Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C. F. Hess) im Zentrum Radiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Auswirkungen einer Radiochemotherapie auf die Zytokinkonzentration im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Friederike Linnemann

> > aus

### Bückeburg

Göttingen 2015

# Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

- 1. Berichterstatter: PD Dr. med. H. A. Wolff
- 2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Canis
- 3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2015

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung1		
	1.1 Inzi	denz, Pathologie und Risikofaktoren von Kopf-Hals-Tumoren	1
1.2 Thera		rapie und Prognose	2
	1.2 Cha		
	1.5 Cile 131	Chemokine und ihre Rolle in der Metastasenhildung	4 1
	1.3.1	Bedeutung der Chemokinexpression in Konf-Hals-Tumoren	<del>-</del> 5
	1.3.3	Chemokinexpression and Proliferation	
	1.3.4	Auswirkungen einer Radiochemotherapie auf die Chemokinexpression	6
	1.3.5	Untersuchte Chemokine und Zytokine	7
	1.3.5.1	CCL2	7
	1.3.5.2	CCL5	8
	1.3.5.3	CCL20	9
	1.3.5.4	CXCL12	9
	1.3.5.5	5 IL-6	10
	1.4 Ziel	der Untersuchung	12
		C	
2	Material	und Methoden	13
	2.1 Mat	erial	13
	2.1.1	Laborkits	13
	2.1.2	Geräte	. 15
	2.1.3	Zubehör	16
	2.1.4	Software	16
	2.2 Met	hoden	17
	2.2.1	Patientenrekrutierung	17
	2.2.2	Patientenkollektiv	17
	2.2.3	Radiochemotherapie	18
	2.2.4	Blutentnahme	19
	2.2.4.1	Verarbeitung des Blutes	19
	2.2.5	ELISA	20
	2.2.5.1	Waschpuffer und Standardverdünnungsreihe	21
	2.2.5.2	Bestückung der Mikrotiterplatte	22
	2.2.5.3	Waschvorgang und Zugabe von CXCL12-Conjugate	23
	2.2.5.4	Zugabe von Substrate Solution und Stop-Solution	23
	2.2.5.5	Messung der Absorption	23
	2.2.0	Statistische Auswartung	24
	2.2.1	Statistische Auswertung	23
3	Ergebnis	SSe	26
	3.1 Mes	sung der Chemokinkonzentration mittels ELISA	26
	3.2 CCI	.2-Konzentration während der Radiochemotherapie	27

6 Anhar	ıg	65
5 Zusan	ımenfassung	63
4.5.3	IL-6-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	61
4.5.2	IL-6-Verlauf bei unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven	61
4.5.1	IL-6-Anstieg während einer Radiochemotherapie	59
4.5 P	asma-IL-6 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor	59
4.4.2	CXCL12-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	58
4.4.1	CXCL12-Verlauf während einer Radiochemotherapie	
4.4 P	asma-CXCL12 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor	
4.3.2	CCL20-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	56
4.3.1	Abfall der CCL20-Konzentration während der Radiochemotherapie	55
4.3 P	asma-CCL20 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor	54
4.2.3	CCL5-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	53
4.2.2	CCL5-Verlauf bei unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven	52
4.2.1	CCL5-Abfall während einer Radiochemotherapie	51
4.2 P	lasma-CCL5 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor	51
4.1.3	CCL2-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	50
4.1.2	CCL2-Verlauf bei unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven	49
4.1.1	Anstieg der CCL2-Konzentration während einer Radiochemotherapie	
4.1 P	lasma-CCL2 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor	
4 Diskus	ssion	47
5.6.3	IL-o-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	
3.6.2	Einzelverläufe von IL-6	
3.6.1	IL-6-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven	
3.6 II	2-6-Konzentration während der Radiochemotherapie	
3.5.3	CXCL12-Verlauf bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	
3.5.2	Einzelverläufe von CXCL12	
3.5.1	CXCL12-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven	40
3.5 C	XCL12-Konzentration während der Radiochemotherapie	39
3.4.3	CCL20-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	
3.4.2	Einzelverläufe von CCL20	
3.4.1	CCL20-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven	
3.4 C	CL20-Konzentration während der Radiochemotherapie	
3.3.3	CCL5-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	
3.3.2	Einzelverläufe von CCL5	
3.3.1	CCL5-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven	
33 C	CI 5 Konzentration während der Padiochemotheranie	31
3.2.2	CCL2-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus	
3.2.1	Einzelverläufe von CCL2	
2 2 1	CCI 2 Varlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkellektiven	28

Literaturverzeichnis	71	l
	Literaturverzeichnis	Literaturverzeichnis71

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf ELISA
Abbildung 2: Verdünnungsreihe
Abbildung 3: Plan einer Mikrotiterplatte bestehend aus 96 Wells
Abbildung 4: Standardkurve CXCL12
Abbildung 5: CCL2-Konzentration im Gesamtverlauf
Abbildung 6: Verlauf von CCL2 in primär oder adjuvant behandelten Patienten
Abbildung 7: Konzentrationen von CCL2 bei einzelnen Patienten
Abbildung 8: CCL2-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus
Abbildung 9: CCL5-Konzentration im Gesamtverlauf
Abbildung 10: Verlauf von CCL5 bei primär oder adjuvant behandelten Patienten
Abbildung 11: Konzentrationen von CCL5 bei einzelnen Patienten
Abbildung 12: CCL5-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus
Abbildung 13: CCL20-Konzentration im Gesamtverlauf
Abbildung 14: Verlauf von CCL20 bei primär oder adjuvant behandelten Patienten
Abbildung 15: Konzentrationen von CCL20 bei einzelnen Patienten
Abbildung 16: CCL20-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus
Abbildung 17: CXCL12-Konzentration im Gesamtverlauf
Abbildung 18: Verlauf von CXCL12 bei primär oder adjuvant behandelten Patienten 40
Abbildung 19: Konzentrationen von CXCL12 bei einzelnen Patienten
Abbildung 20: CXCL12-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus
Abbildung 21: IL-6-Konzentration im Gesamtverlauf
Abbildung 22: Verlauf von IL-6 bei primär oder adjuvant behandelten Patienten
Abbildung 23: Konzentrationen von IL-6 bei einzelnen Patienten
Abbildung 24: IL-6-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus

# Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: UICC-Stadien	3
Tabelle 2: Untersuchte Chemokine und Zytokine	7
Tabelle 3: Laborkits	13
Tabelle 4: Geräte	15
Tabelle 5: Zubehör	16
Tabelle 6: Software	16
Tabelle 7: UICC-Stadien	65
Tabelle 8: Untersuchte Chemokine und Zytokine	65
Tabelle 9: T-Stadien von Kopf-Hals-Tumoren	66
Tabelle 10: N-Stadien von Kopf-Hals-Tumoren	66
Tabelle 11: Grading von Kopf-Hals-Tumoren	67
Tabelle 12: Patientenkollektiv	67
Tabelle 13: Patientencharakteristika	69

# Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
c in TNM	kurativ
d. h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Einheitszeichen für Gray
HIF1A	Hypoxie-induzierter Faktor
HP-Virus	Humanes Papillomavirus
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
0. g.	oben genannt
p in TNM	pathologisch
pg	Pikogramm
RCT	Radiochemotherapie
rpm	revolutions per minute
Tis	Tumor in situ
TNM	Tumor/Node/Metastasis
u. a.	unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
U/min	Umdrehungen pro Minute
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

### 1 Einleitung

### 1.1 Inzidenz, Pathologie und Risikofaktoren von Kopf-Hals-Tumoren

Unter allen Tumorentitäten gehören Kopf-Hals-Tumoren mit zunehmender Tendenz mittlerweile zu den sechsthäufigsten weltweit (Duvvuri und Myers 2009). Noch im Jahr 2000 war diese Tumorentität auf Platz 8 im weltweiten Vergleich (Ragin et al. 2007). So erkrankten 2008 weltweit etwa 635.000 Menschen an Kopf-Hals-Tumoren, davon etwa 13.000 in Deutschland (Jemal et al. 2008; Kaatsch et al. 2012).

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt insgesamt über alle Tumorstadien gemittelt bei etwa 50% und konnte während der letzten Jahre trotz der Anwendung neuer multimodaler Therapieregime nicht wesentlich verbessert werden (Begg 2012; Chen et al. 2008; Guntinas-Lichius et al. 2010).

Insgesamt ist das männliche Geschlecht etwa zehnmal häufiger betroffen als das weibliche, wobei sich seit einigen Jahrzehnten ein Trend erkennen lässt, der eine Zunahme der Inzidenz bei Frauen proportional zu den gesteigerten Rauchgewohnheiten verzeichnet (Strutz und Mann 2000).

Der Altersgipfel, in dem Männer ein Malignom des Kopf-Hals-Bereichs entwickeln, liegt zwischen 50 und 70 Jahren, bei Frauen zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr (Chin et al. 2006).

Am häufigsten sind die Tumoren dabei in der Mundhöhle und im Oropharynx lokalisiert, es treten aber auch Malignome im Hypopharynx und Larynx auf (Canto und Devesa 2002). Histologisch liegt bei 90% der Patienten ein Plattenepithelkarzinom vor, andere histologische Typen (wie z. B. Sarkome) treten deutlich seltener auf (Riede et al. 2004).

Zu den Risikofaktoren, ein Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich zu entwickeln, zählen v.a. der Nikotin- und Alkoholabusus und in diesem Zusammenhang häufig ein niedriger sozioökonomischer Status. In Kombination wirken diese beiden Noxen mehr als additiv; das Risiko ein Karzinom zu entwickeln, beträgt das 15fache im Vergleich zur Normalbevölkerung (Mashberg und Samit 1995).

Als weitere Ursache konnte in den letzten 20 Jahren zunehmend auch das Vorliegen einer Humanen-Papilloma(HP)-Virus-Infektion (hier v. a. HP-Virus 16) für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen werden (Löning et al. 1985). Die Prävalenz des HP-Virus in Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich beträgt etwa 25-30%, ist jedoch stark von der Tumorlokalisation (hier v. a. im Tonsillenbereich) abhängig (Dahlgren et al.

2004). Interessanterweise erkranken in den USA immer mehr jüngere (< 50 Jahren) HP-Virus-positive Patienten, die weder vermehrt Zigaretten noch Alkohol konsumieren und einen höheren sozioökonomischen Status haben, an Malignomen im Kopf-Hals-Bereich (Chaturvedi et al. 2008; Nguyen et al. 2010).

Das Gesamtüberleben dieses Patientenkollektives ist deutlich besser als bei HP-Virusnegativen Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor, wobei mehrere Faktoren wie z. B. das jüngere Alter diese Statistik beeinflussen können (O'Rorke et al. 2012).

### **1.2** Therapie und Prognose

Maßgeblich für die individuelle Wahl der Therapie von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren sind der Ausbreitungsgrad des Tumors, seine exakte Lokalisation und der Allgemeinzustand des Patienten.

Grundsätzlich wird, sofern es die Ausbreitung des Tumors und der Allgemeinzustand des Patienten zulassen, eine vollständige operative Entfernung angestrebt. (komplette onkologische Resektion) (Bogdanov-Berezovsky et al. 2008). Bei klinischem oder bildgebendem Verdacht auf das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen wird nicht nur der Primärtumor entfernt, sondern zumeist zweizeitig eine *neck dissection* durchgeführt, um ggf. vorliegende Lymphknotenmetastasen zu entfernen (Gil und Fliss 2009).

In Abhängigkeit vom postoperativen histopathologischen Stadium kann im Anschluss an die Operation eine kombinierte Radiochemotherapie (RCT) indiziert sein.

So ist bei den Union Internationale Contre Le Cancer (UICC)-Stadien I und II (s. Tabelle 1) eine alleinige operative Entfernung des Karzinoms ausreichend, während bei fortgeschrittenen UICC-Stadien oder bei unvollständiger Resektion die Durchführung einer adjuvanten kombinierten RCT das Gesamtüberleben deutlich verbessert (Bernier et al. 2004; Bachaud et al. 1996).

#### Tabelle 1: UICC-Stadien

(Wittekind und M	(Ieyer 2010)
------------------	--------------

Stadium 0	Tis	NO	M0
Stadium I	T1	NO	M0
Stadium II	T2	NO	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	Т3	N0,N1	M0
Stadium IV	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	N0, N1, N2	<b>M</b> 0
	jedes T	jedes N	M1

Das Bestrahlungsausmaß und die Dosis richten sich dabei nach der Tumorlokalisation, dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und dem Allgemeinzustand des Patienten.

Kopf-Hals-Tumoren, die bereits bei Diagnosestellung als inoperabel eingestuft werden, werden in kurativer Absicht primär mit einer kombinierten RCT behandelt (Merlano et al. 1996; Pignon et al. 2009).

Da in dieser Behandlungssituation ein manifester Tumor vorliegt, wird der Tumor sowie sein Lymphabflussgebiet mit einer höheren Gesamtdosis als in der adjuvanten Situation bestrahlt.

In einer bereits fernmetastasierten Situation wird das kurative Behandlungskonzept verlassen und ein palliatives Therapieregime durchgeführt. Dieses beinhaltet häufig eine lokale Therapie (Brachytherapie oder lokalisierte perkutane Bestrahlung) oder eine alleinige Chemotherapie (Meyer JE et al. 2010; Vermorken et al. 2008).

Die Gesamtprognose eines Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Entscheidend sind aber die lokale Ausdehnung des Tumors und das Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen bei Diagnosestellung.

Dies ist insbesondere von Bedeutung, da es bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich u. a. auch wegen des Fehlens von Frühsymptomen meist erst spät zur Diagnosestellung kommt. Daher befinden sich viele Patienten in weiter fortgeschrittenen Stadien (UICC III und IV) der Erkrankung, was dann mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Baatenburg de Jong et al. 2001).

#### 1.3 Chemokine

Chemokine und ihre Rezeptoren bilden eine Superfamilie niedrig-molekularer Peptide (~ 8-14 kDa), die zu der großen Gruppe der Zytokine gehören und hauptsächlich die Migration (Chemotaxis) unterschiedlichster Zelltypen des Immunsystems in die Gewebe kontrollieren.

Sie werden in vier verschiedene Gruppen (C, CC, CXC, und CX3C) eingeteilt, die sich in der Lokalisation der Zysteinrest-Gruppe am N–Terminus des Proteins unterscheiden.

Mittlerweile sind etwa 50 verschiedene Chemokine und 18 unterschiedliche Chemokinrezeptoren bekannt. Dieses Verhältnis von Liganden und Rezeptoren macht deutlich, dass es häufig mehrere Liganden für einen Rezeptor gibt.

Chemokine sind nicht nur in Prozesse der Immunantwort des Körpers involviert, sondern übernehmen auch immunmodulatorische Aufgaben, wie sie z. B. im Rahmen von malignen Geschehen im Körper auftreten können (Zlotnik und Yoshie 2000).

Chemokine werden durch unterschiedliche proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und pathogene Stimuli induziert. Dabei entsteht die Wirkung der Liganden über ihre transmembranen G-Protein-gekoppelten (Chemokin)-Rezeptoren.

Nicht nur in physiologischen Prozessen im Körper sind Chemokine maßgeblich beteiligt. Studien belegen, dass auch Tumorzellen und die den Tumor umgebenden Zellen (Stroma) eine Chemokinexpression induzieren und beeinflussen können und somit eine Rolle in der Proliferation eines Tumors und in der Entstehung von Metastasen spielen (Zlotnik 2006).

#### **1.3.1** Chemokine und ihre Rolle in der Metastasenbildung

Ähnlich wie bei der Leukozytenmigration in unterschiedliche Gewebe kann die Entstehung und die Ausbreitung der Metastasen im Körper mit einer gewissen Organselektivität einhergehen.

Eine solche Migration von Tumorzellen in diverse Gewebe wurde von Koizumi et al. als mehrstufig beschrieben (Koizumi et al. 2007).

Zunächst werden die Tumorzellen vom Primarius in die direkt umliegenden Gewebe freigesetzt und müssen von dort in lokale Lymph- oder Blutgefäße eintreten, um sich im Körper verteilen zu können. Häufig treten die Tumorzellen dann im Kapillarbett einzelner Organparenchyme wieder aus den Gefäßen aus und es kommt zur Metastasenbildung im Organ.

Letztendlich ist noch nicht genau verstanden, über welche Signalwege die Metastasierungsprozesse ablaufen. Allerdings mehren sich die Hinweise, dass an den

Prozessen der Metastasierung Chemokine und ihre Rezeptoren in vielen Signalwegen der Metastasierung von Tumorzellen durch autokrine und parakrine Mechanismen beteiligt sind (Wang et al. 1998; Wang et al. 2009).

So zeigten Uchida et al., dass bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle parakrine Mechanismen des CXCR4/CXCL12-Systems bei der Metastasierung in regionäre Lymphknoten eine wichtige Rolle spielen, während die Fernmetastasierung über autokrine Signalwege desselben Chemokinrezeptor/Chemokinliganden gesteuert wird (Uchida et al. 2007).

Müller et al. zeigten 2001 im Mausmodell, dass in isolierten Brustkrebszellen und Metastasen dieser Tumorentität v. a. die Expression des Rezeptors CXCR4 und seines entsprechenden Liganden CXCL12 signifikant erhöht war. Unterdrückte man diese Expression, konnte auch die Metastasierungsrate des Primärtumors gesenkt werden (Müller et al. 2001).

### 1.3.2 Bedeutung der Chemokinexpression in Kopf-Hals-Tumoren

In verschiedenen Studien konnte die Expression von Chemokinen und ihren Rezeptoren in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs nachgewiesen werden (Muller et al. 2006; Albert et al. 2013; Wolff et al. 2011).

Mehrfach wurde in dieser Tumorentität eine Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 (Ligand CXCL12) beschrieben (Katayama et al. 2005; Ueda et al. 2010; Albert et al. 2013).

Das Vorliegen dieses Rezeptors und seines Liganden beeinflusst eine Metastasierung sowohl in regionäre Lymphknoten als auch in ferner gelegene CXCL12-reiche Organe, was sich letztlich in einer schlechteren Prognose für den Patienten äußert (Almofti et al. 2004; Ishikawa et al. 2006; Uchida et al. 2007; Samara et al. 2004).

Dass die Überexpression von CXCR4/CXL12 Auswirkungen auf die Metastasierung der Erkrankung hat, zeigten auch Oliveira-Neto et al. Sie wiesen bei Plattenepithelkarzinomen der Lippe ohne Lymphknotenmetastasen signifikant niedrigere Expressionen von CXCR4/CXCL12 nach als bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx, die bereits in die Lymphknoten metastasiert hatten (Oliveira-Neto et al. 2008).

