

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde  
Direktor: Prof. Dr. med. T. Stöver

**Immunologische Prognosefaktoren bei Patienten  
mit fortgeschrittenen Kopf-/Hals-Tumoren  
behandelt mit TPF- Induktionschemotherapie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
**Dr. med. Corinna Mühleib**  
aus Mülheim an der Ruhr

Frankfurt am Main, 2014

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: PD Dr. M. Baghi

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Für alle Tumorpatienten

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Maligne Tumore im Kopf-/Halsbereich	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese	1
1.1.3 Ätiologie	3
1.1.4 Klinik	4
1.1.5 Diagnostik	4
1.1.6 TNM- und UICC-Klassifikation	5
1.1.7 Histologisches Grading	7
1.2 Therapie der malignen Tumore im Kopf-/Halsbereich	8
1.2.1 Chirurgische Therapie	8
1.2.2 Folgen der radikalen chirurgischen Therapie	10
1.2.3 Radiotherapie	11
1.2.4 Chemotherapie	12
1.2.5 Therapie mit EGFR-Inhibitoren	13
1.2.6 Gentherapie	14
1.3 TPF-Induktionschemotherapie	15
1.3.1 Zusammensetzung der TPF-Induktionschemotherapie	15
1.3.2 Bisherige Ergebnisse der TPF-Induktionschemotherapie	18
1.4 Prognosefaktoren bei malignen Kopf-/Hals-Tumoren	20
1.5 In dieser Arbeit untersuchte immunhistochemische Marker	22
1.5.1 Ki67	22
1.5.2 EGFR	22
1.5.3 Von-Willebrandt-Faktor	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit	25
<b>2. Material, Patientengut und Methodik</b>	<b>26</b>
2.1 Materialliste	26
2.2 Auswahl des Patientenkollektivs	27
2.3 Gewinnung der Proben	28

2.4	Anfertigung der Schnitte	29
2.5	Färbung der Schnitte	29
2.5.1	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	29
2.5.2	Färbung mit Ki67	30
2.5.3	Färbung mit EGFR	30
2.5.4	Färbung mit vWF	31
2.6	Mikroskopische Beurteilung der Gewebeschnitte	32
2.6.1	Beurteilung der Ki67-Färbung	32
2.6.2	Beurteilung der EGFR-Färbung	33
2.6.3	Beurteilung der vWF-Färbung	33
2.7	Erhebung der klinischen Parameter	34
2.8	Statistische Verfahren	35
2.8.1	Mittelwert, Median, Streuungsmaße	35
2.8.2	Korrelation und Regression	36
2.8.3	Multinominale logistische Regression	37
2.8.4	Kruskal-Wallis-Test	38
2.8.5	Überlebenszeitanalyse	38
2.8.6	Signifikanz	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Das Patientenlientel	40
3.2	Die Auszählungsergebnisse	44
3.3	Korrelationsübersicht mit T-, N-, und UICC-Stadium sowie dem histologischen Grading	47
3.4	Korrelation der drei Marker untereinander	48
3.4.1	Korrelation zwischen Ki67 und EGFR	48
3.4.2	Korrelation zwischen Ki67 und vWF	49
3.4.3	Korrelation zwischen EGFR und vWF	50
3.4.4	Zusammenfassung zur Korrelation der Marker untereinander	51
3.5	Korrelation der Marker mit dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie	51
3.5.1	Korrelation zwischen Ki67 und dem Remissionsgrad	52
3.5.2	Korrelation zwischen EGFR und dem Remissionsgrad	53
3.5.3	Korrelation zwischen vWF und dem Remissionsgrad	54

3.6	Multinominale logistische Regression zum Remissionsgrad nach TPF-Induktionstherapie	55
3.7	Vergleich der Hauptlokalisationen	57
3.7.1	Unterschiede in der Ausprägung von Ki67	57
3.7.2	Unterschiede in der Ausprägung von EGFR	59
3.7.3	Unterschiede in der Ausprägung von vWF	60
3.7.4	Unterschiede der Gruppen für den Remissionsgrad nach TPF-Induktionstherapie	62
3.8	Überlebenszeitanalyse	64
3.8.1	Kaplan-Meier-Funktionen	64
3.8.2	Cox-Regression	72
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1	Zum Patientenkollektiv	75
4.2	Zu den Auswertungsergebnissen	77
4.3	Zur Korrelationsübersicht mit T-, N-, UICC-Stadium sowie dem histologischen Grading	79
4.4	Zur Korrelation und Regression der Marker untereinander	81
4.5	Zur Korrelation der Marker mit dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionstherapie	83
4.6	Über die multinominale logistische Regression zum Remissionsgrad nach TPF-Induktionstherapie	85
4.7	Zum Vergleich der Hauptlokalisationen	87
4.8	Zur Überlebenszeitanalyse	89
4.9	Ausblick	92
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Abstract</b>	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>9.</b>	<b>Quellennachweis</b>	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
a.p.	anterior-posterior
AP	Alkalische Phosphatase
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
C225	Cetuximab
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“),
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR	komplette Remission
CT	Computertomographie
DFS	krankheitsfreies Überleben
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	Lebensqualitätsindex der Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor <i>Receptor</i>
G	histologisches Grading
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma

## VIII

HPV	Humanes Papillomavirus
IgG	Immunglobulin G
ILK	integrin-linked kinase
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MRND	modifiziert radikale Neck dissection
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Stichprobenzahl
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OP	Operation
OS	Gesamtüberleben
pRB	Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PD	progressive Erkrankung
P.D.	Privatdozent
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PF	Chemotherapiekombination aus Platinderivaten und 5-Fluoruracil
PR	partielle Remission
Prof.	Professor
R	Resektionsränderbeurteilung
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SD	stabile Erkrankung
Tab.	Tabelle
Tanis	Tumor and Node Integer Score
TGF-alpha	Transforming growth factor alpha
TNM	Tumor, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen
TPF	Chemotherapiekombination aus Docetaxel, Cisplatin und 5-FU
u.a.	und andere
UICC	Union internationale contre le cancer



USP22	anti-Ubiquitin Specific Peptidase 22
VEGF	vascular endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrandt Faktor
z.B.	zum Beispiel
5-FU	5-Fluoruracil
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter

# 1. Einleitung

## 1.1 Maligne Tumore im Kopf- /Hals-Bereich

### 1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland stehen maligne Tumore im Kopf-/Hals-Bereich an sechster Stelle in der Prävalenz aller Krebserkrankungen und zeigten in letzter Zeit bei den malignen Erkrankungen eine der höchsten Anstiegsraten in der Letalität (Schmelzeisen, 2003). Sie treten gehäuft nach dem vierten Lebensjahrzehnt auf, mit einem Gipfel im sechsten Lebensjahrzehnt (Rudert, 1992). Bislang sind Männer häufiger betroffen als Frauen, auch wenn in den letzten Jahren ein zunehmender Anstieg der Inzidenz bei Frauen beobachtet wurde (Schön et al., 2008). Bis zu 85% dieser Karzinome sind Plattenepithelkarzinome (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC), also maligne Neubildungen epithelialer Zellen (Strutz und Mann, 2010). Sonst kommen verruköse Karzinome, Adenokarzinome, Sarkome, Melanome und Mischtumore aus epithelialen und mesenchymalen Anteilen vor (Fröhlich et al., 1992). Weltweit sind Plattenepithelkarzinome des Kopf-/Hals-Bereiches die fünfthäufigste Tumorart und die sechsthäufigste Ursache krebs-assoziiertes Mortalität (Fremgen et al., 1999). Die Inzidenz für diese Tumore schwankt von 0,1% bis zu 40% zwischen verschiedenen geographischen Lokalisationen (Muir et al., 1988). In Deutschland liegt sie bei ungefähr 12,4% (Casiglia und Woo, 2001). Weltweit erwartet die Weltgesundheitsorganisation in den nächsten Jahrzehnten einen starken Anstieg der Inzidenz (Massano et al., 2006).

### 1.1.2 Pathogenese

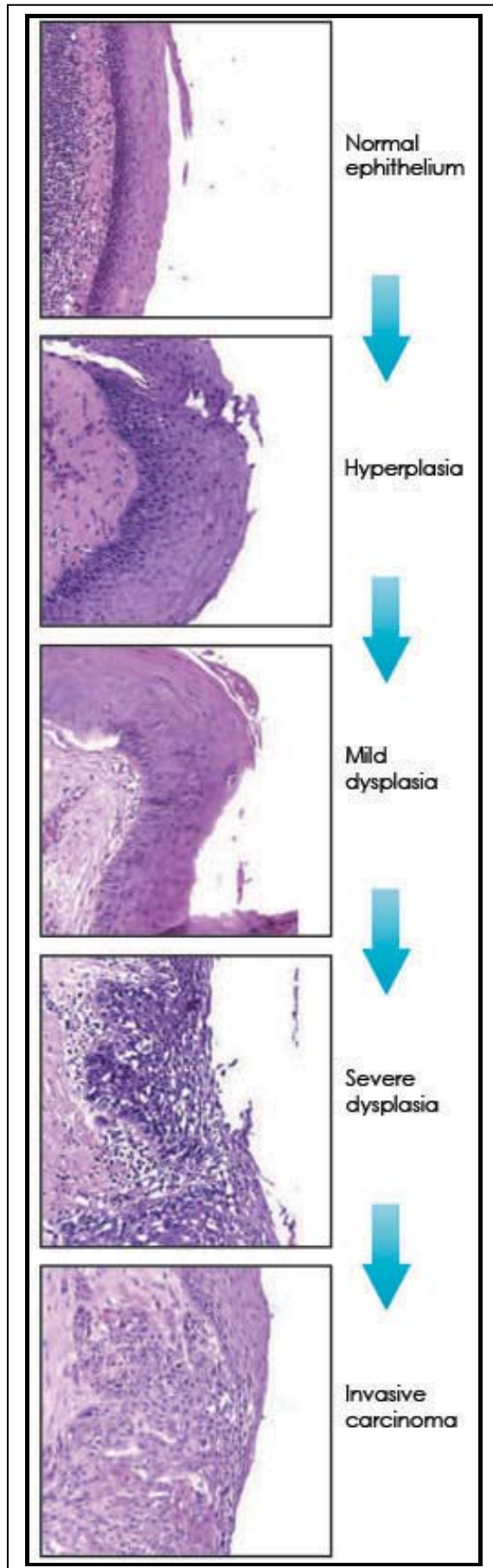
Die Entstehung eines Tumors beginnt mit der Transformation, der Umwandlung einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle (Böcker et al., 2001). Diese läuft in vier Phasen ab und kann mehrere Jahre dauern. Zuerst ändern wachstumsregulatorische Gene ihre Struktur. Dazu kann es z.B. spontan, durch kanzerogene Noxen, durch Onkogene oder durch Schädigung von Kontrollgenen kommen. Diese Phase nennt man Initiationsphase. In der zweiten Phase scheitern zelluläre Reparaturmechanismen bei der Wiederherstellung der physiologischen Wachstumsregulation. In der dritten Phase schaffen es die Abwehrmechanismen nicht die transformierte Zelle zu zerstören. In der letzten Phase, der Promotionsphase, werden die veränderten genetischen

Informationen von der Zelle umgesetzt. Die Bösartigkeit der entarteten Zellen ist dabei durch unkontrollierte Teilung und hohe Proliferationsraten charakterisiert (Löffler und Petrides, 2001). Dadurch entsteht eine verschobene Kern-Plasma-Relation zugunsten der Kerns. Die Mitoserate ist erhöht und es zeigen sich viele atypische Mitosen. Die Zellen sind verstärkt anfärbbar, was man als Hyperchromatismus bezeichnet. Es kommt zu einer Entdifferenzierung, also einem Verlust der ursprünglichen Zellstruktur und der Funktionen des normalen Gewebes. Es zeigt sich ein Polymorphismus, eine Vielgestaltigkeit der Zellen oder eine Zellheterotopie, also ein Vorliegen eines Zelltyps an einer Lokalisation an der er typischerweise nicht vorkommt. Es findet sich ein invasives, infiltrierendes und destruierendes Wachstum mit Durchbruch der Basalmembran und einer Neigung zu Metastasierung und Rezidiven (Cawson und Odell, 2008). Den Übergang von normalem Epithel über Dysplasien zu einem invasiven Karzinom zeigt die Abbildung 1.

**Abbildung 1:**

Die Abbildung zeigt den Verlauf eines normalen Mundschleimhautepithels über Dysplasien zu einem invasiven Karzinom in der HE-Färbung.

Quelle: siehe Quellenverzeichnis



### 1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie der Kopf-/Hals-Tumore ist multifaktoriell. Es werden dabei exogene von endogenen Faktoren unterschieden (Grimm, 1990).

Zu den exogenen Faktoren zählen Alkohol- und Nikotinabusus. Ätiologisch spielen in mindestens 75% der Fälle ein jahrelanger Tabak- und Alkoholkonsum eine entscheidende Rolle, wobei ein synergistischer Effekt dieser beiden Noxen belegt wurde (Argiris und Eng, 2003). Dabei scheint der Alkohol die Permeabilität der Mundschleimhaut für die Kanzerogene des Tabaks zu erhöhen (Rothman und Keller, 1972). Der Konsum von Marihuana (Wenger, 1993) und das Kauen von Betelnüssen (Chen et al., 2008) sind ebenfalls exogene Risikofaktoren. Auch eine berufliche Exposition zu kanzerogenen Stoffen wie Metallstaub und nickelhaltigen Farben und Lacken gehört zu diesen Faktoren (Tisch et al., 1996). Für ein erhöhtes Risiko kann außerdem eine schlechte Mundhygiene mit unzureichendem Sanierungsstatus des Gebisses und chronischen Entzündungen der Mundschleimhaut verantwortlich sein (Cawson und Odell, 2008). Des Weiteren besteht ein Zusammenhang mit Infektionen durch Humane Papillomaviren und Epstein-Barr-Viren (Koch et al., 1995). Humane Papillomaviren, insbesondere die Typen 16 und 18, fördern durch Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53 und pRB die Karzinogenese insbesondere beim Tonsillen- und Oropharynxkarzinom (Agrawal et al., 2008). Auch die Immunsuppression, z.B. im Rahmen der HIV-Erkrankung (Flaitz et al., 1995; Roland et al., 1993) oder nach Organ- (Demetrick et al., 1990) oder Knochenmarkstransplantation (Curtis et al., 1997), gilt als Risikofaktor. Außerdem entstehen Tumore auch aus vorbestehenden präkanzerösen Läsionen wie einer inhomogenen Leukoplakie (Silverman und Gorsky, 1997), einer Erythroplakie (Dunsche und Härle, 2000) und dem oralen Lichen ruber planus (van der Maij et al., 1999).

Zu den endogenen Faktoren zählen das Geschlecht, das Alter und die genetische Determination. Das männliche Geschlecht ist bislang häufiger betroffen (Fries et al., 1979; Platz et al., 1982; Erisen et al., 1996). Die Anzahl an Frauen nimmt aber in den letzten Jahren kontinuierlich zu. Die Tumore sind auch zunehmend häufiger schon vor dem 50. Lebensjahr nachzuweisen, der Altersgipfel liegt jedoch zwischen dem fünften und siebten Lebensjahrzehnt (Fries et al., 1979; El Husseiny et al., 2000). Dabei korreliert das Alter auch mit der Einwirkzeit exogener Noxen. Die endogene Vulnerabilität einen Tumor zu

entwickeln scheint individuell verschieden zu sein (Chen und Meyers, 2000). Eine hereditäre Komponente wird diskutiert (Ankathil et al., 1996). Des Weiteren scheinen verschiedene Genmutationen in der Ätiologie eine wichtige Rolle zu spielen (Koch et al., 1995; Xu et al., 1998; Ibrahim et al., 2003).

#### **1.1.4 Klinik**

Plattenepithelkarzinome des Kopf-/Hals-Bereiches können sich klinisch sehr unterschiedlich zeigen und auch ganz verschiedene Beschwerden verursachen. Von leukoplakischen Veränderungen über erythroplakische Veränderungen bis hin zu ulzerierenden Wunden oder exophytisch wachsenden Tumoren ist jedes Erscheinungsbild möglich (Casiglia und Woo, 2001). Die Beschwerden können beispielsweise Schmerzen, Schwellungen, Ulzerationen, Blutungen, Dysphagie und länger bestehende Heiserkeit sein. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass ein Tumor, der bereits Beschwerden verursacht, sich meist schon in einem fortgeschritteneren Stadium befindet. Nur einer von zehn Tumoren wird durch eine allgemeine Untersuchung oder eine Früherkennungsmaßnahme entdeckt (Mashberg und Samit, 1995). Das frühzeitige Erkennen eines Tumors ist für seine weitere Therapie besonders entscheidend (Macfarlane et al., 1995), aber die Mehrzahl der Patienten kommt erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium und in deutlich reduziertem Allgemein- und Ernährungszustand zur klinischen Vorstellung (Lang et al., 2002). Plattenepithelkarzinome des Kopf-/Hals-Bereiches bilden im Krankheitsverlauf zuerst regionäre Lymphknotenmetastasen. Die Prävalenz wird dabei mit 50-80% angegeben (Kovacs et al., 2007). Welche Lymphknotengruppen befallen sind, wird durch die Lokalisation des Primärtumors beeinflusst (Rudert, 1992). Später können auch hämatogene Fernmetastasen dazukommen. Diese werden in circa 10-20% der Fälle beobachtet und finden sich am häufigsten in der Lunge, der Leber und dem Knochenmark. Außerdem leiden 10-15% der Patienten gleichzeitig unter einem zweiten malignen Tumor (Licciardello et al., 1989).

#### **1.1.5 Diagnostik**

Alle unklaren länger als zwei Wochen bestehenden Mundschleimhaut-Veränderungen sollten histologisch abgeklärt werden (Ehrenfeld und Prein, 2002). Bei kleinen Veränderungen ist eine Exzisionsbiopsie mit 1cm Randabstand möglich (Rudert, 1992). Bei größeren Veränderungen sollte eine

Probibiopsie aus dem Randbereich der Veränderung entnommen werden (Metelmann und Kaduk, 2007). Zytologische Untersuchungen haben eine begrenzte diagnostische Sicherheit und werden deshalb nur noch selten angewandt (Hausamen, 2004).

Ist das Vorliegen eines Tumors histologisch bestätigt sollte ein Staging durchgeführt werden. Bildgebende Verfahren wie zum Beispiel konventionelles Röntgen, CT, MRT, Sonographie, Szintigraphie und PET stehen dabei im Vordergrund. Standardmäßig wird auch auf Lungen-, Knochen- und Lebermetastasen gescreent (Sadick et al., 2012). Deshalb erfolgen in der Regel eine Röntgenuntersuchung des Thorax, eine Skelettszintigraphie und eine Abdomensonographie.

### 1.1.6 TNM- und UICC-Klassifikation

Mit Hilfe mehrerer Parameter wird eine Tumorerkrankung zuverlässig beschrieben. Dazu gehören die topographische Lage des Tumors, seine Größe, der Zustand regionaler Lymphknoten, die Nachweisbarkeit von Fernmetastasen und die Histologie des Tumors. Die TNM-Klassifikation (siehe Tabellen 1-8) nach der Union Internationale Contre le Cancer soll eine möglichst genaue klinische und histopathologische Beschreibung des Tumors ermöglichen. Sie hilft bei der Behandlungsplanung, gibt prognostische Hinweise und erleichtert den Informationsaustausch zwischen Behandlungszentren (Strutz und Mann, 2010). Anhand der Staging-Untersuchungsergebnisse wird die klinische Klassifikation (c) vorgenommen. Die histopathologische Klassifikation (p) wird nach der Tumorresektion anhand der Tumorausdehnung im Präparat gestellt.

#### T-Klassifikation für das Oropharynxkarzinom

T X	Primärtumor nicht beurteilbar
T 0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T is	Carcinoma in situ
T 1	Tumor kleiner 2cm
T 2	Tumor zwischen 2 und 4cm
T 3	Tumor größer 4cm oder Tumorausbreitung auf linguale Fläche der Epiglottis
T 4a	Tumor infiltriert Larynx, äußere Muskulatur der Zunge, Lamina med. Proc. pterygoideus, harter Gaumen, Unterkiefer
T 4b	Tumor infiltriert M. pterygoideus lat., Lamina lat. Proc. pterygoideus, Schädelbasis, tumoröse Ummauerung A. carotis interna

### T-Klassifikation für das Hypopharynxkarzinom

T 1	Tumor kleiner 2cm und auf einen Unterbezirk begrenzt
T 2	Tumor zwischen 2 und 4cm oder Invasion eines angrenzenden Bezirks
T 3	Tumor größer 4cm oder Fixation des Hemilarynx.
T 4a	Tumor infiltriert Schild-, Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Halsweichteile
T 4b	Tumor infiltriert den paravertebralen Raum, umgibt die A. carotis oder infiltriert mediastinale Strukturen

### T-Klassifikation für das supraglottische Larynxkarzinom

T 1	Tumor auf eine Stelle begrenzt, die Stimmbänder normal beweglich
T 2	Tumor infiltriert Mukosa von mehr als einer Stelle der Supraglottis, der Glottis oder einer Region außerhalb der Supraglottis (z.B. Mukosa des Zungengrundes, der Vallecula, der medialen Wand des Sinus piriformis), Larynx in seiner Beweglichkeit uneingeschränkt
T 3	Tumor ist auf Larynx begrenzt mit Stimmbandfixation und/oder invadiert den paraglottischen Raum und/oder es bestehen kleine Erosionen des Schildknorpels (z.B. der inneren Rinde)
T 4a	Tumor durchbricht den Schildknorpel und/oder infiltriert Gewebe außerhalb des Kehlkopfes (z.B. Trachea, Weichgewebe des Halses, einschließlich des tiefen glatten Muskels der Zunge, quergestreifte Muskulatur, die Schilddrüse oder den Ösophagus)
T 4b	Tumor infiltriert den paravertebralen Raum, umgibt die A. carotis oder infiltriert mediastinale Strukturen

### T-Klassifikation für Glottistumoren

T 1a	Tumor auf ein Stimmband begrenzt (vordere oder hintere Kommissur kann mitbetroffen sein), normale Beweglichkeit der Stimmbänder
T 1b	Tumor auf beide Stimmbänder begrenzt (vordere oder hintere Kommissur kann mitbetroffen sein), normale Beweglichkeit der Stimmbänder
T 2	Tumor erstreckt sich auf die Supraglottis und/oder die Infraglottis und/oder die Stimmbandbeweglichkeit ist herabgesetzt
T 3 und T 4	siehe oben

### T-Klassifikation für das subglottische Larynxkarzinom

T 1	Tumor auf Subglottis beschränkt
T 2	Tumor erstreckt sich auf die Stimmbänder mit normaler oder herabgesetzter Stimmbandbeweglichkeit
T 3 und T 4	siehe oben

## N-Klassifikation für Kopf-/Hals-Tumoren allgemein

N X	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N 0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N 1	Lymphknotenmetastase kleiner 3cm, solitär, ipsilateral
N 2a	Lymphknotenmetastase 3–6cm, solitärer Knoten, ipsilateral
N 2b	Lymphknotenmetastasen 3–6cm, multiple Knoten, ipsilateral
N 2c	Lymphknotenmetastasen 3–6 cm, bilateral oder kontralateral
N 3	Lymphknotenmetastase größer 6 cm

## M-Klassifikation für Kopf-/Hals-Tumoren allgemein

M X	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M 0	Keine Fernmetastasen
M 1	Fernmetastasen vorhanden

## UICC-Klassifikation

Stadium 0	T cis	N 0	M 0				
Stadium I	T 1	N 0	M 0				
Stadium II	T 2	N 0	M 0				
Stadium III	T 1-2	N 1	M 0	Oder	T 3	N 0-1	M 0
Stadium IV A	T 1-3	N 2	M 0	Oder	T 4a	N 0-2	M 0
Stadium IV B	T 4b	Jedes N	M 0	oder	jedes T	N 3	M 0
Stadium V	jedes T	Jedes N	M 1				

**Tabelle 1-8:** Es werden das TNM-System für die unterschiedlichen Tumorlokalisationen sowie die UICC-Klassifikation dargestellt.

### 1.1.7 Histologisches Grading

Um das Wachstumsverhalten und die Aggressivität eines malignen Tumors auf histologischer Ebene beschreiben zu können, wurde ein histologisches Grading eingeführt (siehe Tab. 9). Beurteilungsgrundlagen sind Zellreichtum, Mitoserate, Zellpleomorphie, Vorliegen von Nekrosen und Verhältnis von Zellen zu Interzellulärschubstanz innerhalb des Tumorgewebes (Cawson und Odell, 2008). Ein Problem des Tumorgradings ist die Tatsache, dass innerhalb eines Tumors Areale unterschiedlichen Wachstumsverhaltens und somit unterschiedlichen Differenzierungsgrades vorkommen können (Strutz und Mann, 2010).

GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G1	Tumor gut differenziert
G2	Tumor mäßig differenziert
G3	Tumor gering differenziert
G4	Tumor entdifferenziert, anaplastisch

**Tabelle 9:** Einteilung des histologischen Gradings.



## **1.2 Therapie der malignen Tumore im Kopf-/Halsbereich**

Die Auswahl der Therapiemodalitäten ist abhängig vom Allgemeinzustand und der Lebensqualität des Patienten, zu deren objektiven Einschätzung der ECOG und der Karnofsky-Index verwendet werden. Die vier wesentlichen Säulen sind dabei die chirurgische Therapie, die Radiatio, die Chemotherapie und die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen EGFR. Diese vier Optionen können einzeln oder kombiniert zum Einsatz kommen. Außerdem gibt es noch moderne Therapieansätze, bei denen die Tumorzellproliferation und Tumorangiogenese gehemmt werden sollen (Gellrich und Zizelmann, 2004). Bei der Wahl entscheidend sind die Größe des Primärtumors, die Resektabilität, der Lymphknotenbefall, der histologische Differenzierungsgrad, die Tumorlokalisation und das Vorliegen von Fernmetastasen (Sadick et al., 2012). Es kann zwischen einem kurativen und einem palliativen Therapieansatz unterschieden werden. Ab dem Tumorstadium T2 sollte ein multimodales Therapiekonzept gewählt werden (Schultze et al., 2006). Trotz verfeinerter Therapien und des zunehmenden Einsatzes multimodaler Therapieansätze konnte in den letzten Jahren keine signifikante Verbesserung der klinischen Prognose für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches erzielt werden (Forastiere et al., 2001; Lang et al., 2002). Nach erfolgter Therapie sollten die Patienten an einem engmaschigen Nachuntersuchungsprogramm teilnehmen, in dessen Rahmen lokale Tumorrezidive, Zweittumoren sowie Fernmetastasen möglichst frühzeitig entdeckt werden können, so dass sinnvoll therapeutisch interveniert werden kann (Sadick et al., 2012).

### **1.2.1 Chirurgische Therapie**

Die chirurgische Therapie ist nach wie vor die Standardtherapie bei Kopf-/Hals-Tumoren. Es wird eine En-bloc-Resektion des Tumors mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1cm und eine Entfernung der regionären Lymphknoten angestrebt (Hausamen, 2004). Eine gute Ergänzung zur klassischen Schnittresektion stellt gerade bei kleineren Tumoren der CO<sub>2</sub>-Laser dar (Outzen und Illum, 1995). Dank moderner Operationstechniken mit rekonstruktiven Verfahren und dem selektiven Einsatz des Lasers gelang es, die postoperative Funktionalität zu verbessern und die Rate der therapiebezogenen Morbidität zu reduzieren (Strutz und Mann, 2010). So ist es

zum Teil auch bei fortgeschrittenen Tumorstadien möglich eine komplette Resektion durchzuführen und trotzdem eine zufriedenstellende Funktion zu erhalten. Häufig ist der Funktionserhalt jedoch nicht machbar. Eine komplette Resektion gestaltet sich umso schwieriger, je größer der Tumor ist. Prognostisch wichtig ist die pathologische Beurteilung der Resektionsränder nach der Tumorresektion (siehe Tabelle 10).

R0	Resektionsrand ist tumorfrei.
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor am Resektionsrand.
R2	Makroskopisch nachgewiesener Residualtumor am Resektionsrand.
R2a	Mikroskopisch bestätigt.
R2b	Mikroskopisch nicht bestätigt.

**Tabelle 10:** Die Tabelle zeigt die Einteilung der pathologischen Beurteilung der Resektionsränder nach chirurgischer Tumorentfernung.

