al., 2004; Wolf et al., 2003). Außerdem wurden erhöhte Werte von Tregs bei Krebspatienten verschiedener Entitäten wie zum Beispiel Brustkrebs, Ovarialkarzinome, hepatozelluläre Karzinome und Magenkarzinome mit schlechteren Prognosen in Verbindung gebracht (Bates et al., 2008; Curiel et al., 2004; Fu et al., 2007; Sasada et al., 2003). Neue Therapieansätze beschäftigen sich mit der Störung der Treg Aktivität und damit der Unterbindung dieses Tumorescapemechanismus (Ruter et al., 2009). Im Rahmen der vorliegenden Studie kann kein signifikanter Unterschied bezüglich der Treg Werte beim Vergleich von Patienten- und Kontrollkollektiv ($5,62 \pm 1,26$ vs. $5,93 \pm 1,42$)

Diskussion

nachgewiesen werden. Auch bei der Analyse der Tregs der Patientengruppe im Therapieverlauf lässt sich kein eindeutiger Trend erkennen.

„Tumore, die sich in einem immunkompetenten Patienten entwickeln, sind entweder der Überwachung des Immunsystems entkommen oder die gegen sie gerichtete Immunantwort reicht nicht aus, um das Tumorwachstum zu verhindern. Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Immuntherapien hat die Definition und Identifizierung von Mechanismen, die zum „Immune escape“ von Tumoren führen, in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen“ (Seliger 1999 5: 668, (Seliger und Huber, 1999)).

NK-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Immunüberwachung von maligne entarteten Zellen. Sie sind in der Lage, präkanzeröse und kanzeröse Zellen zu erkennen und zu zerstören (Kim et al., 2007; Parham und Janeway, 2015; Whiteside, 2006). Ihre Zytotoxizität wird durch aktivierende und inaktivierende Rezeptoren sowie deren Liganden gesteuert (Moretta et al., 2001). Es ist bekannt, dass NK Zellen die Prognose und das Outcome von SCCHN Patienten maßgeblich beeinflussen können (Schantz und Goepfert, 1987; Schantz et al., 1986b; Schantz et al., 1986a).

Das untersuchte Patientenkollektiv zeigt tendenziell bei allen getesteten NK-Zellsubpopulationen (CD3-/CD94+, CD3-/CD56+, CD56+/CD69+, CD3-/NKG2D+, CD3-/NKp30+, CD3-/NKp46+) höhere Gated % Werte als das gesunde Vergleichskollektiv. Für CD56+/CD69+ NK-Zellen können sogar signifikant höhere Werte gezeigt werden. Die Zunahme der NK-Zellreihen und im Speziellen auch die Proliferation der CD69+ Zellen kann als Reaktion des Körpers auf die Tumorerkrankung gedeutet werden, welcher versucht immunkompetente Zellen gegen das Malignom zu mobilisieren. Trotz dieser quantitativen Zunahme der NK-Zellen zeigt der Vergleich der MFI-Werte verschiedener NK-Zellrezeptoren (CD94+, CD56+, CD69+, NKG2D) bei der Patientengruppe tendenziell eine Deprivation der Rezeptoraktivität. Verschiedene Studien beschreiben ebenfalls eine Aktivitätsminderung von NK-Zellen bei SCCHN unabhängig von Tumorlokalisierung, Tumorstadium oder der Exposition von Karzinogenen (Accomando et al., 2012; Molling et al., 2007; Wulff et al., 2009). Einen Erklärungsversuch bietet der PD-1/PD-L1 (Programmed Death 1) Immun-Checkpoint-Mechanismus, welcher die Immunantwort des Körpers runterregulieren kann. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass neben CD8+ T-Lymphozyten auch NK Zellen den Rezeptor PD-1 exprimieren. PD-1 wurde dabei nicht auf allen NK-Zellreihen gleichmäßig exprimiert, sondern gehäuft auf besonders aktiven NK-Zellen, wie z.B. der CD69+ Zellreihe nachgewiesen (Hsu et al., 2018). Weiter wurde PD-L1 auf SCCHN-

Diskussion

Tumorzellen nachgewiesen – aus beiden resultierte eine geringere NK-Zellantwort auf den Tumor und damit einhergehend ein aggressiverer Tumorverlauf *in vivo*. Deswegen muss davon ausgegangen werden, dass, obwohl das Patientenkollektiv hohe Werte an CD56+/CD69+ NK-Zellen aufweist, diese möglicherweise durch die verstärkte Expression des Immun-Checkpoint-Inhibitors PD-1 inaktiviert werden und diese NK-Zellen bei der Tumorbekämpfung effektiv nur eine geringe Aktivität aufweisen. Die Blockade des PD1/PD-L1-Mechanismus stellt damit einen sehr vielversprechenden neuen Ansatz für Immuntherapien dar, welcher das Outcome für verschiedene Krebserkrankungen verbessern kann (Brahmer et al., 2012; Callahan et al., 2014). Das Medikament Nivolumab (Opdivo®) ist ein Immun-Checkpoint-Inhibitor des PD-1/PD-L1-Mechanismus und wird bereits in der Rezidivtherapie von SCCHN eingesetzt, sofern die PD-L1-Expression des Tumors 1% übersteigt.

Einer der wichtigsten aktivierenden NK-Zellrezeptoren ist der “Natural Killer Group 2D” Rezeptor oder kurz NKG2D. Neben NK-Zellen ist er ebenfalls auf T-Zellen und NKT-Zellen zu finden. Bei NKG2D handelt es sich um einen C-Typ Lektin Rezeptor (kurz CTL), welcher stressinduzierte Liganden, wie zum Beispiel MHC Klasse I assoziierte Moleküle, auf der Oberfläche maligne transformierter Zellen erkennen und binden kann (Konjevic et al., 2012).

Weil et al. (Weil et al., 2017) beschrieben den NKG2D Mechanismus als sehr wichtigen Tumorescapemechanismus bei HNSCC, indem die Tumorzellen verschiedene Liganden von NKG2D, die NKG2DLs sowohl überexprimierten als auch von der Zelloberfläche abstießen. Dadurch wird die Funktion des aktivierenden Rezeptors NKG2D gehemmt. Dies inhibierte NK-Zellen in ihrer physiologischen Aktivität. Das Plasmalevel dieser NKG2DLs korrelierte mit der Inhibition und damit auch dem Krankheitsprogress. Es wurde gezeigt, dass im Beisein von hohen NKG2DL-Spiegeln in SCCHN-Patienten NK-Zellen daran scheitern, in den Primärtumor einzudringen.