Nicht nur der CXCR4/CXL12-Komplex, sondern auch weitere Chemokine und ihre Rezeptoren sind in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs *in vivo* nachzuweisen. Ferreira et al. beschrieben eine höhere CCL2-Expression in Lymphknotenmetastasen von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs als in nicht-befallenen Lymphknoten (Ferreira et al. 2008). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Silva et al., die CCL3 und seinen Rezeptor CCR1 in

Lymphknotenmetastasen untersuchten und eine höhere Expression dieses Chemokins im Vergleich zu nicht-befallenen Lymphknoten fanden (Silva et al. 2007).

Die Rezeptoren CCR6 und 7 spielen ebenfalls eine signifikante Rolle in der Entwicklung von Metastasen in Kopf-Hals-Tumoren. So sind eine erniedrigte Expression von CCR6 (Ligand CCL20) und eine erhöhte Expression von CCR7 mit einer vermehrten Metastasierung assoziiert (Wang et al. 2004; Wang et al. 2008).

### 1.3.3 Chemokinexpression und Proliferation

Die Interaktion von CXCR4 und seinem Liganden CXCL12 scheint nicht nur in Prozessen der Metastasierung von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs involviert zu sein, sondern auch direkte Auswirkungen auf die Proliferation des Primarius zu haben. Muller et al. beschrieben eine CXCR4/CXL12-vermittelte Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, die zu einer erhöhten Proliferation und einer verminderten Apoptose des Primärtumors führen können, die letztendlich in einem verlängerten Überleben der Tumorzelle münden (Muller et al. 2006).

### 1.3.4 Auswirkungen einer Radiochemotherapie auf die Chemokinexpression

Einige Studien konnten zeigen, dass sich die Expression der Chemokine und ihrer Rezeptoren während und nach einer RCT ändern. Diese Effekte wurden sowohl an gesunden Geweben und Zellen (Müller und Meineke 2007; Ao et al. 2009) als auch an neoplastischen Zellen und Geweben beobachtet (Lugade et al. 2008; Foulds et al. 2013).

Meist beschränkten sich die Versuche auf die Auswirkungen der RCT auf die Änderung der Chemokinexpression, so dass es nur wenig Aussagen darüber gibt, wie sich die Expression der Chemokinrezeptoren während einer RCT ändert (Johnston et al. 2002; Wolff et al. 2011).

Der CXCL12/CXCR4-Signalweg, der in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wurde im Mausmodell von Kozin et al. während einer Bestrahlung untersucht. Hier zeigte sich ein signifikantes Ansteigen der CXCL12-Expression nach lokaler Bestrahlung von Mäusen, die zuvor Tumorzellen implantiert bekommen hatten (Kozin et al. 2010).

Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs konnten ebenfalls Änderungen der Chemokinexpression während einer Bestrahlung beschrieben werden. So zeigten Schmidtner et. al. eine Erhöhung der Expression von CCL20 *in vitro* aus Zellkulturen von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs unter laufender Bestrahlung (inklusive Hyperthermie) (Schmidtner et al. 2009).

Es konnten nicht nur veränderte Expressionsmuster von Chemokinen während einer RCT festgestellt werden, sondern auch die Auswirkungen dieser Therapie auf die Konzentrationen der Chemokine. Michiels et al. beschrieben eine Änderung der Chemokinkonzentration im Speichel von Patienten, die wegen eines Malignoms im Kopf-Hals-Bereich mit einer RCT behandelt wurden (Michiels et al. 2009).

Auch Wolff et al. zeigten in ihrer Studie eine nach Bestrahlung veränderte CXCL12-Konzentration in Zelllinien eines Oropharynxkarzinoms (Wolff et al. 2011).

### 1.3.5 Untersuchte Chemokine und Zytokine

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Chemokine (CCL2, CCL5, CCL20, CXCL12) und das Akut-Phase-Zytokin (IL-6) kurz charakterisiert (s. Tabelle 2). Diese Chemokine wurden aufgrund von Ergebnissen vorausgegangener Arbeiten der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie in Göttingen gewählt (Wolff et al. 2011). Tabelle 2: Untersuchte Chemokine und Zytokine

Chemokin	anderer Name	vollständiger Name	Rezeptor
CCL2	MCP-1, SCYA-2	monocyte chemoattractant protein 1	CCR2
CCL5	RANTES	regulated upon activation of normal T cell	CCR1,3, 5
CCL20	MIP3-α, LARC	macrophage inflammatory protein 3 alpha	CCR6
CXCL12	SDF-1, SCYB12	stromal cell-derived factor 1	CXCR4, 7

Zytokin	anderer Name	vollständiger Name
IL-6	IFNB2	Interleukin 6

### 1.3.5.1 CCL2

CCL2 gehört der Subgruppe CC der Superfamilie der Chemokine an. Seine Rolle im Immunsystem ist vielfältig; hauptsächlich ist es ein Aktivator von Monozyten und Makrophagen und induziert deren Chemotaxis (Matsushima et al. 1989).

CCL2 selbst wird ebenfalls von den verschiedensten Mediatoren, die in Immunantworten involviert sind, aktiviert. Dazu gehören u.a. TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-4 (Schröder 1992).

Mittlerweile gibt es eindeutige Hinweise darauf, dass CCL2 nicht nur in den Prozessen der Immunantwort eine wichtige Rolle spielt, sondern auch in vielen Vorgängen maßgeblich beteiligt ist, die für die Entwicklung von Malignomen entscheidend sind (Loberg et al. 2006; Enjuanes et al. 2008).

Das Vorliegen von CCL2 bei Patienten, die unter einer malignen Tumorerkrankung leiden, wurde schon vielfach beschrieben. Zu diesen Tumorentitäten, die hohe Level von CCL2 exprimieren, zählen u. a. Malignome des Kopf-Hals-Bereichs, des Ösophagus, der Prostata und der Brust (Wolff et al. 2011; Koide et al. 2004; Zhang et al. 2010; Saji et al. 2001).

Hohe Expressionsmuster von CCL2 korrelieren hierbei mit einer aktiven Angiogenese, einer damit verbundenen verstärkten Tumorproliferation und höheren Metastasierungsrate. Daraus resultieren häufig eine schlechtere Prognose und eine frühere Rezidivneigung der Tumorerkrankung (Qian et al. 2011; Saji et al. 2001; Ferreira et al. 2008).

Lu et al. konnten ähnliche Ergebnisse nachweisen. Bei Karzinomen des Nasopharynx korrelierten hohe CCL2-Konzentrationen im Serum von Patienten mit einer kürzeren Überlebenswahrscheinlichkeit und einem kürzeren metastasenfreien Überleben (Lu et al. 2011).

# 1.3.5.2 CCL5

CCL5 gehört zu der Subgruppe CC der Superfamilie der Chemokine. In der Immunantwort des Körpers spielt es eine zentrale Rolle über seine Funktion der Initiierung der Chemotaxis von Leukozyten und deren Modulation. Dieses wirkt sich insbesondere auf T-Zellen und ihre spezifischen Subtypen, aber auch auf viele andere in Immunprozessen involvierte Zellen aus (Taub und Oppenheim 1993). Diese Zelltypen können nach erfolgter Chemotaxis von CCL5 aktiviert werden.

Wird CCL5 in Mäusen deaktiviert, ist die Entwicklung von Leukozyten (hier v. a. T-Zellen) in Entzündungsprozessen fehlerhaft (Makino et al. 2002).

Eine CCL5-Expression wurde in verschiedenen Tumorentitäten detektiert, beispielsweise in Malignomen der Mamma, im Kopf-Hals-Bereich und in Hodgkin-Lymphomen (Luboshits et al. 1999; Buettner et al. 2007; Wolff et al. 2011; Rao et al. 2010; Aldinucci et al. 2008).

Dabei korrelieren hohe Expressionsmuster von CCL5 in Malignomen der Brust mit einer Progression des Tumorwachstums, mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und werden häufig auch dann erhöht gemessen, wenn es zum Rezidiv und/oder Metastasenbildung kommt (Zhang et al. 2013; Luboshits et al. 1999; Niwa et al. 2001; Bièche et al. 2004).

Auch im Serum von Patientinnen mit einem Malignom der Mamma sind höhere Konzentrationen von CCL5 zu messen als bei Patientinnen ohne diese Erkrankung, wobei noch nicht endgültig bewiesen werden konnte, dass diese aufgrund der Tumorerkrankung erhöht waren und nicht aufgrund anderer Faktoren (Eissa et al. 2005).

Vergleichbare Beobachtungen machten Trellakis et al. auch bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, deren CCL5-Konzentration sie im Serum bestimmten. Sie stellten eine signifikant höhere Konzentration von CCL5 im Serum fest als bei der gesunden Kontrollgruppe (Trellakis et al. 2011).

### 1.3.5.3 CCL20

CCL20 gehört der Subgruppe CC der Superfamilie der Chemokine an und hat eine relativ selektive Aktivität für die Chemotaxis von Lymphozyten und dendritischen Zellen (Power et al. 1997).

CCL20 wird in vielen Geweben und Zellen exprimiert. Dazu zählen u. a. die Leber, das Pankreas, Lymphozyten und Makrophagen (Schutyser et al. 2003).

Zytokine wie z. B. TNF- $\alpha$  können die Expression von CCL20 induzieren, was über autokrine und parakrine Mechanismen zu den unterschiedlichsten Erkrankungen z. B. Psoriasis und atopische Dermatitis führen kann (Homey et al. 2000).

Auch unter onkologischen Gesichtspunkten scheint CCL20 eine immer wichtigere Rolle zu spielen, da es von vielen Tumorentitäten (Schilddrüsenkarzinome, Pankreaskarzinome und Kopf-Hals-Tumore) vermehrt exprimiert wird (Abiko et al. 2003; Kleeff et al. 1999).

Beim Nasopharynxkarzinom, aber auch beim kolorektalen Karzinom konnte CCL20 als prognostischer Marker identifiziert werden. So korreliert CCL20 im Serum mit dem synchronen Vorliegen von Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom (Iwata et al. 2013).

Beim Nasopharynxkarzinom korrelierten sowohl hohe CCL20-Spiegel im Serum als auch eine erhöhte CCL20-Expression auf den Tumorzellen mit dem Vorliegen von Fernmetastasen und waren signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Chang et al. 2008).

### 1.3.5.4 CXCL12

CXCL12 gehört der Subgruppe CXC der Superfamilie der Chemokine an und wird sowohl von Stromazellen des Knochenmarks als auch von vielen anderen Geweben exprimiert (Tashiro et al. 1993).

CXCL12 spielt eine Schlüsselrolle in der B-Zell-Lymphopoese, Stammzellmobilisation aus dem Knochenmark und Leukozytenmigration (Ma et al. 1998).

CXCL12 wird von vielen Krebszellen exprimiert und spielt in der Metastasenbildung und Proliferation von Krebszellen verschiedener Entitäten über seine Rezeptoren CXCR4 und 7 eine große Rolle (Taichman et al. 2002; Zhou et al. 2002; Uchida et al. 2003).

In Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs induziert eine Überexpression von CXCL12/CXCR4 zelluläre Mechanismen, die für die Motilität der Tumorzellen, ihre Invasion in andere Gewebe und die Fähigkeit Metastasen zu bilden von großer Bedeutung sind (Albert et al. 2013; Yin et al. 2013).

Zudem konnte eine Hochregulierung von CXCL12 und seinem Rezeptor CXCR4 in hypoxischen Brustkrebszellen beobachtet werden. Dieses führte zu einer vermehrten Angiogenese und Proliferation der Krebszellen. Auch eine Hypoxie-induzierte Adhäsion der Tumorzellen an Endothelzellen und eine damit stimulierte transendotheliale Migration konnte nachgewiesen werden. Die Effekte der Hypoxie über eine Hochregulierung von CXCL12 und seinem Rezeptor waren von der Aktivität des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF1A) abhängig (Jin et al. 2012).

### 1.3.5.5 IL-6

Während es sich bei den zuvor genannten Proteinen um Peptide aus der Gruppe der Chemokine handelte, ist IL-6 ein pleitropes proinflammatorisches Zytokin. Zusammen mit dem Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  und Interleukin-1 initiiert es die körpereigene Immunantwort, indem es die Akut-Phase-Reaktion induziert (Le und Vilcek 1989; Ramadori und Christ 1999). Die IL-6-Produktion wird durch verschiedene Hormone wie Steroide, Katecholamine und Sexualhormone gesteuert und kontrolliert (Schuett et al. 2009).

Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der IL-6-Expression und der malignen Transformation von Zellen epithelialen Ursprungs und Tumorprogression gesichert werden (Oka et al. 1996).

Beim kolorektalen Karzinom beispielsweise korrelieren hohe IL-6-Spiegel im Serum mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und einer schlechteren Prognose (Waldner et al. 2012). Hohe Level von IL-6 im Serum von Patienten mit einem Ösophaguskarzinom sind mit Lokalrezidiven und dem Entwickeln von Fernmetastasen eng assoziiert (Chen et al. 2013).

Auch bei Kopf-Hals-Tumoren konnte eine erhöhte Expression von IL-6 mit einem Potential zur Metastasenbildung und Invasivität assoziiert werden (Shkeir et al. 2013; Kanazawa et al.

2007; Klein und Grandis 2010). In der Annahme, dass IL-6 direkt vom Tumor in das Blut sezerniert wird, kann die Serumkonzentration von IL-6 bereits als Biomarker für Aussagen über die Prognose von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor herangezogen werden (Duffy et al. 2008; Riedel et al. 2005; St John et al. 2004).

Das Verhalten von IL-6 während einer Bestrahlung konnte bereits in einigen Studien beschrieben werden. So zeigte sich sowohl im Mausmodell als auch z. B. im Speichel von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor ein signifikanter Anstieg des IL-6-Levels nach einer Bestrahlung (Ao et al. 2009; Akmansu et al. 2005; Citrin et al. 2012; Reers et al. 2013).

### 1.4 Ziel der Untersuchung

Die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich hat sich trotz vieler neu entwickelter Therapieregime in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert. Über alle Tumorstadien gemittelt liegt sie nur bei ca. 50% (Begg 2012; Chen et al. 2008; Guntinas-Lichius et al. 2010).

Dabei ist die Prognose in weiter fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung trotz zum Teil radikaler Operation und RCT nochmals deutlich schlechter. Dies ist insofern von Bedeutung, als 40-50% aller Patienten bei Diagnosestellung ein lokal oder regional fortgeschrittenes Karzinom (T3 oder T4, N1-3, M0) aufweisen (Vokes et al. 1993).

Die genauen Prozesse der Entstehung regionaler Lymphknotenmetastasen sind hierbei letztlich nicht verstanden. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass Chemokine und ihre Rezeptoren an der Entstehung und Verbreitung dieser Metastasen maßgeblich beteiligt sind (Ferreira et al. 2008; Oliveira-Neto et al. 2008; Silva et al. 2007).

Ein Zusammenhang zwischen der Chemokinexpression- oder konzentration einzelner Chemokine und der RCT bei Kopf-Hals-Tumoren wurde erst in wenigen Studien beschrieben (Wolff et al. 2011; Reers et al. 2013).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, die Chemokinkonzentration im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich während einer RCT mittels eines Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zu untersuchen. Hierzu sollen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (vor RCT, Mitte RCT und Ende RCT) die Konzentrationen im Plasma gemessen werden.

Es soll zusätzlich untersucht werden, ob Unterschiede in der Chemokinkonzentration im Plasma von Patienten, die eine adjuvante RCT erhielten im Vergleich zu Patienten, die primär mit einer RCT behandelt wurden, bestehen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu prüfen, ob sich ein Effekt der Konzentration der Chemokine auf die Lymphknotenmetastasierung nachweisen lässt.

Die gewonnenen Ergebnisse könnten für zukünftige Therapieentscheidungen in der Behandlung von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich herangezogen werden und somit zu einer Individualisierung der Therapie mit Verbesserung der Prognose beitragen.

# 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien aufgezählt. Anschließend werden die Patientenrekrutierung und das weitere Vorgehen im Methodenteil beschrieben.

# 2.1 Material

# 2.1.1 Laborkits

### Tabelle 3: Laborkits

Quantikine® Human IL-6 Immunoassay,	R&D Systems	Minneapolis, USA
Katalog-Nr. D6050, bestehend aus:		
Diluted Wash Buffer		
Stop-Solution		
Calibrator Diluent RD6F		
Assay Diluent RD1W		
Conjugate		
Unmixed Color Reagent A & B		
Standard		
Microplate Wells		
Quantikine® Human CXCL12/SDF-1a	R&D Systems	Minneapolis, USA
Immunoassay, Katalog-Nr. DSA00, bestehend		
aus:		
Diluted Wash Buffer		
Stop-Solution		
Calibrator Diluent RD6Q		
Assay Diluent RD1-55		
Conjugate		

Unmixed Color Reagent A & B		
Standard		
Microplate Wells		
Quantikine® Human CCL2/MCP-1	R&D Systems	Minneapolis, USA
Immunoassay, Katalog-Nr. DCP00, bestehend		
aus:		
Diluted Wash Buffer		
Stop-Solution		
Calibrator Diluent RD6Q		
Assay Diluent RD1-83		
Conjugate		
Unmixed Color Reagent A & B		
Standard		
Microplate Wells		
Quantikine® Human CCL5/RANTES	R&D Systems	Minneapolis, USA
Immunoassay, Katalog-Nr. DRN00B, bestehend		
aus:		
Diluted Wash Buffer		
Stop-Solution		
Calibrator Diluent RD6-11		
Assay Diluent RD1W		
Conjugate		
Unmixed Color Reagent A & B		
Standard		
Microplate Wells		

Quantikine® Human CCL20/MIP-3α	R&D Systems	Minneapolis, USA
Immunoassay, Katalog-Nr. DM3A00, bestehend		
aus:		
Diluted Wash Buffer		
Stop-Solution		
Calibrator Diluent RD6U		
Assay Diluent RD1-5		
Conjugate		
Unmixed Color Reagent A & B		
Standard		
Microplate Wells		

# 2.1.2 Geräte

### Tabelle 4: Geräte

Sterilisator	Memmert	Schwalbach, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research mit Spitzen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Elisa Reader	Tecan	Salzburg, Österreich
Kühlgefrierkombination	Bosch	München, Deutschland
Kühlschrank (-80°C)	SANYO-	Bad Nenndorf,
	Biomedical	Deutschland
Zentrifuge (Modell 5810R)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker	IKA	Taquara, Brasilien
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra	Chur, Schweiz
	Biosciences	
Pipette Eppendorf Research mit Spitzen (2-	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

20 µl), (20-200 µl), (100-1000 µl)	

# 2.1.3 Zubehör

Eppendorf-Cups 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf-	Hamburg, Deutschland
	Nether - Hinz	
	GmbH	
PAXgene <sup>™</sup> Blood RNA System	Qiagen	Düsseldorf, Deutschland
EDTA-Monovette 2,7 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
EDTA-Monovette 9 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Multifly-Kanüle 0,8x19 mm	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipetten steril 10 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

# 2.1.4 Software

### Tabelle 6: Software

Word, Version 2003	Microsoft	Redmond, USA
Excel, Version 2003	Microsoft	Redmond, USA
Magellan 5.0 (Elisa)	Tecan	Salzburg, Österreich
KaleidaGraph Version 4.01	Synergy Software	Reading, USA

# 2.2 Methoden

# 2.2.1 Patientenrekrutierung

In die Studie wurden alle Patienten eingeschlossen, die wegen eines Malignoms im Kopf-Hals-Bereich im Zeitraum Oktober 2010 bis Oktober 2012 mit einer kombinierten Radiochemotherapie in der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen behandelt wurden.