Eine Neck dissection wird bei klinischen Hinweisen auf zervikale Lymphknotenbeteiligung durchgeführt (Ord und Blanchaert, 2001). Bei der Neck dissection unterscheidet man verschiedene Varianten. Bei der klassisch radikalen Neck dissection nach Crile werden die Level I-V mit dem Musculus sternocleidomastoideus, der Vena jugularis externa und dem Nervus accessorius ausgeräumt (Crile, 1906). Funktionelle Einschränkungen mit Schmerzen im kompletten Schultergürtel sind oft die Folge, die Mitte des letzten Jahrhunderts als das „Shoulder Syndrome“ beschrieben wurden (Nahum et al., 1961). Heute wird die konservative bzw. funktionelle Neck dissection nach Bocca favorisiert. Dabei werden die Level I-V ausgeräumt, während der Nervus accessorius, die Vena jugularis und der Musculus sternocleidomastoideus erhalten bleiben. Diese Modifikationen werden heute zunehmend angewandt, da sie bei gleicher onkologischer Sicherheit funktionell und ästhetisch bessere Ergebnisse erzielen (Bocca et al., 1984). Hinsichtlich der Überlebensraten waren zwischen den beiden Methoden keine signifikanten Unterschiede ersichtlich (Bier et al., 1992 und 1993). Die suprahyoidale Neck dissection beinhaltet die Entfernung aller Lymphknoten und des Fettgewebes aus dem submandibulären Dreieck.

Ob eine ein- oder beidseitige Neck-Dissektion notwendig ist, hängt von der Lokalisation des Primärtumors, des dortigen Lymphabflusses und von bereits

vorhandenen Lymphknotenmetastasen ab. Das Vorgehen bei Patienten, bei denen im Rahmen des Stagings keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar sind, ist nach wie vor umstritten. Bei der Inzidenz von circa 20-40% okkulten Lymphknotenmetastasen in allen T-Stadien (Giacomarra et al., 1999) wird von einem abwartenden Verhalten abgeraten (Hausamen, 2004). Bisher gibt es allerdings keine einheitliche Strategie, sondern radikalere und schonendere Konzepte. Bei der selektiven Neck dissection werden in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors nur die Levels mit der größten Wahrscheinlichkeit auf eine Beteiligung ausgeräumt. Umstritten ist das Sentinel-Lymph-Node-Konzept, bei dem eine Neck dissection nur durchgeführt wird, wenn der sogenannte Wächterlymphknoten, der erste Lymphknoten des Abflussgebietes des Tumors, Tumorzellen enthält (Werner et al., 2002).

### **1.2.2 Folgen der radikalen chirurgischen Therapie**

Kaum eine andere Krebserkrankung ist in ihren Folgen so offensichtlich und deswegen für die Betroffenen so schwer zu akzeptieren wie eine Krebserkrankung im Mund-, Kiefer- Gesichts- oder Halsbereich. Die Betroffenen sind häufig deutlich entstellt und schweren funktionellen wie auch psychischen Belastungen ausgesetzt (Noonan und Hegarty, 2010). Wurde der Kehlkopf entfernt, bleibt auf Dauer ein Tracheostoma zurück. Da jetzt das Atmen durch die Nase nicht mehr möglich ist, trocknen die Schleimhaut der Nase und des Mundes aus. Der Verlust der gewohnten Stimme wiegt bei dieser Erkrankung besonders schwer. Das Empfinden, nicht mehr man selbst zu sein, führt oft dazu, dass sich viele Patienten zurückziehen und isolieren. Viele leiden unter Depressionen oder Stimmungsschwankungen (Bussian et al., 2010). Die Patienten müssen sich damit abfinden, dass beim Atmen, Schlucken, Sprechen und Essen besondere Maßnahmen notwendig werden. Auch beim Rasieren, Duschen oder Baden muss auf das Tracheostoma geachtet werden, das außerdem selbst besonderer Pflege bedarf. Die Patienten empfinden ihre Lebensqualität als eingeschränkt (Braz et al., 2005).

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten mit einer totalen und einer partiellen Laryngektomie zwar die gleichen Probleme haben, diese aber bei Patienten mit einer totalen Laryngektomie doch stärker ausgeprägt sind (Bussian et al., 2010; Braz et al., 2005). Die Radikalität von

Operationen zu senken und somit die Funktion zu erhalten, ist also ein anzustrebender Schritt in der Tumorchirurgie.

### **1.2.3 Radiotherapie**

Die Radiotherapie kann bei Kopf-/Hals-Tumoren sowohl kurativ als auch palliativ eingesetzt werden. Meist ist sie Bestandteil multimodaler Therapiekonzepte. Die Wirkung beruht auf einer Interaktion der Strahlung mit der Zell-DNS zum einen durch die Strahlung direkt, zum anderen größeren Teil durch die Bildung von freien Sauerstoffradikalen, so dass es zu einer Störung des Zellzyklus und zur Apoptose kommen kann (Hall, 2000). Man unterscheidet die adjuvante, die neoadjuvante und die primäre (definitive) Radiotherapie.

Bisher ist eine adjuvante, also postoperative Bestrahlung bei Vorliegen einer Halslymphknotenmetastase oder bei größerer Tumorausdehnung indiziert (Langendijk et al., 2010). In diesen Fällen wird so die lokale Tumorkontrolle und das Gesamtüberleben verbessert (Bernier et al., 2004; Corvo, 2007; Lavaf et al., 2008). Die Strahlentherapie wird konventionell, hyperfraktioniert und akzeleriert eingesetzt mit einer Gesamtzieldosis von 72 Gy (Strutz und Mann, 2010).

Beim neoadjuvanten Therapiekonzept geht die Bestrahlung meist in Kombination mit einer Chemotherapie der radikalen Tumoresektion voraus. Dieses Vorgehen gilt als aggressiver, nebenwirkungsreicher und belastender für den Patienten, erzielt aber bessere Überlebensraten als die anderen Konzepte (Mohr et al., 1994). Die Vorteile liegen vor allen Dingen im minimierten Risiko von Implantationsmetastasen während der Operation (Klug et al., 2005) und den höheren Raten an R0-Resektionen (Eich et al., 2008).

Ist der Tumor soweit fortgeschritten, dass eine Resektion zu entstellend ist bzw. nicht mehr ausreichend im Gesunden durchgeführt werden kann, so ist eine primäre akzelerierte und hyperfaktionierte Bestrahlung ggf. im Kombination mit einer Chemotherapie indiziert (Forastiere et al., 2003). Auch Grunderkrankungen, die das OP-Risiko unverträglich machen, hohes Alter, schlechter Allgemeinzustand und der Patientenwunsch können Indikationen für eine definitive Bestrahlung sein (Corvo, 2007).

Bei der Bestrahlung kommt es immer auch zu Schäden am gesunden Gewebe. Häufigste Komplikationen sind Erytheme, Radiodermatitis, Mukositis, Xerostomie, Geschmacksstörungen, Ulzerationen der Schleimhaut, bis hin zum

freiliegenden Kieferknochen und Osteoradionekrose (Eich et al., 2008). Die Lebensqualität kann durch die Folgen von akuter und chronischer Toxizität reduziert sein. Durch Intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT), Protonenstrahlentherapie und alternative Fraktionierungsschemata soll eine Verringerung dieser Toxizität erzielt werden, in dem eine Dosiserhöhung im Zielvolumen und eine Dosisreduktion im gesunden umgebenden Gewebe angestrebt wird (Mandapathil et al., 2009).

#### **1.2.4 Chemotherapie**

Während lange Zeit die operative Therapie und die darauf folgende Bestrahlung als Goldstandard der Therapieoptionen galt, ist seit einigen Jahren eine Verbesserung der Heilung durch die kombinierte simultane Radio-Chemotherapie zu verzeichnen. Aktuell wird eine Chemotherapie als Option zur Behandlung des HNSCC meist in Ergänzung zur Strahlentherapie simultan oder sequentiell angewendet. Eine simultan kombinierte Radiochemotherapie zeigt einen Überlebensvorteil und eine höhere lokoregionäre Tumorfreiheit gegenüber alleiniger Radiotherapie und Radiochemotherapie im sequentiellen Setting (Budach, 2000). Die Chemotherapie als alleinige Therapieoption spielt bisher eher eine palliative Rolle.

Als Zytostatika bewähren sich zum Beispiel Mitomycin oder Cisplatin bzw. Carboplatin, jeweils kombiniert mit 5-Fluoruracil (=5-FU) (Zackrisson et al., 2003). Auch die Substanzklasse der Taxane gewinnt zunehmend an Bedeutung (Eckhardt et al., 2006). Die systemisch wirksame Chemotherapie führt zur Verstärkung der Wirkung der Radiatio, in dem das Tumorgewebe für die Strahlenwirkung sensibilisiert wird, dadurch dass die Tumorzellen in den strahlensensiblen Zellzyklusphasen verharren (Bernier, 2009).

Seit der Funktionserhalt mehr in den Fokus des Interesses gerückt ist, wird die Option eines kurativen Chemotherapieansatzes zunehmend interessanter. Eigentlich gilt der Grundsatz, dass resektable Tumore primär einer operativen Therapie zugeführt werden sollen. Allerdings zeigte eine Studie bei einer Patientenpopulation mit resektablen Tumoren, dass es keinen Überlebensunterschied gab zwischen einem primär chirurgischen Ansatz und einer primären Radiochemotherapie mit nachfolgender organerhaltender Operation (Forastiere et al., 2003). Ein kurativer Ansatz mit einer kombinierten

Cisplatin-basierten Radiochemotherapie kann als alternative Therapiemethode diskutiert werden.

Auf die TPF-Induktionstherapie wird im nächsten Kapitel noch ausführlicher eingegangen.

### **1.2.5 Therapie mit EGFR-Inhibitoren**

Zunehmend gewinnen neue molekularbiologische Therapieansätze an Bedeutung. So wurde Cetuximab (C225), ein monoklonaler Antikörper gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (epidermal growth factor receptor=EGFR), 2006 in Verbindung mit einer Strahlentherapie und 2008 in Kombination mit einer Chemotherapie zur Behandlung lokal fortgeschrittener Kopf-/Hals-Karzinome in Deutschland zugelassen.

Die Überexpression von EGFR auf HNSCC Zelllinien wurde erstmals von Cohen nachgewiesen (Cohen et al., 1980). Sie geht einher mit erhöhtem Wachstum, Invasionskapazität, Metastasierung und Neoangiogenese und ist also prognostisch ungünstig, wie erstmals Grandis und Twardy definierten (Grandis und Twardy, 1993). Eine Wachstumshemmung des Tumors ist durch EGFR-Inhibition zu erzielen.

Die Zulassung von Cetuximab in Kombination mit einer Strahlentherapie basierte auf Ergebnissen einer Phase-III-Studie von Bonner et al., bei der eine verlängerte mediane Überlebenszeit um ca. 20 Monate und eine signifikante Verbesserung der lokoregionären Tumorkontrolle nach 2 Jahren im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie nachgewiesen wurde. Die postradiogenen Nebenwirkungen wurden dabei im Vergleich zu einer kombinierten konventionellen Radiochemotherapie nicht signifikant verstärkt (Bonner et al., 2006).

Die Zulassung von Cetuximab in Kombination mit platin-basierter Chemotherapie plus 5-FU basierte auf der internationalen, randomisierten Extreme-Studie, bei der eine 3-monatige mediane Gesamtüberlebenszeitverlängerung, eine Reduktion des relativen Sterbens um 20%, eine 70%-ige Verlängerung des medianen progressionsfreien Überlebens und eine 80%-ige relative Erhöhung der Ansprechrate im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie nachgewiesen werden konnte (Vermorken, Mesia et al., 2007).

Weitere erfolgsversprechende immuntherapeutische Ansätze sind die Applikation von Zytokinen (Hadden et al., 2007; van Herpen et al., 2008) und Verfahren, die auf dem Einsatz dendritischer Zellen basieren (Whiteside, 2007; Shurin et al., 2005). Diese Therapieformen versuchen eine Immunreaktion gegen die Tumorzellen auszulösen oder diese zu verstärken.

### **1.2.6 Genterapie**

Bei der Genterapie wird genetisches Material entweder direkt in die Krebszellen eingebracht, umso einen zytotoxischen Effekt zu erzielen, oder indirekt in gesunde Zellen in der Umgebung des Tumors, um das körpereigene Immunsystem gezielt gegen die Tumorzellen zu aktivieren. Diese in Deutschland und Europa bisher noch experimentellen Therapieansätze scheinen für HNSCC geeignet zu sein, da bei diesen Tumoren meist eine gute Zugänglichkeit für die notwendigen Injektionen besteht und eine Verbesserung von lokoregionären Rezidiven bewirkt werden kann, die ein häufiges Problem bei HNSCC sind (Mandapathil et al., 2009).

Ein Konzept zielt dabei auf das Tumorsuppressorgen p53, welches in 40-60% der HNSCC-Fälle mutiert ist. p53 ist ein zentrales Protein der Zellzykluskontrolle und Mutationen führen zur unkontrollierten Vervielfachung der genetisch beschädigten Zellen und gehen mit einer signifikanten Verschlechterung der Prognose einher (Koch et al., 1996). In präklinischen Studien wurden durch den genterapeutischen Ersatz von mutiertem p53 ein reduziertes Wachstum von HNSCC und eine erhöhte Radiochemosensitivität erreicht (Liu et al., 1994). Der klinische Einsatz von Advexin, einem modifizierten p53-kodierenden Adenovirus, erbrachte einen antineoplastischen Effekt bei geringer Toxizität (Edelman und Nemunaitis, 2003; Nemunaitis, 2008). Gendicine, ein replikationsdefizienter adenoviraler Vektor, der für das humane Wildtyp-p53 kodiert, ist in China seit 2004 für die Therapie des HNSCC im Einsatz, nachdem in einer Studie mit 120 Patienten die Kombinationstherapie von Bestrahlung mit Gendicine etwa dreimal so häufig eine komplette Tumorregression im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie erbrachte (Peng, 2005).

## **1.3 TPF-Induktionschemotherapie**

### **1.3.1 Zusammensetzung der TPF-Induktionschemotherapie**

Die heute verwendeten Chemotherapien sind zumeist Kombinationschemotherapien, bei denen jedes in der Kombination enthaltene Zytostatikum auch als Einzelsubstanz bei dem zu behandelnden Tumor wirksam sein muss (Bruhn et al., 2003). Der Vorteil der Kombinationschemotherapie ist darin zu sehen, dass durch die Kombination mehrerer Zytostatika Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen geschädigt werden können und im Vergleich zur Monotherapie toxische Bereiche gemieden und eine Resistenzentwicklung gegenüber den einzelnen Präparaten hinausgezögert werden kann (Bruhn et al., 2003). Eingesetzt werden bei Kopf-/Hals-Tumoren Cisplatin und Carboplatin, Taxane, Methotrexat, Mitomycin sowie 5-Fluoruracil (Bruhn et al., 2003). Als besonders effektiv wird das Dreier-Regime aus Cisplatin, 5-Fluoruracil und Docetaxel, also das TPF-Regime, eingestuft (Calais, 2010).

#### **Cisplatin**

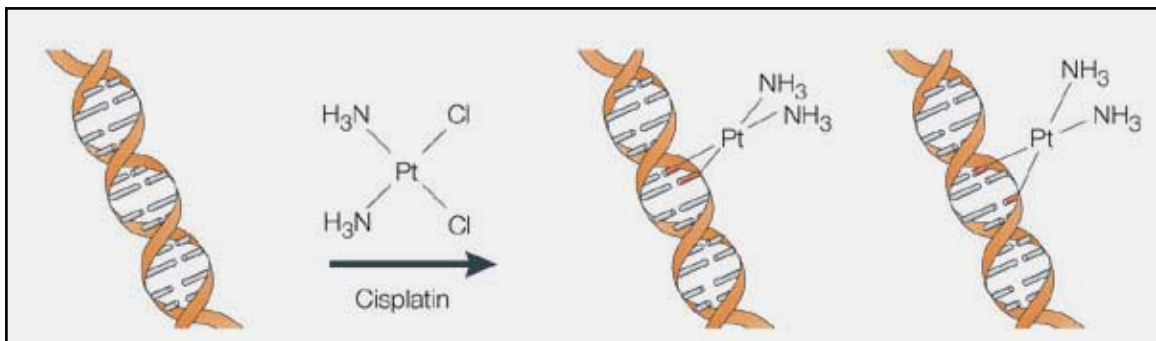
Platin-Verbindungen enthalten ein komplexgebundenes Platinatom und gehören zu den alkylierenden Substanzen, da sie über eine kovalente Bindung nukleophile Gruppen intrazellulärer Moleküle alkylieren (Bruhn et al., 2003). Der zytostatische Wirkungsmechanismus beruht auf einer chemisch induzierten Beeinträchtigung der Funktion von Nukleinsäuren und Proteinen, bei der die DNS-Replikation durch Querverknüpfungen zwischen den beiden DNS-Strängen unmöglich wird. Dieser Mechanismus ist in der Abbildung 2 dargestellt. Der Zellstoffwechsel kommt zum Erliegen und die Zelle leitet die Apoptose ein (Wang und Lippard, 2005).

Wie andere Zytostatika auch wirken die Platinverbindungen daher nicht nur auf schnell wachsende Tumorzellen, sondern in gewissem Grad auch auf gesunde Körperzellen. Cisplatin gehört zu den Zytostatika, die am häufigsten zu Übelkeit, Erbrechen und Durchfall führen. Des Weiteren wurden Nephrotoxizität, Hörschäden in den höheren Frequenzen, periphere Neuropathie mit Parästhesien, Krämpfen und Verlust motorischer Funktionen und Knochenmarksuppression beobachtet (Bruhn et al., 2003). Carboplatin hat im Vergleich mit Cisplatin eine geringere Ototoxizität und Nephrotoxizität und verursacht seltener gastrointestinale Nebenwirkungen (Lokich und Anderson,



1998). Cisplatin zeigte allerdings in einer Studie zum Kieferhöhlenkarzinom mit neoadjuvanter Radiochemotherapie das bessere Ansprechen im Vergleich zu Carboplatin (Kreppel et al., 2012).

Die Platin-Komplex-Bildner Cisplatin und Carboplatin gehören zu den wirksamsten Chemotherapeutika beim HNSCC und werden als Standardregime in Kombination mit anderen Zytostatika oder Bestrahlung verwendet (Pan et al., 2009). Bisher sind Platin-basierte Therapieansätze solchen ohne Platinderivate überlegen (Pignon et al., 2000 und 2005).

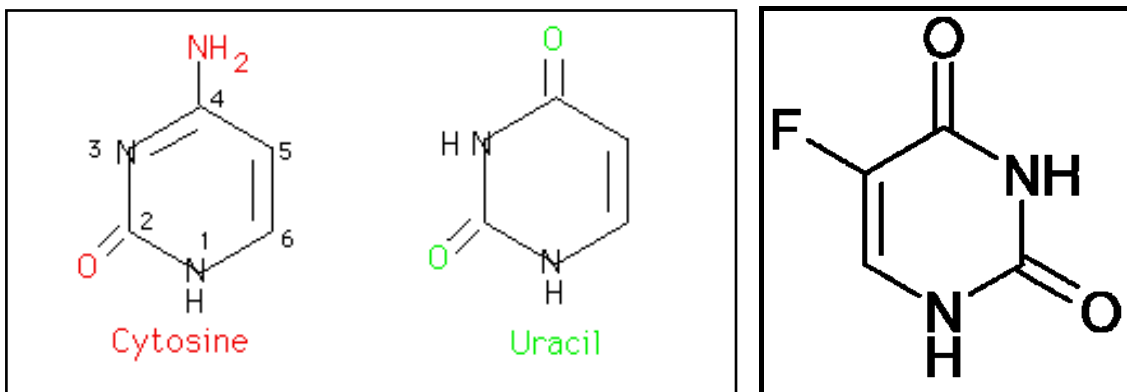


**Abbildung 2:** Die Abbildung zeigt die Strukturformel von Cisplatin und seine Wirkung auf die DNS.

Quelle: siehe Quellenverzeichnis

### 5-Fluoruracil (5-FU)

5-Fluoruracil gehört zur Gruppe der Antimetabolite. Als Pyrimidin-Analogon hat es Strukturähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin und Uracil (Bruhn et al., 2003), siehe Abbildung 3.



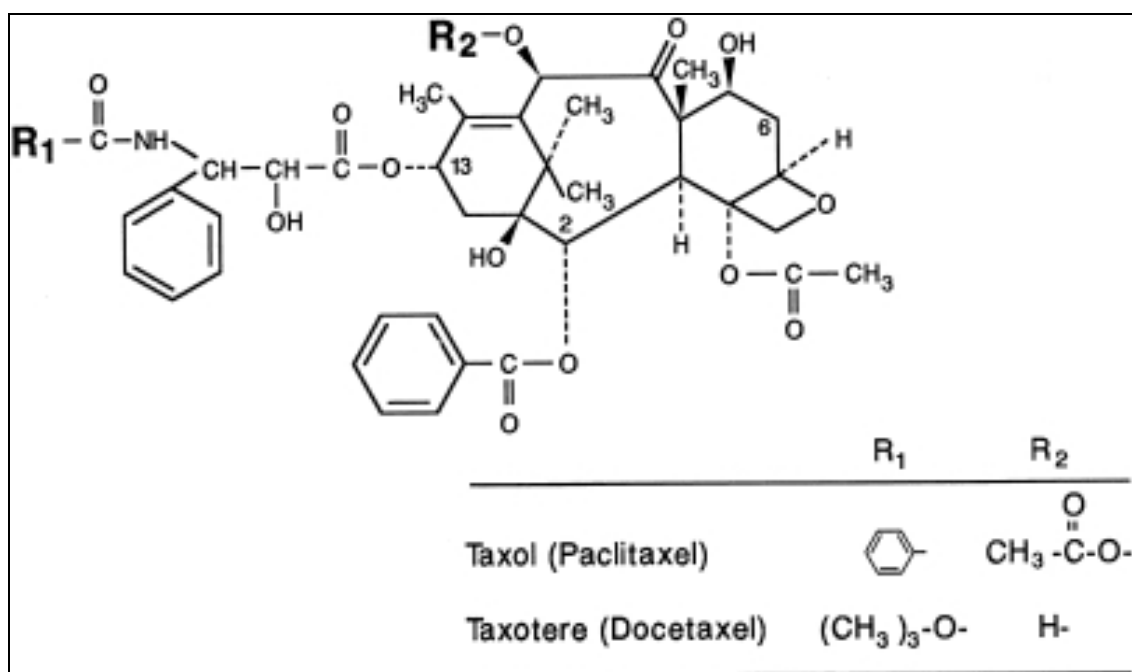
**Abbildung 3:** Die Abbildung zeigt links die Strukturformeln der Pyrimidine Cytosin und Uracil und im Vergleich dazu rechts die sehr ähnliche Strukturformel von 5-FU.

Quelle: siehe Quellenverzeichnis

Als Prodrug muss 5-FU erst in aktive Metabolite umgewandelt werden, um zytostatisch wirken zu können (Parker und Stivers, 2011). Bei der Zellteilung wird es anstelle der eigentlichen Nukleotide in die DNS bzw. RNS eingebaut, die dadurch funktionsunfähig sind. Außerdem hemmt 5-FU die Thymidylat-Synthase und somit die Methylierung der Deoxyuridyl-Säure zu Thymidyl-Säure, die für die Bereitstellung der Pyrimidine bei der DNS-Synthese notwendig ist (Parker und Stivers, 2011). Die Nebenwirkungen können von Übelkeit, Erbrechen, Schleimhautentzündungen, Knochenmarkschädigung bishin zu Gehirnschäden durch Schädigung von Gliazellen reichen (Advani und Fakih, 2011). Durch die zusätzliche Gabe von Tetrahydrofolsäure bzw. Folsäure (Rustum et al., 1998) bzw. Interferon- $\alpha$  (Miura et al., 2010) wird eine Wirkungsverstärkung bewirkt. Der Abbau von 5-FU geschieht über das Enzym Dihydropyrimidinehydrogenase (Ciccolini, et al., 2010).

### Docetaxel

Docetaxel ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Taxane, welches semisynthetisch aus der Europäischen Eibe gewonnen wird (Bast et al., 2000).



**Abbildung 4:** Die Abbildung zeigt die Strukturformeln von Docetaxel und Paclitaxel.  
Quelle: siehe Quellenverzeichnis

Die zytostatische Wirkung von Docetaxel beruht auf seiner Bindung an den Mikrotubuli-Apparat, wodurch es zur Stabilisierung der Mikrotubuli und zur Blockierung der Mitose der Zelle kommt (Christiansen et al., 2006). Docetaxel wird hepatisch metabolisiert und erfordert bei erhöhten Transaminasen eine Dosisanpassung (Minami et al., 2009). Hauptnebenwirkungen sind eine Neuropathie, Blutbildungsstörungen und Leberfunktionsstörungen (Geney et al., 2005). Es kann auch zu Resistenzen kommen, weshalb schon an einer zweiten Generation von Taxanen gearbeitet wird, zu denen zum Beispiel Ortataxal gehört (Geney et al., 2005). Zusätzliche Blockierung von EGFR führt zu erhöhter Toxizität von Docetaxel bei HNSCC (Choe et al., 2007).

### **1.3.2 Bisherige Ergebnisse der TPF-Induktionschemotherapie**

Bei primär nicht resektablen Kopf-/Hals-Tumoren wurde in den letzten Jahren auch die Wertigkeit von Induktionschemotherapien nachgewiesen. Eine Metaanalyse belegte, dass eine neoadjuvante Induktionschemotherapie mit Cisplatin und 5-FU (PF) zu einer signifikanten Reduktion von Fernmetastasen bei HNSCC führte. Eine Verbesserung des Überlebens selbst konnte jedoch nicht belegt werden (Pignon et al., 2000). Die Studien TAX 323 in Europa und TAX 324 in den USA zeigten an 501 Patienten mit lokal fortgeschrittenem HNSCC, dass bei einer Induktionstherapie mit einer Dreifachkombination von Docetaxel, Cisplatin und 5-FU (TPF) im Vergleich zu Therapiekonzepten mit einer Kombination von Cisplatin und 5-FU alleine (PF) eine mehr als zweifach gesteigerte mediane Überlebensdauer (70,6 vs. 30,1 Monate) erreicht werden konnte. Dies bedeutet eine Reduktion des relativen Sterberisikos um 30%. Des Weiteren wurden sowohl ein signifikant reduzierter lokaler Tumorprogress als auch eine Reduktion von Fernmetastasen beobachtet (Posner et al., 2007 und 2009). Allerdings enthielt die Studienpopulation circa 60% primär operable Patienten. In der TAX 323-Studie konnte bei inoperablen Patienten gezeigt werden, dass durch das TPF-Regime im Vergleich zur PF-Therapie eine signifikante Verlängerung des mittleren Überlebens in etwas geringerem Maße (18,6 vs. 14,6 Monate,  $p \leq 0,005$ ) erzielt wurde (Vermorken, Remenar et al., 2007). Zusammenfassend lebten Patienten mit lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Hals-Bereich, die im Rahmen dieser Studien eine neue Kombination mit Docetaxel, Cisplatin, 5-FU (TPF) erhalten hatten, signifikant länger bei signifikant besserer Lebensqualität als Patienten, die mit

dem alten Standard Cisplatin und 5-FU (PF) behandelt wurden. Auch in der TAX 324-Studie zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben, progressionsfreies Überleben und Larynektomie-freies-Überleben (Posner et al., 2011). Der Einsatz von Docetaxel in progredienten Kopf-/Hals-Tumoren eröffnet neue Therapieoptionen in der onkologischen Therapie. Hierdurch könnte es ermöglicht werden zunächst inoperable Tumoren in ein operables Stadium zu reduzieren.

In einer Metaanalyse wurden die Daten mehrerer randomisierter kontrollierter Studien ausgewertet, die TPF-Induktionschemotherapie versus PF-Induktionschemotherapie sowie PF-Induktionschemotherapie versus keine Induktionstherapie untersuchten. Daraus wurde mittels statistischer Analyse ein indirekter Vergleich erstellt. Es zeigte sich eine Überlegenheit der TPF-Induktionschemotherapie bezüglich des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens gegenüber keiner Induktionschemotherapie (Hitt et al., 2008).