Zusammengefasst ist NKG2D ein zentraler Bestandteil der Zellüberwachung durch das Immunsystem, indem der Rezeptor Zytotoxizität durch NK- und T-Lymphozyten vermitteln kann. Verschiedene Tumore, darunter auch SCCHN, haben einen Tumorescapemechanismus entwickelt, indem sie NKG2DLs überexprimieren und abstoßen. (Oppenheim et al., 2005; Weil et al., 2017). Damit schränken sie die Funktion des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2D ein. Auch die untersuchte Patientengruppe weist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere MFI-Werte des NKG2D Rezeptors auf CD3- NK-Zellen auf. Dies ist nur ein Beispiel, wie Tumore die Aktivität

der so wichtigen NK-Zellen hemmen. Demzufolge zielen innovative immunotheapeutische Konzepte unter anderem auf die Wiederherstellung der NK-Zellaktivität und im Speziellen des NKG2D-Mechanismus ab, um Tumorzellen effektiv zu bekämpfen. Momentan wird eine Vielzahl von verschiedenen adjuvanten Therapien auf ihre Kapazität bezüglich der Restimulation der NK-Zellaktivität untersucht. Es wurde gezeigt, dass verschiedene monoklonale Antikörper wie zum Beispiel Cetuximab oder Nimotuzumab die NK-Zellaktivität bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich anregen können (Mazorra et al., 2017; Trivedi et al., 2016). Bhattacharya et al. (Bhattacharya et al., 2017) konnten zeigen, dass sogar Bittermelonenextrakt in vitro die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich steigert, indem es unter anderem die Expression der Oberflächenmarker CD16 und NKp30 erhöht. Die lokale Strahlentherapie stellt eine zentrale Säule in der Therapie von SCCHN dar. Ihre Auswirkung auf Immunzellen und besonders NK-Zellen, welche den Krankheitsverlauf maßgeblich beeinflussen können, ist noch nicht ausreichend verstanden und soll deswegen im Folgenden näher untersucht werden.

6.2 Analyse der Patientenparameter im Verlauf

Um Auswirkungen und Zusammenhänge der Strahlentherapie auf Blutzellen und besonders auf Immunzellen bei SCCHN-Patienten aufzudecken, werden die Patientenparameter im Verlauf der Strahlentherapie und der Nachsorgeperiode miteinander verglichen.

6.2.1 Erythrozyten

Bezüglich der Erythrozytenzahlen kann allenfalls eine leichte Senke während der Bestrahlung festgestellt werden. Auch die übrigen erythrozytenassoziierten Laborparameter Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCV, MCHC verändern sich während der Bestrahlung nur sehr wenig bis gar nicht. Prinzipiell ist eine Reduktion der Erythrozyten bis hin zur Anämie zwar eine mögliche Nebenwirkung der Strahlentherapie, aber für Kopf-Halstumore eher selten beschrieben. Klinisch relevant zeigen sich jedoch die Hämoglobinwerte zum Zeitpunkt T0. Mit einem Hämoglobinwert von $12,6 \pm 0,91$ g/dl bei einem Männeranteil von 75% (welche physiologisch leicht höhere HB-Werte ausweisen) ist die Patientengruppe grenzwertig anämisch. Der untere Grenzwert des Klinikums rechts der Isar für Hämoglobin beträgt bei Männern ungefähr 14 g/dl und für Frauen circa 12,3 g/dl. Die optimale Oxygenierung von Tumorzellen trägt zum Erfolg der Bestrahlung bei, da in Anwesenheit von Sauerstoff durch die ionisierende Strahlung

zytotoxische freie Radikale entstehen. Ein niedriger Hämoglobinwert ist ein negativer prognostischer Faktor für den Erfolg der Strahlentherapie bei Kopf-Halstumoren. Bisher konnte allerdings noch keine Verbesserung des Outcomes durch eine Anhebung des Hämoglobinwertes vor oder während der Bestrahlung gezeigt werden (Hoff, 2012). SCCHN-Patienten im Allgemeinen, besonders jene mit einem niedrigen Hämoglobinwert, sind angehalten das Rauchen aufzugeben. Das Kohlenstoffmonoxid im Zigarettenrauch mindert weiter die Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins und damit die suffiziente Oxygenierung des Tumors. Rauchen ist deshalb mit einem schlechteren Outcome der Strahlentherapie vergesellschaftet (Ang et al., 2010).

6.2.2 Thrombozyten

Die Thrombozytenzahlen der Patientengruppe werden von der Strahlentherapie beeinflusst. Es ist eine Reduktion der Zellzahlen bereits zur Mitte der Bestrahlung (T1) zu beobachten, welche sich auch bis zum 6. Monat nach Bestrahlung nicht erholt. Ähnliche Verläufe wurden in der Literatur beschrieben (Mac Manus et al., 1997). Die Zellzahlen bleiben dabei immer im Normalbereich des Klinikums rechts der Isar. Thrombozyten sind ein wichtiger Faktor der Hämostase und auch der Krankheitsprognose. Thrombosen treten als Komplikation gehäuft bei Tumorerkrankungen auf und können zum Beispiel in Form einer Lungenembolie tödlichen Ausgang haben (Khorana und Connolly, 2009). Die Thrombozytenaktivität kann den Krankheitsprogress beeinflussen – aktivierte Thrombozyten können als Pfropf Tumorzellen vor Immunzellen und deren Zytotoxizität abschirmen und die Zellen sogar gewissermaßen in die Peripherie eskortieren und damit das Metastasierungspotential bestimmter Tumore erhöhen. Die Inaktivierung von Thrombozyten kann wiederum das Metastasierungspotential von Tumoren verringern (Labelle et al., 2011). Es bleibt allerdings fraglich, ob die geringe Regression der Thrombozyten durch Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich hoch genug ist, um einen klinischen Unterschied zu machen.

6.2.3 C-Reaktives Protein

Die erhobenen Daten zeigen, dass der Entzündungsparameter C-Reaktives Protein während der Bestrahlung deutlich ansteigt und in der Nachsorgeperiode relativ zügig wieder abfällt. Zum Ende der Bestrahlung übersteigt er auch den physiologischen oberen Grenzwert des Klinikums rechts der Isar München. Der Verlauf des Akute-Phase Proteins CRP deckt sich mit anderen Forschungsergebnissen und kann durch strahlenabhängige Entzündungsreaktionen erklärt werden. Im Bestrahlungsvolumen bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich wird viel Schleimhautgewebe mit bestrahlt, welches sehr sensitiv auf die

ionisierende Strahlung reagiert. Entzündungen im Mund-Rachenraum sind extrem schmerzhaft und gehören zu den am meisten belastenden Nebenwirkungen der Radiotherapie für HNSCC-Patienten, weil sie die Lebensqualität stark einschränken (Chethana et al., 2015; Dovšak et al., 2018; Mohammed et al., 2012). Mohammed et al. beschreiben CRP als einen objektiven und sensitiven Marker für diese strahleninduzierte Mucositis. CRP reagiert dabei sehr dynamisch auf die Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich – er steigt bei Bestrahlung rasch an und fällt nach Beendigung der Strahlentherapie ebenso rasch wieder ab. Außerdem kann CRP durch sonstige Infektionen ansteigen, welche im Rahmen der Immunkompromittierung als Folge von Radio- oder Radiochemotherapie gehäuft auftreten (van Meir et al., 2017).