Die Einschlusskriterien im Einzelnen waren das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx ohne Fernmetastasen, welches primär oder adjuvant in kurativer Intention behandelt wurde.

Es wurden nur die Patienten eingeschlossen, von denen zu allen drei Zeitpunkten Plasmaproben genommen werden konnten. War dies aus unterschiedlichen Gründen (Tod, Allgemeinzustand, Abbruch der Behandlung) nicht möglich, erfolgte der Ausschluss aus der Studie. Die Nummerierung der Patientenplasmen erfolgte anhand der Reihenfolge.

Eine weitere Voraussetzung war die mündliche und schriftliche Aufklärung der Patienten über den Ablauf der Studie und deren schriftliche Einwilligung. Zudem lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen vor.

### 2.2.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 66 Patienten, von denen acht Frauen und 58 Männer waren. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug 61 Jahre, der älteste Patient war 76, der jüngste 23 Jahre alt (s. Tabelle 13).

Der Primärtumor war bei 20 Patienten in der Mundhöhle lokalisiert, bei 24 Patienten im Oropharynx, bei neun Patienten befand sich der Primärtumor im Hypopharynx und bei 13 Patienten im Larynx (s. Tabelle 13).

Das Tumorstadium war bei drei Patienten T1, bei zehn Patienten T2, bei 18 Patienten im Stadium T3 und bei weiteren 34 Patienten lag bereits ein T4-Stadium vor. Ein weiterer Patient wurde aufgrund eines lokoregionären LK-Rezidivs ohne ein Rezidiv im Bereich des ehemaligen Primärtumors behandelt und ist daher nicht in der Tabelle aufgeführt (s. Tabelle 9).

Im Patientenkollektiv lag bei 16 Patienten ein N0-Stadium als Lymphknotenstatus vor, 16 Patienten wiesen ein N1-Stadium auf und bei 34 Patienten lag ein N2-Stadium vor (s. Tabelle 10).

Mittels der Staging-Untersuchungen wurden die Patienten im Hinblick auf das Vorliegen von Fernmetastasen untersucht. Dazu gehörten je nach Fragestellung eine Röntgen-Untersuchung des Thorax, eine Computertomographie des Halses und des Thorax sowie eine Sonographie des Abdomens und in Einzelfällen eine Skelettszintigraphie. Fernmetastasen wurden jedoch bei keinem der Patienten diagnostiziert.

Alle hier vorliegenden Tumoren waren histopathologisch Plattenepithelkarzinome vom verhornenden oder nicht-verhornenden Typ. Sie lagen in drei verschiedenen Differenzierungsgraden vor. Zwei Tumoren hatten einen G1-Status, 58 Tumore einen G2-Status und sechs einen G3-Status (s. Tabelle 11).

Gemäß der Einteilung nach UICC lag bei 18 Patienten ein Stadium III und bei 48 Patienten bereits ein Stadium IV vor (s. Tabelle 7).

50 der 66 Patienten wurden adjuvant und 16 Patienten wurden primär mit einer kombinierten Radiochemotherapie behandelt.

In Tabelle 13 wurden die beschriebenen Charakteristika zusammengefasst.

### 2.2.3 Radiochemotherapie

Alle Patienten wurden mit einer normofraktionierten Radiotherapie behandelt. Je nach Ausbreitungsgrad und Lokalisation des Tumors und der Operabilität wurden unterschiedliche Konzepte durchgeführt. So wurden 50 der 66 Patienten adjuvant mit einer RCT behandelt.

41 dieser 50 Patienten bekamen eine RCT mit einer Gesamtdosis von 62,4 Gy (maximal 2,08 Gy Einzeldosis (ED)/Tag, 5 Tage pro Woche). Diese setzte sich wie folgt zusammen: Der Primärtumor, sowie alle Lymphknoten mit einem nachgewiesenen Kapseldurchbruch wurden täglich mit 2,08 Gy, Lymphknoten ohne Kapseldurchbruch mit 1,92 Gy/Tag und nicht befallene Lymphknoten mit 1,8 Gy/Tag bestrahlt.

Neun Patienten wurden adjuvant mit einer Gesamtdosis von 64 Gy bestrahlt. Hier lag der Primarius in enger Lagebeziehung zum Larynx, weshalb die tägliche Einzeldosis auf 2 Gy/Tag beschränkt werden musste. Der Primärtumor wurde somit zunächst nur mit 2 Gy/Tag bestrahlt, und die Primärregion dann am Ende der Behandlung mit einem Boost von 2x2 Gy/Tag aufgesättigt.

16 Patienten wurden mit einer primären RCT behandelt. 13 dieser 16 Patienten erhielten eine Gesamtdosis von 66 Gy als primäre Therapie. Der Primarius sowie alle Lymphknoten mit einem nachgewiesenen Kapseldurchbruch wurden täglich mit einer Einzeldosis von 2,2 Gy bestrahlt. Lymphknoten ohne Kapseldurchbruch wurden mit 1,92 Gy/Tag und nicht befallenene Lymphknoten wurden täglich mit 1,8 Gy bestrahlt.

Weitere drei Patienten wurden mit insgesamt 70 Gy bestrahlt. Zunächst wurde die Primärregion mit 2 Gy/Tag bis zu einer Dosis von 60 Gy bestrahlt. Anschließend wurde der Primarius und die Lymphabflussstationen noch mit einem Boost von 5x2 Gy behandelt.

Alle Patienten erhielten parallel zur Radiotherapie eine konkomitante Chemotherapie mit Cisplatin in einer Dosierung von 6mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche an jedem Bestrahlungstag.

# 2.2.4 Blutentnahme

Um die Chemokinkonzentration im Blut während der Therapie feststellen zu können, wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der RCT bei jedem Patienten Blutentnahmen durchgeführt.

Die erste unmittelbar vor der ersten RCT-Fraktion, die zweite zur Mitte nach der RCT-Fraktion und die letzte direkt nach der letzten RCT-Fraktion.

Die Blutentnahme erfolgte mittels einer Multifly-Kanüle nach dem Desinfizieren und Stauen der zu punktierenden Vene. Vor der ersten RCT-Fraktion wurden insgesamt vier Monovetten mit peripherem, venösem Vollblut entnommen. Zwei dieser Monovetten waren 9 ml EDTA-Monovetten, eine weitere war eine 2,7 ml EDTA-Monovette und die vierte ein PAXgene Blood RNA System.

Bei den zwei folgenden Blutentnahmen wurde auf die 2,7 ml Monovette verzichtet, so dass nur die beiden 9 ml EDTA-Monovetten und das PAXgene Blood RNA System entnommen wurden.

# 2.2.4.1 Verarbeitung des Blutes

Beide 9 ml EDTA-Monovetten wurden sofort nach der Blutentnahme in die zuvor auf 4°C gekühlte Zentrifuge gestellt und bei 3000 U/min für insgesamt 15 min zentrifugiert.

Das dadurch entstandene Plasma wurde anschließend in E-Cups aliquotiert. Für die bessere spätere Verwendbarkeit wurden unterschiedlich große Volumina des Plasmas in die 1,5 ml E-Cups überführt. Fünf E-Cups wurden mit 500 µl und fünf weitere E-Cups mit 300 µl gefüllt. Das übrig gebliebene Volumen wurde in einen 2 ml E-Cup pipettiert.

Alle E-Cups wurden im Anschluss bei -80°C eingefroren und entsprechende Mengen für den ELISA verwendet.

Die nur bei der ersten Blutentnahme abgenommene 2,7 ml EDTA-Monovette wurde direkt im Anschluss bei -20°C für eventuell spätere DNA-Analysen eingefroren. Ebenso wurde mit dem PAXgene Blood RNA System verfahren.

Die DNA-Analysen und die weitere Verarbeitung des PAXgene-Röhrchens, waren nicht Teil dieser Arbeit, sondern sollen in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

# 2.2.5 ELISA

Der Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren, welches auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, mit dem man die Quantität von Molekülen z. B. in Körperflüssigkeiten bestimmen kann.



Abbildung 1 zeigt schematisch den Ablauf und die prinzipielle Funktionsweise eines ELISA. Zu einem bereits an der Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper (Capture Antibody) wird das nachzuweisende Antigen (Analyte) hinzugegeben. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird ein Detektions-Antikörper (HRP) dazu pipettiert. Nach der Zugabe des Substrats (TMB) entwickelt sich über eine enzymatische Reaktion eine blaue Lösung. Diese ist in ihrer Intensität proportional zur Quantität des nachzuweisenden Antigens. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Stop-Solution beendet. Die Probe färbt sich gelb und die Absorption kann anschließend photometrisch gemessen werden. Alle folgenden Versuche wurden mit den Quantikine® Immunoassays von R&D Systems durchgeführt.

 $http://www.rndsystems.com//product_detail_objectname_quantikineelisaassayprinciple.aspx$ 

Es wurden insgesamt fünf ELISA durchgeführt, um folgende Chemokine und das Akut-Phase-Zytokin (IL-6) nachzuweisen:

- Human CCL2/ MCP-1
- Human CCL5/RANTES
- Human CCL20/MIP-3α
- Human CXCL12/SDF-1α
- Human IL-6

Das Vorgehen war bei allen fünf ELISA nahezu identisch; es wird nun exemplarisch der ELISA für den Nachweis von CXCL12 erläutert. Unterschiede bestanden vornehmlich in der Verwendung der Reagenzien, den Verdünnungen, in der Anzahl der Waschschritte und in den Inkubationszeiten. Alle Schritte fanden in Raumtemperatur statt. Dazu wurden die eingefrorenen Plasmaproben in den E-Cups vorher aufgetaut.

Im ELISA-Kit für CXCL12 waren folgende Bestandteile enthalten (s. Tabelle 3):

- CXCL12-Mikrotiterplatte (bestehend aus 96 Wells)
- CXCL12-Standard (rekombinantes humanes CXCL12)
- CXCL12-Conjugate (polyklonaler Antikörper gegen CXCL12 mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert)
- Assay Diluent RD1-55 (gepuffert, auf Proteinbasis mit blauer Färbung)
- Calibrator Diluent RD6Q (Tierserum)
- Waschpufferkonzentrat
- Color Reagent A (stabilisiertes Hydrogenperoxid)
- Color Reagent B (Tetramethylbenzidine (TMB))
- Stop-Solution (Schwefelsäure)

# 2.2.5.1 Waschpuffer und Standardverdünnungsreihe

Für den Waschpuffer wurden 20 ml des Waschpufferkonzentrats in 480 ml destilliertes Wasser gegeben, um einen 500 ml fassenden Waschpuffer zu erhalten.

Um eine Bezugsgröße (Standard) zu erhalten, wurde zum vorgegebenen CXCL12-Standard 1 ml destilliertes Wasser gegeben. Dies ergab eine Konzentration von 100000 pg/ml nach leichtem Schütteln für 30 min.



Abbildung 2: Verdünnungsreihe

R&D Systems Inc. Quantikine ® ELISA, Human CXCL12/SDF-1a, 5

Abbildung 2 zeigt die Herstellung der Verdünnungsreihe für den CXCL12-Standard.

Zuvor wurden in den 10000 pg/ml-Cup 900 µl RD6Q pipettiert und in jeden weiteren (angefangen ab 5000 pg/ml) Cup 500 µl RD6Q.

Mit der zuvor erstellten 100000 pg/ml Lösung wurde dann die Verdünnungsreihe nach oben gezeigter Abbildung pipettiert.

Das Calibrator Diluent RD6Q diente als Null-Standard (0 pg/ml).

# 2.2.5.2 Bestückung der Mikrotiterplatte

Die Mikrotiterplatte, bestehend aus 96 Wells, war mit einem monoklonalem Antikörper gegen CXCL12 gecoatet.



Abbildung 3: Plan einer Mikrotiterplatte bestehend aus 96 Wells R&D Systems Inc. Quantikine ® ELISA, Human CXCL12/SDF-1α, 12

Zu jedem der 96 Wells wurden zunächst 100µl Assay Diluent RD1-55 gegeben. Anschließend wurden 100 µl des Plasmas oder des Standards in die Wells pipettiert Nebeneinander liegende Wells wurden mit dem gleichen Reagenz (Plasma/Standard) bestückt, um eventuelle

Abweichungen besser detektieren zu können. Zwei Wells wurden frei gelassen und dienten als blank. Das bedeutete, dass keinerlei Probe oder Reagenz hinzugegeben wurde. Der in diesen beiden Wells gemessene Wert wurde im Anschluss von den in den Proben gemessenen Werten abgezogen.

Die nun bestückte Mikrotiterplatte wurde dann für zwei Stunden inkubiert und währenddessen auf dem Minishaker bei 500 rpm leicht bewegt.

# 2.2.5.3 Waschvorgang und Zugabe von CXCL12-Conjugate

Nach Ablauf der zwei Stunden hatte sich ein Antigen-Antikörper-Komplex gebildet. Alle nicht-gebundenen Anteile wurden verworfen und zusätzlich mittels des Waschpuffers (400 µl/well) herausgewaschen. Dieser Vorgang des Waschens und Verwerfens wurde viermal durchgeführt.

Die Wells wurden anschließend mit 200 µl CXCL12-Conjugate bestückt und für weitere zwei Stunden inkubiert und wieder leicht bewegt.

Nach deren Ablauf erfolgte ein weiterer o.g. Waschvorgang, damit erneut alle ungebundenen Anteile herausgewaschen werden konnten und nur noch der nun entstandene Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex vorlag.

# 2.2.5.4 Zugabe von Substrate Solution und Stop-Solution

Zu den Wells wurden anschließend 200 µl Substrate-Solution (Substrat) gegeben. Diese entstand durch Mischen von Color Reagent A und B in gleichen Volumina. Da dieses Reagenz lichtempfindlich war, wurde nun in einem abgedunkelten Milieu gearbeitet.

Das Substrat wurde nun von dem zuvor hinzugegebenen und nun gebundenen Conjugate enzymatisch umgesetzt. Die Proben färbten sich dabei proportional zu ihrer enthaltenen Chemokinkonzentration blau. Je intensiver die Farbe wirkte, desto mehr Chemokin war nun in der Probe zu erwarten.

Nach 30 min wurde die Inkubationszeit durch Zugabe von 50 µl Stop-Solution beendet. Das vorher blau wirkende Reagenz färbte sich nach Zugabe der Stop-Solution gelb.

### 2.2.5.5 Messung der Absorption

Die Mikrotiterplatte wurde sofort im Anschluss in einen Microplate-Reader gestellt. Die Absorption der Wells wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 570 nm mittels der Software Magellan gemessen.

Es wurden jeweils zwei Messungen durchgeführt.

Die Intensität des Farbumschlags war dabei proportional zur Konzentration des nachzuweisenden Antigens.

### 2.2.6 Berechnung der Standardkurve

Um aus den gemessen Daten der Absorption eine Konzentration des jeweiligen Chemokins zu bekommen, wurden Standardkurven pipettiert (s. o). Aus den jeweils zwei gemessen Werten wurde der Mittelwert bestimmt und der *blank* abgezogen.

Mittels der Software Kaleidagraph wurde dann eine Funktion erstellt, die eine Umrechnung der Absorption in die Konzentration des nachzuweisenden Chemokins ermöglichte.

Dies war je nach gemessenen Werten der Absorption entweder mittels einer linearen Anpassung oder mittels einer doppelt-logarithmischen Anpassung möglich.

Abbildung 4 zeigt beispielhaft eine solche lineare Funktion, wie sie aus den Werten der Absorption und der Konzentration des Chemokins CXCL12 erstellt wurde.



Abbildung 4: Standardkurve CXCL12

Über die Steigung der x-Funktion konnte dann über eine Äquivalenzumformung aus der Absorption die Konzentration ermittelt werden.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung aller Ergebnisse wurde der Wilcoxon-Rank-Test für nichtnormalverteilte Stichproben verwendet. Alle Werte mit einem p von kleiner als 0,05 wurden als signifikant angenommen. Die Berechnung der jeweiligen Signifikanzwerte wurde mit Hilfe der Software Kaleidagraph durchgeführt.

Die Ergebnisse für die Chemokine CCL2 und CCL5 wurden von Herrn Prof. Dr. Tim Beißbart aus der Abteilung für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen überprüft und bestätigt.

### 3 Ergebnisse

### 3.1 Messung der Chemokinkonzentration mittels ELISA

Zur Untersuchung der Chemokinkonzentraion im Plasma während einer RCT wurden die entsprechenden ELISA durchgeführt.

Alle fünf untersuchten Chemo- und Zytokine (CCL2, CCL5, CCL20, CXCL12 und IL-6) lagen im Plasma aller Patienten bei allen drei gemessenen Zeitpunkten innerhalb des Messbereichs.

Das Plasma wurde in Doppelreihen gemessen und jeweils ein Mittelwert errechnet. Damit konnten eventuelle Pipettier- oder Messfehler erkannt und möglichst ausgeschlossen werden. Zudem wurde bei etwa der Hälfte der Patienten eine weitere Probe aufgetaut und unabhängig von der ersten Bestimmung gemessen um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu sichern Zusätzlich wurde die Absorption mittels des Microplate-Readers jeweils doppelt bestimmt, um auch hier Messungenauigkeiten zu reduzieren.

Lag die gemessene Konzentration einzelner Chemokine zunächst über dem höchsten Standard, wurde eine Verdünnungsreihe pipettiert, um in einen der Standardreihe angepassten Messbereich zu gelangen.

Im Folgenden soll auf die einzelnen Chemokine eingegangen werden. Es werden sowohl Gesamtverläufe über den Zeitraum der RCT als auch individuelle Einzelverläufe für das jeweilige Chemokin beschrieben. Es wurde ein möglicher Unterschied zwischen Plasma von adjuvant oder primär behandelten Patienten analysiert. Zusätzlich wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Chemokinkonzentration und der Lymphknotenmetastasierung untersucht. Zu beachten ist weiterhin, dass nicht jedes Chemokin in allen der o. g. Plasmaproben untersucht werden konnte, so dass zum Teil weniger als 66 einzelne Proben zur Verfügung standen. Dies lag an der Menge des abgenommenen Blutes, da es aufgrund schlechter Venenverhältnisse bei einigen Patienten nicht möglich war, genügend Material für alle fünf Chemokinmessungen zu asservieren.