Lohnenswert scheint der Einsatz einer Induktionschemotherapie vor allem bei angestrebtem Organerhalt oder grenzwertig resektablen Befunden. Allerdings muss nach einer Induktionschemotherapie mit Veränderungen des Gewebes gerechnet werden, die eine eventuell nachfolgende Operation erschweren können. Zudem müssen dann die Resektionsgrenzen im Verlauf der vor Therapiebeginn bestehenden Tumorausdehnung beachtet werden (Mandapathil et al., 2009).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass wenn Patienten für eine Induktionschemotherapie in Frage kommen, diese mit der Dreierkombination TPF durchgeführt werden sollte, da sich hinsichtlich des Überlebens Vorteile zeigen und die Komplikationen gleichwertig sind (Baghi et al., 2006; Lorch et al., 2011).

## 1.4 Prognosefaktoren bei malignen Kopf-/Hals-Tumoren

Bei HNSCC gibt es ganz verschiedene prognostische Faktoren. Einer der wichtigsten ist die komplette chirurgische Entfernbarkeit des Tumors (Wennerberg, 1996; Shingaki et al., 2002). Die Patienten sind häufig multimorbide, so dass ihre Prognose durch zusätzliche Krankheiten wie Herz-/Gefäßschäden oder Lungen- und Leberkrankheiten eingeschränkt ist (Strutz und Mann, 2010). Einen weiteren prognostischen Anhalt gibt das oben erläuterte UICC-Stadium, das sich aus der TNM-Klassifikation ergibt (Kreppel et al., 2010 und 2011a). Außerdem gibt es verschiedene andere Gruppierungen wie zum Beispiel das TANIS (Jones et al., 1993), die eine bessere Prognose ermöglichen sollen, sich aber bisher noch nicht durchgesetzt haben (Hall et al., 2009). Ein Kritikpunkt am TNM-System ist, dass die individuellen histologischen Eigenschaften nicht berücksichtigt werden. Histologische Kriterien, wie der Differenzierungsgrad oder die Verhornung, beeinflussen die Prognose nämlich ebenfalls stark (Odell et al., 1994; Kleist et al., 2001). Die Tumorausbreitung, die Invasionstiefe und die Tumorklassifikation haben große prognostische Relevanz (Cojocariu et al., 2009). Die regionären Lymphknotenmetastasen, besonders Größe, Anzahl, Level und extranodale Ausbreitung sind von sehr entscheidender Bedeutung (Alvi und Johnson, 1996). Schon ein kleiner positiver Lymphknotenbefund mit Kapseldurchbruch verschlechtert signifikant das krankheitsfreie Überleben, das fernmetastasenfreie Leben und das Gesamtüberleben (Ghadjar et al., 2010). Es wird vermutet, dass die Lymphknotenmetastasierung weniger von der Größe des Tumors als von der Aggressivität der Tumorzellen abhängig ist (Bryne et al., 1998). Das Auftreten von Fernmetastasen (Shingaki et al., 2003) und Lokalrezidiven (Lang et al., 2002) ist prognostisch besonders ungünstig. Genetische Marker wie eine 11q13-Amplifikation und eine 3q-Überpräsentation sollen eine genauere Prognose ermöglichen als die TNM-Klassifikation und das histologische Grading (Bockmühl et al., 2000). Chromosomale Aberrationen scheinen die Prognose zusätzlich zu verschlechtern (Rose et al., 2000), dabei kann es zur Aktivierung von Onkogenen (EGFR), Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und zur unkontrollierten Zellproliferation mit verstärkter Expression von Ki67 kommen. Immunhistologische Faktoren treten bei der prognostischen Einschätzung von Tumorerkrankungen immer mehr in den Vordergrund. Hohe Expression von Tumorproliferation-verwandten Faktoren wie Ki67, PCNA und AgNOR,

Veränderungen von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und alpha-Catenin, Aktivierung von autokrinen Mechanismen von Wachstumsfaktoren wie EGFR, TGF-alpha und EGF sind prognostische Faktoren für Ösophaguskrebs (Shimada und Imamura, 1996).

Obwohl TNM-Stadium und der histopathologische Grad des Karzinoms prädiktiv für das Überleben in großen Patientengruppen sind, liefert keiner von beiden ausreichend Informationen, um die Behandlung des individuellen Patienten festzulegen (Roland et al., 1992). Die Forschung nach molekularen Faktoren mit prädiktivem Potential über Erfolge einer bestimmten Therapie, würde neue Möglichkeiten eröffnen. Bisher ist bekannt, dass der HPV-positive-Status beim HNSCC im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren ein prognostisch günstiger Marker zu sein scheint, denn in der Regel sind HPV-positive HNSCC radio- und chemosensitiver, und auch die postoperative Langzeitprognose erscheint bei diesen Patienten günstiger (Licitra et al., 2006; Klusmann et al., 2009). Die Podoplanin-Expression bei Patienten mit HNSCC ist prognostisch ungünstig zu beurteilen. Das Ansprechen auf eine platinbasierte Radiochemotherapie ist bei höherer Podoplanin-Expression signifikant schlechter, sowie das Gesamtüberleben und die lokoregionäre Rezidivfreiheit (Kreppel et al., 2011b).

In dieser Arbeit soll nach prognostischen Faktoren gesucht werden, die eine Vorhersage über die Therapieerfolge einer TPF-Induktionschemotherapie ermöglichen.

## **1.5 In dieser Arbeit untersuchte immunhistochemische Marker**

### **1.5.1 Ki67**

1983 gelang Gerdes und seinen Mitarbeitern die Herstellung des monoklonalen Ki67-Antikörpers (Gerdes et al., 1983). Dieser erkennt ein Antigen, das nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird, in ruhenden aber fehlt (Gerdes et al., 1983). Ki67 tritt vornehmlich in der späten G1-Phase sowie der S, M und G2-Phase des Zellzyklus auf. Ruhende Zellen in der G0-Phase sind für Ki67 negativ (Gerdes et al., 1984). So ergibt sich ein direkter Bezug zwischen der Ki67-Expression und der Proliferation sowie der Mitoserate. Der genaue molekulare Mechanismus von Ki67 ist bisher noch ungeklärt. Bekannt ist aber, dass es Bestandteil des regulatorischen Proteinnetzwerkes des Zellteilungszyklus ist (Endl und Gerdes, 2000) und essentieller Bestandteil bei der Zellproliferation (Schlüter et al., 1993). Der Ki67-Antikörper ist heute ein gängiger Proliferationsmarker für Tumore, da er die sich vermehrenden Zellen anfärbt, die so genannte Wachstumsfraktion. So kann der Proliferationsindex, berechnet werden. Das ist die relative Anzahl positiv gefärbter Zellen an der Gesamtanzahl der Zellen. Dieser Index kann Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Gewebes geben. Bisher hat der Nachweis von Ki67 nur deskriptiven Charakter, zur therapeutischen Intervention ist es ungeeignet (Michalides et al., 2002).

### **1.5.2 EGFR (engl.: Epidermal Growth Factor Receptor) = ErbB1 = Her1**

EGFR ist ein in allen Zellen vorkommender Transmembran-Glykoproteinrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität und gehört zu den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Wie drei weitere Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört es zur ErbB-Familie: EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4). Das Protein besteht aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einem transmembranen lipophilen Segment und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne mit einer endständigen regulatorischen Carboxyl-Gruppe und ATP-Bindungsstelle. Durch extrazelluläre Ligandenbindung von z.B. Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF- $\alpha$ ), Epregrulin, Betacellulin und Heparin-binding EGF (HB-EGF) kommt es zur Dimerisierung und somit Aktivierung des EGFR über Autophosphorylierung. Es werden Signalmoleküle ins Zellinnere geleitet, die das Zellwachstum stimulieren und den apoptotischen Zelltod verhindern. So

werden die DNS-Synthese, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung beeinflusst. EGFR wird in einer Vielzahl von Krebsformen überexprimiert und/oder in mutierter Form vorgefunden, z.B. bei Karzinomen von Kolorektum, Mamma, Ovar, Zervix, Endometrium, Gehirn, Harnblase und Lunge. Auch bei 80 - 90% der HNSCC ist EGFR überexprimiert. Die Überexpression des EGFR auf HNSCC-Zelllinien wurde erstmalig in den 80er Jahren von Cohen et al. beschrieben (Cohen et al., 1980). EGFR Überexpression ist außerdem assoziiert mit Tumorprogression. Die Überexpression des Proteins wird dabei oft durch eine Genamplifikation und erhöhte Transkription hervorgerufen. Eine erhöhte EGFR/TGF $\alpha$ -Expression in der tumornahen, jedoch karzinomfreien Mundschleimhaut von HNSCC-Patienten legt den Schluss nahe, dass der EGFR ein frühes Signal in der Karzinogenese des HNSCC vermittelt (Grandis und Tweardy, 1993). Eine gesteigerte EGFR-Expression ist zudem mit einer schlechten klinischen Prognose vergesellschaftet (Grandis et al., 1998). Besonders vor dem Hintergrund neuartiger Krebstherapien, die speziell in die durch EGFR vermittelte Signalkaskade eingreifen, wird es zunehmend wichtiger immunhistochemisch zu prüfen, bei welchen Patienten eine Überexpression von EGFR vorliegt, denn diese neuartigen Krebstherapien zielen darauf ab, das onkogene Signal von EGFR zu blockieren und somit das Tumorwachstum zu unterbinden. Bereits erfolgreich getestete und zugelassene Substanzen dieser sogenannten gezielten Krebstherapie sind unter anderem Gefitinib, Erlotinib oder die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab.

### **1.5.3 Von-Willebrand-Faktor**

Der von-Willebrand-Faktor ist ein großes Glykoprotein mit einer multimeren Struktur. Er liegt im Plasma vor, in den Weibel-Pallade-Korpuskeln der Endothelzellen, im Alpha-Granulom der Megakaryozyten, den Thromozyten und der subendothelialen Matrix der Gefäßwand. Bei einer Verletzung der Gefäßwand wird der von-Willebrand-Faktor freigesetzt und bindet an subendotheliale Kollagene der verletzten Zellen. Das Protein weist selbst keine enzymatische Aktivität auf, es ist jedoch direkt an der Blutgerinnung beteiligt. Seine Funktion besteht darin, dass es die Adhäsion der Thrombozyten am Ort der Gewebeverletzung ermöglicht und quasi wie ein Klebprotein wirkt. Patienten, denen dieser Faktor fehlt (autosomal dominant vererbtes von-Willebrand-Syndrom) leiden unter schweren Gerinnungsstörungen. Da der von-



Willebrand-Faktor im Blut auch mit dem Blutgerinnungsfaktor VIII assoziiert ist, diesen stabilisiert und vor einem vorzeitigen Abbau schützt, führt ein vollständiger Ausfall des von-Willebrand-Faktors auch zu einem Mangel an Blutgerinnungsfaktor VIII (Ruggeri, 1991). Seinen Namen hat das Protein von dem finnischen Internisten Erik von Willebrand, der 1924 erstmals dieses Krankheitsbild beschrieb (van Gijn und Gijssels, 2011). Auf Grund seiner Lage in der Gefäßwand eignet sich vWF aber auch als immunhistochemischer Marker für Gefäße und Kapillaren. In dieser Arbeit soll so der Grad der Vaskularisation im Tumorgewebe quantifiziert werden.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Hals-Bereich (HNSCC) werden ab dem Tumorstadium 2 multimodale Therapiekonzepte eingesetzt (Schultze et al., 2006). Diese Therapiekonzepte sind vielfältig und welche Patienten von welchem Konzept profitieren ist noch umstritten. Das Ziel der TPF-Induktionschemotherapie ist den vorhandenen Tumor und seine Metastasen zu verkleinern, damit eine Operation mit geringerer Radikalität durchgeführt werden kann. Bei welchen Patienten ein gutes Ansprechen auf eine Induktionschemotherapie zu erwarten ist und bei welchen nicht, wäre interessant herauszufinden. Dahingehend sollen in dieser Arbeit klinische und immunhistochemische Marker untersucht werden.

Folgende Fragen sollen durch diese Arbeit beantwortet werden:

Wie korrelieren die untersuchten Parameter Ki67, vWF und EGFR mit den klinischen Befunden und erzielten Erfolgen durch die TPF-Induktionschemotherapie?

Gibt es eine Korrelation zwischen den drei Markern?

Haben der Proliferationsgrad und die Vaskularisation des Tumors Einfluss auf die Wirksamkeit der Chemotherapie?

Kann man die Erfolgsaussichten der TPF-Induktionschemotherapie noch vor ihrem Beginn anhand der erhobenen Parameter einschätzen?

Lässt sich ein mathematisches Modell entwickeln mit dem durch verschiedene klinische und histologische Parameter ein Remissionsgrad vorhergesagt werden kann?

Ist zwischen den verschiedenen Tumorstadien ein Unterschied hinsichtlich der histologischen Parameter festzustellen?

Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den drei Markern und dem Gesamtüberleben?

## 2. Material, Patientengut und Methodik

### 2.1 Materialliste

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Aquabidest	Cambrex, Verviers (Belgien)
Aceton	Merck, Darmstadt
Bechergläser	Fisher, Frankfurt
Dako Fuchsin Substrat Chromogen	DakoCytomation, Carpinteria (USA)
Dako Target Retrieval Solution	DakoCytomation, Carpinteria (USA)
Deckgläser	Diagonal, Münster
Einmalhandschuhe	Ansell, Brüssel (Belgien)
Einmalpipetten	Fisher, Frankfurt
Eosin Y Lösung	Waldeck, Münster
EGFR	DCS, Hamburg
Ethanol (verschieden %ig)	Merck, Darmstadt
Glasröhrchen	NeoLab Migge, Heidelberg
Hämalaun Lösung	Merck, Darmstadt
Ki67	DCS, Hamburg
Microsoft Office XP	Microsoft GmbH, Unterschleißheim
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Objektträger	Diagonal, Münster
Papiertücher (Kleenex)	Wepa, Arnsberg
Paraclear	Merck, Darmstadt
Personal Copmputer	Acer, Taipeh (Taiwan)
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Cambrex, Verviers (Belgien)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Schlittenmikrotom HN 40	Reichert Jung, Heidelberg
Schutzbrille	Uvex, Fürth
SPSS	IBM, Ehningen
Streptavidin AP Konjugat	DCS, Hamburg
vWF	DCS, Hamburg
Wecker	Fisher, Frankfurt

## 2.2 Auswahl des Patientenlientels

In dieser Arbeit wurden histologische Proben von 105 Patienten untersucht, die in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Frankfurt am Main in verschiedenen Studien zur Therapie von Tumorpatienten eingeschlossen sind. Die Einschluss- und Ausschlusskriterien für diese Studien sind in Abbildung 5 dargestellt.

### Einschlusskriterien:

1. histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich
2. bisher keine Therapie des Tumors
3. Allgemeinzustand ECOG 0-2
4. Alter der Patienten 18-80 Jahre
5. ausreichende hämatologische, renale, hepatische und kardiale Funktion
  - Leukozyten:  $\geq 3000/\mu\text{l}$
  - Thrombozyten:  $\geq 100000/\mu\text{l}$
  - Hämoglobin  $\geq 10\text{g/dl}$
  - Gesamtbilirubin  $\leq 1,25 \times$  obere Grenze des Normbereichs
  - GOT und GPT  $\leq 3,5 \times$  des Normwertes
  - Kreatinin  $\leq 2,5 \text{ mg/dl}$
6. schriftliches Einverständnis
7. keine Teilnahme an weiteren Studien

### Ausschlusskriterien:

1. sekundäre Neoplasie
2. vorbestehende motorische oder sensorische Neurotoxizität
3. aktive Infektion
4. eingeschränkte Geschäftsfähigkeit (im juristischen Sinne)
5. mangelnde Kooperationsbereitschaft des Patienten
6. Schwangerschaft und Stillzeit (Bei Frauen im gebärfähigen Alter sind kontrazeptive Maßnahmen zu ergreifen.)

**Abbildung 5:** Ein- und Ausschlusskriterien der Studien, in denen die Patienten eingeschlossen sind, deren histologische Proben in dieser Arbeit untersucht wurden.

Alle diese Patienten hatten einen Tumor im Kopf-/Halsbereich, der mit 3 Zyklen TPF-Induktionstherapie behandelt wurde. Viele von ihnen befinden oder befanden sich nach der Therapie in den Kontrollen der Tumorsprechstunde der Klinik.

In der Einverständniserklärung bestätigen die Patienten, dass sie mit der Verwendung ihrer Gewebeproben und klinischen Daten in weiteren Studien und Untersuchungen einverstanden sind. So konnten in dieser Arbeit klinische Parameter mit histologischen Parametern in Zusammenhang gebracht werden.

### 2.3 Gewinnung der Proben

In die histologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden Biopsien von Patienten einbezogen, die in den Phasen des Stagings gewonnen wurden.

Studienablauf:

1. Staging:

Anamnese, Befund, Endoskopie, Sonographie Kopf/Hals, NMR, Thorax a.-p.-Aufnahme, Oberbauchsonographie

2. Einverständniserklärung

3. Randomisierung

4. 3 Zyklen TPF-Induktionstherapie:

Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup>dl, 3-wöchentlich

Cisplatin 100 mg/m<sup>2</sup>dl, 3-wöchentlich

5FU 1000 mg/m<sup>2</sup>dl, 3-wöchentlich

5. Restaging und Remissionsbeurteilung:

Innerhalb von 3 Wochen nach der Chemotherapie: Endoskopie, NMR

6. Innerhalb von 4 Wochen nach dem Restaging, wenn CR oder PR:

a. Organerhaltende und funktionserhaltende Resektion mit modifiziert radikaler Neck dissection (MRND) und anschließender Radiotherapie

b. Konkommittante Radiochemotherapie

(Falls SD oder PD: Studienende und Laryngo(pharyng)ektomie, MRND, konventionelle Radiotherapie.)

7. Nachbeobachtung

**Abbildung 6:** Studienablauf in Stichpunkten

Der Studienablauf der Studien, aus denen die Proben dieser Patienten stammen, ist in der Abbildung 6 kurz dargestellt.

In dieser Arbeit sollten sowohl Biopsien vor als auch nach Chemotherapie untersucht werden. Dazu wurden die Proben aus dem ersten Staging und dem Restaging nach der Chemotherapie verwendet. Die eingelagerten Paraffinblöcke zusammen mit den dazugehörigen Pathologie-Berichten wurden aus dem Zentrum für Pathologie angefordert.

## **2.4 Anfertigung der Schnitte**

Für die Anfertigung von histologischen Paraffinschnitten wurden die Gewebeproben in Paraffin auf Holzblöcken befestigt und in die vorgesehene Halterung eines Schlittenmikrotoms eingespannt. Die ca. 6 µm dicken Gewebescheiben wurden in warmes autoklaviertes Wasser überführt und auf einen Objektträger aufgenommen. Die Trocknung erfolgte zunächst für 30 min bei 60 °C und anschließend über Nacht bei 37 °C.

## **2.5 Färbung der Schnitte**

### **2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung**

Die Schnitte wurden in Paraclear zweimal fünfzehn Minuten entparaffiniert und durchliefen dann eine absteigende Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser. Danach erfolgte die fünfminütige Inkubation in Hämalaun und zehnminütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Die Gegenfärbung erfolgte in Eosin für eine Minute, wonach die Schnitte nochmals unter Leitungswasser abgespült wurden. Zur Dehydrierung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit Aceton und Paraclear. Dann wurden sie eingedeckelt. Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine histologische Standardfärbung. Grundlage für die Färbung der Gewebsbestandteile ist eine unterschiedliche Affinität dieser zu den jeweiligen Farbstoffen, wobei hierfür meist elektrostatische Interaktionen verantwortlich sind. Hämalaun, ein Komplex aus Aluminiumionen und dem Farbstoff Hämatein, bindet dabei als basischer (= kationischer) Farbstoff an basophilen (= anionischen) Zellkomponenten wie z. B. DNS und RNS und färbt somit den Zellkern (blau) an. Dagegen wirkt der saure (= anionische) Farbstoff

Eosin als Zytoplasmafarbstoff (rot) für die eosinophilen (= kationische) Bestandteile wie Mitochondrien, Proteine und Sekretgranula. Vor jeder immunhistochemischen Analyse wurden HE-Färbungen angefertigt, um repräsentative Schnitte mit ausreichend Tumorgewebe zu gewährleisten. Plattenepitheliales Tumorgewebe angefärbt mittels HE-Färbung ist in Abbildung 1 in der Einleitung dieser Arbeit zu sehen.

### **2.5.2 Färbung mit Ki67**

Die Schnitte wurden in Paraclear zweimal fünfzehn Minuten entparaffiniert und durchliefen dann eine absteigende Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte für zwanzig Minuten in Dako Target Retrieval Solution gekocht. Die langsame Abkühlung erfolgte, indem regelmäßig etwas Puffer entfernt und destilliertes Wasser dazugegeben wurde, bis die Schnitte am Ende in purem Aqua dest standen. Nach der Trocknung der Schnitte erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200. Nach fünfminütigem Aufenthalt im Waschpuffer wurden die Schnitte dreißig Minuten mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Des Weiteren erfolgten die Inkubation mit Streptavidin AP Konjugat für dreißig Minuten sowie die Färbung mit Dako Fuchsin Substrat Chromogen und Hämalaun. Dako-Fuchsin Substrat Chromogen wird bei immunhistochemischen Färbungen und In-Situ Hybridisierungen eingesetzt, bei denen Alkalische Phosphatase genutzt wird und eine hohe Sensitivität notwendig ist. Zwischen den Schritten wurde jeweils für fünf Minuten in dem Waschpuffer gewaschen. Zum Abschluss durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit Aceton und Paraclear. Dann wurden sie eingedeckelt. Es wurde zur Überprüfung des Vorgehens jeweils eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgefärbt und überprüft. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper ist synthetisches Kaninchen-IgG, entsprechend dem menschlichen Ki67 Protein.

### **2.5.3 Färbung mit EGFR**

Die Schnitte wurden in Paraclear zweimal fünfzehn Minuten entparaffiniert und durchliefen dann eine absteigende Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser. Nach Trocknung der Schnitte erfolgte die 45-minütige Inkubation mit dem Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100. Nach fünfminütigem Aufenthalt im Waschpuffer wurden die Schnitte dreißig Minuten mit dem

Sekundär-Antikörper inkubiert. Des Weiteren erfolgten die Inkubation mit Streptavidin AP Konjugat für dreißig Minuten sowie die Färbung mit Dako Fuchsin Substrat Chromogen und Hämalaun. Dako-Fuchsin Substrat Chromogen wird bei immunhistochemischen Färbungen und In-Situ Hybridisierungen eingesetzt, bei denen Alkalische Phosphatase genutzt wird und eine hohe Sensitivität notwendig ist. Zwischen den Schritten wurde jeweils für fünf Minuten in dem Waschpuffer gewaschen. Zum Abschluss durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit Aceton und Paraclear. Dann wurden sie eingedeckelt. Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Maus-Antikörper, ein rekombinantes Protein entsprechend der extrazellulären Domäne des menschlichen EGF-Rezeptors Maus IgG1, zeichnet sich dabei durch besonders hohe Spezifität und Sensitivität aus.

#### **2.5.4 Färbung mit vWF**

Die Schnitte wurden in Paraclear zweimal fünfzehn Minuten entparaffiniert und durchliefen dann eine absteigende Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte für zwanzig min in Dako Target Retrieval Solution gekocht. Die langsame Abkühlung erfolgte, in dem regelmäßig etwas Puffer entfernt und destilliertes Wasser dazugegeben wurde, bis die Schnitte am Ende in purem Aqua dest standen. Nach Trocknung der Schnitte erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:300. Nach fünfminütigem Aufenthalt im Waschpuffer wurden die Schnitte dreißig Minuten mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Des Weiteren erfolgten die Inkubation mit Streptavidin AP Konjugat für dreißig Minuten sowie die Färbung mit Dako Fuchsin Substrat Chromogen und Hämalaun. Dako-Fuchsin Substrat Chromogen wird bei immunhistochemischen Färbungen und In-Situ Hybridisierungen eingesetzt, bei denen Alkalische Phosphatase genutzt wird und eine hohe Sensitivität notwendig ist. Zwischen den Schritten wurde jeweils für fünf Minuten in dem Waschpuffer gewaschen. Zum Abschluss durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit Aceton und Paraclear. Dann wurden sie eingedeckelt. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper reagiert mit dem menschlichen vWF VIII Komplex.

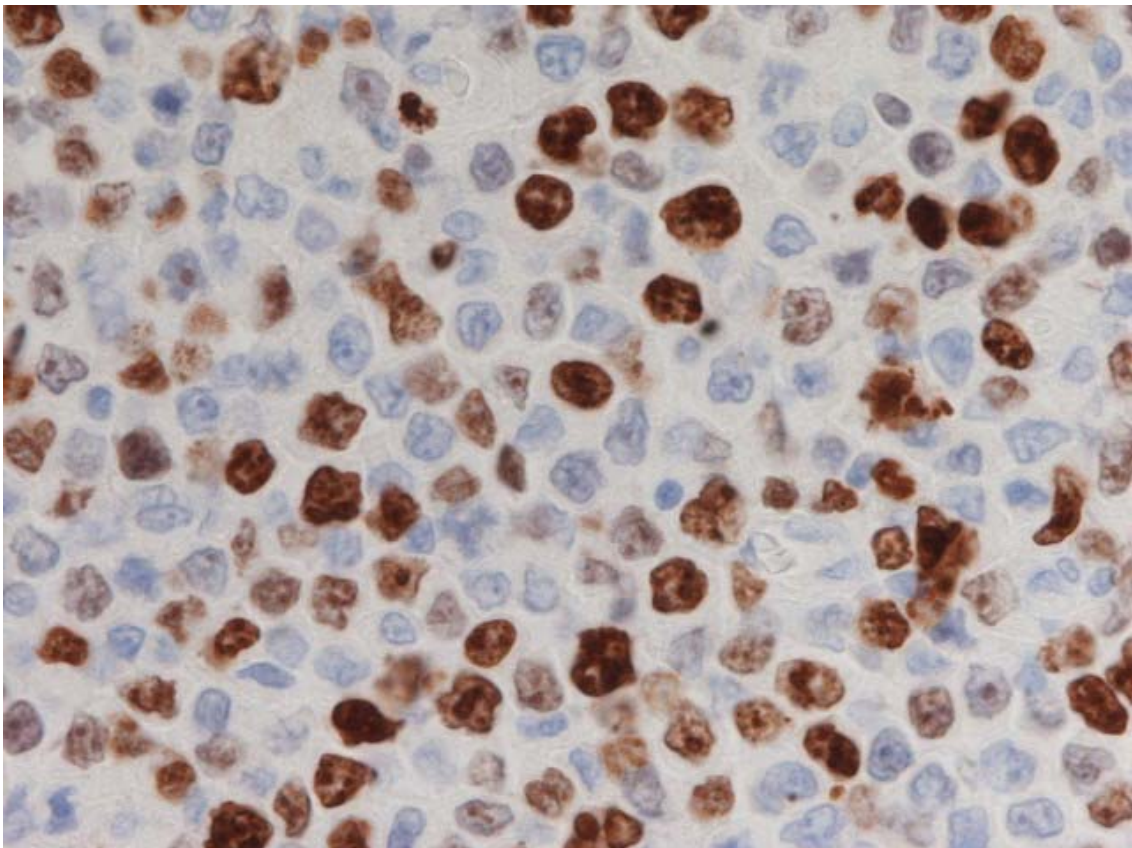


## 2.6 Mikroskopische Beurteilung der Gewebeschnitte

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop bei 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung. Die verschiedenen Auszählungen und Bewertungen erfolgten nur in Gebieten mit vielen Tumorzellen. Bei größeren Präparaten wurden alle Areale mit Tumoranteilen in die Auszählung mit einbezogen. Bei sehr kleinen Präparaten wurde zum Teil das gesamte Präparat ausgezählt.

### 2.6.1 Beurteilung der Ki67-Färbung

Das Präparat wurde unter dem Mikroskop in der Übersichtsvergrößerung betrachtet und ein Areal mit vielen Tumorzellen eingestellt. Dann wurde die größte Vergrößerung gewählt und in einem Gesichtsfeld 100 Zellen gezählt. Mit Hilfe zweier Ticker wurden dabei rot und blau gefärbte Zellen unterschieden und das Ergebnis in einer Tabelle notiert. Dann wurde das nächste Gesichtsfeld aufgesucht und erneut 100 Zellen ausgezählt. Insgesamt wurden 10 Gesichtfelder pro Präparat ausgezählt.