6.2.4 Neutrophile Granulozyten

Ähnlich zum CRP zeigt sich der Verlauf der Neutrophilen Granulozyten, welche ebenfalls als Indikatoren für Inflammation und Entzündung gelten. Es lässt sich ein leichter Anstieg während der Bestrahlung beobachten, der 6 Monate nach der Bestrahlung fast wieder auf den ursprünglichen Level abgesunken ist. Eigentlich hätte man einen gegensätzlichen Verlauf erwarten können, denn eine Neutropenie wird als häufige Komplikation der Strahlentherapie genannt (Mac Manus et al., 1997). Eine strahlentherapieinduzierte Neutropenie ist allerdings eher mit größeren Bestrahlungsfeldern, als es bei SCCHN der Fall ist, assoziiert. Außerdem kommt es bei Bestrahlung des Kopf-Hals-Bereiches fast immer zu einer strahleninduzierten Mucositis, welche in der Beeinflussung der Neutrophilen möglicherweise überwiegen und die vorliegende Erhöhung der Neutrophilen Granulozyten erklären könnte. Es wurde herausgefunden, dass Neutrophile Granulozyten im peripheren Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren funktionelle Unterschiede zu den Granulozyten im Blut von gesunden Spendern aufweisen (Trellakis et al., 2011). Möglicherweise beeinflussen diese veränderten Neutrophilen den Krankheitsverlauf sogar negativ, indem sie zum Beispiel die Metastasierung von Tumorzellen vorantreiben (Wu et al., 2011). Die alleinige Analyse der Zellzahlen von Neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut lässt im Rahmen dieser Arbeit allerdings keine weiteren Rückschlüsse auf die komplexen Interaktionen von Neutrophilen Granulozyten und dem Immunsystem bei Kopf-Hals-Tumoren zu.

6.2.5 Leukozytenzahl und Lymphozyten

Die Verteilung der Leukozyten verändert sich signifikant im Verlauf. Im Bestrahlungszeitraum fallen die Leukozytenzahlen ab, wobei auch bis 6 Monate nach

Bestrahlung keine vollständige Erholung beobachtet wird. Ein ganz ähnlicher Verlauf wird bei den Lymphozyten beobachtet, welche prozentual ebenfalls während der Bestrahlung abnehmen und sich bis zum 2. Nachsorgetermin, 6 Monate nach Bestrahlung, auch nicht vollständig erholt haben. Vergleichbare Ergebnisse wurden von anderen Studien beschrieben, bei denen sich die Zellen sogar ein Jahr nach Ende der Strahlentherapie noch nicht auf ihr ursprüngliches Level erholt haben (Dovšak et al., 2018).

6.2.6 B-Lymphozyten und NK-Zellen

Bei der Analyse der Lymphozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie fällt auf, dass die Zellzahlen sowohl von B-Lymphozyten als auch von verschiedenen NK-Zellreihen während der Radiotherapie absinken. Der Kopf-Hals-Bereich enthält viele lymphatische Organe, wie zum Beispiel Tonsillen, Lymphknotenstränge vor und hinter den Ohren, okzipital sowie entlang des Halses und im Bereich des Unterkiefers und ist damit Reservoir zahlreicher Lymphozyten. Diese lymphatischen Organe liegen zu großen Teilen innerhalb des Bestrahlungsfeldes bei der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren. Studien berichteten von nachhaltigen Immundefiziten nach Bestrahlung des Kopf-Hals-Bereiches (Verastegui et al., 2003). Jüngst wurde eine Studie von Dovšak et al. publiziert, welche sich mit dem Effekt der operativen Therapie und der Strahlentherapie bei fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle auf Blutwerte inklusive Leukozyten, Lymphozyten sowie entzündliche Veränderungen beschäftigte (Dovšak et al., 2018). Die Autoren berichteten von einer Reduktion von B-Lymphozyten und NK-Zellen nach der Bestrahlung. Hierbei blieben die Zellzahlen der B-Lymphozyten auch ein Jahr nach Bestrahlung erniedrigt, während die NK-Zellzahlen nach einem Jahr auf ihr ursprüngliches Level vor Bestrahlung anstiegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit befindet sich das letzte Follow-Up 6 Monate und nicht wie bei Dovšak et al. ein Jahr nach Beendigung der Strahlentherapie – die erhobenen Daten decken sich aber mit denen der Vergleichsliteratur.

Bei der Analyse der Mean Fluorescence Intensity Werte verschiedener aktivierender NK-Zelloberflächenmarker, unter anderem auch dem vorher beschriebenen NKG2D, zeigt sich ein bemerkenswertes Ergebnis. Es werden signifikante Steigerungen der MFI-Werte während der Strahlentherapie beobachtet, welche ihr Maximum zum Ende der Bestrahlung erreichen und innerhalb der 6-monatigen Nachsorgeperiode wieder auf präradiotherapeutische Niveaus abfallen.

In Zusammenschau mit dem Verlauf der Zellzahlen bedeutet das, dass, obwohl die NK-Zellen mengenmäßig während der Bestrahlung abnehmen, die Expressionsdichte verschiedener wichtiger Oberflächenrezeptoren, darunter CD94+, CD56+, CD69+, NKG2D+, NKp30+ und NKp46+ auf der verbleibenden Population hochreguliert wird. Im Zuge des NKG2D/NKG2DL-Mechanismus (siehe 6.1) wird ein wichtiger Tumorescapemechanismus von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich vorgestellt, welcher mit verringerter NK-Zellaktivität assoziiert ist. Weiterhin wird eindrücklich gezeigt, dass NK-Zellen ein zentraler Bestandteil bei der Überwachung und Bekämpfung von Tumorzellen durch das Immunsystem sind und das Immunsystem maßgeblich auf ihre Aktivität angewiesen ist. Die Forschungsgruppe des Helmholtz Zentrums München konnte zeigen, dass eine geringe Infiltration von NK-Zellen in Tumorgewebe von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mit einem schlechten klinischen Outcome einhergeht (Stangl et al., 2018). Eine bessere NK-Zellaktivität verstärkt die Kompetenz des Immunsystems bei der Tumorbekämpfung und kann die Heilungsraten bei Plattenepithelkarzinomen verbessern.

Die Ergebnisse legen nahe, dass NK-Zellen unter Umständen im Zuge der Bestrahlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich stimuliert werden könnten. Dies würde neue Möglichkeiten bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich eröffnen – so könnte zum Beispiel eine (low-dose) Bestrahlung in Zukunft als adjuvante Immuntherapie in Frage kommen. Hierzu müssen die Ergebnisse allerdings noch durch Studien mit größerer Teilnehmerzahl validiert werden. Weiterhin ist nicht geklärt, ob der Anstieg der MFI der aktivierenden NK-Zellrezeptoren wirklich auf direkte Wechselwirkungen mit der ionisierenden Strahlung zurückzuführen ist oder etwa sekundär durch Regress des Tumolvolumens und die Ausschüttung von sogenannten Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) durch absterbende Tumorzellen, welche inflammatorische Reaktionen triggern. Eventuell könnten auch beide Faktoren einen Beitrag leisten.