### 3.2 CCL2-Konzentration während der Radiochemotherapie



Abbildung 5: CCL2-Konzentration im Gesamtverlauf Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CCL2

Abbildung 5 zeigt den Verlauf der Konzentration des Chemokins CCL2 in pg/ml im Plasma des gesamten Patientenkollektivs (N=64) während der RCT.

Die Daten wurden in einem Boxplot dargestellt. Die waagerechte Linie innerhalb der Box zeigt den Median an, das obere Ende der Box ist als oberes Quartil definiert, das untere Ende der Box als unteres Quartil. Innerhalb der Box liegen also die mittleren 50% der Daten. Die Antennen zeigen die Werte an, die außerhalb der Box liegen und nicht mehr zum Interquartilsabstand zählen. Alle Werte, die sich auch außerhalb der Antennen befinden, sind als Ausreißer definiert.

Der Median der Gruppe vor RCT lag bei 90,005 pg/ml, der der Gruppe Ende RCT lag bei 109,333 pg/ml.

Auffällig war eine hohe Konzentration (~700 pg/ml), die sich über alle Zeitpunkte erstreckte. Interessanterweise stammten diese Plasmaproben von einem Patienten, so dass ein Messfehler nahezu auszuschließen war.

Es ließ sich zunächst ein signifikanter Abfall der Chemokinkonzentration vom Zeitpunkt vor RCT zum Zeitpunkt Mitte RCT erkennen (p=0,038).

Verglich man den Zeitpunkt Mitte RCT mit dem Zeitpunkt Ende RCT, kam es zu einem Anstieg, der ebenfalls signifikant (p<0,0001) war.

Betrachtete man den gesamten Zeitraum von vor der RCT bis zum Ende RCT, war ein signifikanter Anstieg der Konzentration von CCL2 im Plasma der Patienten nachzuweisen (p=0,001).

### 3.2.1 CCL2-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven



Abbildung 6: Verlauf von CCL2 in primär oder adjuvant behandelten Patienten Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CCL2

Abbildung 6 zeigt den Verlauf von CCL2 in pg/ml getrennt nach unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven. Insgesamt 16 Proben von primär behandelten Patienten und 48 Proben von adjuvant behandelten Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen.

Es bestand sowohl ein signifikanter Unterschied (p=0,006) in der Anfangskonzentration von CCL2 in den beiden Kollektiven, als auch ein signifikanter Unterschied (p=0,005) in der Konzentration in der Mitte der Bestrahlungseinheiten.

Verglich man die Konzentrationen von CCL2 am Ende der RCT, konnte ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden, der unterhalb des Signifikanzniveaus lag (p=0,013).
## 3.2.2 Einzelverläufe von CCL2



Abbildung 7: Konzentrationen von CCL2 bei einzelnen Patienten

Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen. Zeitpunkt 1 entspricht dem Zeitpunkt vor RCT, Zeitpunkt 2 dem Zeitpunkt Mitte RCT und Zeitpunkt 3 dem Zeitpunkt Ende RCT. Gestrichelte Linien zeigen den Verlauf der Patienten, die eine primäre RCT erhielten.

Abbildung 7 zeigt den Verlauf von CCL2 in pg/ml im Plasma jedes einzelnen der 64 untersuchten Patienten. Die einzelnen Diagramme sind aufsteigend sortiert nach der Anfangskonzentration von CCL2 im Plasma vor der ersten Bestrahlungs- und Chemotherapiefraktion. Die oberen Diagramme (a und b) stellen die Verläufe der Patienten dar, die vor der ersten RCT-Fraktion eine niedrige Konzentration von CCL2 im Plasma aufwiesen. Es sind in diesen beiden Diagrammen deutlich mehr Patienten zu sehen, die in einem primären Rahmen eine RCT erhielten als in den unteren beiden Diagrammen (e und f). Diese stellen die Verläufe der Patienten dar, die zu Beginn eine hohe Konzentration von CCL2 im Blut aufwiesen.

Die initial beschriebene vergleichsweise hohe Konzentration (~700 pg/ml) von CCL2, die sich über alle drei Zeitpunkte erstreckte, ist nicht in den Einzeldiagrammen zu finden. Über die Ursache für diese hohen Konzentrationen kann nur spekuliert werden.

#### 3.2.3 CCL2-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus



Abbildung 8: CCL2-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CCL2

Abbildung 8 zeigt den Verlauf der Konzentrationen des Chemokins CCL2 bei Patienten mit einem unterschiedlichen Lymphknotenstatus. Insgesamt 15 Patienten wiesen bei Diagnosestellung einen N0-Status und 49 wiesen einen positiven Lymphknotenstatus auf. Die Proben dieser Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der RCT ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen untereinander.

## 3.3 CCL5-Konzentration während der Radiochemotherapie





Abbildung 9 zeigt den Verlauf des Chemokins CCL5 im Plasma in ng/ml des gesamten Patientenkollektivs (N=52) während der RCT.

Der Median der Gruppe vor RCT betrug 44,026 ng/ml, der Median der Gruppe Ende RCT betrug 19,151 ng/ml. Dies ergab eine Differenz von 24,875 ng/ml.

Betrachtete man den Zeitraum vor der RCT mit dem Mitte RCT, ließ sich ein signifikanter Abfall (p<0,0001) der CCL5-Konzentration messen. Der Abfall der Konzentration von Mitte RCT zu Ende RCT war ebenfalls signifikant (p=0,031). Auch über den gesamten Zeitraum der RCT betrachtet, war ein signifikanter Abfall der Chemokinkonzentration im Plasma zu beobachten (p<0,0001).



## 3.3.1 CCL5-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven



Abbildung 10 zeigt den Verlauf von CCL5 getrennt nach unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven. Insgesamt 15 Proben von primär behandelten Patienten und 37 Proben von adjuvant behandelten Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen. Es bestand ein signifikanter Unterschied (p=0,045) in der Anfangskonzentration von CCL5 im Plasma in beiden Gruppen. So war die Konzentration bei primär behandelten, also nicht operierten Patienten deutlich höher als bei Patienten, die sich in der adjuvanten Behandlungssituation befanden.

Ähnliches zeigte sich bei dem Zeitpunkt Mitte RCT. Beide Konzentrationen hatten im Vergleich zur Anfangskonzentration deutlich abgenommen; verglich man beide Konzentrationen von CCL5 zum Zeitpunkt Mitte RCT miteinander, war der Unterschied ebenfalls signifikant (p=0,005).

Auch die Konzentrationen der beiden Gruppen Ende RCT zeigten einen signifikanten Unterschied (p=0,03) zueinander.

## 3.3.2 Einzelverläufe von CCL5



Abbildung 11: Konzentrationen von CCL5 bei einzelnen Patienten

Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen. Zeitpunkt 1 entspricht dem Zeitpunkt vor RCT, Zeitpunkt 2 dem Zeitpunkt Mitte RCT und Zeitpunkt 3 dem Zeitpunkt Ende RCT. Gestrichelte Linien zeigen den Verlauf der Patienten, die eine primäre RCT erhielten.

Abbildung 11 zeigt den Verlauf von CCL5 in ng/ml im Plasma jedes einzelnen der 52 untersuchten Patienten.

Die Abbildungen sind aufsteigend sortiert nach der Anfangskonzentration von CCL5 im Plasma vor der ersten Bestrahlungs- und Chemotherapiefraktion, d.h. Abbildung a zeigt den Verlauf der 10 Patienten, die die niedrigste Anfangskonzentration von CCL5 aufwiesen.

Abbildung e und f stellen die Verläufe der Patienten dar, die vor der ersten RCT-Fraktion eine hohe Konzentration von CCL5 im Plasma aufwiesen. Es sind deutlich mehr Patienten festzustellen, die in einem primären Rahmen eine RCT erhielten als in den Abbildungen (a und b), die die Verläufe der Patienten darstellen, die anfangs eine niedrige Konzentration von CCL5 im Blut aufwiesen.

Werden Patienten ohne vorangegangene Operation bestrahlt, waren die Werte von CCL5 in ihrem Plasma signifikant höher als bei Patienten, die in einem adjuvanten Rahmen eine RCT erhielten.

Der Abfall der Konzentration von CCL5 war dann umso größer, je höher seine Konzentration vor der begonnenen Therapie war.

## 3.3.3 CCL5-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus





Abbildung 12 zeigt den Verlauf der Konzentrationen des Chemokins CCL5 bei Patienten mit einem unterschiedlichen Lymphknotenstatus. Insgesamt 15 Patienten wiesen bei Diagnosestellung einen N0-Status und 37 wiesen einen positiven Lymphknotenstatus auf.

Die Proben dieser Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der RCT ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen untereinander.

## 3.4 CCL20-Konzentration während der Radiochemotherapie



Abbildung 13: CCL20-Konzentration im Gesamtverlauf Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CCL20

Abbildung 13 zeigt den Verlauf des Chemokins CCL20 im Plasma in pg/ml des gesamten Patientenkollektivs (N=63) während der RCT.

Der Median des Zeitpunktes vor RCT betrug 24,495 pg/ml, der des Zeitpunktes nach RCT betrug 17,674 pg/ml. Dies ergab eine Differenz von 6,821 pg/ml.

Vom Zeitpunkt vor RCT zum Zeitpunkt Mitte RCT kam es zu einem signifikanten Abfall (p=0,001) der Konzentration von CCL20. Betrachtete man die Zeitpunkte Mitte RCT und Ende RCT, war der Unterschied der beiden Gruppen nicht signifikant (p=0,958).

Über den gesamten Zeitraum der RCT war jedoch ein Abfall der CCL20-Konzentration zu messen, der innerhalb des Signifikanzniveaus lag (p=0,017).



## 3.4.1 CCL20-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven



Abbildung 14 zeigt den Verlauf von CCL20 getrennt nach unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven. Insgesamt 16 Proben von primär behandelten Patienten und 47 Proben von adjuvant behandelten Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen.

Im Vergleich der beiden Anfangskonzentrationen von CCL20 ließ sich ein signifikanter Unterschied (p=0,042) feststellen. Die Konzentration von CCL20 war bei primär behandelten Patienten vor Beginn der RCT signifikant höher als bei Patienten, die adjuvant behandelt wurden.

Verglich man zwischen den beiden Kollektiven die beiden nächsten Zeitpunkte (Mitte und Ende RCT), ließ sich weder beim Zeitpunkt Mitte RCT (p=0,174) noch bei Zeitpunkt Ende RCT (p=0,218) ein signifikanter Unterschied messen.

## 3.4.2 Einzelverläufe von CCL20



Abbildung 15: Konzentrationen von CCL20 bei einzelnen Patienten

Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen. Zeitpunkt 1 entspricht dem Zeitpunkt vor RCT, Zeitpunkt 2 dem Zeitpunkt Mitte RCT und Zeitpunkt 3 dem Zeitpunkt Ende RCT. Gestrichelte Linien zeigen den Verlauf der Patienten, die eine primäre RCT erhielten.

Abbildung 15 zeigt den Verlauf von CCL20 in pg/ml im Plasma jedes einzelnen der 63 untersuchten Patienten.

Die Abbildungen sind aufsteigend sortiert nach der Konzentration von CCL20 im Plasma vor der ersten RCT-Fraktion, d.h. Abbildung a zeigt den Verlauf der 10 Patienten, die die niedrigste Anfangskonzentration von CCL20 aufwiesen.

Vorherige statistische Tests bewiesen, dass es zu einem signifikanten Abfall der Konzentration von CCL20 während der RCT kommt.

Es stellte sich hier ein Abfall der CCL20-Konzentration dar, der sich unabhängig von der Behandlungssituation (primär oder adjuvant) verhielt.

# 3.4.3 CCL20-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus



Abbildung 16: CCL20-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CCL20

Abbildung 16 zeigt den Verlauf der Konzentrationen des Chemokins CCL20 bei Patienten mit einem unterschiedlichen Lymphknotenstatus. Insgesamt 14 Patienten wiesen bei Diagnosestellung einen NO-Status und 49 wiesen einen positiven Lymphknotenstatus auf.

Die Proben dieser Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der RCT ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen untereinander.



# 3.5 CXCL12-Konzentration während der Radiochemotherapie

Abbildung 17: CXCL12-Konzentration im Gesamtverlauf Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CXCL12

Abbildung 17 zeigt den Verlauf der Konzentration des Chemokins CXCL12 in pg/ml im Plasma des gesamten Patientenkollektivs (N=63) während der RCT.

Der Median des Zeitpunktes vor RCT lag bei 2132,56 pg/ml, der des Zeitpunktes nach RCT lag bei 2319,15 pg/ml. Dies entsprach einer Differenz von 186,59 pg/ml.

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied (p=0,73) feststellen, wenn die Zeitpunkte vor RCT und Mitte RCT miteinander verglichen wurden. Der Anstieg vom Zeitpunkt Mitte RCT zum Zeitpunkt Ende RCT war signifikant (p=0,006).

Über den gesamten Zeitraum von vor RCT bis Ende RCT kam es ebenfalls zu einem Anstieg, der jedoch knapp nicht im Signifikanzniveau lag (p=0,064).



# 3.5.1 CXCL12-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven

Abbildung 18: Verlauf von CXCL12 bei primär oder adjuvant behandelten Patienten Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CXCL12

Abbildung 18 zeigt den Verlauf von CXCL12 in pg/ml getrennt nach unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven. Insgesamt 15 Proben von primär behandelten Patienten und 48 Proben von adjuvant behandelten Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der beiden unterschiedlich behandelten Kollektive untereinander.

# 3.5.2 Einzelverläufe von CXCL12



Abbildung 19: Konzentrationen von CXCL12 bei einzelnen Patienten

Dabei ist auf der Abszisse der Zeitpunkt der RCT aufgetragen. Zeitpunkt 1 entspricht dem Zeitpunkt vor RCT, Zeitpunkt 2 dem Zeitpunkt Mitte RCT und Zeitpunkt 3 dem Zeitpunkt Ende RCT. Gestrichelte Linien zeigen den Verlauf der Patienten, die eine primäre RCT erhielten.

Abbildung 19 zeigt den Verlauf von CX CL12 in pg/ml im Plasma jedes einzelnen der 63 untersuchten Patienten.

Die Abbildungen sind aufsteigend sortiert nach der Konzentration von CXCL12 im Plasma vor der ersten RCT-Fraktion, d.h. Abbildung a zeigt den Verlauf der 11 Patienten, die die niedrigste Anfangskonzentration von CXCL12 aufwiesen.

Ein gehäuftes Auftreten des Anstiegs der CXCL12-Konzentration während der RCT wurde nicht beobachtet.

## 3.5.3 CXCL12-Verlauf bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus



Abbildung 20: CXCL12-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Chemokins CXCL12

Abbildung 20 zeigt den Verlauf der Konzentrationen des Chemokins CXCL12 bei Patienten mit einem unterschiedlichen Lymphknotenstatus. Insgesamt 14 Patienten wiesen bei Diagnosestellung einen N0-Status und 49 wiesen einen positiven Lymphknotenstatus auf.

Die Proben dieser Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich nur zum Zeitpunkt Ende RCT (p=0,039) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. So hatten Patienten ohne Lymphknotenmetastasen eine signifikant höhere CXCXL12-Konzentration im Plasma zum Ende der RCT als Patienten mit einem positiven Lymphknotenstatus.





Abbildung 21: IL-6-Konzentration im Gesamtverlauf Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Zytokins IL-6

Abbildung 21 zeigt den Verlauf der Konzentration des Zytokins IL-6 in pg/ml im Plasma des gesamten Patientenkollektivs (N=47) während der RCT.

Der Median der Gruppe vor RCT lag bei 7,476 pg/ml, der der Gruppe Ende RCT lag bei 20,935 pg/ml. Dies ergab eine Differenz von 13,459 pg/ml.

Von dem Zeitpunkt vor RCT zum Zeitpunkt Mitte RCT kam es zu einem signifikanten (p<0,001) Anstieg der Konzentration von IL-6 im Plasma.

Betrachtete man den Verlauf der Konzentration vom Zeitpunkt Mitte RCT zum Zeitpunkt Ende RCT, kam es zu einem weiteren signifikanten (p=0,02) Anstieg.

Über den gesamten Zeitraum von vor RCT zum Ende der RCT ließ sich ein signifikanter (p<0,0001) Anstieg der Konzentration von IL-6 im Plasma beobachten.



3.6.1 IL-6-Verlauf in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven

Abbildung 22: Verlauf von IL-6 bei primär oder adjuvant behandelten Patienten Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Zytokins IL-6

Abbildung 22 zeigt den Verlauf von IL-6 in pg/ml in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven. Insgesamt 13 Proben von primär behandelten Patienten und 34 Proben von adjuvant behandelten Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen.

Beim Vergleich der Gruppen vor RCT ließ sich kein signifikanter Unterschied (p=0,056) in der Anfangskonzentration nachweisen. Zum Zeitpunkt Mitte RCT stiegen in beiden Kollektiven die Konzentrationen von IL-6 an; hier war ein signifikanter Unterschied (p=0,023) zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen nachzuweisen.

Zum Zeitpunkt Ende RCT war die Konzentration von IL-6 weiter angestiegen. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied (p=0,013) zwischen dem primär oder adjuvant behandelten Kollektiv festgestellt werden. Die Konzentration von IL-6 war bei primär behandelten Patienten zum Zeitpunkt Mitte RCT und zum Zeitpunkt Ende RCT signifikant höher als bei adjuvant behandelten Patienten.

# 3.6.2 Einzelverläufe von IL-6



Abbildung 23: Konzentrationen von IL-6 bei einzelnen Patienten

Dabei ist auf der Abszisse der Zeitpunkt der RCT aufgetragen. Zeitpunkt 1 entspricht dem Zeitpunkt vor RCT, Zeitpunkt 2 dem Zeitpunkt Mitte RCT und Zeitpunkt 3 dem Zeitpunkt Ende RCT. Gestrichelte Linien zeigen den Verlauf der Patienten, die eine primäre RCT erhielten.

Abbildung 23 zeigt den Verlauf von IL-6 in pg/ml im Plasma jedes einzelnen der 47 untersuchten Patienten.

Die Abbildungen sind aufsteigend sortiert nach der Konzentration von IL-6 im Plasma vor der ersten RCT-Fraktion, d.h. Abbildung a zeigt den Verlauf der 8 Patienten, die die niedrigste Anfangskonzentration von IL-6 aufwiesen.

Den Einzeldarstellungen ist sehr gut zu entnehmen, dass es unabhängig von der Anfangskonzentration des Chemokins im Plasma fast ausnahmslos zu einem signifikanten Anstieg zum Zeitpunkt Ende RCT kam.