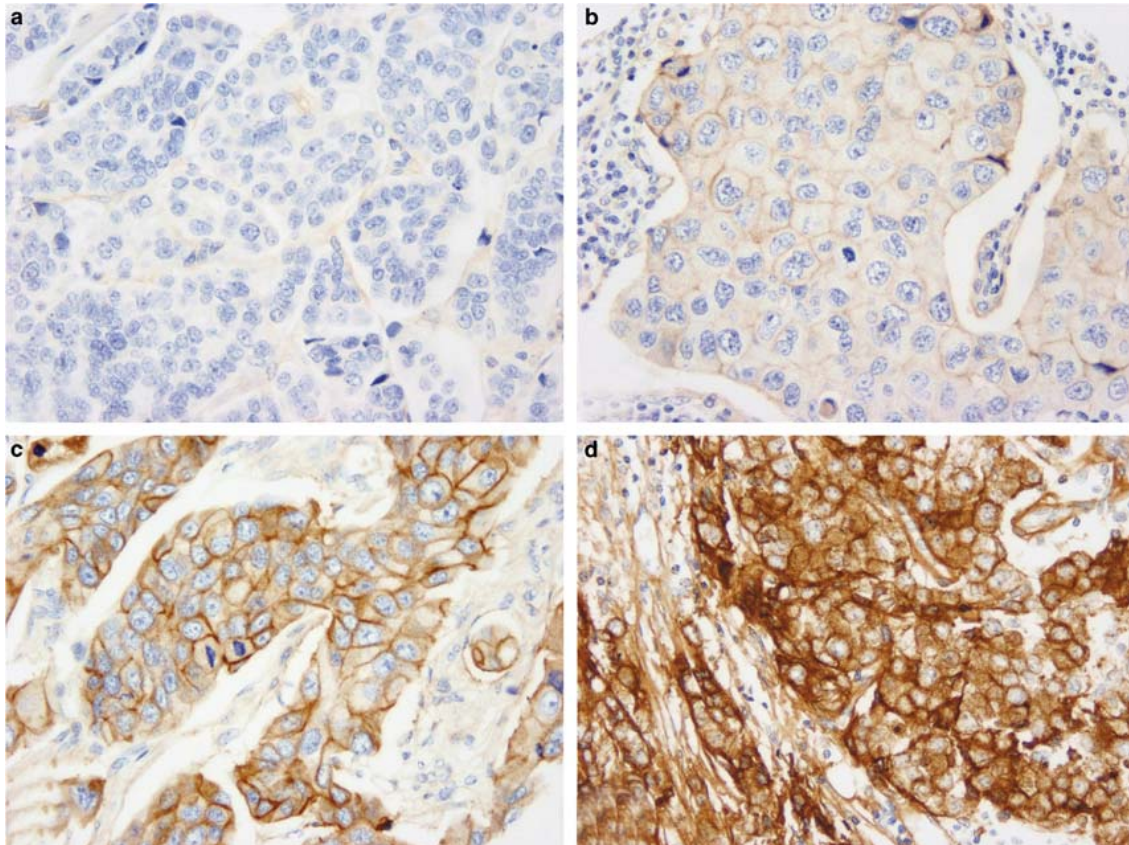


**Abbildung 7:** Zur Verdeutlichung des Färbeergebnisses ist ein mit Ki67 angefärbtes Präparat bei 40-facher Vergrößerung dargestellt. Es sind deutlich die Unterschiede zwischen Ki67 exprimierenden Zellen (rot) und nicht exprimierenden Zellen (blau) zu erkennen.

Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis

## 2.6.2 Beurteilung EGFR-Färbung

Anhand eines anerkannten bereits in der Literatur beschriebenen Bewertungsschemas erfolgte die Auswertung der EGFR-Expression, also die Stärke der Anfärbung in 3 Grade. Es wurden gar nicht angefärbte Tumorzellen von leicht, mittel und stark angefärbten Tumorzellen unterschieden. Ein Gesichtsfeld wurde immer mit dem in ihm am häufigsten vertretenen Anfärbungsgrad der Zellen bewertet. Es wurden 10 Gesichtsfelder bewertet.



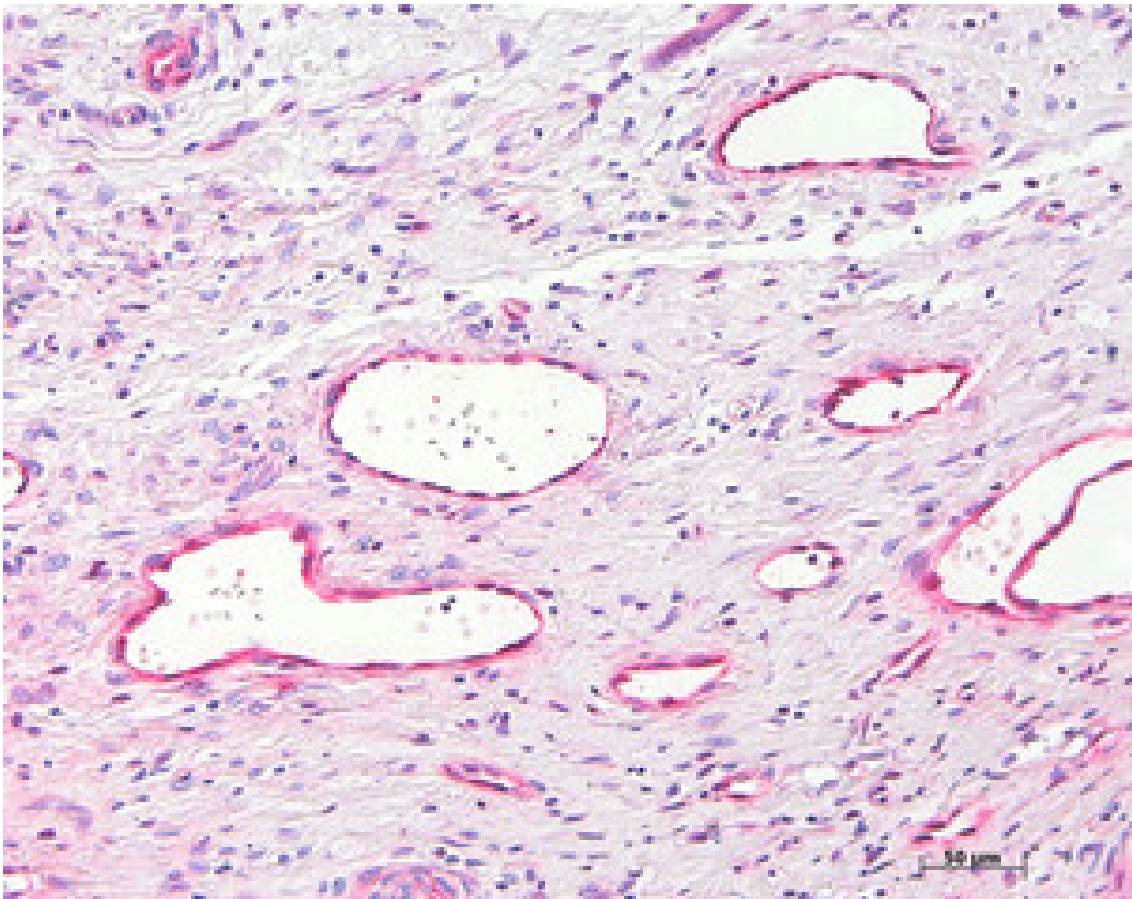
**Abbildung 8:** Die Bilder zeigen die vier unterschiedlichen Bewertungsgrade bei der EGFR Färbung:

- a) Grad 0 (nicht angefärbt)
- b) Grad 1 (leicht angefärbt)
- c) Grad 2 (mittelstark angefärbt)
- d) Grad 3 (stark angefärbt)

Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis

## 2.6.3 Beurteilung der vWF-Färbung

Mit vWF wurden die Endothelien der Gefäße im Präparat angefärbt. In 10 Gesichtsfeldern, in denen viele Tumorzellen vertreten waren, wurden die Gefäße ausgezählt. Große und kleine Gefäße wurden dabei nicht unterschieden. Dass Gefäße durch Doppelanschneidungen mehrfach gezählt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 9:** Zur Verdeutlichung des Färbeergebnisses ist ein mit vWF-gefärbtes Präparat bei 40-facher Vergrößerung dargestellt. Die angefärbten Endothelzellen und damit die Gefäße sind deutlich zu erkennen.  
Quelle: siehe Abbildungsverzeichnis

## 2.7 Erhebung der klinischen Parameter

Die klinischen Werte wurden alle aus den Patientenakten übernommen. Alle Parameter sind dabei von den behandelnden Ärzten notiert worden. Ausgewertet wurden für alle beteiligten Patienten das Geschlecht, das Alter bei Erstdiagnose des Tumors, die genaue Lokalisation des Tumors, TNM-Klassifikation und UICC-Stadium. Das histologische Grading der Proben stammt aus den Berichten des pathologischen Instituts. Aus CT-Befunden wurde das Tumolvolumen vor und nach der Chemotherapie bestimmt. Der Remissionsgrad nach der Chemotherapie wurde festgehalten. Des Weiteren wurde aus den Akten der Tumorsprechstunde genau herausgesucht zu welchen Zeitpunkten die Patienten sich vorstellten bzw. in der Klinik in Behandlung waren. Aus den vorhandenen Daten wurde für die Patienten, zum einen die Überlebensdauer und zum anderen auch die Überlebensdauer ohne erneute Erkrankung notiert, um so das sogenannte Gesamtüberleben (OS =

Overall Survival) und das Krankheitsfreie Überleben (DFS = Disease-free Survival) zu errechnen und damit Überlebenszeitanalysen zu erstellen. Beim Gesamtüberleben ist der Grund des Todes nicht genau spezifiziert. Es wird also nicht unterschieden, ob Patienten aus Gründen in direktem Bezug zu ihrer Erkrankung gestorben sind oder aus anderem Grund. Das krankheitsfreie Überleben beschreibt den Zeitraum nach der Behandlung einer bestimmten Erkrankung, in der ein Patient ohne erneute Zeichen der Erkrankung gelebt hat.

## **2.8 Statistische Verfahren**

Zur Auswertung der verschiedenen oben beschriebenen Methoden wurden unterschiedliche statistische Verfahren verwendet, die an dieser Stelle kurz dargestellt werden. Die Datenanalysen erfolgten mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL und der Analyse Software SPSS.

### **2.8.1 Mittelwert, Median und Streuungsmaße**

Der arithmetische Mittelwert beschreibt den Schwerpunkt einer Messreihe, wobei jeder einzelnen Beobachtung das gleiche Gewicht zukommt. Von Ausreißerwerten ist er also stark beeinflusst, aber bei symmetrischen, eingipfeligen Verteilungen ist seine Verwendung sehr sinnvoll. Er hat die gleiche Maßeinheit wie die gemessenen Werte und errechnet sich aus der Summe aller einzelnen Stichproben dividiert durch die Stichprobenanzahl.

Der Median bezeichnet eine Grenze zwischen zwei Hälften. Sowie „median“ als anatomische Lagebezeichnung „in der Mitte liegend“ oder „zur Mitte hin“ bedeutet, halbiert der Median in der Statistik eine Verteilung. Er lässt sich deshalb auch auf ordinal skalierte Variablen anwenden und ist robuster gegenüber Ausreißern als der arithmetischen Mittelwert.

Streuungsmaße quantifizieren die Abweichungen der Stichprobenwerte vom Mittelwert. Die Varianz ist die mittlere quadratische Abweichung der Daten vom Mittelwert. Wegen ihrer quadratischen Dimension ist die Varianz sehr schwer zu interpretieren, weshalb man auf die Standardabweichung zurückgreift.

Die Standardabweichung ist die Wurzel aus der Varianz und ein Streuungsmaß mit der gleichen Dimension wie die gemessenen Stichprobenwerte. Sie stellt ein Maß für die Homogenität bzw. Heterogenität der Stichproben dar. Je größer die Standardabweichung, desto heterogener sind die einzelnen Stichproben.



Der Standardfehler des Mittelwertes ist ein Streuungsmaß für den Mittelwert einer Messreihe. Er gibt die Abweichung des Mittelwertes einer Stichprobe vom Erwartungswert an.

### **2.8.2 Korrelation und Regression**

Eine Korrelation ist ein Zusammenhang zwischen zwei gleichberechtigten Merkmalen. In der Korrelationsrechnung fasst man formal erst die eine und dann die andere der beiden Variablen als Einflussgröße auf, wobei die jeweils andere als Zielgröße verwendet wird. Mit den Mitteln der Regressionsanalyse berechnet man die Steigung und den Korrelationskoeffizient  $R$ .

Der Korrelationskoeffizient von Bravais und Pearson, auch Pearson-Korrelation genannt, ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen. Er kann Werte zwischen  $-1$  und  $1$  annehmen. Bei einem Wert von  $+1$  besteht ein vollständig positiver, bei einem Wert von  $-1$  besteht ein vollständig negativer linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert  $0$  aufweist, hängen die beiden Merkmale überhaupt nicht linear voneinander ab. Allerdings können diese ungeachtet dessen in nicht-linearer Weise voneinander abhängen.

Spearman's Rho, oder Spearman's Rangkorrelationskoeffizient ist ein verteilungsfreies, non-parametrisches Korrelationsmaß für Daten auf Rangskalenniveau. Grundlage ist der Pearsonsche Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient, in den Rangplätze eingesetzt werden. Allerdings kann er bei gebundenen Rängen nicht sinnvoll angewendet werden, sondern nur bei halbwegs gleichen oder zufällig verteilten Rangabständen. Non-parametrisches Korrelationsmaß bedeutet, dass der Rangkorrelationskoeffizient misst, wie gut eine beliebige monotone Funktion den Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreiben kann, ohne dabei irgendwelche Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung dieser Variablen zu machen. Anders als der Pearsons Korrelationskoeffizient, benötigt er also weder die Annahme, dass die Beziehung zwischen den Variablen linear ist, noch ist es erforderlich, dass die Variablen auf einer Intervallskala gemessen werden können. Außerdem ist er robuster gegenüber Ausreißern.

Während die Korrelation nicht von einer Abhängigkeit, sondern von einem Zusammenhang zwischen zweigleichberechtigten Merkmalen ausgeht, sucht

die Regression nach einer Abhängigkeit einer Zielgröße von einer Einflussgröße. Diese Abhängigkeit wird dann durch eine Regressionsgerade beschrieben, deren Steigung der so genannte Regressionskoeffizient ist. Wenn das Ziel die Vorhersage ist, dann kann der durch das Regressionsverfahren ermittelte funktionale Zusammenhang verwendet werden, um ein Vorhersagemodell zu erstellen.

### **2.8.3 Multinominale logistische Regression**

Unter logistischer Regression oder Logit-Modell versteht man ein Verfahren zur Analyse abhängiger Variablen. Die Multinominale logistische Regression ist eine Variante der logistischen Regression, bei der die abhängige Variable nicht dichotom sein muss, sondern mehr als zwei Kategorien aufweisen darf. Als unabhängige Variablen können sowohl kategoriale Variablen (genannt: Faktoren), als auch unabhängige metrische Variablen (genannt: Kovariaten) berücksichtigt werden. Die Regressionskoeffizienten geben die Veränderung der Chance an, mit der eine Beobachtung der betreffenden Gruppe im Vergleich zur Referenzgruppe angehört, wenn sich die unabhängige Variable erhöht. Ist der Regressionskoeffizient negativ, deutet dies also darauf hin, dass eine Person mit hohem Skalenwert bei der unabhängigen Variablen eher der Referenzkategorie angehört. Bei positivem Regressionskoeffizient, gehört sie eher der Bezugsgruppe an. Ist der Regressionskoeffizient gleich null, erlaubt die unabhängige Variable keine Trennung der Gruppen. Schließlich können Wahrscheinlichkeiten für die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe berechnet werden. Für jede Variable wird der Wert eines reduzierten Modells ausgewiesen, aus dem die betreffende Variable entfernt wird, während alle anderen Variablen erhalten bleiben. Die Differenz zwischen diesem reduzierten und dem vollständigen Modell wird unter Chi-Quadrat ausgewiesen und unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade auf Signifikanz getestet. Je höher die Diskrepanz zwischen dem vollständigen und dem reduzierten Modell ist, desto höher ist die Erklärungsleistung, also die Trennkraft der betreffenden Variablen. Gleichzeitig sollte die Signifikanz für die betreffende Variable nahe Null sein, d.h. dass die Nullhypothese, dass die Variable keinen Beitrag zur Gruppentrennung leistet, verworfen werden kann.

#### **2.8.4 Kruskal-Wallis-Test**

Der Kruskal-Wallis-Test, auch H-Test genannt, ist ein nichtparametrisches Verfahren, das im Rahmen einer Varianzanalyse vergleicht, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben hinsichtlich einer Variablen in ihrem Erwartungswert unterscheiden. Die Nullhypothese lautet, dass zwischen den Gruppen kein Unterschied besteht. Als Prüfgröße des Kruskal-Wallis-Tests wird ein sogenannter H-Wert berechnet, indem der Rang für jede der Beobachtungen in der Vereinigung der Stichproben bestimmt wird. Daraus werden dann die Rangsummen für die einzelnen Gruppen und daraus die Teststatistik errechnet. Diese folgt unter Annahme der Nullhypothese einer Chi-Quadrat-Verteilung. Die berechnete Prüfgröße H wird mit einer theoretischen Größe aus der Chi-Quadrat-Verteilung für eine gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit verglichen. Ist der errechnete H-Wert größer als der H-Wert aus der Chi-Quadrat-Tabelle, wird die Nullhypothese verworfen. Es besteht dann ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

#### **2.8.5 Überlebenszeitanalyse**

Die Überlebenszeitanalyse ist eine Zeit-bis-Ereignis-Fragestellung. Bei Überlebenszeitanalysen ist es sinnlos, einen Mittelwert oder einen Median zu berechnen, denn Überlebenszeit sind nicht symmetrisch verteilt und bei Erstellen der Analyse ist nicht bekannt, wie lange einzelne Patienten noch leben werden.

Bei der Kaplan-Meier-Methode werden so genannte zensierte Beobachtungen berücksichtigt, also dass zum Auswertungszeitpunkt Patienten noch leben und damit deren Überlebenszeit noch nicht feststeht und andere dagegen bereits verstorben sind.

Die Cox-Regression ist ein Regressionsmodell und basiert auf dem Konzept des Hazardwertes. Der Hazardwert (englisch hazard: Zufall, Risiko) gibt grob gesprochen die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass zu einem festen Zeitpunkt ein bestimmtes Ereignis eintritt, beispielsweise der Tod einer Person. Das von Cox vorgeschlagene Regressionsmodell wird zur Untersuchung des Verhaltens der Hazardfunktion in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen benutzt.

### **2.8.6 Signifikanz**

Unterschiede zwischen Messgrößen oder Variablen in der Statistik sind signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch Zufall so zustande kommen würden, nur gering ist. Überprüft wird Signifikanz durch an das Datenmaterial angepasste statistische Tests, die eine Abschätzung der Irrtumswahrscheinlichkeit erlauben. Liegt Signifikanz vor, wird statistisch darauf geschlossen, dass tatsächlich ein Unterschied vorliegt. Dennoch muss ein solcher Unterschied nicht zwingend vorhanden sein. Auch Unterschiede, die statistisch signifikant sind, können zufällig sein. In allen Fällen dieser Arbeit erfolgte die Überprüfung auf zweiseitige Signifikanz. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet. Das Signifikanzniveau wird bei allen Ergebnissen mitangegeben.

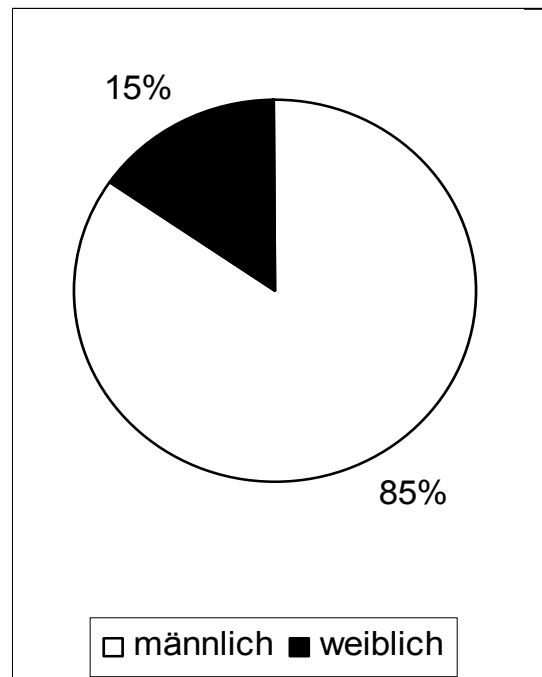


### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Das Patientenkollektiv

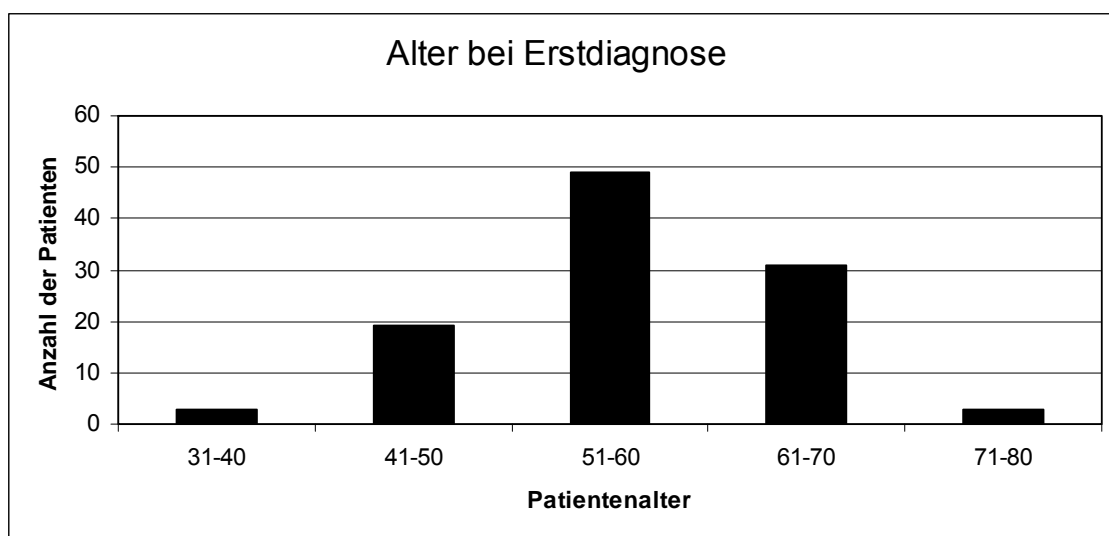
Insgesamt wurden in dieser Arbeit die histopathologischen Schnitte von 105 Patienten bewertet. Davon waren 89 Personen, also 85%, männlich und 16 Personen, also 15%, weiblich.

Die Abbildung 10 verdeutlicht diese Geschlechterverteilung mittels eines Tortendiagramms.



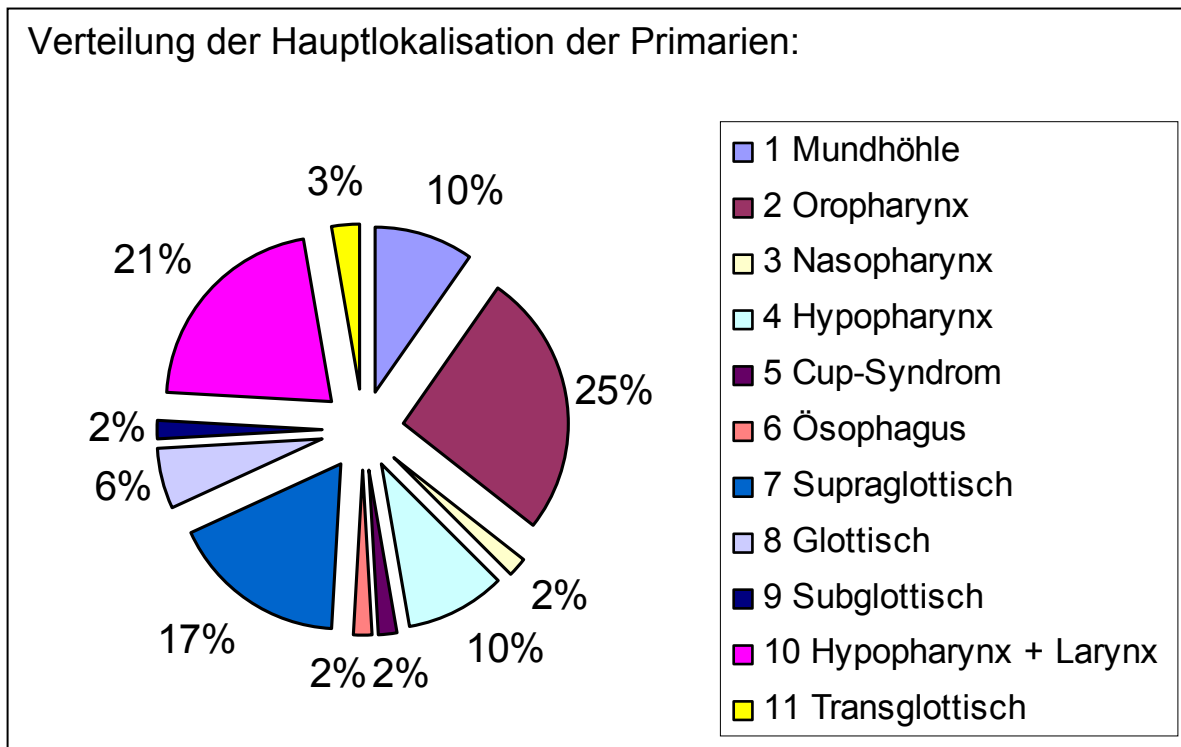
**Abbildung 10** (rechts): In einem Tortendiagramm dargestellte Geschlechterverteilung der in dieser Studie eingeschlossenen 105 Patienten.

In der Abbildung 11 wird das Alter der Patienten bei der Erstdiagnose ihrer Tumorerkrankung mit Hilfe eines Säulendiagramms wiedergegeben. 19 Patienten waren bei Diagnosestellung zwischen 41 und 50 Jahren. 49 Patienten hatten bei Erstdiagnose ihrer Tumorerkrankung ein Alter zwischen 51 und 60 Jahren. 31 Patienten erhielten ihre Diagnose im Alter von 61 bis 70 Jahren. Nur sehr wenige Patienten waren noch jünger bzw. älter als die bisher aufgezählten Gruppen. Das mittlere Alter lag bei 57,2 Jahren.