6.3 Limitationen der Studie

Insgesamt verfügt die Studie über eine verhältnismäßig geringe Teilnehmeranzahl. Von den ursprünglich 25 rekrutierten Patienten wurden aufgrund zu weniger Datensätze lediglich 16 in die Analyse eingeschlossen. Die Rekrutierung der Patienten gestaltet sich langwierig. Die Studienteilnahme wird den Patienten zum Planungstermin der Strahlentherapie, etwa 2 Wochen vor der eigentlichen Bestrahlung, angeboten. Das bedeutet, dass Patienten, die adjuvant behandelt werden, sich bereits ihrer Voroperation

Diskussion

unterzogen haben und unter etwaigen Folgen der OP wie einem Tracheostoma, Schmerzen oder Narben im Kopf-Hals-Bereich leiden. Es wird versucht, die Blutentnahmen der Studie mit Blutentnahmen des normalen Therapieprotokolls zu kombinieren; trotzdem fällt es schwer, die Patienten von einer zusätzlichen Belastung im schon schweren Therapieweg zu überzeugen, von denen sie selbst keinen direkten Vorteil haben würden. Auch die Organisation der Studie im Therapieverlauf und die Arbeit mit Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich bringt Probleme mit sich. Ein Großteil der Patienten nimmt die Bestrahlungstermine nur unzuverlässig wahr; sie kommen teilweise Stunden zu früh oder zu spät oder auch gar nicht. Einige Patienten versterben leider bereits während der Bestrahlungsphase oder in der Nachsorgeperiode. 3 Patienten widerrufen nachträglich ihre Zustimmung zur Studie und treten aus.

Anfangs ist geplant, nur definitive Bestrahlungspatienten zu rekrutieren, um ein homogenes Patientenkollektiv darzustellen und mögliche Störungsfaktoren bei der Analyse der Parameter auszuschließen. Es zeigt sich jedoch schnell, dass nur sehr wenige Patienten im Rekrutierungszeitraum definitiv bestrahlt werden, woraufhin das Kollektiv auf alle Therapiemodalitäten für Plattenepithelkarzinomen mit Kopf-Halstumoren ausgeweitet wird. Mögliche Einflüsse einer vorangegangenen operativen Therapie oder Chemotherapie einzelner Patienten auf die Ergebnisse der Arbeit können nicht ausgeschlossen werden. Einige der vorher genannten Studien wie z.B. Accomando et al. beschrieben Veränderungen verschiedener Immunzellen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, allerdings unabhängig von Tumorlokalisation, Tumorstadium oder der Exposition von Karzinogenen, was die Störfaktoren eines heterogenen Patientenkollektivs wiederum relativieren könnte.

Es handelt sich um eine Studie der Strahlentherapie. Da die Strahlentherapie bei SCCHN in der Regel adjuvant nach einer Operation durchgeführt wird, sind Patienten, welche sich zur adjuvanten Bestrahlung in der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie vorstellten, zum Rekrutierungszeitpunkt bereits voroperiert und es können keine präoperativen Vergleichswerte erhoben werden.

Als explorative Pilotstudie ergeben sich bestimmte Zusammenhänge erst im Verlauf der Studie – so wäre es nachträglich beispielweise sehr interessant, auch die PD-1 Expression auf den mengenvermehrten CD3-/CD69+ NK-Zellen (siehe 6.1) zu messen, um herauszufinden, ob diese tatsächlich durch den PD-1/PD-L1-Mechanismus gehemmt werden.

6.4 Ausblick

Die Wechselwirkung zwischen malignen Tumoren und dem Immunsystem ist aktuell Gegenstand vieler Untersuchungen. Tumore können sich der Kontrolle des Immunsystems entziehen und die Immunantwort negativ beeinflussen. Besonders bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs spielt dies möglicherweise eine große Rolle für Pathogenese, Verlauf und Outcome. Die vorliegende Arbeit zeigt im Rahmen quantitativ und qualitativ veränderter NK-Zellen immunologische Auffälligkeiten bei SCCHN-Patienten. Im Rahmen der Systemtherapie haben bereits erste Target- und Immuntherapeutika einen festen Stellenwert im Therapieschema von SCCHN. Ein besseres Verständnis über die von SCCHN ausgelösten immunologischen Defizite wird in Zukunft neue Behandlungsmöglichkeiten hervorbringen und die Heilungsrate der Krankheit verbessern.

Weiter legen die Ergebnisse nahe, dass die Bestrahlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich einen immunmodulatorischen Effekt hat, indem die Aktivität von zur Tumorbekämpfung wichtigen Immunzellen, wie den NK-Zellen, angeregt wird. Der Stellenwert der Radiotherapie im Behandlungskonzept von SCCHN wird somit unterstrichen, da neben der direkten Tumorzerstörung körpereigene Abwehrmechanismen angeregt werden. Es ist denkbar, dass man sich diese immunologischen Phänomene in Zukunft gezielt zu Nutze machen kann. Die Ergebnisse müssen im Detail allerdings erst in spezialisierten Studien mit einem größeren Patientenkollektiv validiert werden. Ein besseres Verständnis darüber kann zukünftig den Therapieverlauf bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich positiv beeinflussen und möglicherweise den Weg für eine adjuvante Immuntherapie durch Bestrahlung ebnen.

7 Zusammenfassung

Die Gruppe der Kopf-Hals-Tumore sind die sechsthäufigste Malignomentität weltweit mit ca. 500.000 jährlichen Neuerkrankungen. 90% der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome. Wegen fehlender Frühsymptome werden Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich häufig erst spät erkannt und haben mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 40-60% eine verbesserungsbedürftige Prognose. Die drei Säulen der heutigen Therapie stellen die chirurgische Behandlung, die Strahlentherapie und die Systemtherapie dar, welche alle mit sehr belastenden Nebenwirkungen und Folgen für den Patienten einhergehen.

Die Arbeit analysiert immunologische Phänomene im peripheren Blut von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Untersucht werden sowohl Einflüsse der Tumorerkrankung selbst als auch der lokalen Strahlentherapie als häufige Therapiemodalität auf verschiedene Blut- und Immunzellen. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigten Auffälligkeiten verschiedener Immunparameter bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Beispielsweise wurden Aktivitätsminderungen von NK-Zellen und Interferenzen der physiologischen Immunaktivität durch verschiedene Tumorescapemechanismen nachgewiesen. Zusätzlich enthält der Kopf-Hals-Bereich viele lymphatische Organe und ist somit Reservoir zahlreicher Immunzellen, die sensitiv auf eine Bestrahlung reagieren.

Hierzu werden prospektiv zum einen Eigenschaften von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich vor Bestrahlung mit denen eines gesunden Kontrollkollektivs verglichen. Zum anderen werden verschiedene Blutparameter der Patienten jeweils vor, während und bis 6 Monate nach Bestrahlung analysiert. Hierfür wird den Patienten zu 5 festgelegten Zeitpunkten im Verlauf der Therapie peripher Blut entnommen. Dieses wird im Labor unter anderem mittels der Durchflusszytometrie aufgearbeitet. Analysiert werden LDH, der Entzündungsmarker CRP und ein großes Blutbild. Auch wird die Zusammensetzung verschiedener Lymphozytensubpopulationen und das Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker erforscht.