# 3.6.3 IL-6-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus



Abbildung 24: IL-6-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der RCT aufgetragen, auf der Ordinate die Konzentration des Zytokins IL-6

Abbildung 24 zeigt den Verlauf der Konzentrationen des Zytokins IL-6 bei Patienten mit einem unterschiedlichen Lymphknotenstatus. Insgesamt 13 Patienten wiesen bei Diagnosestellung einen N0-Status und 34 wiesen einen positiven Lymphknotenstatus auf.

Die Proben dieser Patienten wurden untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt der RCT ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen untereinander.

### 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es unter einer konkomitanten RCT, die bei einem Patientenkollektiv mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs erfolgte, zu einer Änderung der Konzentration der Chemokine CCL2, CCL5, CCL20, CXCL12 und des Zytokin IL-6 im Serum kam. Dabei wurde zudem ein möglicher Unterschied in der Behandlungsweise (primär oder adjuvant) untersucht.

### 4.1 Plasma-CCL2 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich das Chemokin CCL2 generell nachweisbar ist. Zusätzlich kommt es während einer RCT zu einem signifikanten (p=0,001) Anstieg von CCL2.

Während der Median der Konzentration von CCL2 vor Beginn der RCT bei 90,005 pg/ml lag, konnte direkt nach dem Ende der Therapie ein Medianwert von 109,333 pg/ml im Plasma der Patienten gemessen werden.

Die (Über-)expression und Sekretion von CCL2 in Kopf-Hals-Tumoren wurde schon mehrfach beschrieben (Chang et al. 2008; Ferreira et al. 2008; Wolff et al. 2011).

So zeigten Chang et al. in ihrer Studie, dass CCL2 im Serum bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor im Vergleich zu einem gesunden Patientenkollektiv erhöht ist. Sie untersuchten die Seren auf CCL2 bei 166 Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom und stellten erhöhte Level im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv (N=250) fest. Dabei korrelierte die CCL2-Konzentration im Serum mit dem Gesamtüberleben und dem metastasenfreien Überleben und könnte somit als Biomarker im Serum für Aussagen über Prognose und Ansprechen einer Therapie in Zukunft gehandelt werden (Chang et al. 2008).

Lu et al. konnten ähnliche Ergebnisse nachweisen. Bei Karzinomen des Nasopharynx korrelierten hohe CCL2-Spiegel im Serum mit einer kürzeren Überlebenswahrscheinlichkeit und einem kürzeren metastasenfreien Überleben. Sie untersuchten in ihrer Studie die Seren von 297 Patienten, die an einem Nasopharynxkarzinom erkrankt und mit einer konkomitanten RCT behandelt worden waren (Lu et al. 2011).

Beide herangezogenen Studien (Chang et al. 2008; Lu et al. 2011) sind nur in manchen Punkten mit unseren Ergebnissen vergleichbar. Es wurden in beiden Studien ausschließlich Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom untersucht, während in unsere Studie keine Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom eingeschlossen wurden. Die Entstehung von Nasopharynxkarzinomen Gegensatz ist im zu den von uns untersuchten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs häufig eng mit einer Infektion des Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert. Es liegt histopathologisch meist als schlecht- oder undifferenziertes Malignom vor und hat eine erhöhte Chemo- und Strahlensensitivität. Da es anatomisch einer operativen Therapie meist nicht zugänglich ist, ist die alleinige Bestrahlung oder in fortgeschritteneren Stadien die konkomitante RCT die Therapie der ersten Wahl. Liegt ein undifferenziertes Karzinom vor, liegen die Heilungsraten in frühen Stadien der Erkrankung aufgrund der hohen Strahlensensibilität bei über 90% (Lee et al. 2012).

Da Nasopharynxkarzinome also mit einer zumindest teilweise vergleichbaren RCT im Kopf-Hals-Bereich behandelt werden, sind Vergleiche zwischen dieser und der von uns untersuchten Tumorentität vertretbar.

Die bislang fehlende Nachbeobachtungszeit in unserer Studie macht eine Aussage zum Einfluss der CCL2-Konzentration auf die Überlebenswahrscheinlichkeit unmöglich. Dass CCL2 jedoch im Plasma von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor nachzuweisen ist, deckt sich mit den Ergebnissen der Studien von Chang und Lu. Einen Anstieg der CCL2-Konzentration unter einer RCT konnten auch Lu et al. nachweisen.

## 4.1.1 Anstieg der CCL2-Konzentration während einer Radiochemotherapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen signifikanten Anstieg der CCL2-Konzentration im Plasma der Patienten, die sich einer RCT unterzogen.

Ähnliche Resultate konnten bereits in anderen Studien nachgewiesen werden. So maßen Ao et al. erhöhte Konzentrationen im Serum von CCL2 nach der Bestrahlung der Lunge von Ratten, die sensibel für Strahlen-assoziierte Lungenfibrose waren. Der Anstieg der Konzentration von CCL2 war höher und trat schneller nach der Bestrahlung ein als bei Ratten, die keine Lungenfibrose entwickelt hatten (Ao et al. 2009).

Signifikant erhöhte Konzentrationen von CCL2 nach einer Bestrahlung fanden auch Moriconi et al., die die Spiegel von CCL2 im Serum von Ratten untersuchten, deren Leber bestrahlt wurde (Moriconi et al. 2008).

Ao et al. und Moriconi et al., die in ihrer Studie zu ähnlichen Ergebnissen kamen wie wir, untersuchten jedoch nur den Effekt einer Bestrahlung auf die Chemokinkonzentration im Serum. In unserer Studie muss auch der mögliche Effekt der konkomitanten Chemotherapie auf die Chemokinkonzentration mit in Betracht gezogen werden. So untersuchten Citrin et al. u. a. die Expression von CCL2 in Speichelproben von 11 Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor während einer RCT und konnten einen signifikanten Anstieg des Chemokins am Ende der RCT nachweisen (Citrin et al. 2012).

Michiels et al., die die Konzentration von CCL2 im Speichel von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich vor (N=13) und nach einer RCT (N=4) untersuchten, kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen. So maßen sie niedrigere Spiegel von CCL2 im Speichel nach der erfolgten Therapie als vor der Therapie (Michiels et al. 2009).

Die niedrige Anzahl an Patienten, die Michiels et al. in ihrer Studie untersuchten sowie die Bestimmung der CCL2-Konzentration im Speichel, sind mögliche Erklärungsansätze, weswegen die Ergebnisse von Michiels et al. sich gegensätzlich zu unseren Ergebnissen darstellen.

#### 4.1.2 CCL2-Verlauf bei unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven

Im Hinblick auf die Behandlungssituation stellten wir in unseren Untersuchungen fest, dass Patienten, die primär, also ohne vorangegangene Operation, bestrahlt wurden, signifikant niedrigere Konzentrationen von CCL2 vor Beginn der RCT im Plasma aufwiesen als Patienten, die mit einem adjuvanten Konzept behandelt wurden.

Die Studienlage bietet zu diesem speziellen Aspekt bislang sehr wenige Daten. Jedoch konnten die o. g. Studien einen Zusammenhang zwischen hohen CCL2-Leveln und fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung aufzeigen (Lu et al. 2011; Chang et al. 2008).

Ordnet man nun Patienten, die wegen der Ausdehnung des Tumors und daraus folgender Inoperabilität mit einem primären Behandlungskonzept behandelt wurden, der Gruppe der fortgeschrittenen Stadien zu, zeigen unsere Ergebnisse ein anderes Bild.

Patienten, die mit einem primären Behandlungskonzept therapiert wurden, wiesen signifikant niedrigere CCL2-Spiegel in ihrem Plasma auf als Patienten, die vor Beginn der RCT operiert worden waren. Der Rückschluss, dass CCL2 vom noch bestehenden Tumor vermehrt in das Blut sezerniert wird, ist bei unseren Ergebnissen nicht möglich. Die gegensätzlichen Ergebnisse zu den Studien von Lu und Chang sind möglicherweise auch dadurch zu erklären, dass wir eine andere Entität des Kopf-Hals-Tumors untersuchten und Nasopharynx-Karzinome nicht in unsere Studie einschlossen. Dieser spezielle Aspekt sollte jedoch in Studien mit einer größeren Anzahl von Patienten untersucht werden, um die Möglichkeit des Einsatzes von CCL2 als Biomarker weiterhin untersuchen zu können.

#### 4.1.3 CCL2-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus

Wir untersuchten den Verlauf der CCL2-Konzentration bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus der Patienten. Unsere Ergebnisse zeigen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven N0 und N>0.

Eine Studie, geleitet von Chang et al., untersuchte die Seren von 166 Patienten und das Tumorgewebe von 65 Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom auf die CCL2-Konzentration- und Expression. Dabei bestimmten sie die Konzentrationen von CCL2 im Serum sowohl vor als auch nach der Therapie. Patienten, die vor Beginn der Therapie schon Fernmetastasen präsentierten, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Bei 155 Patienten führte die von Chang geleitete Arbeitsgruppe anschließend Follow-Up-Untersuchungen durch und stellte dabei eine signifikante Korrelation zwischen der CCL2-Konzentration und dem metastasenfreien Überleben fest. Je höher die CCL2-Konzentration vor der Therapie war, desto früher kam es im Verlauf zur (Fern)metastasierung (Chang et al. 2008).

Auch Lu et al. konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CCL2-Konzentration im Serum von Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom und einer (Fern)Metastasierung nachweisen. Hohe CCL2-Level gingen mit einer frühzeitigen Metastasierung einher (Lu et al. 2011).

Wir untersuchten in unserer Studie im Gegensatz zu den beiden zuletzt genannten nicht die Fernmetastasierung, sondern die Metastasierung in die Lymphknotenstationen. Eine Aussage über die Fernmetastasierung ist daher auf Basis der von uns erhobenen Daten nicht möglich. Betrachtet man jedoch den Ablauf einer Metastasierung als generellen Prozess, so lassen sich die Studien von Chang et al. und Lu et al. mit unseren Ergebnissen vergleichen. Die dann voneinander abweichenden Ergebnisse könnten aber letztlich darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedliche Metastasierungsstationen untersucht wurden.

Die in Absatz 4.1 erwähnten Unterschiede dieser beiden Studien zu unseren Ergebnissen sind auch bei diesem Unterpunkt heranzuziehen. Da in unserer Studie kein Plasma von Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom untersucht wurde, könnten die Ergebnisse nicht vergleichbar und der festgestellte Unterschied dadurch begründbar sein. Da aber ein Nasopharynxkarzinom ein Tumor der Kopf-Hals-Bereiches ist, könnte es auch an anderen, von uns nicht untersuchten Faktoren oder an der zu geringen Anzahl an untersuchten Patienten liegen, dass wir gegensätzliche Ergebnisse feststellten als die von Chang und Lu geführten Arbeitsgruppen.

## 4.2 Plasma-CCL5 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor

Unsere Ergebnisse zeigen, dass CCL5 im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich generell nachweisbar ist. Zudem kommt es während einer RCT zu einem signifikanten Abfall der Konzentration von CCL5.

Der Median der Gruppe vor RCT betrug 44,026 ng/ml, der Median der Gruppe Ende RCT betrug 19,151 ng/ml. Dies ergab eine Differenz von 24,875 ng/ml.

Die Einflüsse von CCL5 auf die Proliferations- und Metastasierungsprozesse bei unterschiedlichen Malignomen wurden schon von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Buettner et al. 2007; Aldinucci et al. 2008).

Hohe Expressionsmuster von CCL5 in Malignomen der Brust korrelieren beispielsweise mit einer Progression des Tumorwachstums, mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und werden häufig auch dann erhöht gemessen, wenn es zum Rezidiv und/oder Metastasenbildung kommt (Zhang et al. 2013; Luboshits et al. 1999; Niwa et al. 2001; Bièche et al. 2004).

Trellakis et al., die die Serumkonzentration von CCL5 bei 114 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich maßen, stellten eine signifikant erhöhte Konzentration im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv fest (Trellakis et al. 2011).

Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, dass CCL5 im Plasma von Patienten mit dieser Tumorentität messbar erhöht ist, wobei in unserer Studie kein Kontrollkollektiv mit gesunden Probanden untersucht wurde. Dies wäre ein Ansatz für weitere Studien, um diese These noch weiter zu untermauern.

Auch die von Wolff geleitete Arbeitsgruppe konnte *in vitro* CCL5 nachweisen. Sie untersuchten 15 Zelllinien, die aus Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches kultiviert wurden, und zwei Zelllinien aus gesunden Fibroblasten. Dabei stellten sie in praktisch allen Zelllinien eine CCL5-Expression fest (Wolff et al 2011).

## 4.2.1 CCL5-Abfall während einer Radiochemotherapie

Unsere Ergebnisse zeigen einen signifikanten Abfall der Konzentration von CCL5 im Plasma während einer RCT.

Wie und ob sich die Expression oder Konzentration von CCL5 im Plasma oder in Tumorzelllinien während einer RCT verändert, wurde bisher nur wenig untersucht.

Wolff et al., die aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs kultivierte Zelllinien u. a. auf die CCL5-Expression während einer Bestrahlung untersuchten, stellten veränderte Expressionsmuster fest. Sie maßen zwei signifikante Minderungen und eine signifikante

Steigerung der CCL5-Expression nach einer Bestrahlung mit 2 Gy. Diese Effekte könnten zelllinienabhängig sein. So entstammen die Zelllinien, in denen sich eine signifikante Minderung der CCL5-Expression messen ließ, aus Karzinomen der Mundhöhle, während die Zelllinie, die nach einer Bestrahlung eine signifikante Steigerung der CCL5-Expression zeigte, einem Pharynx-Karzinom entstammte (Wolff et al. 2011).

Der von uns gemessene Abfall der CCL5-Konzentration im Plasma nach einer RCT könnte auf das Zurückgehen der Tumormasse unter der Therapie zurückzuführen sein. Hier sollten weitere Untersuchungen mit einer größeren Probenanzahl folgen, um den möglicherweise strahleninduzierten Effekt auf die Abnahme der CCL5-Konzentration weiter untermauern und den Effekt der konkomitanten Chemotherapie herausfiltern zu können.

Guo et al. stellten eine signifikant erhöhte CCL5-Expression in Zelllinien aus Nasopharynxkarzinomen fest, die radiotherapieresistent waren. Dabei war die CCL5-Expression in der Kontrolle (radiotherapiesensible Zelllinien aus einem Nasopharynxkarzinom) praktisch bei null (Guo et al. 2012).

Den speziellen Aspekt der Radiotherapieresistenz untersuchten wir nicht. Jedoch lassen sich die Ergebnisse bedingt vergleichen. In der Annahme, dass wir Plasmen von radiotherapiesensiblen Patienten untersuchten, ließ sich in unserer Arbeit eine messbare CCL5-Konzentration nachweisen, die unter RCT geringer wurde. Dies widerspricht den Ergebnissen von Guo, die in radiotherapiesensiblen Zelllinien keine CCL5-Expression messen konnten.

Auch hier gilt zu bedenken, dass die von Guo geleitete Arbeitsgruppe Zelllinien aus Nasopharynxkarzinomen untersuchte, die wir nicht in unsere Studie einschlossen. Mögliche Unterschiede sind auch hierdurch zu begründen. Zudem wurden in beiden Studien unterschiedliche Gewebe untersucht. Während wir die CCL5-Konzentration im Plasma maßen, stellten Guo et al. die fehlende CCL5-Expression in radiotherapiesensiblen Zelllinien fest. Das Vorkommen von CCL5 im Plasma von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor ist möglicherweise nicht ausschließlich vom Tumor in das Blut sezerniert worden, sondern ließe sich auch bei gesunden Probanden in geringen Mengen im Plasma nachweisen.

# 4.2.2 CCL5-Verlauf bei unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven

Unsere Ergebnisse zeigen nicht nur einen Abfall der Chemokinkonzentration während einer RCT. Wir untersuchten zusätzlich, ob sich das Verhalten von CCL5 in unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven (primär oder adjuvant) voneinander unterschied.

Patienten, die in einem primären Rahmen eine RCT erhielten, hatten signifikant höhere Spiegel von CCL5 in ihrem Plasma vor der RCT als adjuvant behandelte Patienten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Chemokin CCL5 vom manifesten Tumor bei primär behandelten Patienten direkt ins Blut sezerniert wird. Adjuvant behandelte Patienten, die keinen manifesten Tumor mehr aufweisen, haben dementsprechend niedrigere Spiegel von CCL5 im Plasma.

Während der RCT fielen die Spiegel von CCL5 in beiden Kollektiven ab, der Unterschied zwischen den beiden Kollektiven blieb bis zum Ende der RCT signifikant (p=0,03).

Die Zusammenhänge zwischen der CCL5-Konzentration im Plasma und Stadien eines Kopf-Hals-Tumors wurden bisher nur sehr wenig untersucht.

Beispielhaft stellten Trellakis et al. höhere Konzentrationen von CCL5 im Serum bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor als bei einem gesunden Vergleichskollektiv fest (Trellakis et al. 2011).

#### 4.2.3 CCL5-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus

Unsere Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied der CCL5-Konzentration im Plasma bei Patienten mit einem unterschiedlichen Lymphknotenstatus (N0 oder N>0). Weder vor der RCT (p=0,389) noch danach (p=0,213) konnten Unterschiede gemessen werden.

Ob CCL5 in die Metastasierungsprozesse von Kopf-Hals-Tumoren involviert ist, wurde bisher kaum untersucht. Chuang et al. maßen bei unterschiedlichen Zelllinen aus drei Karzinomen der Mundhöhle die Expressionsmuster von CCL5. Sie stellten eine erhöhte Expression von CCL5 in der Zelllinie fest, die das meiste Potential für Invasivität und Migration aufwies (Chuang et al. 2009).

Studien, die sich beispielsweise mit Malignomen der Mamma befassten, konnten einen positiven Zusammenhang zwischen der CCL5-Expression und der Metastasierungsrate feststellen, so dass vermutet werden kann, dass die erhöhte CCL5-Expression auch bei anderen Malignomen mit dem Potential zur Metastasierung zusammenhängt (Zhang et al. 2013).

Ob dies auch bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs der Fall ist, gilt es weiter zu untersuchen. Unsere Ergebnisse deuten bislang nicht darauf hin und sind widersprüchlich zu den Ergebnissen, die Chuang et al. in ihrer Studie feststellen konnten. Während Chuang et al. die Expression von CCL5 direkt in der Tumorzelllinie maßen, untersuchten wir das Plasma von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor. Möglicherweise ist eine größere Anzahl von Patienten nötig, um diesen Zusammenhang zwischen der CCL5-Konzentration im Plasma und dem Lymphknotenstatus belegen zu können. Es könnten jedoch auch weitere, von uns nicht untersuchte Faktoren eine Rolle in den Metastasierungsprozessen von Kopf-Hals-Tumoren spielen.