**Abbildung 11:** Patientenalter bei Erstdiagnose dargestellt in einem Säulendiagramm.

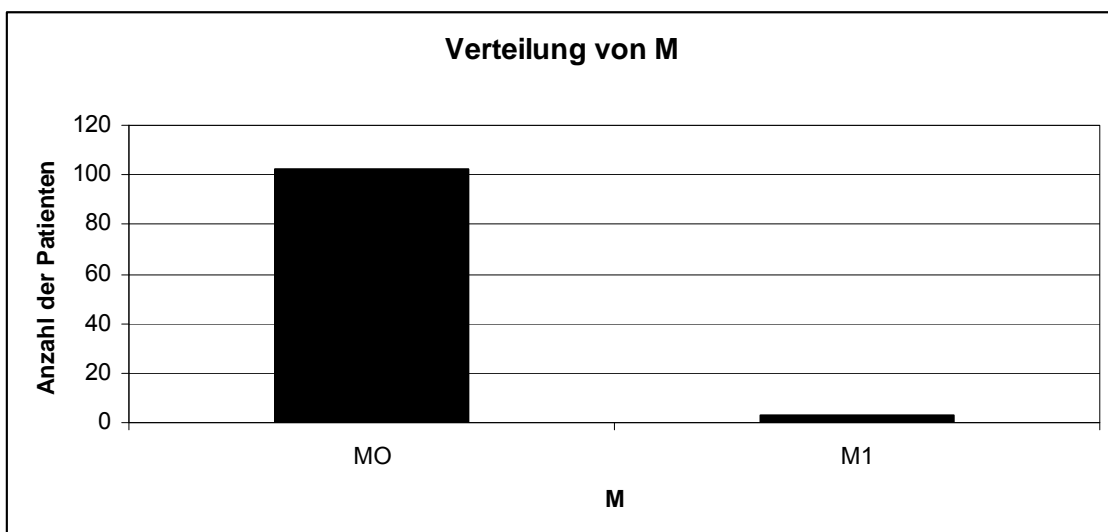
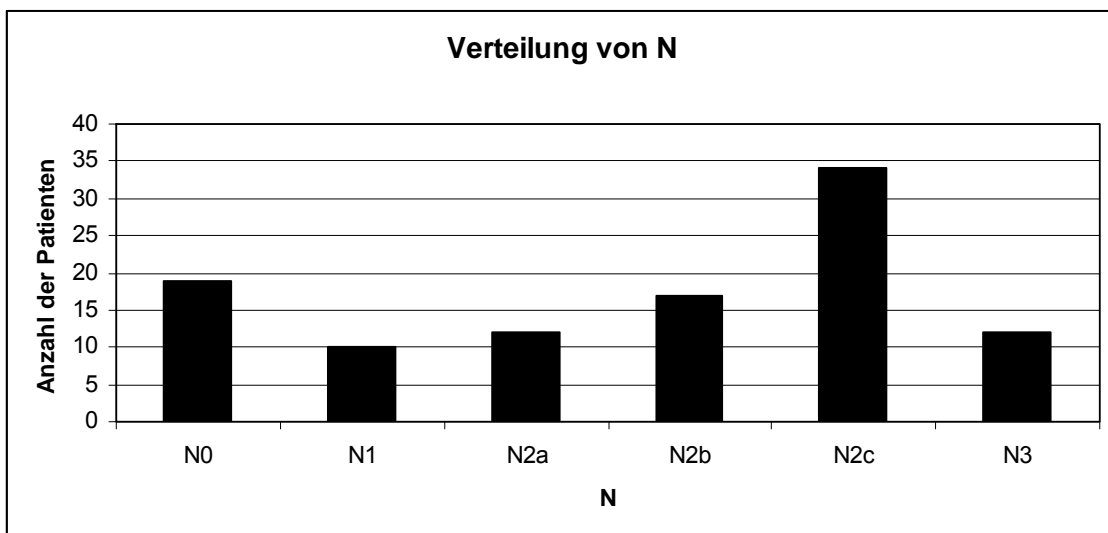
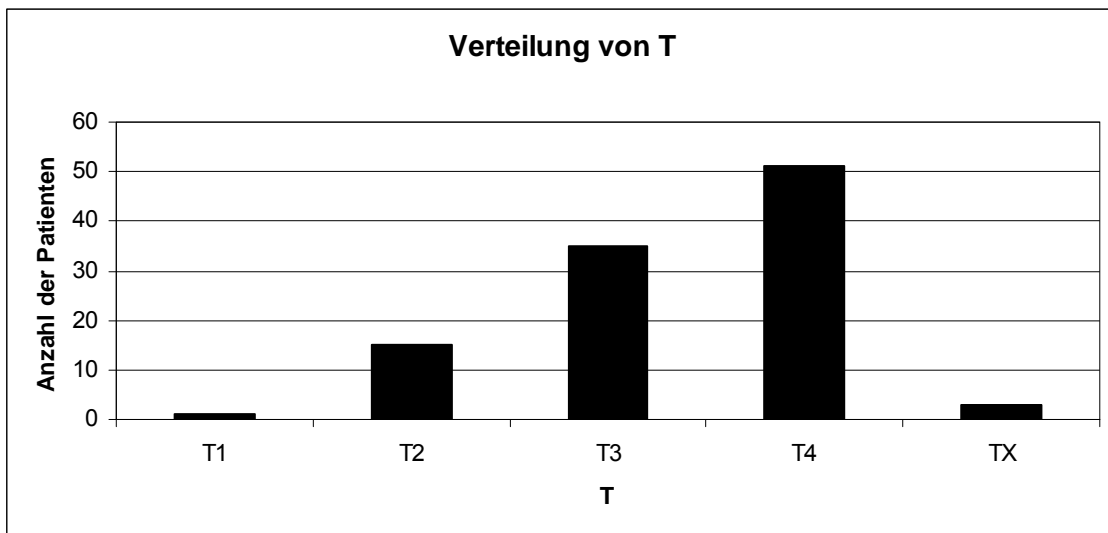
Die Abbildung 12 zeigt den Sitz der Primarien der Patienten mittels eines Tortendiagramms. Die mit 59% häufigsten Lokalisationen waren bei diesem Patientenkollekt Larynx und Hypopharynx, wobei diese Positionen nochmals in verschiedene Unterkategorien unterteilt wurden. An zweiter Stelle mit 25% folgte der Oropharynx. Die anderen Lokalisationen waren seltener vertreten: Die Mundhöhle mit 10% und Nasopharynx, Ösophagus und das Cup-Syndrom jeweils mit 2%.



**Abbildung 12:** Verteilung der Hauptlokalisierung der Primarien in einem Tortendiagramm mit angegebener Prozentzahl der Häufigkeit der Lokalisation in der gesamten untersuchten Population.

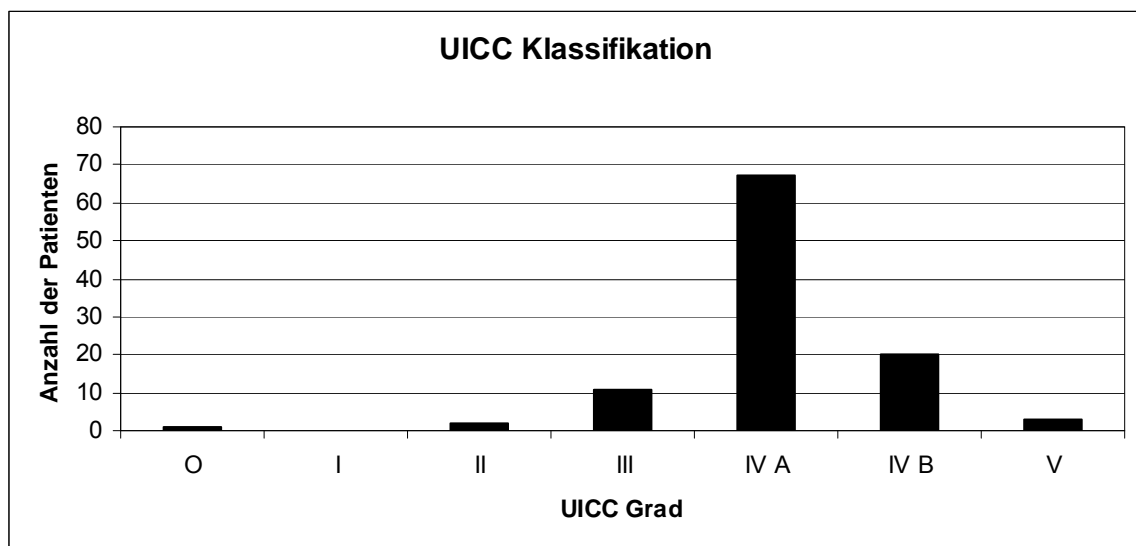
Alle Patienten durchliefen das Staging und wurden TNM klassifiziert. Die Abbildung 13 zeigt die Verteilung von T, N und M bei der vorliegenden Patientenpopulation. Nur 1 Patient hatte einen T1 Tumor. 15 Patienten hatten einen T2 Tumor, 35 einen T3 Tumor. Bei 51 Patienten, der größten Gruppe, zeigte sich ein T4 Tumor. Bei 3 Patienten konnte das Tumorstadium nicht eingeteilt werden, sie sind unter TX aufgeführt. Bei 19 Patienten wurden keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen (Stadium N0). 10 Patienten hatten Stadium N1. 63 Patienten und somit am meisten Patienten waren dem Stadium N2 zuzuordnen, welches sich noch in a, b und c aufteilt. Von diesen drei Unterteilungen war c die am häufigsten Vertretene. 12 Patienten hatten ein N3

Stadium. Bei 3 Patienten lagen bereits Fernmetastasen vor. Alle anderen Patienten hatten zum Zeitpunkt des Stagings keine Fernmetastasen.

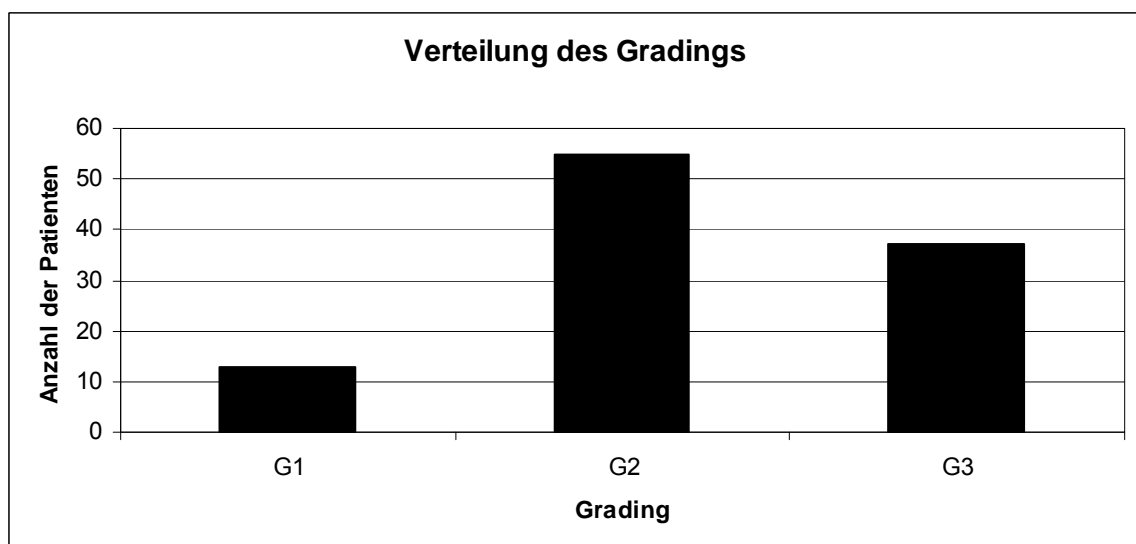


**Abbildung 13:** Drei Säulendiagramme zur TNM-Klassifikation: Das obere zeigt die Einteilung der T-Klassifikation, das mittlere die N-Klassifikation und das untere zeigt die Verteilung von M bei der untersuchten Patientenpopulation.

Die Verteilung der UICC-Klassifikation bei den Patienten dieser Arbeit ist in der Abbildung 14 zu sehen. Ein Patient befand sich im UICC-Stadium 0. Keine Patienten waren dem UICC-Stadium I zuzuteilen. Es ist nur zur Vollständigkeit aufgeführt. 2 Patienten waren UICC-Stadium II klassifiziert. 11 Patienten wurden dem UICC-Stadium III zugeordnet. Der größte Teil mit 86 Patienten befand sich im Stadium IV, wobei noch A (67 Patienten) und B (20 Patienten) unterschieden wurden. Drei Patienten wurden dem UICC-Stadium V zugeordnet.



**Abbildung 14:** Das Säulendiagramm zeigt die UICC-Klassifikation der untersuchten Patienten.

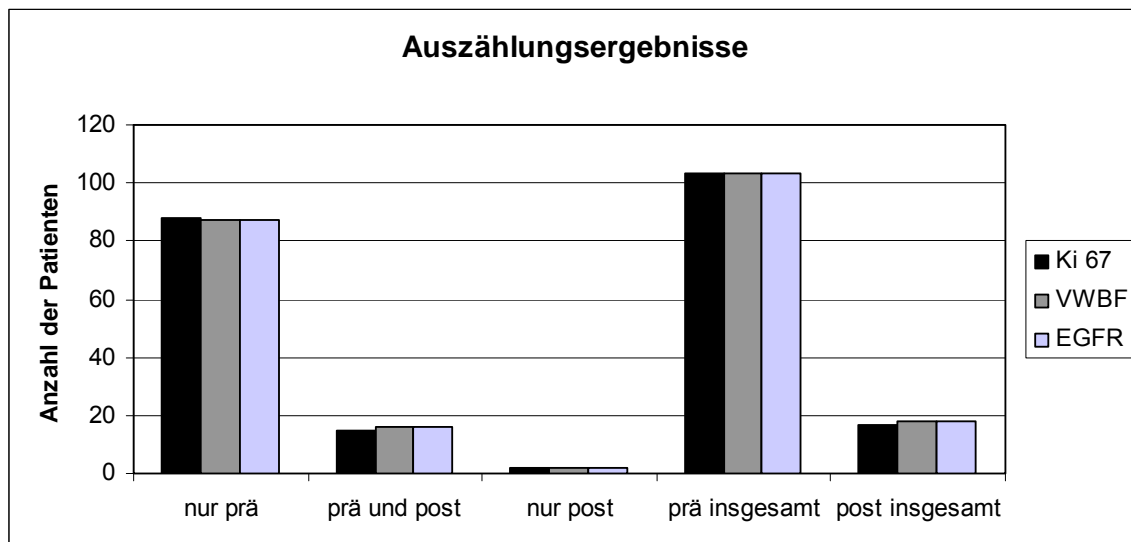


**Abbildung 15:** Durch ein Säulendiagramm ist die Verteilung des Grading dargestellt.

In der Abbildung 15 wird das Grading der histopathologischen Proben aus der Tumorregion vor Beginn der Therapie dargestellt. 13 Patienten hatten einen gut differenzierten Tumor entsprechend G1. 55 Patienten und somit die meisten hatten einen mäßig differenzierten Tumor, also G2. Danach folgten 37 Patienten, die einen gering differenzierten Tumor G3 hatten.

### 3.2 Die Auszählungsergebnisse

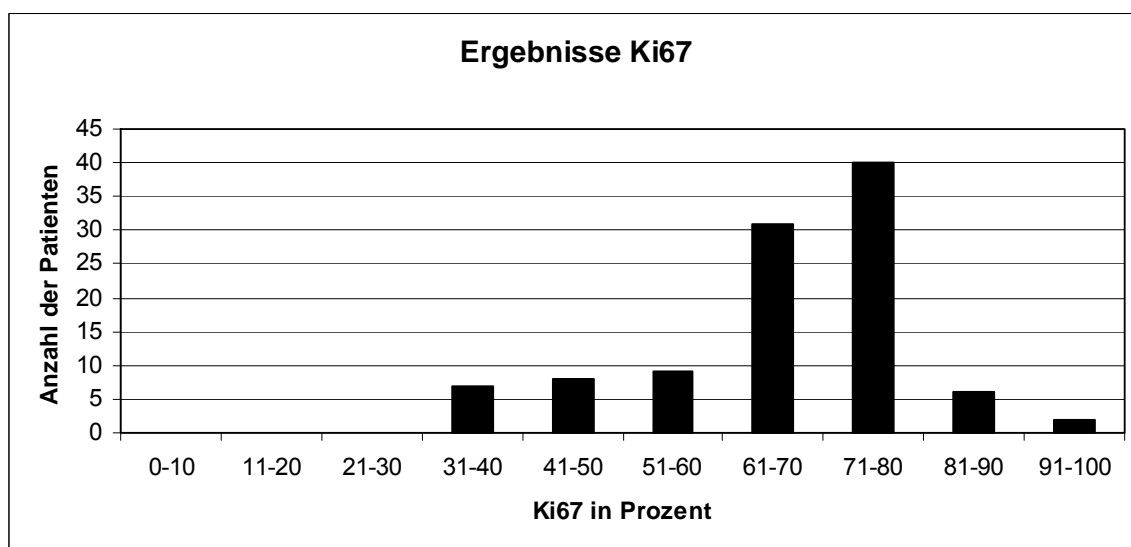
Von allen 105 Patienten wurden die im Institut für Pathologie vorhandenen Proben vor und nach Chemotherapie angefordert, geschnitten, gefärbt und bewertet. Es wurden aber nur Präparate mit Tumorarealen zur Auszählung herangezogen. Die Abbildung 16 gibt die Anzahl an Präparaten wieder, die für die einzelnen Färbungen ausgezählt werden konnten. Es zeigte sich, dass nach der Chemotherapie, in den meisten Schnitten kein Tumor mehr nachweisbar war und so keine Auszählungen möglich. Nur 17 Schnitte konnten nach der Therapie ausgezählt werden. Dies waren zudem sehr kleine Präparate, bei denen oft keine 10 Gesichtsfelder ausgezählt werden konnten. Ein Präparat war sogar so klein, dass es nicht mal für alle drei Färbungen herangezogen werden konnte.



**Abbildung 16:** Durch verschiedene Säulendiagramme sind die Anzahl der Auszählungsergebnisse dargestellt. Die erste Säule zeigt die Anzahl der Präparate, die nur vor Chemotherapie ausgezählt werden konnten, die zweite die, die vor und nach, und die dritte die, die nur nach Chemotherapie auszählbar waren. Die vierte Säule fasst alle auszählbaren Präparate vor und die fünfte alle nach Chemotherapie zusammen.

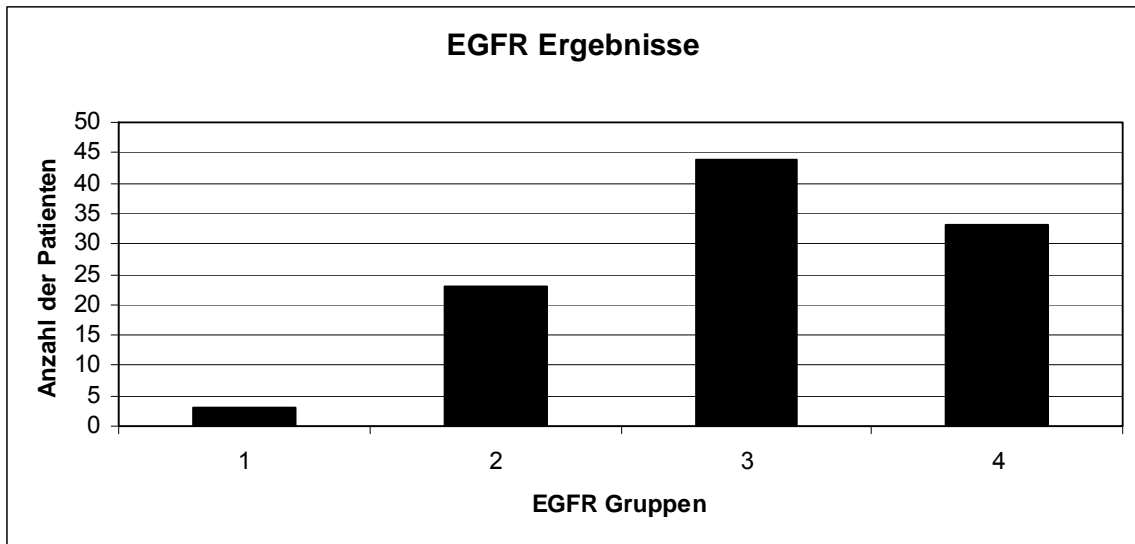
Auf Grund der geringen Anzahl der Präparate und ihrer kleinen Größe wurde die Ergebnisse der Präparate nach der Chemotherapie nicht weiter zu Auswertung verwendet. Im Folgenden werden die Auszählungsergebnisse für die drei histologischen Färbungen von den Schnitten vor der Chemotherapie besprochen und graphisch dargestellt.

Bei den Auszählungsergebnissen der Ki67-Färbung sieht man, dass bei keinem der Patienten im Tumorbereich ein Proliferationsindex (=Ki67 positive Zellen) unter 30% ausgezählt wurde. Die folgenden Stufen von 31-40%, 41-50% und 51-60% waren jeweils mit ca. 8% vertreten. Mit ungefähr 70% wurde bei den meisten Patienten ein Proliferationsindex zwischen 61 und 80% ausgezählt. 30% nämlich hatten einen Prozentsatz zwischen 61 und 70% und 40% hatten einen Prozentsatz der zwischen 71 und 80% lag. Einen Proliferationsindex von 81-90% hatten ca. 6% der Patienten und nur 2% hatten einen Proliferationsindex zwischen 91-100%. Die Ergebnisse sind abgebildet durch ein Säulendiagramm in Abbildung 17.



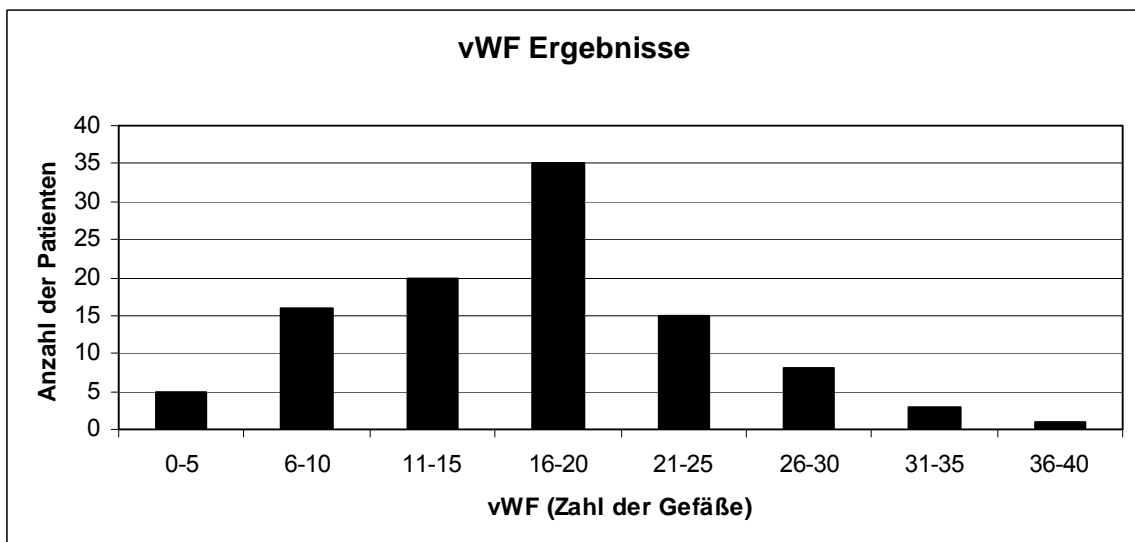
**Abbildung 17:** Auszählungsergebnisse der Ki67-Färbung eingeteilt in Intervalle und verdeutlicht durch ein Säulendiagramm. Ki67 positive Zellen in Prozent können auch als Proliferationsindex bezeichnet werden.

Bei der Auswertung der EGFR-Expressionsgruppen (siehe Abbildung 18) zeigte sich, dass die Gruppe 3 (mäßige Expression) in dieser Patientenpopulation mit 43% am häufigsten vertreten war. Mit 32% folgte die Gruppe 4 (starke Expression). 22% wurden der Gruppe 2 (geringe Expression) zugeordnet. In Gruppe 1 (keine Expression) waren nur 3%.



**Abbildung 18:** EGFR-Expression eingeteilt in vier Gruppen dargestellt mittels Säulendiagramm.

Bei den vWF Färbungen lagen die ausgezählten Werte zwischen 0 und 40 Gefäße pro Gesichtsfeld. Bei 34% der Patienten wurden zwischen 16 und 20 Gefäße ausgezählt. Bei ungefähr 20% der Patienten wurden zwischen 11 und 15 Gefäßen ausgezählt. Die Gruppen 6-10 Gefäße und 21-25 Gefäße waren jeweils mit ungefähr 15% vertreten. Bei 8% wurden zwischen 26-30 Gefäßen ausgezählt. In den anderen Gruppen waren jeweils nur weniger als 5% der Patienten. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Auszählungsergebnisse der Gefäße pro Gesichtsfeld mittels vWF-Färbung eingeteilt in Intervalle und verdeutlicht durch ein Säulendiagramm.

### 3.3 Korrelationsübersicht mit T-, N- und UICC-Stadium sowie dem histologischen Grading

Zu Beginn der Auswertung wurde eine Korrelation nach Spearman mit den Daten T-Stadium, N-Stadium, UICC-Stadium und dem histopathologischen Grading sowie den drei erhobenen Markern durchgeführt, um eine Übersicht über mögliche Ergebnisse zu erhalten (siehe Tabelle 11).

Das T-Stadium korrelierte signifikant mit dem N- und dem UICC-Stadium und umgekehrt. Die Korrelation von T und N mit dem UICC-Stadium ist dabei jeweils eine abhängige Korrelation.

Das Grading korrelierte mit keinem der getesteten Werte signifikant.

Keiner der drei ausgezählten Marker korrelierte mit den hier getesteten Werten signifikant. Die Korrelation der Marker untereinander wird im nächsten Kapitel noch einmal genauer verdeutlicht und besprochen.

		T	N	UICC	Grading	Ki67	EGFR	vWF
T	Korrelationskoeffizient	1.000	.207(*)	.302(**)	.141	.090	-.019	-.165
	Sig. (2-seitig)	.	.035	.002	.151	.367	.852	.096
	N	105	104	105	105	102	103	103
N	Korrelationskoeffizient	.207(*)	1.000	.528(**)	-.045	.049	.150	.052
	Sig. (2-seitig)	.035	.	.000	.649	.625	.133	.604
	N	104	104	104	104	101	102	102
UICC	Korrelationskoeffizient	.302(**)	.528(**)	1.000	-.016	.064	-.051	-.001
	Sig. (2-seitig)	.002	.000	.	.873	.526	.609	.989
	N	105	104	105	105	102	103	103
Grading	Korrelationskoeffizient	.141	-.045	-.016	1.000	.122	.023	.078
	Sig. (2-seitig)	.151	.649	.873	.	.223	.821	.436
	N	105	104	105	105	102	103	103
Ki67	Korrelationskoeffizient	.090	.049	.064	.122	1.000	.072	.267(**)
	Sig. (2-seitig)	.367	.625	.526	.223	.	.472	.007
	N	102	101	102	102	102	102	102
EGFR	Korrelationskoeffizient	-.019	.150	-.051	.023	.072	1.000	.290(**)
	Sig. (2-seitig)	.852	.133	.609	.821	.472	.	.003
	N	103	102	103	103	102	103	103
vWF	Korrelationskoeffizient	-.165	.052	-.001	.078	.267(**)	.290(**)	1.000
	Sig. (2-seitig)	.096	.604	.989	.436	.007	.003	.
	N	103	102	103	103	102	103	103

\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

**Tabelle 11:** Korrelationsübersicht zwischen den Werten T, N, UICC, Grading, Ki67, EGFR, vWF. Die signifikanten Korrelationen sind rot hervorgehoben und mit den Sternchen ist das Signifikanzniveau zu erkennen.

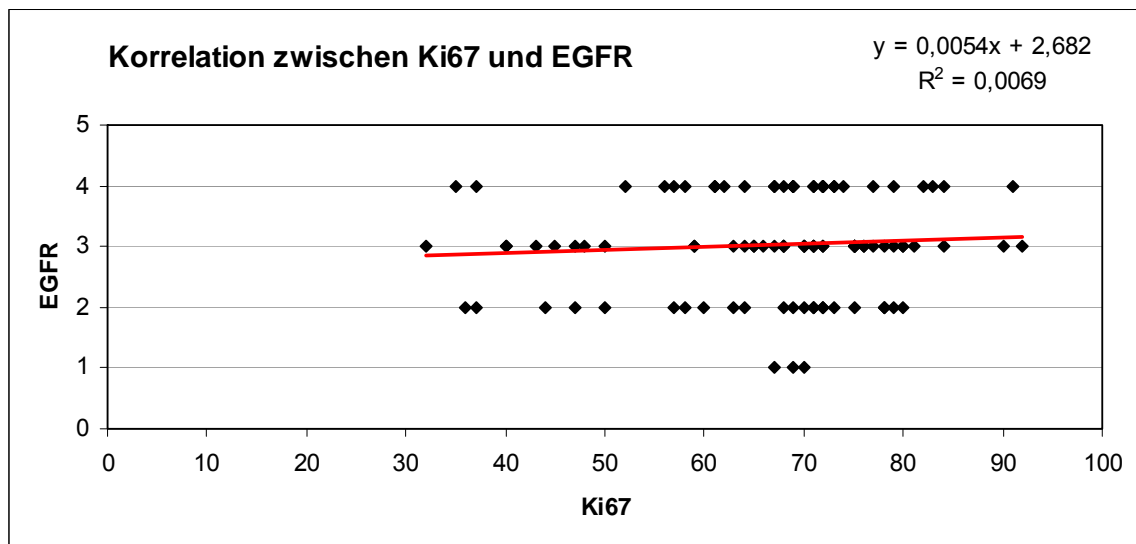


### 3.4 Korrelation der drei Marker untereinander

#### 3.4.1 Korrelation zwischen Ki67 und EGFR

Zwischen Ki67 und EGFR lag keine signifikante Korrelation vor. Der berechnete Korrelationskoeffizient lag lediglich bei 0,072 ( $p = 0,472$ ), wie der Tabelle 12 zu entnehmen ist.