Der Vergleich von Patienten- und Kontrollparameter zeigt, dass SCCHN-Patienten tendenziell höhere Gated%-Werte verschiedener NK-Zellsubpopulationen haben; für CD56+/CD69+ Zellen können diese sogar hochsignifikant nachgewiesen werden. Die Vermehrung der NK-Zellen kann als Reaktion des Immunsystems auf den Tumor

Zusammenfassung

verstanden werden. Vergleichsliteratur legt allerdings nahe, dass diese NK-Zellen durch einen Tumorescapemechanismus inaktiv sein könnten. Weiterhin zeigen Patienten signifikant niedrigere MFI-Werte für den Rezeptor NKG2D. Dieses Ergebnis könnte durch einen Tumorescapemechanismus erklärt werden, bei dem Tumorzellen die Liganden für NKG2D überexprimieren und abstoßen und so die NK-Zellaktivität verringern. Die Ergebnisse stellen dar, wie Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich die Immunaktivität manipulieren können, um sich so vor der Bekämpfung durch das Immunsystem zu schützen. Besonders NK-Zellen spielen eine große Rolle in der Tumorbekämpfung. Viele Forschungsarbeiten zielen auf die Wiederherstellung der Immunkompetenz durch immunmodulatorische Therapien und versprechen sich damit eine bessere Heilungsprognose. Bei der Analyse der Patientenparameter im Verlauf der Strahlentherapie zeigt sich eine Verringerung der absoluten Zellzahlen von B-Lymphozyten und NK-Zellen, welche sich nur teilweise wieder erholten. Trotz der fallenden Zellzahlen können hinsichtlich der Expressionsdichten verschiedener aktivierender NK-Zellrezeptoren signifikante Steigerungen festgestellt werden. Die MFI der NK-Zellrezeptoren, darunter auch NKG2D und CD56, erreicht zum Ende der Bestrahlung ein Maximum und fällt während der Nachsorgeperiode wieder auf ursprüngliche Werte ab. Das bedeutet, dass trotz der Mengenabnahme der NK-Zellen die verbleibenden Zellen besonders aktiv sind.

Für ein genaues Verständnis wie NK-Zellrezeptoren im Detail auf Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich reagieren, müssen künftige Studien mit größeren Patientenkollektiven weitere Zusammenhänge analysieren. Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass SCCHN-Patienten von der Bestrahlung des Kopf-Hals-Bereichs in Form einer adjuvanten immunmodulatorischen Therapie profitieren könnten.

8 Literaturverzeichnis

Accomando WP, Wiencke JK, Houseman EA, Butler RA, Zheng S, Nelson HH, Kelsey KT (2012): Decreased NK cells in patients with head and neck cancer determined in archival DNA. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (22), S. 6147–6154. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1008.

Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE et al. (2009): Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head & neck* 31 (11), S. 1393–1422. DOI: 10.1002/hed.21269.

Adrien J, Bertolus C, Gambotti L, Mallet A, Baujat B (2014): Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. *Oral oncology* 50 (2), S. 90–97. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.10.016.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF et al. (2010): Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 363 (1), S. 24–35. DOI: 10.1056/NEJMoa0912217.

Bates GJ, Fox SB, Han C, Launchbury R, Leek RD, Harris AL, Banham AH (2008): Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with that of estrogen receptor-beta in primary invasive breast carcinomas. *Breast cancer research and treatment* 111 (3), S. 453–459. DOI: 10.1007/s10549-007-9812-4.

Bhattacharya S, Muhammad N, Steele R, Kornbluth J, Ray RB (2017): Bitter Melon Enhances Natural Killer-Mediated Toxicity against Head and Neck Cancer Cells. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 10 (6), S. 337–344. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0046.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research* 48 (11), S. 3282–3287.

Borrego F, Masilamani M, Marusina AI, Tang X, Coligan JE (2006): The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunologic research* 35 (3), S. 263–278. DOI: 10.1385/IR:35:3:263.

Zusammenfassung

- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P et al. (2012): Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine* 366 (26), S. 2455–2465. DOI: 10.1056/NEJMoa1200694.
- Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD (2014): CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Frontiers in oncology* 4, S. 385. DOI: 10.3389/fonc.2014.00385.
- Casares N, Arribillaga L, Sarobe P, Dotor J, Lopez-Diaz de Cerio A, Melero I et al. (2003): CD4⁺/CD25⁺ Regulatory Cells Inhibit Activation of Tumor-Primed CD4⁺ T Cells with IFN- γ -Dependent Antiangiogenic Activity, as well as Long-Lasting Tumor Immunity Elicited by Peptide Vaccination. *The Journal of Immunology* 171 (11), S. 5931–5939. DOI: 10.4049/jimmunol.171.11.5931.
- Castling B, Telfer M, Avery BS (1994): Complications of tracheostomy in major head and neck cancer surgery; a retrospective study of 60 consecutive cases. *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 32 (1), S. 3–5.
- Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E et al. (2011): Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (32), S. 4294–4301. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.4596.
- Chethana, Rao PS, Madathil LP, Rao S, Shetty P, Patidar M (2015): Quantitative Analysis of Acute Phase Proteins in Post Chemo-Radiation Mucositis. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 9 (10), ZC28-31. DOI: 10.7860/JCDR/2015/13732.6591.
- Christoffersson G und Herrath M von (2019): Regulatory Immune Mechanisms beyond Regulatory T Cells. *Trends in immunology*. DOI: 10.1016/j.it.2019.04.005.
- Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB et al. (2004): Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* 350 (19), S. 1937–1944. DOI: 10.1056/NEJMoa032646.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P et al. (2004): Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 10 (9), S. 942–949. DOI: 10.1038/nm1093.

Zusammenfassung

- Dovšak T, Ihan A, Didanovič V, Kansky A, Verdenik M, Hren NI (2018): Effect of surgery and radiotherapy on complete blood count, lymphocyte subsets and inflammatory response in patients with advanced oral cancer. *BMC cancer* 18 (1), S. 235. DOI: 10.1186/s12885-018-4136-9.
- Economopoulou P, Perisanidis C, Giotakis EI, Psyrris A (2016): The emerging role of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): anti-tumor immunity and clinical applications. *Annals of translational medicine* 4 (9), S. 173. DOI: 10.21037/atm.2016.03.34.
- Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF (1995): Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 3 (1), S. 39–50.
- Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L et al. (2018): Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral oncology* 81, S. 45–51. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.04.008.
- Fietkau R.: Simultane Radiochemotherapie zur Behandlung solider Tumoren. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* (2012/S3), S. 263–271.
- Forster MD und Devlin M-J (2018): Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer. *Frontiers in oncology* 8, S. 310. DOI: 10.3389/fonc.2018.00310.
- Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B et al. (2007): Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* 132 (7), S. 2328–2339. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.102.
- Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Boyle P (2008): Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer* 122 (1), S. 155–164. DOI: 10.1002/ijc.23033.
- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R (2008): Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 100 (6), S. 407–420. DOI: 10.1093/jnci/djn025.

Zusammenfassung

- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L et al. (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 92 (9), S. 709–720.
- Hall EJ und Giaccia AJ (2012): *Radiobiology for the radiologist*. 7. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP et al. (2007): Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute* 99 (10), S. 777–789. DOI: 10.1093/jnci/djk179.
- Hashibe M, Brennan P, Chuang S-C, Boccia S, Castellsague X, Chen C et al. (2009): Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (2), S. 541–550. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0347.
- Hecht M-L, Rosental B, Horlacher T, Hershkovitz O, Paz JL de, Noti C et al. (2009): Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *Journal of proteome research* 8 (2), S. 712–720. DOI: 10.1021/pr800747c.
- Hoff CM (2012): Importance of hemoglobin concentration and its modification for the outcome of head and neck cancer patients treated with radiotherapy. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 51 (4), S. 419–432. DOI: 10.3109/0284186X.2011.653438.
- Holländer GA und Barthlott T (Hg.) (2006): *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*. 1. Aufl. Elsevier Urban & Fischer, München.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2017): Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 198 (3), S. 981–985.
- Howaldt H-P, Kainz M, Euler B, Vorast H (1999): Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 27 (5), S. 275–288. DOI: 10.1054/jcms.1999.0070.