### 4.3 Plasma-CCL20 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor

Unsere Ergebnisse zeigen sowohl das Vorliegen von CCL20 im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs, als auch einen signifikanten Abfall der Konzentration von CCL20 während der RCT.

Wie in Absatz 1.3.5.3 erwähnt, wird CCL20 in vielen Tumorentitäten vermehrt exprimiert und bereits als prognostischer Marker für einige Karzinome herangezogen (Abiko et al. 2003; Iwata et al. 2013; Chang et al. 2008).

So untersuchten Chang et al. Karzinome des Nasopharynx auf ihre CCL20-Expression und stellten eine Überexpression im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv fest.

Sie maßen zusätzlich die Konzentration im Serum der Patienten mit dem Nasopharynxkarzinom (N=257) und stellten signifikant höhere Spiegel von CCL20 in unbehandelten Patienten und Patienten, die sich mit einem Rezidiv vorstellten, fest. Das Vergleichskollektiv (N=250) bestand aus gesunden Probanden oder aus Patienten, die bereits eine Therapie des Nasopharnyxkarzinoms erhalten hatten und sich in kompletter Remission befanden.

Die CCL20-Konzentration im Serum korrelierte hierbei mit dem Gesamtüberleben und dem metastasenfreien Überleben (Chang et al. 2008).

Auch hier ist zu bedenken, dass Chang et al. Karzinome des Nasopharynx untersuchten und in ihrer Studie auch den Zusammenhang der CCL20-Konzentration mit dem rezidivfreien Überleben darstellen konnten. In unsere Studie wurden Patienten mit einem Nasopharnyxkarzinom nicht eingeschlossen und den Zusammenhang der CCL20-Konzentration mit dem rezidivfreien Überleben und der Fernmetastasierung stellten wir aufgrund der fehlenden Nachbeobachtungszeit nicht fest. Die von Chang geleitete Arbeitsgruppe untersuchte sowohl die Expression des Tumors als auch die Konzentration im Serum der Patienten. Dabei stellten sie einen positiven Zusammenhang fest, so dass zu vermuten ist, dass CCL20 vom Tumor in das Blut sezerniert werden kann.

Abiko et al. untersuchten sechs Zelllinien, die aus Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle kultiviert wurden, sowie eine Zelllinie aus gesundem Mundschleimhautgewebe auf die CCL20-mRNA-Expression. In fünf der sechs untersuchten malignen Zelllinien war CCL20 nachzuweisen. Sie stellten zudem eine große Variabilität der CCL20-Expression der

einzelnen Zelllinien fest. Dies führen sie auf mutierte oder modifizierte Gene der neoplastischen Zellen zurück, so dass eine Dysregulation der Genexpression daraus folgen kann. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, wobei wir nicht die Expression von CCL20 in Zelllinien bestimmten, sondern Konzentration dieses Chemokins im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (Abiko et al. 2003).

## 4.3.1 Abfall der CCL20-Konzentration während der Radiochemotherapie

Unsere Ergebnisse zeigen einen signifikanten Abfall der CCL20-Konzentration im Plasma während einer RCT. Vor Beginn der RCT lag der Median der Konzentration von CCL20 im Plasma bei 24,495 pg/ml, direkt nach der letzten RCT-Fraktion lag der Median bei 17,64 pg/ml.

Wie sich die CCL20-Konzentration im Plasma während einer RCT verhält, wurde bisher in keiner Studie untersucht.

Es gibt jedoch experimentelle Studien, die Veränderungen der CCL20-Expression durch Bestrahlung allein untersuchten.

So stellten Rödel et al. eine signifikant verminderte CCL20-Expression in Endothelzellen fest, wenn sie sie mit 0,5 - 1 Gy bestrahlten (Rödel et al. 2008). Der Vergleich zu unseren Analysen kann jedoch nur bedingt herangezogen werden, da Rödel et al. im Rahmen einer entzündungshemmenden Wirkung mit nur geringen Dosen bestrahlten.

Moriconi et al. bestrahlten die Leber von Ratten sowohl *in vivo* als auch isolierte Hepatozyten *in vitro* und stellten auf RNA-Ebene im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine erhöhte Expression von CCL20 nach der Bestrahlung fest (Moriconi et al. 2008). Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zu unseren Ergebnissen ist, dass Moriconi et al. gesundes Gewebe bestrahlten, während wir Patienten wegen eines Malignoms mit einer RCT behandelten, die zudem eine Chemotherapie beinhaltete.

Wolff et al. bestrahlten aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches kultivierte Zelllinien mit 2 Gy und maßen anschließend die Expression. Dabei stellten sie bei fünf Zelllinien eine signifikant verminderte CCL20-Expression nach der Bestrahlung fest, während bei einer weiteren Zelllinie nach Bestrahlung eine signifikant erhöhte CCL20-Expression festgestellt werden konnte (Wolff et al. 2011).

Im Unterschied zu der von Wolff geleiteten Arbeitsgruppe muss bei unseren Ergebnissen auch der Einfluss der konkomitanten Chemotherapie berücksichtigt werden. Die von uns und von Wolff et al. beobachteten Effekte könnten jedoch in der Zusammenschau ein Hinweis auf die Remission des Tumors und damit ein Ansprechen der Therapie sein.

### 4.3.2 CCL20-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus

Unsere Ergebnisse konnten keinen signifikanten Unterschied der CCL20-Konzentration zwischen Patienten ohne Lymphknotenmetastasen und Patienten mit Lymphknotenmetastasen aufweisen. Dies war weder vor der Bestrahlung (p=0,417) noch danach der Fall (p=0,245).

Chang et al. untersuchten die Serumkonzentrationen von CCL20 von Patienten mit einem Nasopharnyxkarzinom und stellten eine inverse Korrelation zwischen der Konzentration und dem (fern)metastasenfreien Überleben fest. Je höher die Konzentration von CCL20 im Serum, desto früher kam es zur Metastasierung (Chang et al. 2008).

Weitere Studien, die eine solche Korrelation bei Kopf-Hals-Tumoren belegen können, gibt es derzeit nicht.

Jedoch spielt CCL20 bei vielen anderen Tumorentitäten in den Metastasierungsprozessen eine wichtige Rolle. Rubie et al. untersuchten beispielsweise die CCL20-Expression von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome und stellten signifikant höhere Level als in nichtbefallenen Geweben fest (Rubie et al. 2006).

Auch die von Iwata geleitete Arbeitsgruppe kam zu ähnlichen Ergebnissen. Sie untersuchten die Seren von 242 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom und stellten erhöhte CCL20-Level bei den Patienten fest, die bereits Lebermetastasen entwickelt hatten (Iwata et al. 2013). Diese Studien weisen auf einen positiven Zusammenhang des CCL20-Levels mit der Fähigkeit Metastasen bilden zu können hin, den wir aufgrund der fehlenden Nachbeobachtungszeit nicht nachweisen konnten. Zudem gilt es auch hier zu bedenken, dass in unserer Studie der Zusammenhang der konkomitanten RCT und der Lymphknotenmetastasierung untersucht wurde, so dass Vergleiche zwischen den genannten Studien und unseren Ergebnissen nur bedingt möglich sind.

## 4.4 Plasma-CXCL12 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor

Unsere Ergebnisse zeigen das Vorliegen von CXCL12 im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs, allerdings kam es während einer RCT zu keiner signifikanten Änderung der Konzentration von CXCL12.

In Abbildung 17 ist zwar ein leichter Anstieg der Konzentration von CXCL12 zu erkennen, der sich jedoch nicht als signifikant darstellte.

Das CXCR4/CXCL12-System wird regelmäßig in Kopf-Hals-Tumoren exprimiert und ist assoziiert mit Tumorprogression- und invasion, Lymphknoten- und Fernmetastasen und korreliert mit einer kürzeren Überlebenswahrscheinlichkeit bei Patienten (Almofti et al. 2004; Katayama et al. 2005; Uchida et al. 2007; Yoon et al. 2007).

So untersuchten Katayama et al. in ihrer Studie 56 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich und konnten einen Zusammenhang zwischen einer hohen CXCR4-Expression und dem späteren Entstehen von Fernmetastasen nachweisen (Katayama et al. 2005). Eine andere große Studie mit 90 Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor, geleitet von Ishikawa et al., fand eine positive Korrelation zwischen der CXCR4-Expression und der Lymphknotenmetastasierung (Ishikawa et al. 2006).

Durch eine dauerhafte Herunterregulierung von CXCR4 in Zelllinien aus Mundhöhlenkarzinomen konnten Hong et al. eine verminderte Invasivität und Proliferation nachweisen (Hong et al. 2009). In einer anderen Studie induzierten Uchida et al. eine CXCL12-Expression in Mäusen, die daraufhin aggressivere Lymphknoten- und Lungenmetastasen entwickelten. Mittels einer Behandlung mit einem CXCR4-Antagonisten konnte die Metastasierungsrate gesenkt und das Überleben der Mäuse verbessert werden (Uchida et al. 2007; Uchida et al. 2011).

Clatot et al., die die Expression von CXCL12 in 71 Proben aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs untersuchten, stellten fest, dass niedrig (unter dem Median) liegende intratumorale Expressionslevel von CXCL12 mit einem signifikant schlechteren metastasen-freien- und Gesamtüberleben einhergingen (Clatot et al. 2011).

Wie sich die CXCL12-Konzentration im Plasma auf die Metastasierung und das Überleben auswirken kann, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

Fraglich ist, ob die intratumorale Expression, wie sie von Clatot et al. beschrieben worden ist, Auswirkungen auf die CXCL12-Konzentration im Plasma hat und als Folge einer Sekretion des Tumors ins Blut dort ebenfalls repräsentativ messbar ist. So wäre CXCL12 als Biomarker für die Prognose von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor leicht zugänglich.

### 4.4.1 CXCL12-Verlauf während einer Radiochemotherapie

Unsere Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede der CXCL12-Konzentration während einer RCT.

Der Median des Zeitpunktes vor RCT lag bei 2132,56 pg/ml, der des Zeitpunktes nach RCT lag bei 2319,15 pg/ml. Dies entsprach einer Differenz von 186,59 pg/ml.

Über den gesamten Zeitraum von vor RCT bis Ende RCT kam es zu einem Anstieg, der jedoch knapp nicht im Signifikanzniveau lag (p=0,064). Zu signifikanten Ergebnissen kam die von Wolff geleitete Arbeitsgruppe. Sie untersuchten u. a. die Expression von CXCL12 nach einer Radiotherapie in Zellkulturüberständen von sowohl Plattenepithelkarzinomzellen aus dem Kopf-Hals-Bereich als auch von Fibroblasten. Sie stellten eine persistierend hohe Expression und signifikante Akkumulation von CXCL12 in beiden Zelllinien nach einer Bestrahlung fest (Wolff et al. 2011).

Lerman et al. bestrahlten Endothelzellen und maßen erhöhte Expressionen von CXCL12 nach einer Bestrahlung mit 5 Gy sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene (Lerman et al. 2010). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu unseren, wobei sich bei uns ein Trend erkennen lässt, der darauf hinweist, dass es auch im Plasma zu einer Änderung der Konzentration von CXCL12 während einer RCT kommen kann. Um diese Ergebnisse noch weiter untermauern zu können, sollten weitere Untersuchungen mit mehr Probanden folgen.

## 4.4.2 CXCL12-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus

In unseren Untersuchungen zeigte sich ein signifikanter Unterschied (p=0,039) der CXCL12-Konzentration zwischen Patienten ohne Lymphknotenmetastasen und Patienten mit Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt Ende RCT. Zu den Zeitpunkten vor RCT und Mitte RCT waren die Unterschiede nicht signifikant.

Wie oben bereits erwähnt, ist das Auftreten von Lymphknotenmetastasen mit einer erhöhten CXCL12-Expression assoziiert. Oliveira-Neto et al. zeigten in ihrer Studie, dass das Expressionslevel von CXCL12 in Lymphknotenmetastasen von Karzinomen der Mundhöhle signifikant höher war als in Lymphknoten, die nicht befallen waren (Oliveira-Neto et al. 2008). Ähnliches zeigte auch die von Uchida et al. geleitete Studie. Sie wiesen aggressivere Lymphknoten- und Lungenmetastasen bei Mäusen nach, in denen sie zuvor eine erhöhte CXCL12-Expression induziert hatten (Uchida et al. 2007).

Signifikant erhöhte CXCL12-Level im Plasma von Patienten mit positivem Lymphknotenstatus vor Beginn der RCT konnten wir nicht nachweisen. Ob CXCL12 also als Biomarker für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen herangezogen werden kann, gilt es durch weitere Studien zu untersuchen.

### 4.5 Plasma-IL-6 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor

Unsere Ergebnisse zeigen das Vorliegen von IL-6 im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich und dass es während einer RCT zu einem signifikanten Anstieg (p<0,001) der Konzentration von IL6 kommt.

Die wichtige Rolle von IL-6 bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor konnte schon in einigen Studien beschrieben werden. Riedel et al. untersuchten die IL-6-Level in Serumproben von 90 Patienten mit einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich und verglichen sie mit 39 Serumproben von gesunden Probanden. Sie stellten eine signifikant höhere Serumkonzentration von IL-6 im erkrankten Kollektiv fest (Riedel et al. 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch St. John et al., die ebenfalls die IL-6-Konzentrationen bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv maßen. Die erhöhten Konzentrationen im Serum von IL-6 konnten sie auf der Proteinebene bestätigen (St John et al. 2004).

Diese Ergebnisse konnten von Duffy et al. nochmals bestätigt werden. In einer von ihr geleiteten Studie mit 444 Probanden waren hohe IL-6-Spiegel vor Beginn der Behandlung mit einer kürzeren rezidivfreien Zeit und einem kürzeren Überleben assoziiert (Duffy et al. 2008). Eine Studie von Meyer et al., in der u. a. die IL-6-Spiegel im Serum bei ca. 500 Patienten mit

einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich bestimmt wurden, konnte einen Zusammenhang zwischen der IL-6-Konzentration und dem Entstehen von Zweittumoren belegen. Je höher die Spiegel vor Behandlung im Serum gemessen werden konnten, desto höher war das Risiko an einem Zweittumor zu erkranken (Meyer F et al. 2010).

Bei kolorektalen Karzinomen gibt es mittlerweile Hinweise darauf, dass die Konzentration von IL-6 im Serum mit der Expression von IL-6 direkt im Primarius korreliert (Kinoshita et al. 1999).

## 4.5.1 IL-6-Anstieg während einer Radiochemotherapie

Unsere Ergebnisse zeigen einen signifikanten Anstieg (p<0,0001) der Konzentration von IL-6 im Plasma von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich während einer RCT. Der Median der Gruppe vor RCT lag bei 7,476 pg/ml, der der Gruppe Ende RCT lag bei 20,935 pg/ml. Dies ergab eine Differenz von 13,459 pg/ml.

Das Verhalten von IL-6 während einer Radiotherapie wurde auch von anderen Autoren beschrieben.

So untersuchten Citrin et al. in ihrer Studie Speichelproben von 11 Patienten, die wegen eines Malignoms im Kopf-Hals-Bereich eine kombinierte Radiochemotherapie in kurativer Intention erhielten. Dabei stellten sie ebenfalls einen signifikanten Anstieg des IL-6-Levels im Speichel fest (Citrin et al. 2012).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine von Lopes et al. geführte Studie. Sie untersuchten das Serum von 48 Patienten, die aufgrund eines Prostatakarzinoms bestrahlt wurden. Dabei bestimmten sie auch zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Bestrahlung (vor RCT, Mitte RCT und Ende RCT) die IL-6-Konzentration im Serum. Entsprechend unserer Ergebnisse beschrieben sie einen signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration vom Zeitpunkt vor RCT zum Zeitpunkt Mitte RCT. Danach stellten Lopes et al. jedoch einen Abfall der Konzentration vom Zeitpunkt Mitte RCT zum Zeitpunkt Ende RCT fest, was sich nicht mit unseren Ergebnissen deckt (Lopes und Callera 2012).

Obwohl eine perkutane Bestrahlung eine direkte Wirkung auf die Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Zellen hat, ist die bestrahlungsinduzierte Antwort des Körpers dennoch dynamisch und durch viele verschiedene Mediatoren beeinflusst. IL-6 spielt sowohl in der Progression von Tumoren eine große Rolle als auch in deren Behandlung, weil es einen Einfluss auf die Radiosensibilität einiger Tumoren hat (Chen et al. 2012).

De Schutter et al. untersuchten die Serumlevel von IL-6 von 34 Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor, die in eine primäre RCT erhalten sollten. Sie konnten einen deutlichen Zusammenhang der IL-6-Konzentration vor Behandlungsbeginn mit der lokalen Kontrolle des Tumors induziert durch Radiotherapie aufweisen. Je höher der IL-6-Spiegel vor Behandlungsbeginn, desto schlechter war die lokale Kontrolle des Tumors. Dies könnte laut de Schutter auf eine IL-6-induzierte Radioresistenz *in vivo* bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor hinweisen (Schutter et al. 2005).

Dass IL-6 sowohl unter einer Bestrahlung als auch unter einer Chemotherapie ansteigt, zeigten Reers et al. in ihrer Studie. Sie untersuchten sowohl Zelllinien, die aus dem Primarius eines Kopf-Hals-Tumors entstammten als auch Zelllinien, die aus den Lymphknotenmetastasen eines Malignoms des Kopf-Hals-Bereiches kultiviert wurden und wiesen einen Anstieg der IL-6-Sekretion nach. Dieser Anstieg zeigte sich sowohl nach einer Bestrahlung mit unterschiedlich hohen Dosen bis 18 Gy als auch bei der Behandlung mit den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil und Cisplatin, mit dem auch die Patienten in der vorliegenden Arbeit behandelt wurden (Reers et al. 2013).

# 4.5.2 IL-6-Verlauf bei unterschiedlich behandelten Patientenkollektiven

Unsere Ergebnisse zeigen zu zwei Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied der IL-6-Konzentration zwischen Patienten, die adjuvant oder primär eine Radiochemotherapie erhielten. Zum Zeitpunkt vor RCT war der Unterschied der beiden Kollektive zueinander nicht signifikant (p=0,056). Ab Zeitpunkt Mitte RCT unterschieden sich die IL-6-Konzetrationen in den Kollektiven signifikant (p=0,023), dabei war die IL-6-Konzentration in den primär behandelten Patienten höher. Dies zeigte sich auch zum Zeitpunkt Ende RCT. Der Unterschied der beiden Kollektive zueinander stellte sich auch hier signifikant dar (p=0,013).