In der Abbildung 20 lässt sich eine leichte Tendenz der Regressionsgeraden zu einer positiven Korrelation ablesen, wie durch den Korrelationskoeffizient zu erwarten. Bei mehr Ki67-positiven Zellen bestand auch eine etwas höhere Expression von EGFR.



**Abbildung 20:** Korrelation zwischen Ki67 und EGFR mit der linearen Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.

			Ki67	EGFR
Spearman-Rho	Ki67	Korrelationskoeffizient	1.000	.072
		Sig. (2-seitig)	.	.472
		N	102	102
	EGFR	Korrelationskoeffizient	.072	1.000
		Sig. (2-seitig)	.472	.
		N	102	103

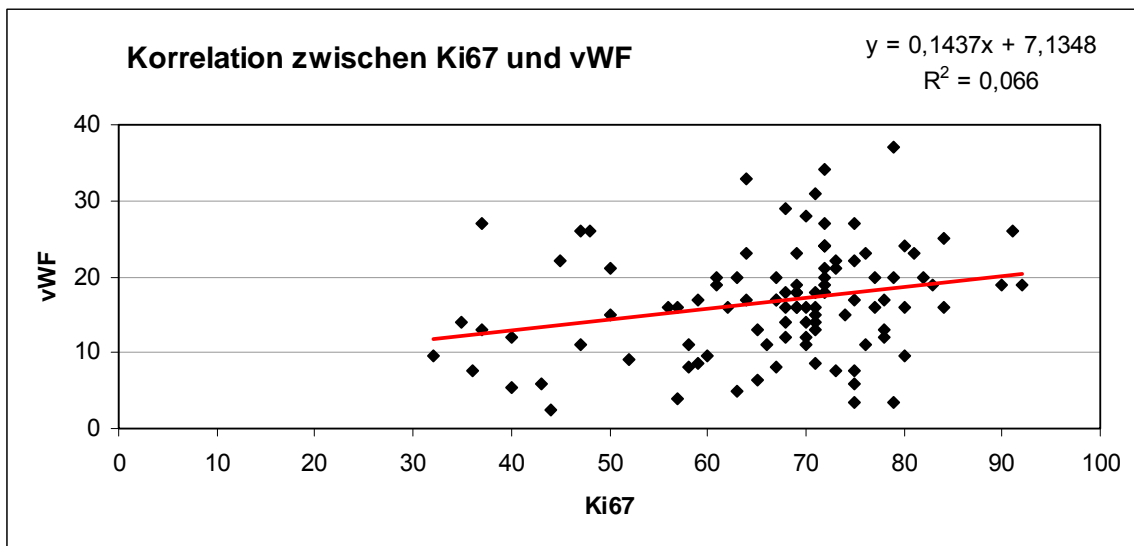
**Tabelle 12:** Korrelation nach Spearman zwischen Ki67 und EGFR. Die Korrelation ist nicht signifikant ( $p = 0,472$ ).

### 3.4.2 Korrelation zwischen Ki67 und vWF

Zwischen Ki67 und vWF lag eine signifikante Korrelation vor. Die Korrelation war positiv und wie der Tabelle 13 zu entnehmen ist lag der Korrelationskoeffizient bei 0,267. Der p-Wert lag bei 0,007. Somit lag das Signifikanzniveau also bei 0,01.

In der Abbildung 21 lässt sich die positive Korrelation an der Regressionsgeraden ablesen. Bei mehr Ki67-positiven Zellen bestand auch eine größere Anzahl von mit vWF angefärbten Gefäßen.

Abbildung 21 zeigt die Korrelation zwischen Ki67 und vWF mit der zugehörigen Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.



**Abbildung 21:** Korrelation zwischen Ki67 und vWF mit der Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.

			Ki67	vWF
Spearman-Rho	Ki67	Korrelationskoeffizient	1.000	.267(**)
		Sig. (2-seitig)	.	.007
		N	102	102
	vWF	Korrelationskoeffizient	.267(**)	1.000
		Sig. (2-seitig)	.007	.
		N	102	103

**Tabelle 13:** Korrelation nach Spearman zwischen Ki67 und vWF.

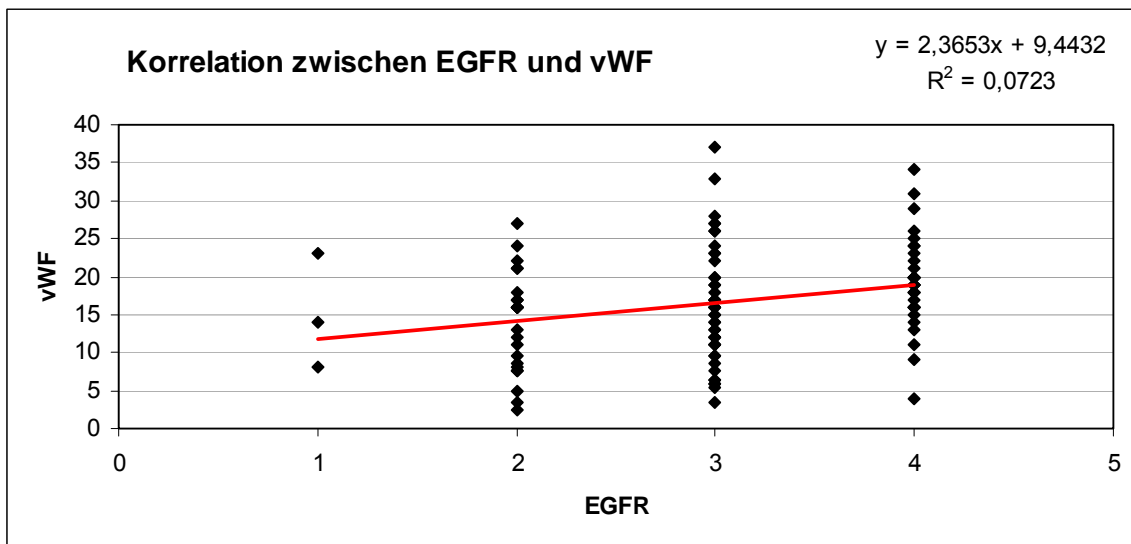
\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

### 3.4.3 Korrelation zwischen EGFR und vWF

Zwischen EGFR und vWF lag eine signifikante Korrelation vor. Die Korrelation war positiv und, wie der Tabelle 14 zu entnehmen ist, lag der Korrelationskoeffizient bei 0,29. Der p-Wert lag bei 0,003. Somit lag das Signifikanzniveau also bei 0,01.

In der Abbildung 22 lässt sich die positive Korrelation an der Regressionsgeraden ablesen. Bei höherer Expression von EGFR bestand auch eine größere Anzahl von mit vWF angefärbten Gefäßen.

Abbildung 22 zeigt die Korrelation zwischen EGFR und vWF mit der zugehörigen Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.



**Abbildung 22:** Korrelation zwischen EGFR und vWF mit der Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.

			EGFR	vWF
Spearman-Rho	EGFR	Korrelationskoeffizient	1.000	.290(**)
		Sig. (2-seitig)	.	.003
		N	103	103
	vWF	Korrelationskoeffizient	.290(**)	1.000
		Sig. (2-seitig)	.003	.
		N	103	103

**Tabelle 14:** Korrelation nach Spearman zwischen EGFR und vWF.

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

### 3.4.4 Zusammenfassung zur Korrelation der Marker untereinander

Die Tabelle 15 fasst die Korrelationen nach Spearman zwischen den drei untersuchten histologischen Markern und deren Signifikanzniveaus zusammen.

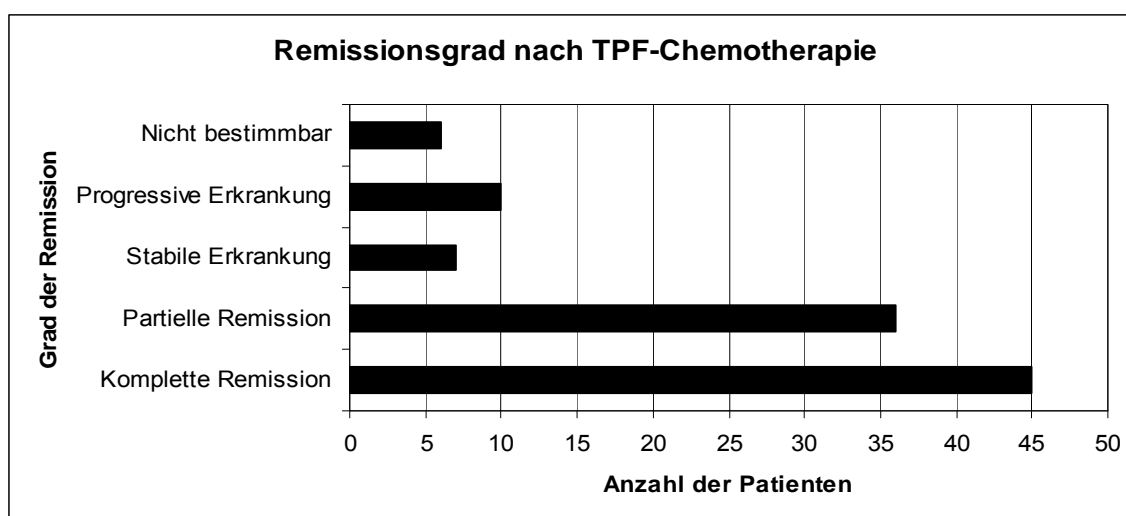
			vWF	Ki67	EGFR
SpearmanRho	vWF	Korrelationskoeffizient	1.000	.267(**)	.290(**)
		Sig. (2-seitig)	.	.007	.003
		N	103	102	103
	Ki67	Korrelationskoeffizient	.267(**)	1.000	.072
		Sig. (2-seitig)	.007	.	.472
		N	102	102	102
	EGFR	Korrelationskoeffizient	.290(**)	.072	1.000
		Sig. (2-seitig)	.003	.472	.
		N	103	102	103

**Tabelle 15:** Korrelationen nach Spearman zwischen Ki67, EGFR und vWF.

\*\*Die Korrelationen sind auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

### 3.5 Korrelation der Marker mit dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie

In der Abbildung 23 ist der Remissionsgrad der in dieser Studie untersuchten Patientenpopulation nach TPF-Induktionschemotherapie dargestellt. 43% der Patienten hatten eine komplette Remission (Remissionsgrad 1) und 35% hatten eine partielle (Remissionsgrad 2). 6% hatten eine stabile (Remissionsgrad 3) und 10% eine progressive Erkrankung (Remissionsgrad 4). Bei den restlichen 6% war der Grad der Remission aus verschiedenen Gründen nicht bestimmbar. Diese 6% wurden bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

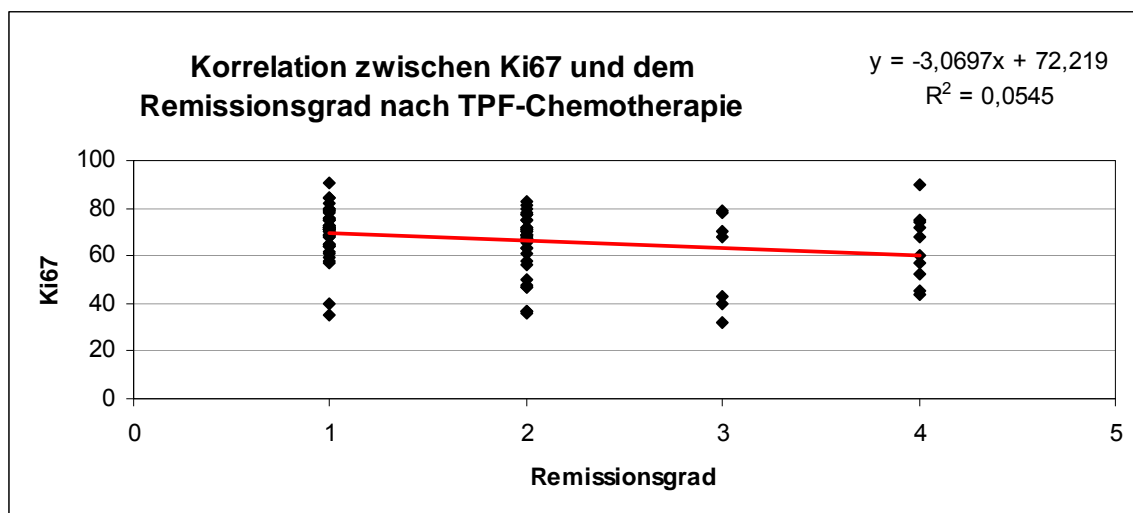


**Abbildung 23:** Remissionsgrade der Patientenpopulation nach TPF-Induktionschemotherapie dargestellt durch ein Balkendiagramm.

### 3.5.1 Korrelation zwischen Ki67 und dem Remissionsgrad

Zwischen Ki67 und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie lag eine signifikante Korrelation vor. Die Korrelation war negativ und wie der Tabelle 16 zu entnehmen ist lag der Korrelationskoeffizient bei  $-0,22$ . Der p-Wert lag bei  $0,026$ . Somit lag das Signifikanzniveau also bei  $0,05$ .

In der Abbildung 24 lässt sich die negative Korrelation an der Regressionsgeraden ablesen. Bei mehr Ki67-positiven Zellen bestand ein niedrigerer (also besserer) Remissionsgrad. Abbildung 24 zeigt die Korrelation zwischen Ki67 und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie mit der zugehörigen Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.



**Abbildung 24:** Korrelation zwischen Ki67 und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie mit der Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.

			Ki67	Remissionsgrad nach Chemo
Spearman -Rho	Ki67	Korrelationskoeffizient	1.000	-.220(*)
		Sig. (2-seitig)	.	.026
		N	102	102
	Remissionsgrad nach Chemo	Korrelationskoeffizient	-.220(*)	1.000
		Sig. (2-seitig)	.026	.
		N	102	105

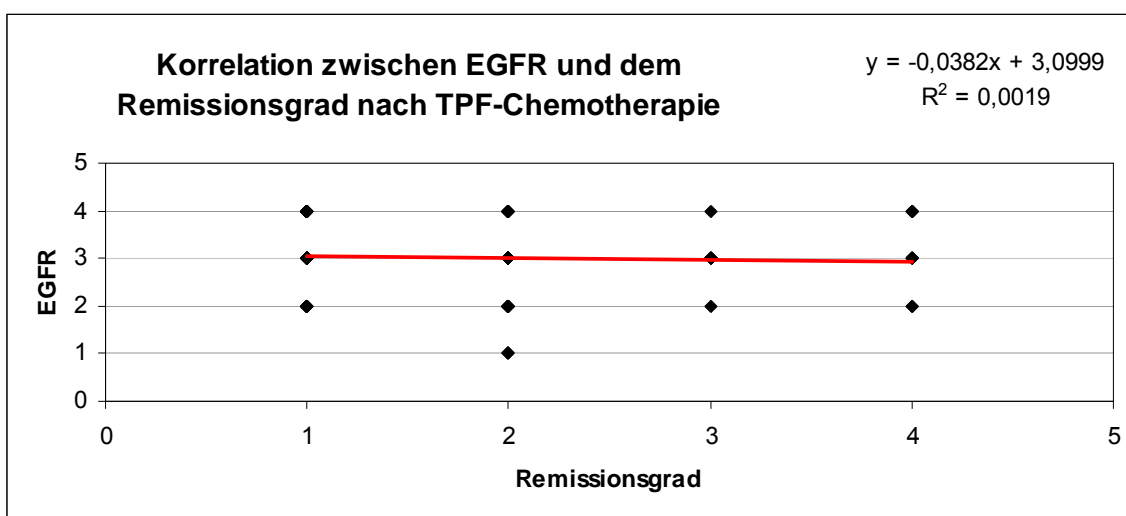
**Tabelle 16:** Korrelation nach Spearman zwischen Ki67 und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie.

\*\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von  $0,05$  (2-seitig) signifikant.

### 3.5.2 Korrelation zwischen EGFR und dem Remissionsgrad

Zwischen EGFR und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie lag keine signifikante Korrelation vor. Die Korrelation war negativ und wie der Tabelle 17 zu entnehmen ist lag der Korrelationskoeffizient bei  $-0,077$ . Der p-Wert lag bei  $0,441$ .

In der Abbildung 25 lässt sich eine leichte Tendenz der Regressionsgeraden zu einer negativen Korrelation ablesen, wie durch den Korrelationskoeffizient zu erwarten. Bei höherer Expression von EGFR bestand auch ein etwas höherer (also schlechterer) Remissionsgrad.



**Abbildung 25:** Korrelation zwischen EGFR und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie mit der Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß

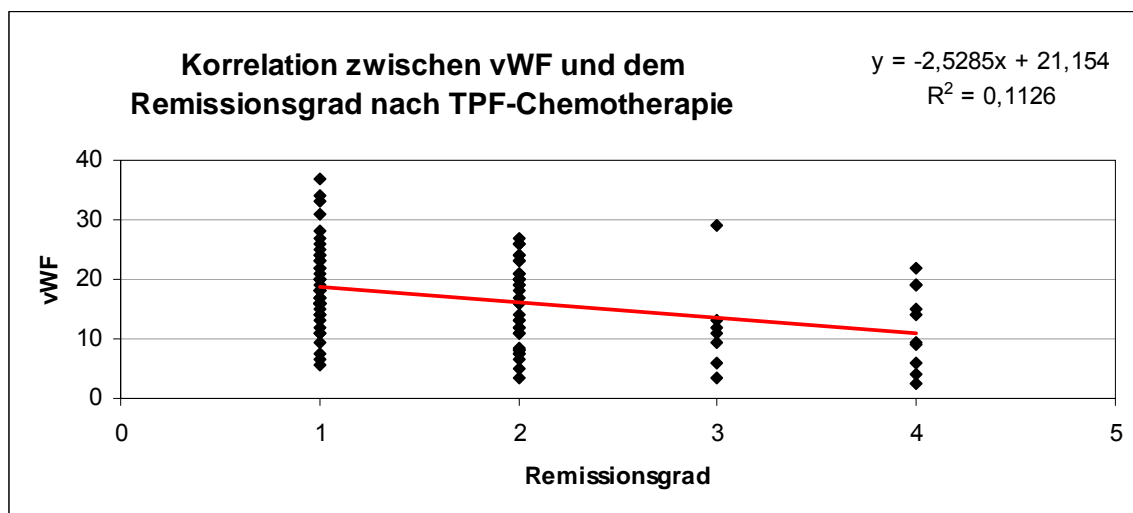
			EGFR	Remissionsgrad nach Chemo
Spearman-Rho	EGFR	Korrelationskoeffizient	1.000	-.077
		Sig. (2-seitig)	.	.441
		N	103	103
	Remissionsgrad nach Chemo	Korrelationskoeffizient	-.077	1.000
		Sig. (2-seitig)	.441	.
		N	103	105

**Tabelle 17:** Korrelation nach Spearman zwischen EGFR und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie. Die Korrelation ist nicht signifikant ( $p = 0,441$ ).

### 3.5.3 Korrelation zwischen vWF und dem Remissionsgrad

Zwischen vWF und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie lag eine signifikante Korrelation vor. Die Korrelation war negativ und wie der Tabelle 18 zu entnehmen ist lag der Korrelationskoeffizient bei -0,262. Der p-Wert lag bei 0,008. Somit lag das Signifikanzniveau also bei 0,01.

In der Abbildung 26 lässt sich die negative Korrelation an der Regressionsgeraden ablesen. Bei größerer Anzahl von mit vWF-angefärbten Gefäßen bestand ein niedrigerer (also besserer) Remissionsgrad. Abbildung 26 zeigt die Korrelation zwischen vWF und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie mit der zugehörigen Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.



**Abbildung 26:** Korrelation zwischen vWF und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie mit der Regressionsgeraden, ihrer Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß.

			vWF	Remissionsgrad nach Chemo
Spearman-Rho	vWF	Korrelationskoeffizient	1.000	-.262(**)
		Sig. (2-seitig)	.	.008
		N	103	103
	Remissionsgrad nach Chemo	Korrelationskoeffizient	-.262(**)	1.000
		Sig. (2-seitig)	.008	.
		N	103	105

**Tabelle 18:** Korrelation nach Spearman zwischen vWF und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie.

\*\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

### 3.6 Multinominale logistische Regression zum Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie

Mit der multinominalen logistischen Regression wurden zwei Modelle zur Vorhersage des Remissionsgrades angepasst. Durch eine vom System erstellte Formel aus den berücksichtigten Werten wurde für jeden Patienten ein Remissionsgrad vorhergesagt und dann mit dem tatsächlichen Remissionsgrad verglichen. So konnte der Prozentsatz, der richtig vorhergesagten Werte einen Anhalt zur Güte des so entstanden Modells geben.

Die Chi-Quadrat-Statistik stellte die Differenz der -2 Log-Likelihoods zwischen dem endgültigen Modell und einem reduziertem Modell dar. Das reduzierte Modell wurde berechnet, indem ein Effekt aus dem endgültigen Modell weggelassen wurde. Hierbei lag die Nullhypothese zugrunde, nach der alle Parameter dieses Effekts 0 betragen würden.

Die untersuchten Werte T, N, Ki67, vWF und EGFR hatten einen signifikanten Effekt auf den Remissionsgrad. Dabei lag der p-Wert für T bei 0,001, der p-Wert von N bei 0,01. Für Ki67 liegt der p-Wert bei 0,025, für vWF bei 0,035 und für EGFR bei 0,03 (siehe Tabelle 19).

Effekt	-2 Log-Likelihood für reduziertem Modell	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Konstanter Term	167.412	.561	3	.905
T	184.110	17.259	3	.001
N	178.115	11.264	3	.010
Ki67	176.223	9.372	3	.025
vWF	175.485	8.634	3	.035
EGFR	175.794	8.943	3	.030

**Tabelle 19:** Effekt, -2Log-Likelihood für reduziertem Modell, Chi-Quadrat, Freiheitsgrade, Signifikanz von T, N, Ki67, vWF und EGFR verdeutlicht in einer Tabelle.

Bei dem ersten Modell (siehe Tabelle 20) wurden die Werte für T, N, Ki67, EGFR und vWF berücksichtigt. Für den Remissionsgrad 1 bestand dann eine richtige Vorhersagewahrscheinlichkeit von 76,1%, für den Remissionsgrad 2 bestand eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 72,7%. Für die Gruppe 3



bestand lediglich eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 14,3% und für die Gruppe 4 von 10%.

Insgesamt wurden 63,5% der Werte für die untersuchte Patientenpopulation richtig vorhergesagt.

Beobachteter Remissionsgrad	Vorhergesagter Remissionsgrad				Prozent richtig
	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	
Grad 1	35	9	0	2	76.1%
Grad 2	9	24	0	0	72.7%
Grad 3	2	4	1	0	14.3%
Grad 4	4	4	1	1	10.0%
Prozent insgesamt	52.1%	42.7%	2.1%	3.1%	63.5%

**Tabelle 20:** Beobachteter Remissionsgrad, Vorhergesagter Remissionsgrad, die Fallzahlen und die Prozente für Modell 1.

Beim zweiten Modell (siehe Tabelle 21) wurden die Werte für T, N und Ki67 berücksichtigt. Für den Remissionsgrad 1 bestand dann eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 82,6%, für den Remissionsgrad 2 bestand eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 69,7%. Für die Gruppe 3 bestand lediglich eine Vorhersagewahrscheinlichkeit von 14,3% und für die Gruppe 4 von 0%.

Insgesamt wurden 64,6% der Werte für die untersuchte Patientenpopulation richtig vorhergesagt.

Beobachteter Remissionsgrad	Vorhergesagter Remissionsgrad				Prozent richtig
	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4	
Grad 1	38	7	0	1	82.6%
Grad 2	10	23	0	0	69.7%
Grad 3	2	4	1	0	14.3%
Grad 4	5	5	0	0	.0%
Prozent insgesamt	57.3%	40.6%	1.0%	1.0%	64.6%

**Tabelle 21:** Beobachteter Remissionsgrad, Vorhergesagter Remissionsgrad, die Fallzahlen und die Prozente für Modell 2.

### 3.7 Vergleich der Hauptlokalisationen

Der Einfluss der Lokalisation des Tumors wurde für die Hauptlokalisationen Oropharynx, Hypopharynx, Hypopharynx und Larynx und Larynx untersucht.

Die Gruppe Oropharynx hatte in der untersuchten Patientenpopulation 27 Patienten. Die Gruppe Hypopharynx bestand nur aus 10 Patienten. Die Gruppe bei der sowohl der Hypopharynx als auch der Larynx betroffen waren bestand aus 22 Patienten. 29 Patienten wurden der Gruppe Larynx zugeordnet. Diese Gruppe setzt sich aus der Unterteilung supraglottisch (18 Patienten), glottisch (6 Patienten), subglottisch (2 Patienten) und transglottisch (3 Patienten) zusammen.

Es wurden Unterschiede zwischen der Ausprägung von Ki67, EGFR und vWF und dem Remissionsgrad nach TFF-Induktionschemotherapie untersucht.

#### 3.7.1 Unterschiede in der Ausprägung von Ki67

Für die Ausprägung von Ki67 wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Gruppen unterschiedlicher Lokalisation festgestellt. Der p-Wert betrug 0,284 (siehe Tabelle 22).

	Ki67
Chi-Quadrat	3.796
Freiheitsgrade (Df)	3
Asymptotische Signifikanz	.284

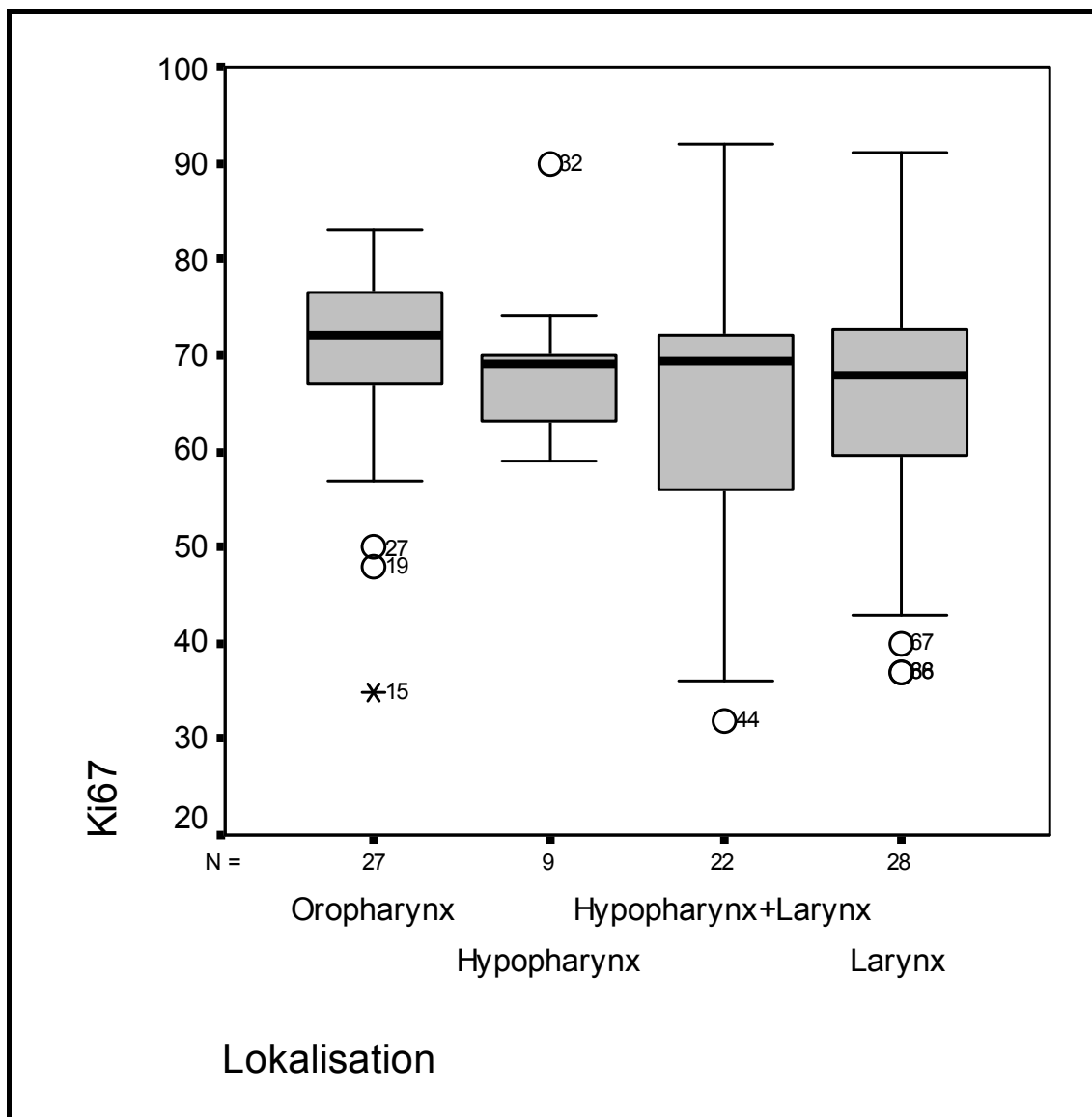
**Tabelle 22:** Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests für die Ausprägung von Ki67.