Zusammenfassung

Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, Nicolai CJ, Bourgeois-Daigneault M-C, Trevino TN et al. (2018): Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *The Journal of clinical investigation*. DOI: 10.1172/JCI99317.

Huang SH und O'Sullivan B (2017): Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Current treatment options in oncology* 18 (7), S. 40. DOI: 10.1007/s11864-017-0484-y.

Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, Zeh HJ, Basse P, Bartlett DL et al. (2005): Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert opinion on biological therapy* 5 (10), S. 1303–1315. DOI: 10.1517/14712598.5.10.1303.

Karre K (2002): NK Cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self. *Scandinavian Journal of Immunology* 55 (3), S. 221–228. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2002.01053.x.

Khorana AA und Connolly GC (2009): Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (29), S. 4839–4847. DOI: 10.1200/JCO.2009.22.3271.

Kim R, Emi M, Tanabe K (2007): Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121 (1), S. 1–14. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.

Ko C und Citrin D (2009): Radiotherapy for the management of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral diseases* 15 (2), S. 121–132. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2008.01495.x.

Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, Vuletic A, Mirjagic Martinovic K, Radenkovic S, Spuzic I (2012): Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. *Immunologic research* 52 (1-2), S. 139–156. DOI: 10.1007/s12026-012-8285-7.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14 (2), S. 467–475. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.

Labelle M, Begum S, Hynes RO (2011): Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer cell* 20 (5), S. 576–590. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.09.009.

Zusammenfassung

- Mac Manus M, Lamborn K, Khan W, Varghese A, Graef L, Knox S (1997): Radiotherapy-associated neutropenia and thrombocytopenia: analysis of risk factors and development of a predictive model. *Blood* 89 (7), S. 2303–2310.
- Marciscano AE, Walker JM, McGee HM, Kim MM, Kunos CA, Monjazebe AM et al. (2018): Incorporating Radiation Oncology into Immunotherapy: proceedings from the ASTRO-SITC-NCI immunotherapy workshop. *Journal for immunotherapy of cancer* 6 (1), S. 6. DOI: 10.1186/s40425-018-0317-y.
- Mazorra Z, Lavastida A, Concha-Benavente F, Valdés A, Srivastava RM, García-Bates TM et al. (2017): Nimotuzumab Induces NK Cell Activation, Cytotoxicity, Dendritic Cell Maturation and Expansion of EGFR-Specific T Cells in Head and Neck Cancer Patients. *Frontiers in pharmacology* 8, S. 382. DOI: 10.3389/fphar.2017.00382.
- Mohammed FF, Poon I, Zhang L, Elliott L, Hodson ID, Sagar SM, Wright J (2012): Acute-phase response reactants as objective biomarkers of radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Head & neck* 34 (7), S. 985–993. DOI: 10.1002/hed.21848.
- Molling JW, Langius JAE, Langendijk JA, Leemans CR, Bontkes HJ, van der Vliet HJJ et al. (2007): Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (7), S. 862–868. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.5787.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC et al. (2001): Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual review of immunology* 19, S. 197–223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197.
- Neumeister B und Böhm BO (2015): *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. 5. Aufl. Urban Fischer Verlag - Lehrbücher, s.l.
- Nishikawa H, Jäger E, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S (2005): CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4⁺ helper T cell responses in cancer patients. *Blood* 106 (3), S. 1008–1011. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0607.
- Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE et al. (2005): Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nature immunology* 6 (9), S. 928–937. DOI: 10.1038/ni1239.

Zusammenfassung

Parham P und Janeway C (2015): *The immune system*. 4. ed. Garland Science Taylor & Francis Group, New York, NY.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005): *Global cancer statistics, 2002*. *CA: a cancer journal for clinicians* 55 (2), S. 74–108.

Picot J, Guerin CL, van Kim C, Boulanger CM (2012): *Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation*. *Cytotechnology* 64 (2), S. 109–130. DOI: 10.1007/s10616-011-9415-0.

Prasad SJ, Farrand KJ, Matthews SA, Chang JH, McHugh RS, Ronchese F (2005): *Dendritic Cells Loaded with Stressed Tumor Cells Elicit Long-Lasting Protective Tumor Immunity in Mice Depleted of CD4+CD25+ Regulatory T Cells*. *The Journal of Immunology* 174 (1), S. 90–98. DOI: 10.4049/jimmunol.174.1.90.

Reiß M (2009): *Facharztwissen HNO-Heilkunde: Differenzierte Diagnostik und Therapie* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Reyes-Gibby CC, Anderson KO, Merriman KW, Todd KH, Shete SS, Hanna EE (2014): *Survival patterns in squamous cell carcinoma of the head and neck: Pain as an independent prognostic factor for survival*. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 15 (10), S. 1015–1022. DOI: 10.1016/j.jpain.2014.07.003.

Ruter J, Barnett BG, Kryczek I, Brumlik MJ, Daniel BJ, Coukos G et al. (2009): *Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines*. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14, S. 1761–1770.

Sage EK, Schmid TE, Geinitz H, Gehrmann M, Sedelmayr M, Duma MN et al. (2017): *Auswirkungen von definitiver und Salvage-Strahlentherapie auf die Verteilung von Lymphozytensubpopulationen bei Prostatakarzinompatienten*. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]*. 193 (8), S. 648–655. DOI: 10.1007/s00066-017-1144-7.

Sage EK, Schmid TE, Sedelmayr M, Gehrmann M, Geinitz H, Duma MN et al. (2016): *Comparative analysis of the effects of radiotherapy versus radiotherapy after adjuvant chemotherapy on the composition of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients*. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 118 (1), S. 176–180. DOI: 10.1016/j.radonc.2015.11.016.

Zusammenfassung

Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A (2003): CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98 (5), S. 1089–1099. DOI: 10.1002/cncr.11618.

Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL (2005): Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *British journal of cancer* 92 (5), S. 913–920. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602407.

Schantz SP, Campbell BH, Guillaumondegui OM (1986a): Pharyngeal carcinoma and natural killer cell activity. *American journal of surgery* 152 (4), S. 467–474.

Schantz SP und Goepfert H (1987): Multimodality therapy and distant metastases. The impact of natural killer cell activity. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 113 (11), S. 1207–1213.

Schantz SP, Shillitoe EJ, Brown B, Campbell B (1986b): Natural killer cell activity and head and neck cancer: a clinical assessment. *Journal of the National Cancer Institute* 77 (4), S. 869–875.

Schwartz RH (2005): Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nature immunology* 6 (4), S. 327–330. DOI: 10.1038/ni1184.

Seliger B und Huber C (1999): „Immune escape“-Mechanismen von humanen Tumoren. *Der Onkologe* 5 (8), S. 668. DOI: 10.1007/s007610050426.