Die Annahme, dass IL-6 direkt vom Tumor ins Blut sezerniert wird, kann durch diese Ergebnisse gestützt werden. Da bei primär behandelten Patienten noch ein manifester Tumor vorliegt, ist die IL-6-Sekretion im Vergleich zu adjuvant behandelten Patienten erhöht.

Andere Ergebnisse stellten Akmansu et al. fest. Sie untersuchten die Seren von 19 primär behandelten und 15 adjuvant behandelten Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich, die eine kombinierte RCT erhielten. Die Proben entnahmen sie vor Beginn der Bestrahlung und zum Abschluss der Behandlung. Akmansu et al. maßen zwar ebenfalls signifikant erhöhte IL-6-Spiegel nach Bestrahlung, jedoch nur in den Seren der Patienten, die adjuvant bestrahlt wurden (Akmansu et al. 2005).

Die Arbeitsgruppe von Akmansu. untersuchte eine relativ geringe Anzahl an Patientenseren, so dass der Unterschied zu unseren Ergebnissen dadurch erklärt werden könnte. Ob die IL-6-Konzentration im Blut von Patienten mit noch manifestem Tumor im erhöht ist, weil es direkt vom Tumor sezerniert wird, sollte weiterhin untersucht werden. Unsere Ergebnisse geben einen weiteren Hinweis darauf.

## 4.5.3 IL-6-Konzentrationen bei unterschiedlichem Lymphknotenstatus

Im Vergleich der Plasmen der Patienten miteinander, die entweder einen positiven oder negativen Lymphknotenstatus aufwiesen, stellten wir keinen signifikanten Unterschied fest. Weder vor der Bestrahlung (p=0,346) noch direkt nach der letzten Bestrahlungseinheit (p=0,676) ließ sich ein Unterschied messen.

Zu anderen Ergebnissen diesbezüglich kamen Riedel et al. In den Seren von 90 Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor stellten sie signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen vor Behandlungsbeginn bei Patienten mit einem positiven Lymphknotenstatus im Vergleich zu Patienten ohne Lymphknotenbefall fest. (Riedel et al. 2005).

Auch de Schutter et al. kamen zu diesen Ergebnissen. Bei 34 Serumproben von Patienten mit der gleichen Tumorentität, die primär behandelt wurden, stellten sie fest, dass die IL-6-Konzentration positiv mit dem Lymphknotenstatus korrelierte (Schutter et al. 2005).

Während wir in unserer Studie die IL-6-Konzentration bei entweder positivem oder negativem Lymphknotenstatus untersuchten, unterschieden de Schutter et al. nochmals nach dem genauen Lymphknotenstatus und maßen daraufhin die IL-6-Konzentration. Bei höherem N-Status zeigte sich auch eine höhere IL-6-Konzentration im Serum. Ein Vergleich mit unseren Ergebnissen ist daher nur bedingt möglich. Die Unterschiede sind unter Umständen durch die andere Herangehensweise zu erklären.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Patientenkollektiv von 66 Patienten untersucht, welches im Zeitraum von Oktober 2010 bis Oktober 2012 wegen eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs mit einer konkomitanten RCT in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen behandelt wurde.

Die Plasmen dieser Patienten wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung auf das Vorliegen der vier Chemokine CCL2, CCL5, CCL20 und CXCL12 und des Akut-Phase-Zytokins IL-6 und deren Konzentrationsveränderungen während der RCT mittels ELISA untersucht. Dabei wurde sowohl ein möglicher Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Behandlungsmodalität als auch ein Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Lymphknotenstatus analysiert.

Unsere Ergebnisse zeigen sowohl, dass CCL2 im Plasma dieses Kollektives nachweisbar ist, als auch einen signifikanten Anstieg der CCL2-Konzentration während einer RCT. Bei Patienten, die zu Beginn der Therapie noch einen manifesten Tumor hatten, ließ sich ein signifikant niedrigerer CCL2-Spiegel messen als bei Patienten, die im adjuvanten Rahmen eine RCT erhielten. Im Vergleich der CCL2-Konzentrationen bei Patienten mit unterschiedlichem Lymphknotenstatus konnten wir keine signifikanten Werte messen.

Während der RCT maßen wir einen signifikanten Abfall der CCL5-Konzentration im Plasma. Patienten, die aufgrund der Ausdehnung des Tumors inoperabel waren, hatten signifikant höhere CCL5-Spiegel als Patienten, die vor Beginn der RCT operiert wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass CCL5 direkt vom bestehenden Tumor ins Blut sezerniert wird und somit auch als möglicher Biomarker in der Diagnose und Therapie des Kopf-Hals-Malignoms genutzt werden könnte. Ein signifikanter Unterschied zwischen einem positiven oder negativen Lymphknotenstatus ließ sich bei CCL5 nicht feststellen.

Die CCL20-Konzentration fiel während der RCT signifikant ab. CCL20 könnte in Zukunft als Biomarker für ein Therapieansprechen unter einer RCT bei einem Kopf-Hals-Tumor eingesetzt werden. Ein Vergleich des unterschiedlichen Lymphknotenstatus zeigte keine Signifikanz.

Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die CXCL12-Konzentration nicht signifikant während einer RCT anstieg. Der Unterschied der CXCL12-Konzentration getrennt nach positivem oder negativem Lymphknotenstatus war ebenfalls nicht signifikant.

Während einer RCT analysierten wir einen signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration. Die Konzentration des Akut-Phase-Zytokins war zu zwei Zeitpunkten unserer Messung in primär behandelten Patientenplasmen signifikant höher als in adjuvant behandelten Patientenplasmen. Einen signifikanten Unterschied der IL-6-Konzentration zwischen einem positiven oder negativen Lymphknotenstatus konnten wir nicht messen.

In nachfolgenden Studien sollte auf den Effekt der Chemotherapie eingegangen werden, da die von uns beobachteten Effekte auch Folge der konkomitant erfolgten Chemotherapie sein könnten. Um eine mögliche Auswirkung der Änderung der Chemokinkonzentration auf das Tumoransprechen und die Überlebenswahrscheinlichkeit feststellen zu können, sollte es in weiteren Studien eine längere Nachbeobachtungszeit geben.

Die klinische Relevanz der dargestellten Ergebnisse ist aufgrund der einfach zugänglichen Probengewinnung und Methodik und einer möglichen Verwendung als Biomarker für das Tumoransprechen und die Prognose als hoch einzuschätzen.

Sollten sich durch weiterführende Untersuchungen die hier beschriebenen Effekte bestätigen, ist die Anwendung im klinischen Alltag als eine sinnvolle Ergänzung zur bisherigen Behandlung in der Therapie von Patienten mit einem Malignom des Kopf-Hals-Bereichs denkbar. Wie in dieser Arbeit z. B. bei dem Chemokin CCL5 gezeigt, könnte es in Zukunft von klinischer Bedeutung sein, eine individualisierte Therapie für Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsstadium (Inoperabilität oder Operabilität des Tumors) etablieren zu können. In der vorgelegten Arbeit ließ sich eine signifikant höhere CCL5-Konzentration im Plasma bei Patienten mit Vorliegen des Primärtumors messen im Vergleich zu Patientenplasma, welches adjuvant behandelt wurde. Sollte sich dies durch weitere Studien belegen lassen, könnte der regelmäßige Nachweis von CCL5 während einer konkomitanten RCT bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor als Biomarker für das Ansprechen unter der Therapie von hohem Nutzen sein.
# 6 Anhang

# Tabelle 7: UICC-Stadien

#### (Wittekind und Meyer 2010)

Stadium 0	Tis	NO	M0
Stadium I	T1	NO	M0
Stadium II	T2	NO	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	Т3	N0,N1	M0
Stadium IV	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	N0, N1, N2	<b>M</b> 0
	jedes T	jedes N	M1

# Tabelle 8: Untersuchte Chemokine und Zytokine

Chemokin	anderer Name	vollständiger Name	Rezeptor
CCL2	MCP-1, SCYA-2	monocyte chemoattractant protein 1	CCR2
CCL5	RANTES	regulated upon activation of normal T cell	CCR1,3, 5
CCL20	MIP3-α, LARC	macrophage inflammatory protein 3 alpha	CCR6
CXCL12	SDF-1, SCYB12	stromal cell-derived factor 1	CXCR4, 7

Zytokin	anderer Name	vollständiger Name
IL-6	IFNB2	Interleukin 6

# Tabelle 9: T-Stadien von Kopf-Hals-Tumoren

# (Wittekind und Meyer 2010)

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
ТО	kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	Tumorgröße liegt bei maximal 2 cm in seiner größten Ausdehnung
T2	Tumorgröße liegt bei mindestens 2 cm aber nicht bei mehr als 4 cm
Т3	Tumorgröße mit mehr als 4 cm Ausdehnung
T4	Tumor mit Ausdehnung auf Nachbar- strukturen (Tiefeninfiltration)

#### Tabelle 10: N-Stadien von Kopf-Hals-Tumoren

(Wittekind und Meyer 2010)

NO	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem ipsilateralen Lymph- knoten mit einer maximalen Größe von 3 cm
N2a	Metastase in einem ipsilateralen Lymph- knoten mit einer Größe zwischen 3 bis 6 cm
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lympknoten mit einer maximalen Größe von 6 cm
N2c	Metastasen in bilalateralen oder kontra- lateralen Lymphknoten mit einer maximalen Größe von 6 cm
N3	Metastasen mit einer Größe von mehr als 6 cm

# Tabelle 11: Grading von Kopf-Hals-Tumoren

Gx	nicht bestimmbar, da Staging bzw. Material unvollständig
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert

#### Tabelle 12: Patientenkollektiv

Patient	Geschlecht	Alter	Tumorlokalisa	Т-	N-	Grading	UICC-
			tion	Stadium	Stadium		Stadium
1	weiblich	67	Mundhöhle	pT2	N1	G2	III
2	männlich	71	Larynx	cT4	N0	G2	IV
3	männlich	58	Mundhöhle	pT2	N2	G2	IV
4 (5)	männlich	56	Mundhöhle	pT2	N2	G2	IV
5 (6)	männlich	67	Larynx	pT4	N2	G2	IV
6 (7)	männlich	66	Oropharynx	pT2	N1	G2	III
7 (8)	männlich	62	Hypopharynx	pT2	N2	G3	IV
8 (9)	männlich	60	Oropharynx	cT4	N2	G2	IV
9 (10)	männlich	52	Hypopharynx	cT4	N2	G2	IV
10 (11)	männlich	69	Oropharynx	pT3	N0	G2	III
11 (14)	männlich	73	Larynx	pT3	N0	G2	III
12 (15)	männlich	69	Mundhöhle	pT3	N1	G1	III
13 (16)	männlich	62	Larynx	cT4	N0	G2	IV
14 (18)	weiblich	53	Larynx	pT3	N0	G2	III
15 (19)	männlich	71	Oropharynx	pT4	N0	G2	IV
16 (20)	weiblich	53	Oropharynx	pT3	N1	G2	III
17 (21)	männlich	69	Oropharynx	cT4	N1	G2	IV
18 (22)	weiblich	50	Oropharynx	pT3	N2	G2	IV
19 (23)	männlich	60	Oropharynx	pT2	N2	G3	IV
20 (25)	männlich	63	Oropharynx	pT4	N2	G2	IV
21 (26)	männlich	53	Hypopharynx	pT3	N2	G1	IV
22 (27)	männlich	48	Mundhöhle	pT1	N2	G2	IV
23 (28)	männlich	72	Larynx	pT4	N0	G2	IV

24 (29)	männlich	44	Oropharynx	pT4	N2	G2	IV
25 (30)	männlich	60	Oropharynx	pT3	N2	G2	IV
26 (31)	männlich	52	Hypopharynx	pT4	N2	G2	IV
27 (32)	männlich	51	Mundhöhle	pT2	N1	G2	III
28 (33)	männlich	52	Mundhöhle	pT4	N2	G2	IV
29 (35)	männlich	72	Mundhöhle	pT0	N2	G2	IV
30 (36)	männlich	72	Mundhöhle	pT3	N0	G2	III
31 (37)	männlich	72	Oropharynx	cT4	N2	G2	IV
32 (38)	männlich	76	Larynx	pT2	N1	G2	III
33 (39)	männlich	71	Larynx	pT4	N0	G2	IV
34 (40)	männlich	69	Mundhöhle	cT4	N2	G2	IV
35(42)	männlich	64	Oropharynx	cT4	N0	G2	IV
36 (44)	männlich	59	Mundhöhle	pT4	N0	G2	IV
37 (45)	männlich	75	Mundhöhle	pT4	N0	G2	IV
38 (46)	männlich	54	Oropharynx	cT4	N2	G3	IV
39 (47)	männlich	68	Mundhöhle	pT2	N2	G2	IV
40 (48)	männlich	71	Oropharynx	pT4	N2	G2	IV
41 (49)	männlich	57	Mundhöhle	pT3	N1	G2	III
42 (52)	männlich	72	Larynx	pT4	N2	G2	IV
43 (53)	weiblich	50	Larynx	pT3	N0	G3	III
44 (54)	männlich	53	Hypopharynx	pT4	N2	G2	IV
45 (55)	männlich	68	Oropharynx	pT4	N2	G2	IV
46 (57)	männlich	49	Mundhöhle	cT4	N1	G2	IV
47 (58)	männlich	54	Hypopharynx	pT3	N1	G2	III
48 (59)	männlich	74	Oropharynx	pT1	N2	G2	IV
49 (60)	männlich	56	Mundhöhle	cT4	N1	G3	IV
50 (62)	männlich	52	Mundhöhle	cT4	N2	G2	IV
51 (64)	männlich	55	Larynx	cT4	N0	G2	IV
52 (65)	männlich	67	Larynx	pT3	N0	G2	III
53 (66)	männlich	51	Oropharynx	pT3	N0	G2	III
54 (67)	männlich	61	Hypopharynx	pT4	N2	G2	IV
55 (68)	männlich	60	Oropharynx	cT4	N2	G2	IV
56 (69)	weiblich	58	Oropharynx	pT3	N2	G3	IV

57 (70)	männlich	56	Oropharynx	cT4	N2	G2	IV
58 (77)	männlich	66	Mundhöhle	cT4	N1	G2	IV
59	männlich	56	Hypopharynx	pT2	N1	G2	III
(101)							
60	männlich	70	Oropharynx	pT4	N2	G2	IV
(102)							
61	weiblich	47	Mundhöhle	pT4	N1	G2	IV
(105)							
62	männlich	52	Mundhöhle	pT1	N1	G2	III
(106)							
63	männlich	72	Oropharynx	pT4	N2	G2	IV
(110)							
64	weiblich	58	Larynx	pT3	N2	G2	IV
(111)							
65	männlich	58	Hypopharynx	pT3	N2	G2	IV
(112)							
66	männlich	23	Mundhöhle	pT3	N1	G2	III
(113)							

Tabelle 13: Patientencharakteristika

Charakteristika	Alter	
Mittelwert	61	
Minimum	23	
Maximum	76	
Charakteristika	N absolut	N (%)
Gesch	lecht	
männlich	58	(87,9)
weiblich	8	(12,1)
Tumorlok	alisation_	
Mundhöhle	20	(30,4)
Oropharynx	24	(36,4)
Hypopharynx	9	(13,6)
Larynx	13	(19,6)

6 Anhang
----------

<u>UICC-Stadium</u>		
III	18	(27,3)
IV	48	(72,7)
<u>Tumorstadium</u>		
1	3	(4,6)
2	10	(15,4)
3	18	(27,7)
4	34	(52,3)
<u>N-Stadium</u>		
0	16	(24,2)
1	16	(24,2)
2	34	(51,6)
<u>Grading</u>		
1	2	(3)
2	58	(87,9)
3	6	(9,1)
<u>Behandlung</u>		
primär	16	(24,2)
adjuvant	50	(75,8)

#### 7 Literaturverzeichnis

Abiko Y, Nishimura M, Kusano K, Nakashima K, Okumura K, Arakawa T, Takuma T, Mizoguchi I, Kaku T (2003): Expression of MIP-3alpha/CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma. Arch Oral Biol <u>48</u>, 171–175

Akmansu M, Unsal D, Bora H, Elbeg S (2005): Influence of locoregional radiation treatment on tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the serum of patients with head and neck cancer. Cytokine <u>31</u>, 41–45

Albert S, Riveiro ME, Halimi C, Hourseau M, Couvelard A, Serova M, Barry B, Raymond E, Faivre S (2013): Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck <u>35</u>, 1819–1828

Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A, Colombatti A (2008): Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. Int J Cancer <u>122</u>, 769–776

Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M (2004): The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol <u>25</u>, 65–71

Ao X, Zhao L, Davis MA, Lubman DM, Lawrence TS, Kong F (2009): Radiation produces differential changes in cytokine profiles in radiation lung fibrosis sensitive and resistant mice. J Hematol Oncol <u>2</u>, 6

Baatenburg de Jong RJ, Hermans J, Molenaar J, Briaire JJ, Le Cessie S (2001): Prediction of survival in patients with head and neck cancer. Head Neck <u>23</u>, 718–724

Bachaud JM, Cohen-Jonathan E, Alzieu C, David JM, Serrano E, Daly-Schveitzer N (1996): Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma: final report of a randomized trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys <u>36</u>, 999–1004

Begg AC (2012): Predicting recurrence after radiotherapy in head and neck cancer. Semin Radiat Oncol <u>22</u>, 108–118

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre J, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M et al. (2004): Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. N Engl J Med <u>350</u>, 1945–1952

Bièche I, Lerebours F, Tozlu S, Espie M, Marty M, Lidereau R (2004): Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. Clin Cancer Res <u>10</u>, 6789–6795

Bogdanov-Berezovsky A, Rosenberg L, Cagniano E, Silberstein E (2008): The role of frozen section histological analysis in the treatment of head and neck skin basal and squamous cell carcinomas. Isr Med Assoc J <u>10</u>, 344–345

Buettner M, Meyer B, Schreck S, Niedobitek G (2007): Expression of RANTES and MCP-1 in epithelial cells is regulated via LMP1 and CD40. Int J Cancer <u>121</u>, 2703–2710

Canto MT, Devesa SS (2002): Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. Oral Oncol <u>38</u>, 610–617

Chang K, Hao S, Chang J, Wu C, Tsang N, Lee Y, Hsu C, Ueng S, Liu S, Liu Y et al. (2008): Macrophage inflammatory protein-3alpha is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes. Clin Cancer Res <u>14</u>, 6979–6987

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML (2008): Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. J. Clin Oncol <u>26</u>, 612–619

Chen M, Hsieh C, Chen W, Lai C (2012): Role of interleukin-6 in the radiation response of liver tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys <u>84</u>, 621-30

Chen M, Chen P, Lu MS, Lin PY, Chen W, Lee K (2013): IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. Mol Cancer <u>12</u>, 26

Chen Y, Chang JT, Liao C, Wang H, Yen T, Chiu C, Lu Y, Li H, Cheng A (2008): Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. Cancer Sci <u>99</u>, 1507–1514

Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB (2006): Head and neck cancer: past, present and future. Expert Rev Anticancer Ther <u>6</u>, 1111–1118

Chuang J, Yang W, Chen H, Huang C, Tan T, Lin Y, Hsu C, Fong Y, Tang C (2009): CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. J Cell Physiol <u>220</u>, 418–426

Citrin DE, Hitchcock YJ, Chung EJ, Frandsen J, Urick ME, Shield W, Gaffney D (2012): Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies. Radiat Oncol <u>7</u>, 64

Clatot F, Picquenot J, Choussy O, Gouérant S, Moldovan C, Schultheis D, Cornic M, François A, Blot E, Laberge-Le-Couteulx S (2011): Intratumoural level of SDF-1 correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol <u>47</u>, 1062–1068

Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Högmo A, Björnestål L, Lindholm J, Lundberg B, Dalianis T, Munck-Wikland E (2004): Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. Int J Cancer <u>112</u>, 1015–1019

Duffy SA, Taylor JMG, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, Wolf GT, Teknos TN (2008): Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. Cancer <u>113</u>, 750–757 Duvvuri U, Myers JN (2009): Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. Curr Probl Surg <u>46</u>, 114–117

Eissa SAL, Zaki SA, El-Maghraby SM, Kadry DY (2005): Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. J Egypt Natl Canc Inst <u>17</u>, 51–55

Enjuanes A, Benavente Y, Bosch F, Martín-Guerrero I, Colomer D, Pérez-Alvarez S, Reina O, Ardanaz MT, Jares P, García-Orad A et al. (2008): Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res <u>68</u>, 10178–10186

Ferreira FO, Ribeiro FLL, Batista AC, Leles CR, Cássia Gonçalves Alencar R de, Silva TA (2008): Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma. Tumour Biol <u>29</u>, 114–121

Foulds GA, Radons J, Kreuzer M, Multhoff G, Pockley AG (2013): Influence of tumors on protective anti-tumor immunity and the effects of irradiation. Front Oncol <u>3</u>, 14

Gil Z, Fliss DM (2009): Contemporary management of head and neck cancers. Isr Med Assoc J <u>11</u>, 296–300

Guntinas-Lichius O, Wendt T, Buentzel J, Esser D, Lochner P, Mueller A, Schultze-Mosgau S, Altendorf-Hofmann A (2010): Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. J Cancer Res Clin Oncol <u>136</u>, 55–63

Guo Y, Zhu X, Qu S, Li L, Su F, Li Y, Huang S, Li D (2012): Identification of genes involved in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by integrating gene ontology and protein-protein interaction networks. Int J Oncol <u>40</u>, 85–92

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Müller A, deWaal Malefyt R et al. (2000): Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. J Immunol <u>164</u>, 6621–6632

74

Hong J, Pai H, Hong K, Kim M, Kim J, Lee J, Hong S, Hong S (2009): CXCR-4 knockdown by small interfering RNA inhibits cell proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. J Oral Pathol Med <u>38</u>, 214–219

Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, Hamakawa H (2006): CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol <u>28</u>, 61–66

Iwata T, Tanaka K, Inoue Y, Toiyama Y, Hiro J, Fujikawa H, Okugawa Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M (2013): Macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3a) is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. J Surg Oncol <u>107</u>, 160–166

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008): Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin <u>58</u>, 71–96

Jin F, Brockmeier U, Otterbach F, Metzen E (2012): New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. Mol Cancer Res<u>10</u>, 1021-1031

Johnston CJ, Williams JP, Okunieff P, Finkelstein JN (2002): Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. Radiat Res <u>157</u>, 256–265

Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008.
8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). <u>8</u>, 24

Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, Ohta Y, Iino Y, Ichimura K, Noda Y (2007): Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. Eur Arch Otorhinolaryngol <u>264</u>, 815–821

Katayama A, Ogino T, Bandoh N, Nonaka S, Harabuchi Y (2005): Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN-gamma in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res <u>11</u>, 2937–2946

Kinoshita T, Ito H, Miki C (1999): Serum interleukin-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal carcinoma. Cancer <u>85</u>, 2526–2531

Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Büchler MW, Zlotnik A, Korc M (1999): Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. Int J Cancer <u>81</u>, 650–657

Klein JD, Grandis JR (2010): The molecular pathogenesis of head and neck cancer. Cancer Biol Ther  $\underline{9}$ , 1–7

Koide N, Nishio A, Sato T, Sugiyama A, Miyagawa S (2004): Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. Am J Gastroenterol <u>99</u>, 1667–1674

Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I (2007): Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. Cancer Sci <u>98</u>, 1652–1658

Kozin SV, Kamoun WS, Huang Y, Dawson MR, Jain RK, Duda DG (2010): Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation. Cancer Res <u>70</u>, 5679–5685

Le JM, Vilcek J (1989): Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. Lab Invest <u>61</u>, 588–602

Lee AW, Ng WT, Chan YH, Sze H, Chan C, Lam TH (2012): The battle against nasopharyngeal cancer. Radiother Oncol <u>104</u>, 272–278

Lerman OZ, Greives MR, Singh SP, Thanik VD, Chang CC, Seiser N, Brown DJ, Knobel D, Schneider RJ, Formenti SC et al. (2010): Low-dose radiation augments vasculogenesis signaling through HIF-1-dependent and -independent SDF-1 induction. Blood <u>116</u>, 3669–3676

Loberg RD, Day LL, Harwood J, Ying C, St John LN, Giles R, Neeley CK, Pienta KJ (2006): CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. Neoplasia <u>8</u>, 578–586

Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, Zur Hausen H (1985): Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. J Invest Dermatol <u>84</u>, 417–420

Lopes CO, Callera F (2012): Three-dimensional conformal radiotherapy in prostate cancer patients: rise in interleukin 6 (IL-6) but not IL-2, IL-4, IL-5, tumor necrosis factor- $\alpha$ , MIP-1- $\alpha$ , and LIF levels. Int J Radiat Oncol Biol Phys <u>82</u>, 1385–1388

Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben-Baruch A (1999): Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. Cancer Res <u>59</u>, 4681–4687

Lugade AA, Sorensen EW, Gerber SA, Moran JP, Frelinger JG, Lord EM (2008): Radiationinduced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. J Immunol <u>180</u>, 3132–3139

Lu X, Qian C, Mu Y, Li N, Li S, Zhang H, Li S, Wang F, Guo X, Xiang Y (2011): Serum CCL2 and serum TNF- $\alpha$ --two new biomarkers predict bone invasion, post-treatment distant metastasis and poor overall survival in nasopharyngeal carcinoma. Eur J Cancer <u>47</u>, 339–346

Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RCT, Springer TA (1998): Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U.S.A. <u>95</u>, 9448–9453

Makino Y, Cook DN, Smithies O, Hwang OY, Neilson EG, Turka LA, Sato H, Wells AD, Danoff TM (2002): Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. Clin Immunol <u>102</u>, 302–309

Mashberg A, Samit A (1995): Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. CA Cancer J Clin <u>45</u>, 328–351

Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ (1989): Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. J Exp Med <u>169</u>, 1485–1490

Merlano M, Benasso M, Corvò R, Rosso R, Vitale V, Blengio F, Numico G, Margarino G, Bonelli L, Santi L (1996): Five-year update of a randomized trial of alternating radiotherapy and chemotherapy compared with radiotherapy alone in treatment of unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. J Natl Cancer Inst <u>88</u>, 583–589

Meyer F, Samson E, Douville P, Duchesne T, Liu G, Bairati I (2010a): Serum prognostic markers in head and neck cancer. Clin Cancer Res <u>16</u>, 1008–1015

Meyer JE, Brocks C, Maune S, Strnad V, Werner JA, Wollenberg B, Kovács G (2010b): Brachytherapie für die Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen. HNO <u>58</u>, 947–958

Michiels K, Schutyser E, Conings R, Lenaerts J, Put W, Nuyts S, Delaere P, Jacobs R, Struyf S, Proost P et al. (2009): Carcinoma cell-derived chemokines and their presence in oral fluid. Eur J Oral Sci <u>117</u>, 362–368

Moriconi F, Christiansen H, Raddatz D, Dudas J, Hermann RM, Rave-Fränk M, Sheikh N, Saile B, Hess CF, Ramadori G (2008): Effect of radiation on gene expression of rat liver chemokines: in vivo and in vitro studies. Radiat Res <u>169</u>, 162–169

Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN et al. (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature <u>410</u>, 50–56

Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitza R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz L et al. (2006): Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. Int J Cancer <u>118</u>, 2147–215

78

Müller K, Meineke V (2007): Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells. Exp Hematol <u>35</u>, 96–104

Nguyen NP, Ly BH, Betz M, Vinh-Hung V (2010): Importance of age as a prognostic factor for tonsillar carcinoma. Ann Surg Oncol <u>17</u>, 2570–2577

Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, Sumi H, Ozaki Y, Abe A (2001): Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. Clin Cancer Res <u>7</u>, 285–289

Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, Hakozaki M, Abe T, Iizuka N, Hazama S, Hirazawa K, Hayashi H, Tangoku A et al. (1996): Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res. <u>56</u>, 2776–2780

Oliveira-Neto HH, Silva ET, Leles CR, Mendonça EF, Alencar RdC, Silva TA, Batista AC (2008): Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinomas. Tumour Biol <u>29</u>, 262–271

O'Rorke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA (2012): Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. Oral Oncol <u>48</u>, 1191–1201

Pignon J, Le Maître A, Maillard E, Bourhis J (2009): Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. Radiother Oncol <u>92</u>, 4–14

Power CA, Church DJ, Meyer A, Alouani S, Proudfoot AE, Clark-Lewis I, Sozzani S, Mantovani A, Wells TN (1997): Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. J Exp Med <u>186</u>, 825–835

Qian B, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW (2011): CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature <u>475</u>, 222–225

Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM (2007): The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. J Dent Res <u>86</u>, 104–114

Ramadori G, Christ B (1999): Cytokines and the hepatic acute-phase response. Semin Liver Dis <u>19</u>, 141–155

Rao SK, Pavicevic Z, Du Z, Kim J, Fan M, Jiao Y, Rosebush M, Samant S, Gu W, Pfeffer LM et al. (2010): Pro-inflammatory genes as biomarkers and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. J Biol Chem <u>285</u>, 32512–32521

R&D Systems (2013):

http://www.rndsystems.com//product\_detail\_objectname\_quantikineelisaassayprinciple.aspx

R&D Systems, Inc.: Quantikine ® ELISA, Human CXCL12/SDF-1a, 5

Reers S, Pfannerstill A, Rades D, Maushagen R, Andratschke M, Pries R, Wollenberg B (2013): Cytokine changes in response to radio-/chemotherapeutic treatment in head and neck cancer. Anticancer Res <u>33</u>, 2481–2489

Riede UN, Werner M, Schaefer HE: Allgemein und spezielle Pathologie. 4. Auflage; Thieme Verlag,, Stuttgart 2004

Riedel F, Zaiss I, Herzog D, Götte K, Naim R, Hörmann K (2005): Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. Anticancer Res <u>25</u>, 2761–2765

Rödel F, Hofmann D, Auer J, Keilholz L, Röllinghoff M, Sauer R, Beuscher HU (2008): The anti-inflammatory effect of low-dose radiation therapy involves a diminished CCL20 chemokine expression and granulocyte/endothelial cell adhesion. Strahlenther Onkol <u>184</u>, 41–47

Rubie C, Oliveira V, Kempf K, Wagner M, Tilton B, Rau B, Kruse B, Konig J, Schilling M (2006): Involvement of chemokine receptor CCR6 in colorectal cancer metastasis. Tumour Biol <u>27</u>, 166–174

Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, Toi M (2001): Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. Cancer <u>92</u>, 1085–1091

Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, Valentino MD, Lyubsky S, Zucker S, Vaday GG (2004): CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Lett <u>214</u>, 231–241

Schmidtner J, Distel LV, Ott OJ, Nkenke E, Sprung CN, Fietkau R, Lubgan D (2009): Hyperthermia and irradiation of head and neck squamous cancer cells causes migratory profile changes of tumour infiltrating lymphocytes. Int J Hyperthermia <u>25</u>, 347–354

Schröder JM (1992): Peptides and cytokines. Arch Dermatol Res 284 Suppl 1, S22-6

Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B (2009): How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. Thromb Haemost <u>102</u>, 215–222

Schutter H de, Landuyt W, Verbeken E, Goethals L, Hermans R, Nuyts S (2005): The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy. BMC Cancer <u>5</u>, 42

Schutyser E, Struyf S, van Damme J (2003): The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. Cytokine Growth Factor Rev <u>14</u>, 409–426

Shkeir O, Athanassiou-Papaefthymiou M, Lapadatescu M, Papagerakis P, Czerwinski MJ, Bradford CR, Carey TE, Prince MEP, Wolf GT, Papagerakis S (2013): In vitro cytokine release profile: Predictive value for metastatic potential in head and neck squamous cell carcinomas. Head Neck

Silva TA, Ribeiro FLL, Oliveira-Neto HHd, Watanabe S, Alencar RdCG, Fukada SY, Cunha FQ, Leles CR, Mendonça EF, Batista AC (2007): Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor metastasis and local host defense. Oncol Rep <u>18</u>, 1107–1113

81

St John MAR, Li Y, Zhou X, Denny P, Ho C, Montemagno C, Shi W, Qi F, Wu B, Sinha U et al. (2004): Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg <u>130</u>, 929–935

Strutz J, Mann W: Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie. Thieme Verlag, Stuttgart-New York 2000

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK (2002): Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. Cancer Res <u>62</u>, 1832–1837

Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T (1993): Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. Science <u>261</u>, 600–603

Taub DD, Oppenheim JJ (1993): Review of the chemokine meeting the Third International Symposium of Chemotactic Cytokines. Cytokine <u>5</u>, 175–179

Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, Scherag A, Hütte J, Dominas N, Lehnerdt GF et al. (2011): Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. Int J Cancer <u>129</u>, 2183–2193

Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, Hamakawa H, Yoshida H, Sato M (2003): Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. Exp Cell Res <u>290</u>, 289–302

Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, Begum NM, Miwa Y, Yoshida H, Sato M (2007): Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant metastasis of human oral squamous cell carcinoma. Mol Cancer Res <u>5</u>, 685–694

Uchida D, Onoue T, Kuribayashi N, Tomizuka Y, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y (2011): Blockade of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma inhibits lymph node metastases. Eur J Cancer <u>47</u>, 452–459 Ueda M, Shimada T, Goto Y, Tei K, Nakai S, Hisa Y, Kannagi R (2010): Expression of CCchemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx <u>37</u>, 488–495

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer H, Cupissol D et al. (2008): Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. N Engl J Med <u>359</u>, 1116–1127

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993): Head and neck cancer. N Engl J Med <u>328</u>, 184–194

Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF (2012): Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. Int J Biol Sci <u>8</u>, 1248–1253

Wang F, Arun P, Friedman J, Chen Z, van Waes C (2009): Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer. Curr Opin Pharmacol <u>9</u>, 389–395

Wang J, Xi L, Hunt JL, Gooding W, Whiteside TL, Chen Z, Godfrey TE, Ferris RL (2004): Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. Cancer Res <u>64</u>, 1861–1866

Wang J, Seethala RR, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H, Ferris RL (2008): Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. J Natl Cancer Inst <u>100</u>, 502–512

Wang JM, Deng X, Gong W, Su S (1998): Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. J Immunol Methods <u>220</u>, 1–17

Wittekind CH, Meyer HJ: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage; Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2010

Wolff HA, Rolke D, Rave-Fränk M, Schirmer M, Eicheler W, Doerfler A, Hille A, Hess CF, Matthias C, Rödel RMW et al. (2011): Analysis of chemokine and chemokine receptor expression in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. Radiat Environ Biophys <u>50</u>, 145–154

Yin D, Zhang Z, Gao S, Li B (2013): [The role of chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 in the process of proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi <u>31</u>, 8–12

Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M, Zhu A, Cho HT, Shin DM, Goodman MM, Chen ZG, Shim H (2007): CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. Cancer Res <u>67</u>, 7518–7524

Zhang J, Patel L, Pienta KJ (2010): CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. Cytokine Growth Factor Rev <u>21</u>, 41–48

Zhang Y, Lv D, Kim H, Kurt RA, Bu W, Li Y, Ma X (2013): A novel role of hematopoietic CCL5 in promoting triple-negative mammary tumor progression by regulating generation of myeloid-derived suppressor cells. Cell Res <u>23</u>, 394–408

Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW (2002): CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. J Biol Chem <u>277</u>, 49481–49487

Zlotnik A (2006): Chemokines and cancer. Int J Cancer 119, 2026–2029

Zlotnik A, Yoshie O (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity <u>12</u>, 121–127

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. med. C. F. Hess möchte ich dafür danken, diese Dissertation in seiner Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie schreiben zu können.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. med. Hendrik Wolff, der mich als mein Doktorvater immer unterstützt, motiviert und aufgebaut hat. Seinem unermüdlichen Einsatz zu jeder Tages- und Nachtzeit habe ich das Gelingen dieser Arbeit zu großen Teilen zu verdanken.

Ein ebenfalls sehr großer Dank geht an Frau Margret Rave-Fränk, die mir u. a. in statistischen Fragen immer geholfen und mich mit konstruktiver Kritik unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Tim Beißbarth aus der Medizinischen Statistik danke ich für die Überprüfung und Berechnung meiner statistischen Daten.

Frau Juliane Kasten-Krapp und Frau Alexandra Bitter danke ich für die große Hilfe und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit.

# Lebenslauf

Am 01. Juni 1987 wurde ich, Friederike Linnemann, als älteste Tochter von Herrn Dirk Linnemann und seiner Frau Anette Linnemann, geb. Schäfer, in Bückeburg geboren.

Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Grundschule in Heeßen, danach schloss sich eine zweijährige Zeit an der Orientierungsstufe Bückeburg an.

Von 1999 bis 2006 besuchte ich das Gymnasium Adolfinum Bückeburg, an dem ich im Frühjahr 2006 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Zum Wintersemester 2006/07 begann ich das Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Im Sommersemester 2008 schloss ich das Erste Staatsexamen mit der Note "sehr gut" ab und wurde daraufhin Stipendiatin der Deutschen Studienstiftung.

Im Herbst 2009 begann ich mit meiner Dissertation in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie in der Universitätsmedizin Göttingen.

Mein Praktisches Jahr absolvierte ich am Hôpital Erasme in Brüssel, im Klinikum Bremen Mitte in Bremen und am St.-Bernward-Krankenhaus in Hildesheim.

Das Zweite Staatsexamen absolvierte ich im Herbst 2012 mit der Note "sehr gut" und erlangte die ärztliche Approbation.

Am 01. Juni 2013 begann ich, in der Kardiologie im Klinikum Links der Weser in Bremen als Ärztin zu arbeiten.