An der Rangverteilung lässt sich ablesen, dass die Hypopharynx-+Larynx-Gruppe die niedrigsten Werte für Ki-67 aufwies. Danach folgten mit etwas höheren Ausprägungen die Larynx- und dann die Hypopharynx-Gruppe. Die Oropharynx Gruppe hatte die höchste Ausprägung von Ki67 (siehe Tabelle 23).

	GRUPPE	N	Mittlerer Rang
Ki67	Oropharynx	27	51.15
	Hypopharynx	9	42.17
	Hypopharynx + Larynx	22	39.09
	Larynx	28	40.02
	Gesamt	86	

**Tabelle 23:** Ränge des Kruskal-Wallis-Tests für die Ausprägung von Ki67.

In der Abbildung 27 ist die Verteilung von Ki67 in den verschiedenen Gruppen graphisch dargestellt. Dabei sind in dem Kästchen die mittleren 50% der Werte, der schwarze Strich gibt den Median der Werte wieder und der Fehlerindikator zeigt die Schwankungsbreite der Werte. Ausreißerwerte werden durch Punkte verdeutlicht. Man sieht, dass der Median von Ki67 für die Oropharynx-Gruppe etwas höher lag als bei den anderen Gruppen. Die Schwankungsbreite der Werte für die Gruppe war auch deutlich kleiner als bei der Hypopharynx-+Larynx- und der Larynx-Gruppe, obwohl die Gruppen etwa gleich groß sind. Die nachzuweisenden Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht groß genug um Signifikanz zu erreichen.



**Abbildung 27:** Boxplot für die Verteilung von Ki67 bei den vier Lokalisationsgruppen.

### 3.7.2 Unterschiede in der Ausprägung von EGFR

Für die Ausprägung von EGFR wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Gruppen unterschiedlicher Lokalisation festgestellt. Der p-Wert betrug 0,983 (siehe Tabelle 24).

	EGFR
Chi-Quadrat	.166
Freiheitsgrade (Df)	3
Asymptotische Signifikanz	.983

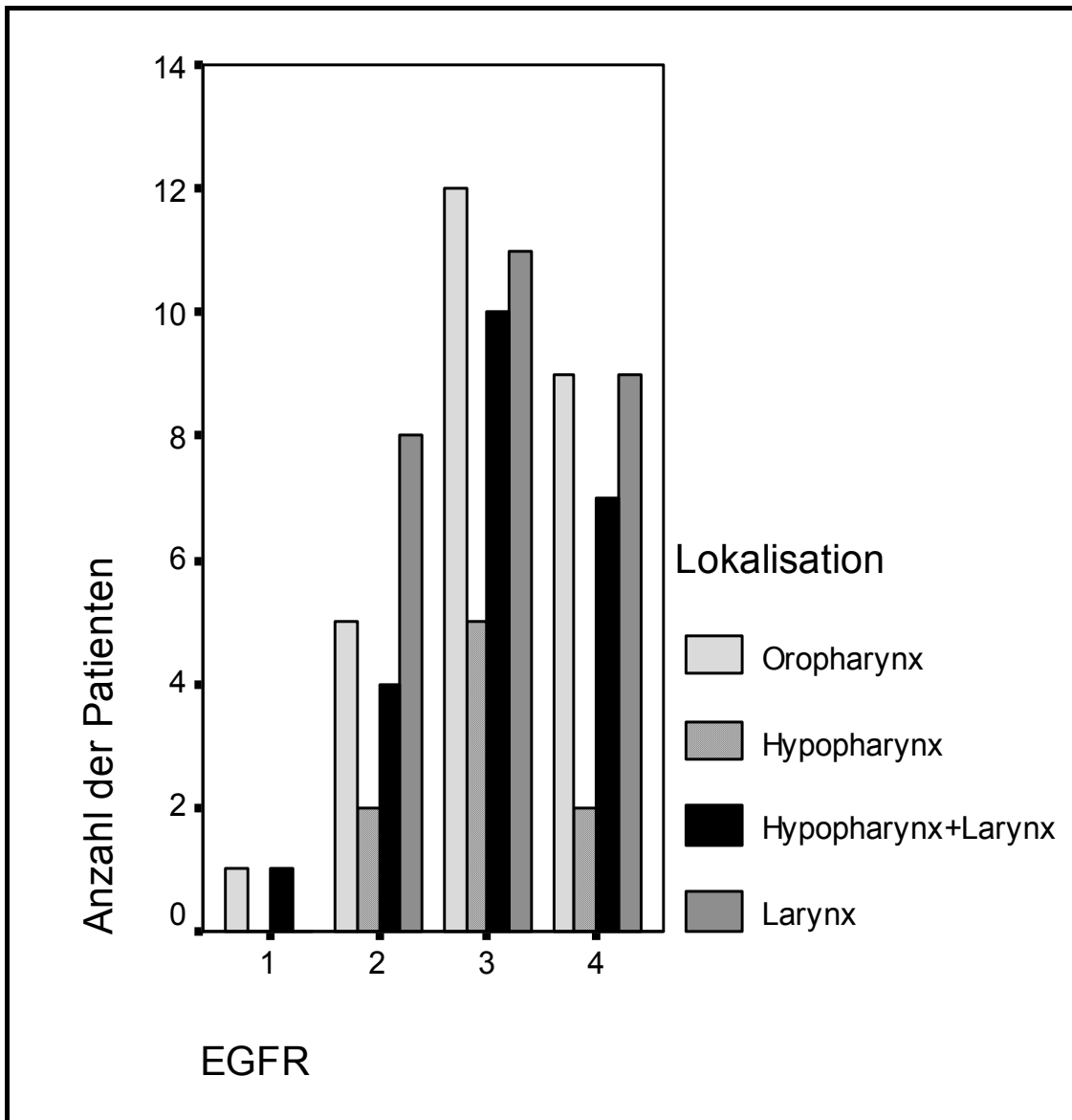
**Tabelle 24:** Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests für die EGFR-Expression.

An der Rangverteilung lässt sich ablesen, dass die Werte aller Gruppen sehr nah beieinander lagen. Die Hypopharynx-Gruppe hatte die niedrigste Expression von EGFR. Danach folgten mit etwas höheren Ausprägungen die Larynx- und dann die Hypopharynx+Larynx-Gruppe. Die Oropharynx Gruppe hatte die höchste Ausprägung von EGFR (siehe Tabelle 25).

	GRUPPE	N	Mittlerer Rang
EGFR	Oropharynx	27	44.61
	Hypopharynx	9	41.39
	Hypopharynx + Larynx	22	43.89
	Larynx	28	42.80
	Gesamt	86	

**Tabelle 25:** Ränge des Kruskal-Wallis-Tests für die EGFR-Expression.

In der Abbildung 28 sind die Ausprägungen von EGFR für die unterschiedlichen Gruppen durch ein Säulendiagramm verdeutlicht. Es zeigt sich dabei eine sehr ähnliche Verteilung bei allen vier Lokalisations-Gruppen. Die meisten Patienten waren der EGFR-Ausprägung 3 zuzuordnen unabhängig von der Lokalisation. Ausprägungsgrad 2 und 4 waren bei allen Gruppen etwas weniger häufig als Grad 3 und ungefähr gleich oft vertreten. Der Ausprägungsgrad 1 war nur selten zu finden. Insgesamt kann man sagen, dass sich eher eine Uniformität der unterschiedlichen Lokalisations-Gruppen hinsichtlich des Ausprägungsgrads von EGFR zeigte.



**Abbildung 28:** Säulendiagramm zur Verteilung der vier Ausprägungen von EGFR bei den vier unterschiedlichen Lokalisations-Gruppen.

### 3.7.3 Unterschiede in der Ausprägung von vWF

Für die Ausprägung von vWF und somit die Anzahl an Gefäßen im Präparat wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Gruppen unterschiedlicher Lokalisation festgestellt. Der p-Wert betrug 0,323 (siehe Tabelle 26).

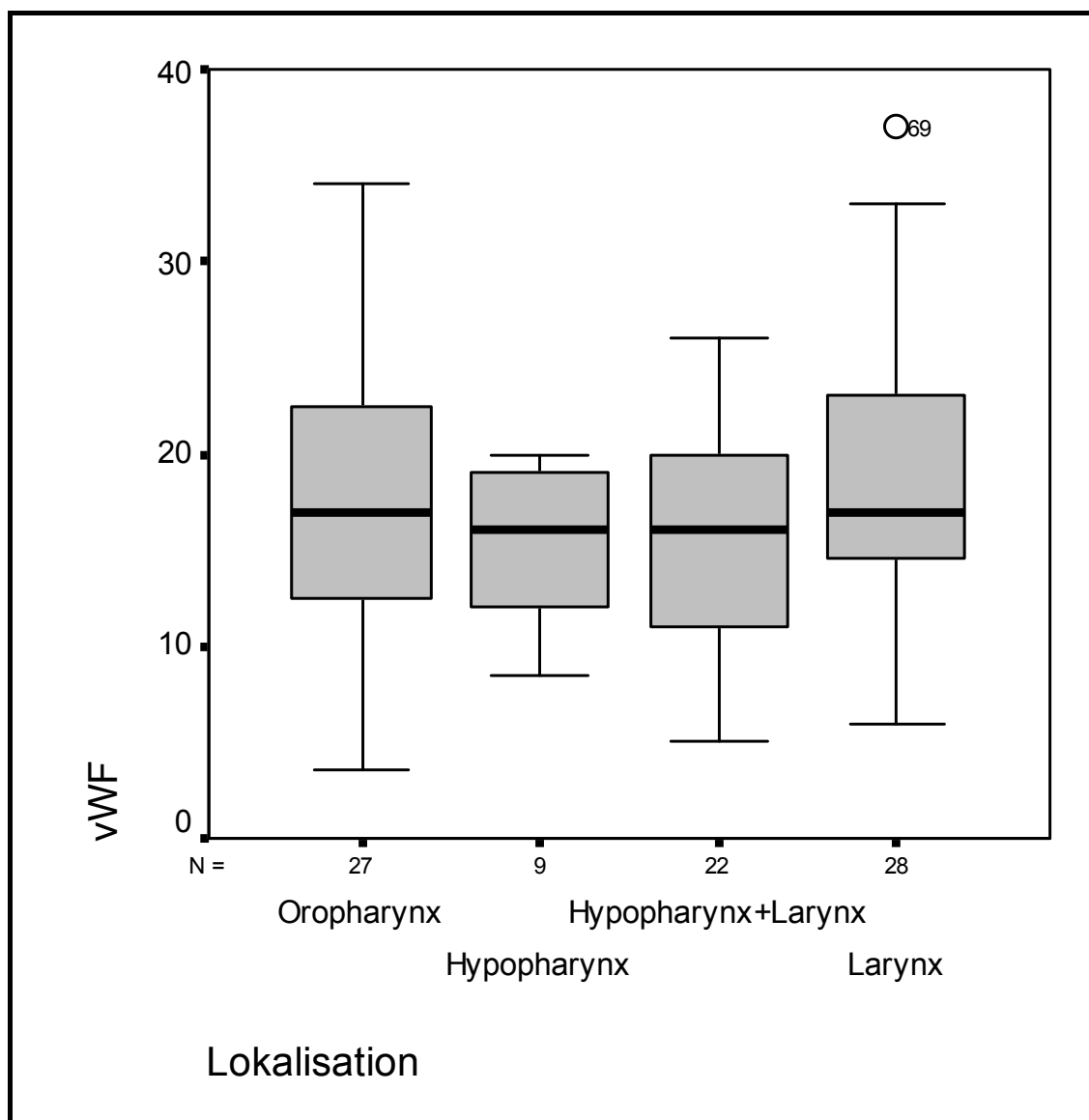
	vWF
Chi-Quadrat	3.485
Freiheitsgrade (Df)	3
Asymptotische Signifikanz	.323

**Tabelle 26:** Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests für die mit vWF angefärbten Gefäße.

An der Rangverteilung lässt sich ablesen, dass die Hypopharynx-Gruppe und die Hypopharynx+Larynx-Gruppe die niedrigste Anzahl an mit vWF-angefärbten Gefäßen im Präparat aufwiesen. Danach folgte mit höheren Ausprägungen die Oropharynx-Gruppe. Die Larynx-Gruppe hatte die höchste Ausprägung von vWF und somit die höchste Anzahl an Gefäßen im Präparat (siehe Tabelle 27).

	GRUPPE	N	Mittlerer Rang
vWF	Oropharynx	27	45.06
	Hypopharynx	9	36.72
	Hypopharynx + Larynx	22	37.34
	Larynx	28	49.02
	Gesamt	86	

**Tabelle 27:** Ränge des Kruskal-Wallis-Tests für die mit vWF angefarbten Gefäße.



**Abbildung 29:** Boxplot für die vWF-angefärbte Gefäße bei den Lokalisationsgruppen.

In der Abbildung 29 ist die Anzahl an mit vWF-angefärbten Gefäßen in den verschiedenen Gruppen graphisch dargestellt. Dabei sind in dem Kästchen die mittleren 50% der Werte, der schwarze Strich gibt den Median der Werte wieder und der Fehlerindikator zeigt die Schwankungsbreite der Werte. Ausreißerwerte werden durch Punkte verdeutlicht. Man sieht, dass der Median von vWF für die Oropharynx- und die Larynx-Gruppe etwas höher lag als für die anderen beiden Gruppen. Die Schwankungsbreite der Werte für diese beiden Gruppen war aber auch etwas größer als bei der Hypopharynx- und der Hypopharynx+Larynx-Gruppe. Die nachzuweisenden Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht groß genug um Signifikanz zu erreichen.

### 3.7.3 Unterschiede der Gruppen für den Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie

Für den Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Gruppen unterschiedlicher Lokalisation festgestellt. Der p-Wert betrug 0,126 (siehe Tabelle 28).

	Remissionsgrad nach TPF
Chi-Quadrat	5.726
Freiheitsgrade (Df)	3
Asymptotische Signifikanz	.126

**Tabelle 28:** Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests für den Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie.

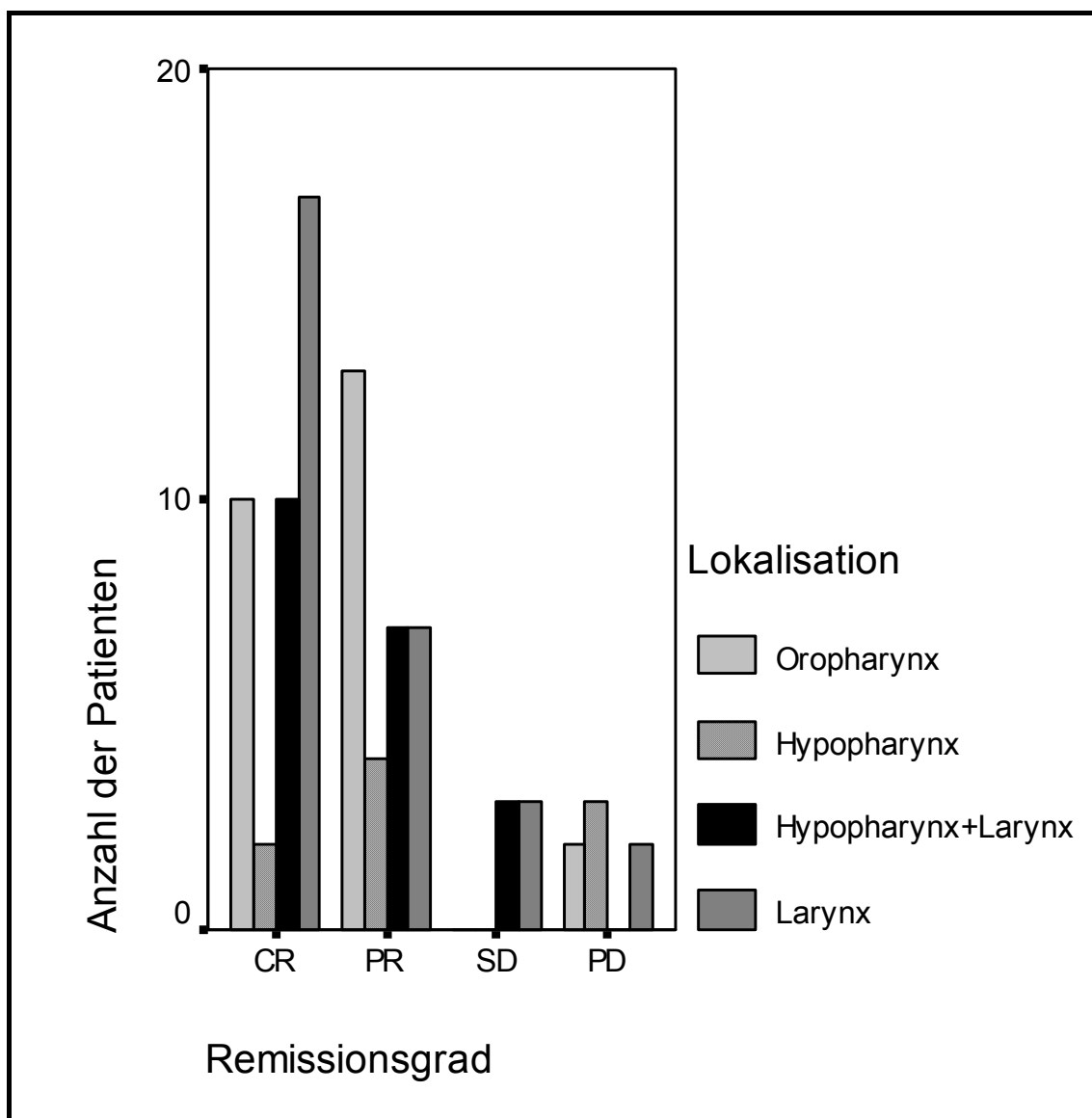
An der Rangverteilung lässt sich ablesen, dass die Larynx-Gruppe die niedrigsten (also besten) Werte für den Remissionsgrad aufwies. Danach folgten die Hypopharynx+Larynx-Gruppe und dann die Oropharynx-Gruppe. Die Hypopharynx-Gruppe hat die höchsten (also schlechtesten) Werte für den Remissionsgrad (siehe Tabelle 29).

	GRUPPE	N	Mittlerer Rang
Remissionsgrad nach TPF	Oropharynx	27	46.19
	Hypopharynx	10	58.60
	Hypopharynx + Larynx	22	44.43
	Larynx	29	38.12
	Gesamt	88	

**Tabelle 29:** Ränge des Kruskal-Wallis-Tests für den Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie.

In der Abbildung 30 sind die Remissionsgrade für die unterschiedlichen Gruppen durch ein Säulendiagramm verdeutlicht.

Es zeigte sich, dass bei der Larynx-Gruppe die meisten Patienten eine komplette Remission (CR) aufwiesen. Bei der Oropharynx-Gruppe und der Hypopharynx-+Larynx-Gruppe sind ungefähr gleich viele Patienten mit einer kompletten und einer partiellen Remission (PR) zu finden. Bei der Hypopharynx-Gruppe ist ein Drittel der Patienten der Kategorie der progressiven Erkrankung (PD) zuzuordnen. Allerdings darf man dabei nicht außer Acht lassen, dass diese Gruppe nur eine kleine Anzahl an Patienten enthält. Die nachzuweisenden Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht groß genug um Signifikanz zu erreichen.



**Abbildung 30:** Säulendiagramm zur Verteilung der Remissionsgrade bei den vier unterschiedlichen Lokalisations-Gruppen.



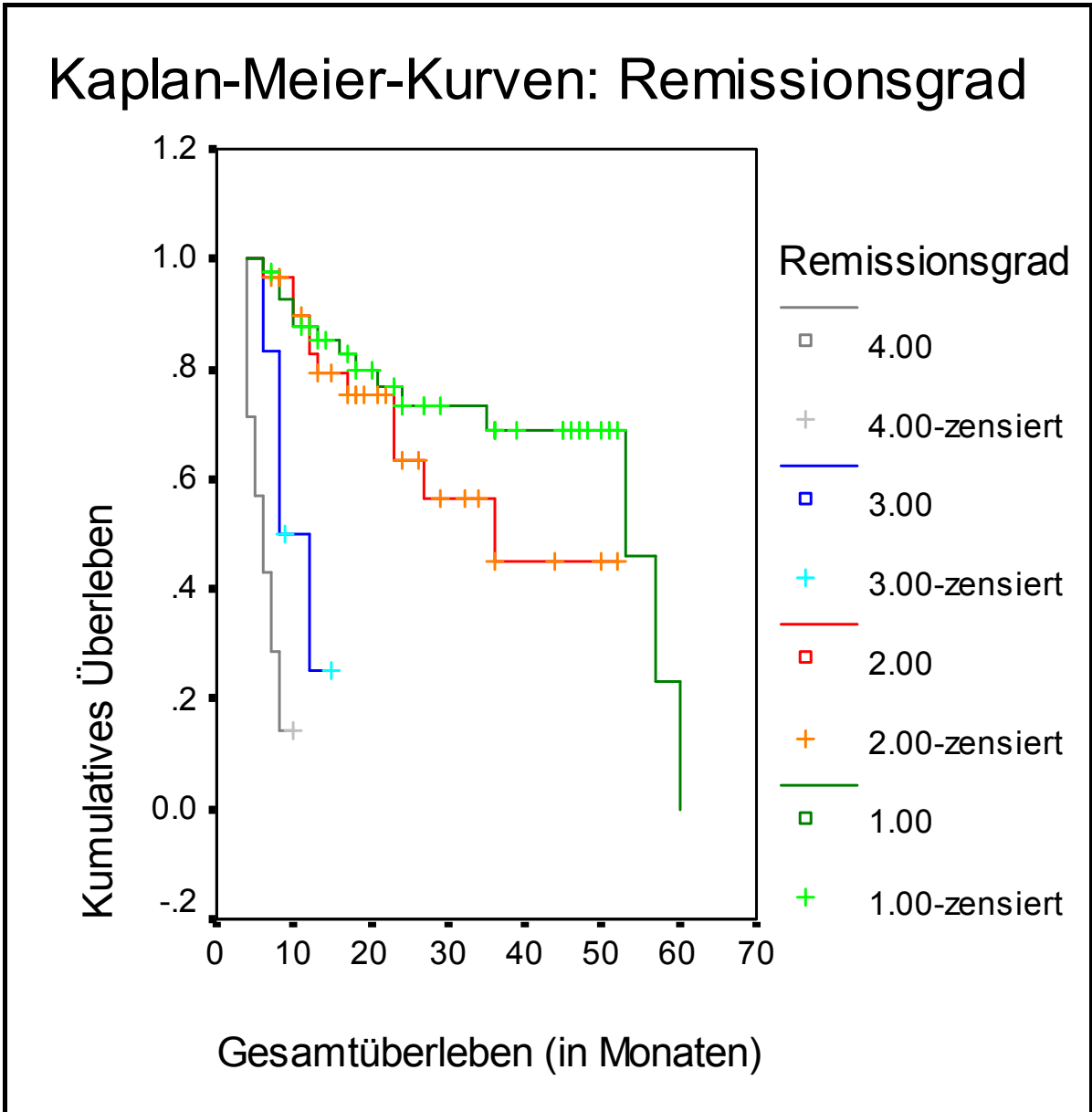
## 3.8 Überlebenszeitanalyse

### 3.8.1 Kaplan-Meier-Funktionen

Es wurden für die vier unterschiedlichen Remissionsgrade und die vier Hauptlokalisationen sowie für die drei untersuchten immunhistochemischen Parameter Kaplan-Meier-Funktionen erstellt. Dazu wurden die Werte von Ki67, EGFR und vWF in Gruppen zusammengefasst. Die Einteilungen sind in den jeweiligen Tabellen nachzuvollziehen.

Die Kaplan-Meier-Kurve für den Remissionsgrad der Gruppe 4 (progressive Erkrankung) beruhte auf Werten von nur ca. 10 Patienten und fiel sehr schnell steil ab. Das mediane Überleben dieser Gruppe lag bei 6 Monaten. Die Kurve für die Gruppe 3 (stabile Erkrankung) beruhte auf Werten von nur ca. 7 Patienten. Die Kurve fiel ebenfalls relativ steil ab und das mediane Überleben lag bei 8 Monaten. Für die Gruppe 2 (partielle Remission) lagen die Ergebnisse Werten von ca. 36 Patienten zu Grunde. Diese Kurve verlief deutlich flacher und das mediane Überleben lag bei 35 Monaten. In die Kurve für die Gruppe 1 (komplette Remission) gingen die Werte von ca. 45 Patienten ein. Diese Kurve fiel am geringsten ab und das mediane Überleben liegt bei 53 Monaten. Der rapide Abfall der Kurve nach diesem Zeitpunkt ist darauf zurückzuführen, dass die letzten Beobachtungen Vermerke über den Tod von Patienten waren und dann die Datenaufnahme zur Auswertung abgebrochen wurde. Die Kurvenverläufe sind in Abbildung 31 dargestellt.

Im Vergleich der vier unterschiedlichen Remissionsgrade zeigte sich, dass die Patienten mit der kompletten Remission deutlich das beste Überleben aufwiesen. Etwas unter dieser Kurve verlief die Überlebenskurve der Patienten mit partieller Remission. Die ersten 20 Monate verliefen die Kurven ungefähr gleich. Ein sehr schlechtes Überleben zeigten die Patienten mit stabiler und progressiver Erkrankung, deren Überlebenskurven sehr stark und schnell abfielen, wobei die Gruppe 4 ein noch schlechteres Überleben zeigte als die Gruppe 3. Allerdings lagen diesen beiden Kurven nur sehr geringe Patientenzahlen zu Grunde (siehe Tabelle 30). Die Werte sind statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 31:** Kaplan-Meier-Kurven für die 4 Remissionsgrade. p-Wert < 0,001.

Remissionsgrad	Gruppe	Patientenanzahl	Medianes Überleben in Monaten
Komplette Remission	1	45	53
Partielle Remission	2	36	35
Stabile Erkrankung	3	7	8
Progressive Erkrankung	4	10	6

**Tabelle 30:** Die Tabelle fasst die vier Remissionsgrade und die Anzahl der jeweiligen Patienten der Gruppe sowie das mediane Überleben der Gruppen in Monaten zusammen.