Semrau R (2017): The Role of Radiotherapy in the Definitive and Postoperative Treatment of Advanced Head and Neck Cancer. *Oncology research and treatment* 40 (6), S. 347–352. DOI: 10.1159/000477128.

Spitz MR (1994): Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Seminars in oncology* 21 (3), S. 281–288.

Stangl S, Tontcheva N, Sievert W, Shevtsov M, Niu M, Schmid TE et al. (2018): Heat shock protein 70 and tumor-infiltrating NK cells as prognostic indicators for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck after radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *International journal of cancer* 142 (9), S. 1911–1925. DOI: 10.1002/ijc.31213.

Zusammenfassung

- Stoyanov GS, Kitanova M, Dzhenkov DL, Ghenev P, Sapundzhiev N (2017): Demographics of Head and Neck Cancer Patients: A Single Institution Experience. *Cureus* 9 (7), e1418. DOI: 10.7759/cureus.1418.
- Strutz J, Mann W, Arndt O (Hg.) (2010): *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie: 265 Tabellen*. 2., vollst. überarb. und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart.
- Sun Z, Du C, Xu P, Miao C (2018): Surgical trauma-induced CCL18 promotes recruitment of regulatory T cells and colon cancer progression. *Journal of cellular physiology*. DOI: 10.1002/jcp.27245.
- Thomas L (2012): *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. 8. Aufl. Th-Books Verl.-Ges, Frankfurt/Main.
- Tolentino EdS, Centurion BS, Ferreira LHC, Souza APd, Damante JH, Rubira-Bullen IRF (2011): Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. *Journal of Applied Oral Science* 19 (5), S. 448–454. DOI: 10.1590/S1678-77572011000500003.
- Trellakis S, Farjah H, Bruderek K, Dumitru CA, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S (2011): Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *International journal of immunopathology and pharmacology* 24 (3), S. 683–693. DOI: 10.1177/039463201102400314.
- Trivedi S, Srivastava RM, Concha-Benavente F, Ferrone S, Garcia-Bates TM, Li J, Ferris RL (2016): Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22 (21), S. 5229–5237. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2971.
- Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F et al. (1988): Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *International journal of cancer* 41 (4), S. 483–491.
- van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, van Tendeloo VF (2017): CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Frontiers in immunology* 8, S. 892. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00892.

Zusammenfassung

van Meir H, Nout RA, Welters MJP, Loof NM, Kam ML de, van Ham JJ et al. (2017): Impact of (chemo)radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients. *Oncoimmunology* 6 (2), e1267095. DOI:

10.1080/2162402X.2016.1267095.

Verastegui EL, Morales RB, Barrera-Franco JL, Poitevin AC, Hadden J (2003): Long-term immune dysfunction after radiotherapy to the head and neck area. *International Immunopharmacology* 3 (8), S. 1093–1104. DOI: 10.1016/S1567-5769(03)00013-4.

Viguiet M, Lemaitre F, Verola O, Cho M-S, Gorochov G, Dubertret L et al. (2004): Foxp3 Expressing CD4⁺CD25^{high} Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells. *The Journal of Immunology* 173 (2), S. 1444–1453. DOI: 10.4049/jimmunol.173.2.1444.

Vozenin M-C, Lord H-K, Hartl D, Deutsch E (2010): Unravelling the biology of human papillomavirus (HPV) related tumours to enhance their radiosensitivity. *Cancer treatment reviews* 36 (8), S. 629–636. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.03.010.

Weil S, Memmer S, Lechner A, Huppert V, Giannattasio A, Becker T et al. (2017): Natural Killer Group 2D Ligand Depletion Reconstitutes Natural Killer Cell Immunosurveillance of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in immunology* 8, S. 387. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00387.

Whiteside TL (2006): The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer treatment and research* 130, S. 103–124.

Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B (2003): Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (2), S. 606–612.

Wu J und Lanier LL (2003): Natural killer cells and cancer. *Advances in cancer research* 90, S. 127–156.

Wu Y, Zhao Q, Peng C, Sun L, Li X-F, Kuang D-M (2011): Neutrophils promote motility of cancer cells via a hyaluronan-mediated TLR4/PI3K activation loop. *The Journal of pathology* 225 (3), S. 438–447. DOI: 10.1002/path.2947.

Wulff S, Pries R, Börngen K, Trenkle T, Wollenberg B (2009): Decreased levels of circulating regulatory NK cells in patients with head and neck cancer throughout all tumor stages. *Anticancer research* 29 (8), S. 3053–3057.

Zucker-Franklin D (Hg.): Atlas der Blutzellen: Funktion und Pathologie G. Fischer, Stuttgart.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Streulicht Dot-Plot eines Patientenröhrchens	30
Abbildung 2 Punktwolkendarstellung eines Kontrollprobenröhrchens	32
Abbildung 3 Punktwolkendarstellung der Oberflächenmarker CD3 und NKG2D eines Patientenröhrchens.....	32
Abbildung 4 Histogrammdarstellung des Parameters CD3 eines Patientenröhrchens...	33
Abbildung 5 Verteilung des Patientenalters	36
Abbildung 6 Verteilung der T-Stadien innerhalb des Patientenkollektivs	37
Abbildung 7 Verteilung der N-Stadien innerhalb des Patientenkollektivs.....	37
Abbildung 8 Vergleich der Gated % von CD56+/CD69+ NK Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe	41
Abbildung 9 Vergleich der Expressionsdichte von NKG2D auf NK-Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe	42
Abbildung 10 Verlauf des Entzündungsparameters CRP vor, während und nach Bestrahlung der Patienten.....	45
Abbildung 11 Verlauf der Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten	46
Abbildung 12 Verlauf der Lymphozyten anteilig an den Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten	47
Abbildung 13 Verlauf der CD3-/CD19+ B-Lymphozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten.....	50
Abbildung 14 Verschiedene NK-Zellgruppen des Patientenkollektivs werden auf Veränderungen vor, während und nach Bestrahlung wurden hinsichtlich ihrer Zellzahlen (a,b,c,d,e) und der Mean fluorescence intensity (mean) ihrer Oberflächenmarker (f,g,h,i,j) untersucht; genau wie in den vorherigen Abbildungen werden normal verteilte Variablen (a,e,g) mit Mittelwerten und Fehlerbalken und nicht normalverteilte Variablen (b,c,d,f,h,i,j) mit blauen Boxplots dargestellt.	52

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Antikörperkombinationen.....	28
Tabelle 2 Charakteristika der Patienten- und Kontrollgruppe.....	38
Tabelle 3 Normalverteilungstests der Variablen	39
Tabelle 4 Vergleich von Patienten- und Kontrollparameter.....	40
Tabelle 5 Vergleich der Gated % von CD56+/CD69+ NK Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe	41
Tabelle 6 Vergleich der Expressionsdichte von NKG2D auf NK-Zellen von Patienten- und Kontrollgruppe	42
Tabelle 7 Analyse der Patientenparameter LDH, CRP und des großen Blutbilds im Verlauf.....	43
Tabelle 8 Normalwerte der Blutbildparameter im Klinikum rechts der Isar München; Stand 2017.....	44
Tabelle 9 Verlauf des Entzündungsparameters CRP vor, während und nach Bestrahlung der Patienten	45
Tabelle 10 Verlauf des Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten	46
Tabelle 11 Verlauf der Lymphozyten anteilig an den Leukozyten vor, während und nach Bestrahlung der Patienten.....	48
Tabelle 12 Analyse der Durchflusszytometrieparameter von NK-Zellen der Patientengruppe im Verlauf.....	49
Tabelle 13 Analyse der Durchflusszytometrieparameter von T-Lymphozyten, NK-Zellen und Tregs der Patientengruppe im Verlauf	52

11 Anhang



Prüfstelle: Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
Direktor: Prof. Dr. Stephanie E. Combs
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Ismaninger Straße 22
81675 München

Hauptprüfer: Dr. Marciana-Nona Duma

**Klinikum rechts der Isar
Anstalt des öffentlichen Rechts**

**Klinik und Poliklinik für
Strahlentherapie und
Radiologische Onkologie**



Mitglied des Roman-Herzog-
Krebszentrums (RHCCO)

Univ.-Prof. Dr. S. E. Combs
Direktor

Ismaninger Straße 22
81675 München
Tel. (089) 41 40 – 4501/4502
Fax: (089) 41 40 – 4882/4477
E-Mail: stefanie.combs@kri.tum.de

– **Datenschutzerklärung und Patienteneinwilligungserklärung** –

**Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen
Strahlentherapie**

Hiermit erkläre ich, _____

dass ich durch Frau/Herrn _____

über das Ziel, das Wesen, die Bedeutung und die Tragweite des oben
erwähnten Studienvorhabens aufgeklärt wurde.

Mein Arzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen
Risiken informiert.

Informationen und Einwilligungserklärung zum Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet werden und namentlich (nicht pseudonymisiert) unabhängig von der Studie zurück an den betreuenden Arzt gehen.

Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (ohne Namensnennung) weitergegeben werden. Präsentationen und Veröffentlichungen der Daten erfolgen ohne Namensnennung.

2. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit meine Einwilligung zur Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile erwachsen. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen.

Vorstand

Univ.-Prof. Dr. Rainer Gradinger
(Arztlicher Direktor, Vorsitzender)
Dr. Philipp Ostwald
(Kaufmännischer Direktor)
Anette Thiele-Coburg
(Pflegedirektorin)
Univ.-Prof. Dr. Peter Henningsen
(Leiter)

Bankverbindung:
Bayer Landesbank Girozentrale
Kto-Nr. 20 272
BLZ 700 500 00

BIC: BYLADEM33
IBAN: DE02 7005 0000 0000 0202 72
US-IdNr.: DE 129 02 3996

Stand 30.04.2015

Anhang



Technische Universität München

Technische Universität München · Fakultät für Medizin · Ethikkommission
Ismaninger Str. 22 · 81675 München · Germany



Fakultät für Medizin
Ethikkommission

Herrn
Prof. Dr. Hans Geinitz
Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie

Im Hause

Prof. Dr.
Albert Schömig
Vorsitzender

Prof. Dr.
Franz B. Hofmann
Stellvertretender Vorsitzender

Prof. Dr.
Georg Schmidt
Geschäftsführendes Mitglied

28.06.2012
Projektnummer **5403/12** (bitte bei jedem Schriftwechsel angeben)

Immunologische und epigenetische Phänomene der lokalen Strahlentherapie

Ismaninger Str. 22
81675 München
Germany

Tel +49.89.4140.4371
Fax +49.89.4140.4199

info@ek.med.tum.de
www.ek.med.tum.de

Sehr geehrter Herr Professor Geinitz,


in der Sitzung der Ethikkommission vom Dienstag, dem 26.06.2012, wurde das o.g. Projekt besprochen.

Zur Begutachtung lagen Prüfplan und Patienteninformationen/ -einwilligungserklärung (jeweils vom 06.06.2012) vor.

Die Ethikkommission, die sich aus den Mitgliedern Herrn Prof. Dr. F.B. Hofmann, Herrn Prof. Dr. H.-H. Eckstein, Herrn Dr. R. Haubenthaler, Herrn Prof. Dr. B. Hemmer, Herrn Prof. Dr. Chr. Peschel, Herrn Prof. Dr. G.H. Schlund, Herrn Prof. Dr. G. Schmidt, Frau Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke und Herrn Prof. Dr. K. Ulm zusammensetzte, kam zu folgendem Votum:

Die Ethikkommission erhebt keine Einwände gegen das geplante Forschungsprojekt. Der Begriff „anonymisieren“ ist durch „pseudonymisieren“ zu ersetzen.

Mit freundlichem Gruß


Prof. Dr. F.B. Hofmann
Stellvertretender Vorsitzender

Die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den ICH-GCP-Richtlinien.

Mitteilungen über schwerwiegende oder unerwartete unerwünschte Ereignisse sind mit einer Stellungnahme des Prüfarztes zum Nutzen/Risiko-Verhältnis des Vorhabens einzureichen (§ 40, Abs. 1, Satz 4 AMG)

Bei Vorlage von Amendments sind Änderungen oder Ergänzungen deutlich zu kennzeichnen. Der Prüfarzt sollte die Protokolländerungen (aufgeteilt nach „wesentlichen“ und „nicht wesentlichen“ Änderungen) einzeln auflisten und mitteilen, ob die Änderungen nach seiner Ansicht ethisch relevant sind. Falls erforderlich, ist eine revidierte Patienteninformation/ Einverständniserklärung einzureichen.

Nach Publikation der Studie bittet die Ethikkommission um Zusendung eines Sonderdruckes.

Anhang 2: Ethikantrag

Anhang

Cytometer Type	FACSCalibur			
Detectors/Amps				
	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.60	Lin
P2	SCC	368	2.00	Lin
P3	FL1	585	1.00	Log
P4	FL2	607	1.00	Log
P5	FL3	628	1.00	Log
P6	FL1-A		1.00	Lin
P7	FL4	616		Log
Threshold				
Primary Parameter	FSC			
Value	100			
Secondary Parameter	None			
Compensation				
FL1	-	0.3%	FL2	
FL2	-	50.3%	FL1	
FL2	-	0.0%	FL3	
FL3	-	8.6%	FL2	
FL3	-	0.0%	FL4	
FL4	-	5.6%	FL3	

Anhang 3: Repräsentative Einstellung des BD FACSCalibur Geräts für die Durchflusszytometrie von Vollblutproben

12 Danksagung

Für Annelie und Alois - vielen Dank für Eure uneingeschränkte Unterstützung, Liebe und Motivation.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Stephanie E. Combs, Herrn PD Dr. Daniel Habermehl und Frau Prof. Dr. Gabriele Multhoff für die fachliche Betreuung, Beratung und Unterstützung – auch über die Grenzen der Doktorarbeit hinaus.

Einen besonderen Dank spreche ich an das MTRA-Team der Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar, an das Laborteam in der Scheckenburgerstr. 8 und an Frau Dr. Eva Sage aus.

Insbesondere bei Lea und Florian sowie meiner Familie und all meinen Freunden bedanke ich mich von ganzem Herzen für den Ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und Ihren Rückhalt.