## Kaplan-Meier-Kurven: Hauptlokalisation

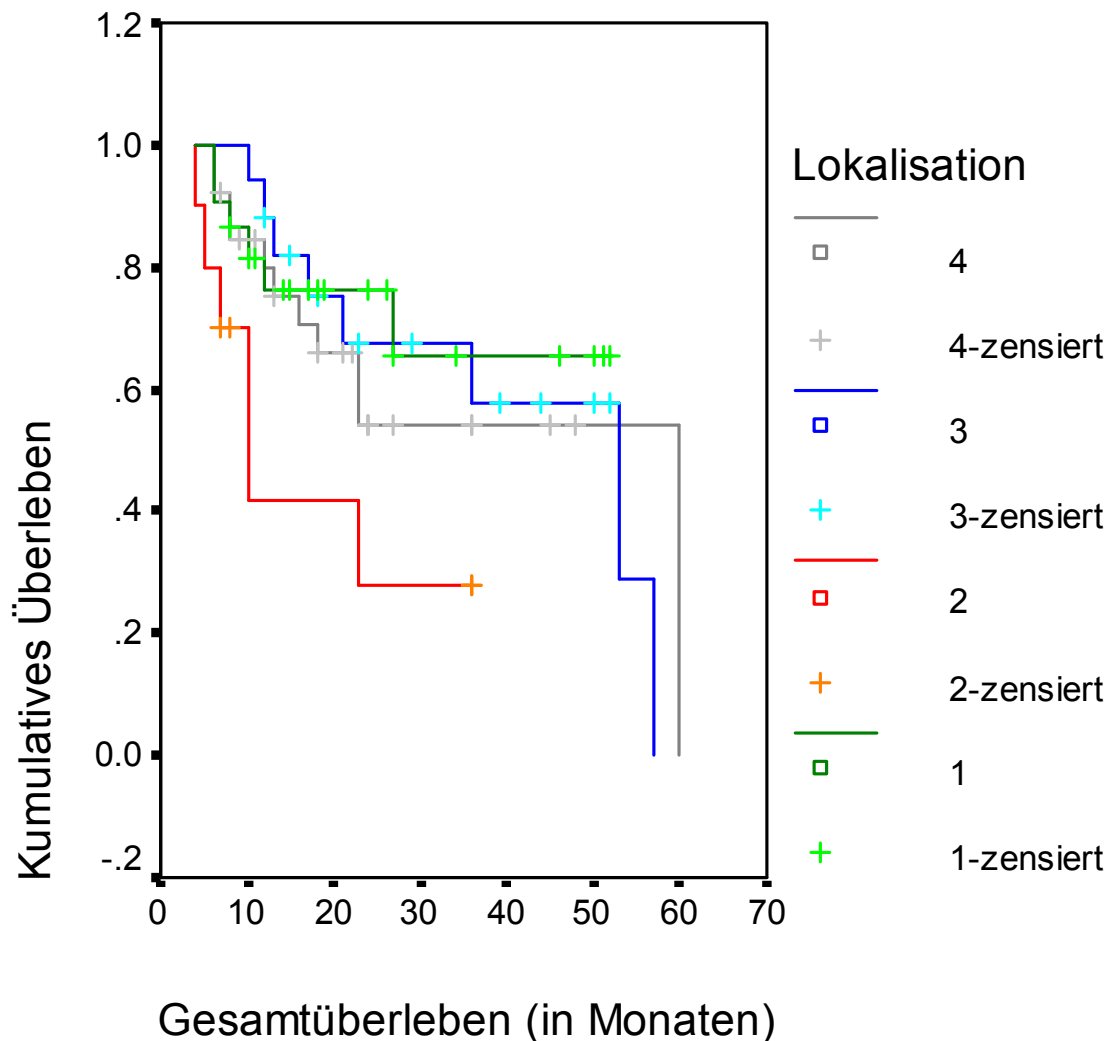


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurven für die vier Hauptlokalisationen. p-Wert = 0,121.

Lokalisation	Gruppe	Patientenanzahl	Medianes Überleben in Monaten
Oropharynx	1	27	>60
Hypopharynx	2	10	10
Hypopharynx + Larynx	3	22	52
Larynx	4	29	60

Tabelle 31: Die Tabelle fasst die vier Hauptlokalisationsgruppen und die Anzahl der jeweiligen Patienten sowie das mediane Überleben der Gruppen in Monaten zusammen.

Bei den Hauptlokalisationen wurden wie bereits im vorherigen Kapitel die Lokalisationen Oropharynx (Gruppe 1), Hypopharynx (Gruppe 2), Hypopharynx+Larynx (Gruppe 3) und Larynx (Gruppe 4) unterschieden.

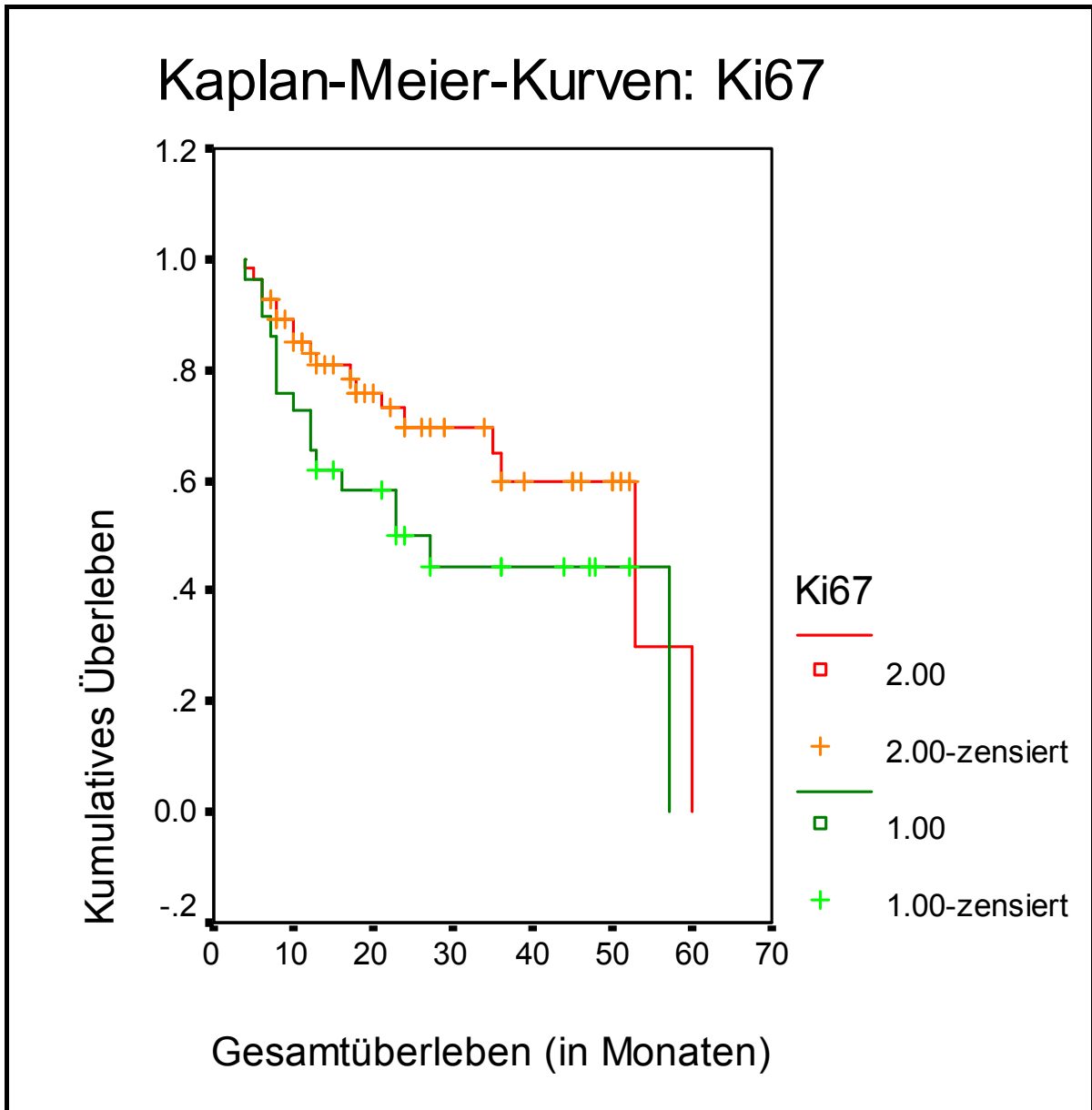
Dabei wurden 27 Patienten in die Oropharynx-Gruppe eingeschlossen. Nur 10 Patienten waren der Hypopharynx-Gruppe zugeteilt. 22 Patienten waren in der Gruppe bei der sowohl Hypopharynx als auch Larynx betroffen waren. Die Larynx-Gruppe beinhaltete 29 Patienten (siehe Tabelle 31).

Die Überlebenszeitkurve der Hypopharynx-Gruppe (Gruppe 2) fiel innerhalb von 30 Monaten nach Therapie relativ steil ab. Das mediane Überleben lag bei nur 10 Monaten. Die anderen drei Kurven verliefen alle ungefähr parallel, wobei die Oropharynx-Gruppe (Gruppe 1) am höchsten verlief. Das mediane Überleben lag hier bei größer 60 Monaten. Ein medianes Überleben von 60 Monaten hatte die Larynx-Gruppe (Gruppe 4). Die Hypopharynx+Larynx-Gruppe (Gruppe 3) zeigte ein medianes Überleben von 52 Monaten. Die Kurvenverläufe sind in Abbildung 32 dargestellt. Die Werte erreichen keine statistische Signifikanz (p-Wert = 0,121).

Die Patienten wurden bezüglich des Proliferationsindex in zwei Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 32). Gruppe 1 entsprach dabei einem niedrigen Proliferationsindex (<65%) und enthielt ca. 34 Patienten. Gruppe 2 entsprach einem hohen Proliferationsindex (>66%) und enthielt ungefähr 68 Patienten.

Die Kurve für Gruppe 1, also der Gruppe mit niedrigem Proliferationsindex, lag deutlich unter der Kurve für Gruppe 2. Das mediane Überleben der Gruppe 1 lag bei 27 Monaten, das der Gruppe 2 bei 52 Monaten. Zum Schluss fielen beide Kurven rapide ab, wobei dieser Abfall darauf beruhte, dass die letzten erhobenen Werte Informationen zum Tod eines Patienten waren und die Datenaufnahme dann zur Auswertung abgebrochen wurde.

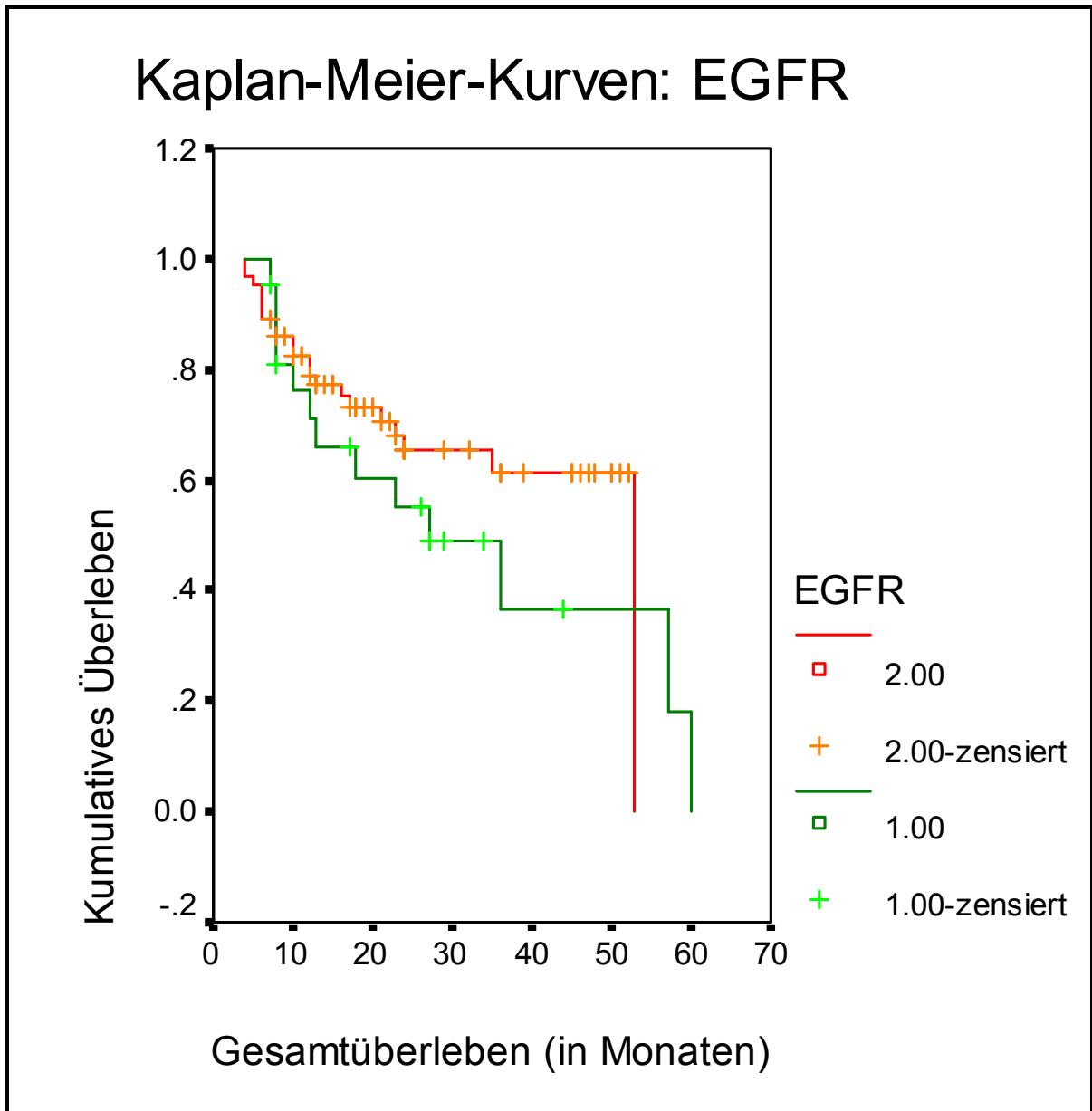
Ein höherer Proliferationsindex korrelierte in dieser Patientenpopulation mit einem höheren kumulativen Überleben. Die Kurvenverläufe sind in Abbildung 33 abgebildet. Die Werte erzielten allerdings keine statistische Signifikanz (p-Wert = 0,083).



**Abbildung 33:** Kaplan-Meier-Kurven für zwei Ki67-Gruppen einmal mit hohem und einmal mit niedrigem Proliferationsindex. p-Wert = 0,083.

Ki67-Proliferation	Gruppe	Patientenanzahl	Medianes Überleben in Monaten
0% - 65%	1	34	27
65% - 100%	2	68	52

**Tabelle 32:** Die Tabelle fasst die beiden Gruppen von Ki67 abhängig vom Proliferationsgrad und die Anzahl der jeweiligen Patienten sowie das mediane Überleben der Gruppen in Monaten zusammen.



**Abbildung 34:** Kaplan-Meier-Kurven für zwei EGFR-Gruppen einmal mit niedriger EGFR-Expression und einmal mit hoher EGFR-Expression. p-Wert = 0,331.

EGFR-Ausprägungsgrad	Gruppe	Patientenanzahl	Medianes Überleben in Monaten
Ausprägungsgrad 1 + 2	1	41	27
Ausprägungsgrad 3 + 4	2	62	53

**Tabelle 33:** Die Tabelle fasst die beiden EGFR-Gruppen nach Ausprägungsgrad und die Anzahl der jeweiligen Patienten sowie das mediane Überleben der Gruppen in Monaten zusammen.

Für EGFR wurden die vier Ausprägungsgrade in zwei Gruppen zusammengefasst (siehe Tabelle 33). Gruppe 1 mit 41 Patienten fasste die Ausprägungsgrade 1 und 2 zusammen und stand somit für eine niedrige EGFR-Expression. Gruppe 2 mit 62 Patienten fasste die Ausprägungsgrade 3 und 4 zusammen und stand somit für eine hohe EGFR-Expression.

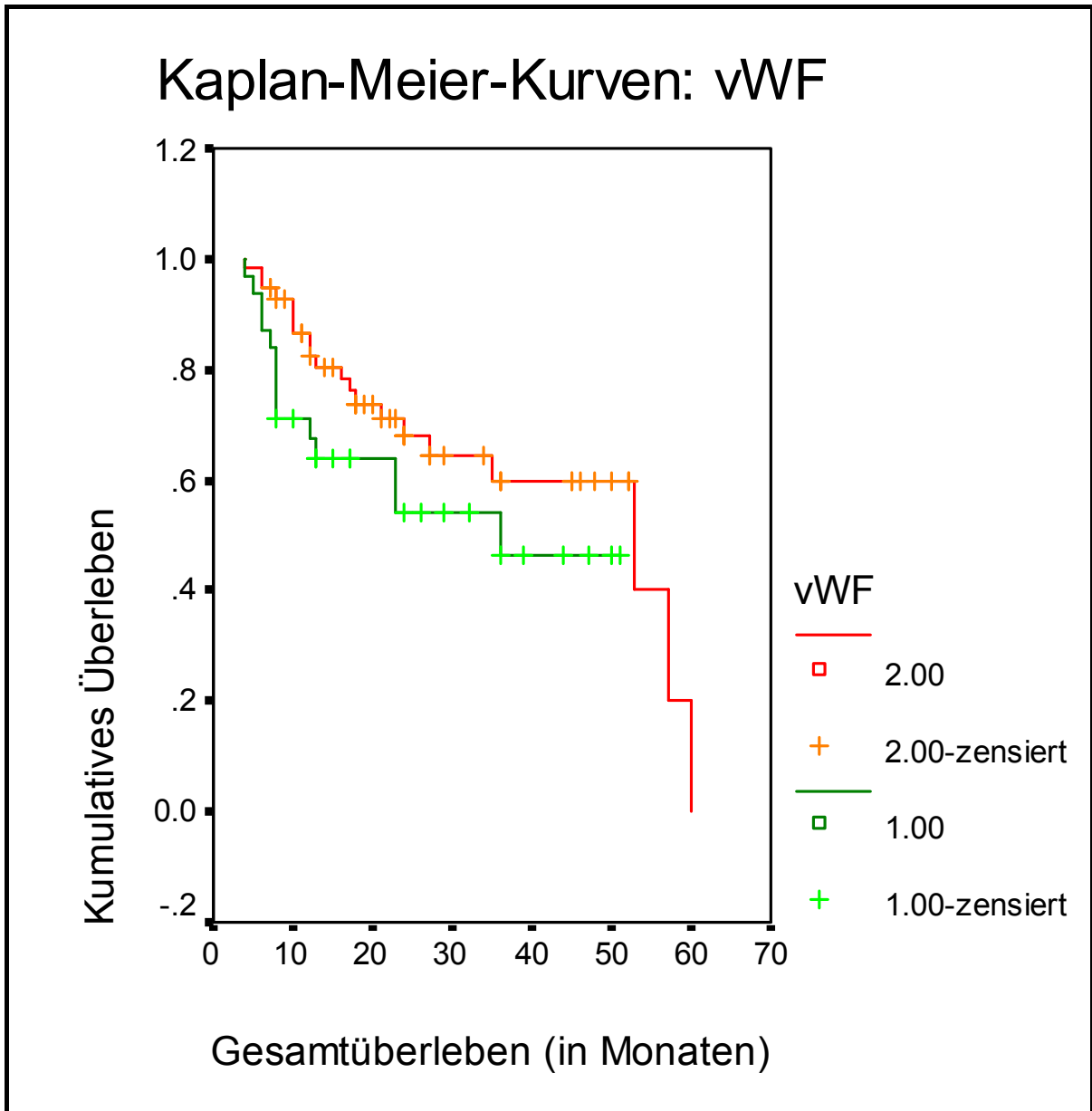
Die Kurve der Gruppe 1 fiel steiler ab als die Kurve der Gruppe 2. Die Gruppe 1 hatte ein medianes Überleben von 27 Monaten. Das mediane Überleben der Gruppe 2 lag bei 53 Monaten.

Zum Schluss fielen beide Kurven rapide ab, wobei dieser Abfall darauf beruhte, dass die letzten erhobenen Werte Informationen zum Tod eines Patienten waren und die Datenaufnahme dann zur Auswertung abgebrochen wurde. Die Kurvenverläufe sind in Abbildung 34 abgebildet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei höheren Ausprägungen von EGFR in dieser Patientenpopulation eine höhere Überlebenschance bestand. Es wurde keine statistische Signifikanz erzielt ( $p$ -Wert = 0,331)

Für die mit vWF angefärbten Gefäße wurden ebenfalls zwei Gruppen erstellt (siehe Tabelle 34). Die vWF Gruppe 1 mit 26 Patienten stand dabei für eher wenige Gefäße im Präparat, mit kleiner 15 ausgezählten Gefäßen pro Gesichtsfeld. Die vWF Gruppe 2 mit 77 Patienten stand für eher viele Gefäße im Präparat, mit mehr als 16 ausgezählten Gefäßen pro Gesichtsfeld. Die Kurve der vWF Gruppe 1 (geringere Gefäßanzahl) fiel steiler ab als die der Gruppe 2 (höhere Gefäßanzahl). Das mediane Überleben der Gruppe 1 lag bei 36 Monaten und das mediane Überleben der Gruppe 2 bei 52 Monaten. Der rapide Kurvenabfall zu Ende der Kurve 2 beruhte darauf, dass die letzten Beobachtungen Informationen zum Tod eines Patienten waren und die Datenaufnahme dann zur Auswertung abgebrochen wurde. Die Kurvenverläufe sind in Abbildung 35 abgebildet.

Zusammenfassend korrelierten mehr mit vWF angefärbte Gefäße innerhalb des Präparates in dieser Patientenpopulation mit einem etwas höheren kumulativen Überleben. Die Werte erzielten keine statistische Signifikanz ( $p$ -Wert = 0,149).



**Abbildung 35:** Kaplan-Meier-Kurven für zwei vWF-Gruppen einmal mit niedriger und einmal mit höherer Anzahl an Gefäßen. p-Wert = 0,149.

Anzahl der mit vWF angefärbten Gefäße	Gruppe	Patientenanzahl	Medianes Überleben in Monaten
0 - 15 Gefäße	1	26	36
16 - 40 Gefäße	2	77	52

**Tabelle 34:** Die Tabelle fasst die beiden Gruppen von vWF nach der Anzahl der angefärbten Gefäße und die Anzahl der jeweiligen Patienten sowie das mediane Überleben der Gruppen in Monaten zusammen.



### 3.8.2 Cox-Regression

Die Cox-Regression wurde zum einen für das Gesamtüberleben zum anderen für das krankheitsfreie Überleben angewandt.

Das Gesamtüberleben wurde durch die Parameter N-Stadium ( $p = 0,033$ ), Remissionsgrad nach TPF-Chemotherapie ( $p = 0,009$ ), Tumolvolumen nach TPF-Chemotherapie ( $p < 0,001$ ) und Ki67 ( $p = 0,032$ ) signifikant beeinflusst (siehe Tabelle 35).

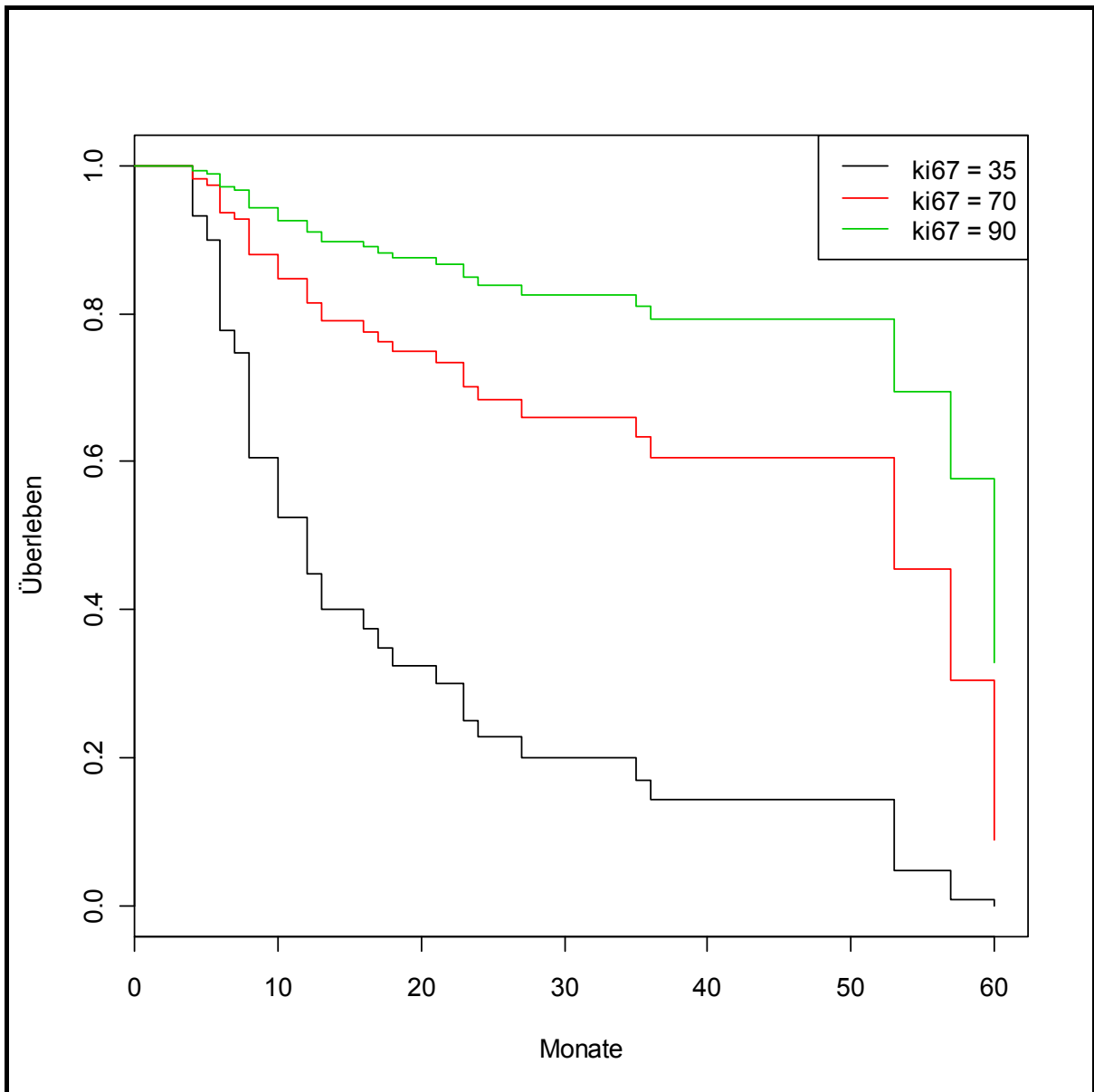
	Score	Freiheitsgrade (df)	Signifikanz
Geschlecht	.097	1	.755
Alter bei Erstdiagnose	1.904	1	.168
Hauptlokalisation	2.143	1	.143
T-Stadium	3.133	1	.077
N-Stadium	4.541	1	.033
UICC-Klassifikation	1.971	1	.160
Remissionsgrad nach TPF-Chemo	6.783	1	.009
Tumolvolumen vor TPF-Chemo	2.432	1	.119
Tumolvolumen nach TPF-Chemo	12.639	1	.000
Grading	.001	1	.982
Ki67	4.610	1	.032
vWF	.007	1	.935
EGFR	.384	1	.536

**Tabelle 35:** Cox-Regression zum Gesamtüberleben.

Das krankheitsfreie Überleben wurde durch keinen der überprüften Werte signifikant beeinflusst (siehe Tabelle 36).

	Score	Freiheitsgrade (df)	Signifikanz
Geschlecht	1.591	1	.207
Alter bei Erstdiagnose	1.040	1	.308
Hauptlokalisation	.048	1	.827
T-Stadium	.330	1	.566
N-Stadium	.302	1	.583
UICC-Klassifikation	.115	1	.735
Remissionsgrad nach TPF- Chemo	.187	1	.665
Tumolvolumen vor TPF- Chemo	1.365	1	.243
Tumolvolumen nach TPF- Chemo	.539	1	.463
Grading	.124	1	.725
Ki67	.309	1	.578
vWF	.735	1	.391
EGFR	.266	1	.606

**Tabelle 36:** Cox-Regression zum krankheitsfreien Überleben.



**Abbildung 36:** Die Darstellung zeigt den mittels Cox-Regression errechneten Verlauf für das Gesamtüberleben für Ausprägungen von Ki67 von 35%, 70% und 90%. p-Wert < 0,05.

Es wurde ein Modell erstellt, an dem für verschiedene Ausprägungsgrade des Proliferationsindex (Ki67-positive Zellen) das zu erwartende Gesamtüberleben abgelesen werden kann.

Für einen Proliferationsindex von 90% würde das Gesamtüberleben innerhalb von 50 Monaten auf ungefähr 80% sinken. Für einen Proliferationsindex von 70% würde das Gesamtüberleben nach 50 Monaten bei ungefähr 60% liegen und für einen Proliferationsindex von 35% würde das Gesamtüberleben nach 50 Monaten auf unter 20% absinken.

Das mediane Überleben läge für einen Proliferationsindex von 90% bei 60 Monaten. Für einen Proliferationsindex von 70% läge das mediane Überleben

bei 53 Monaten. Bei einem Proliferationsindex von 35% läge das mediane Überleben bei 11 Monaten.

Ein höherer Proliferationsindex (höhere Ausprägung von Ki67) lässt nach diesem Modell ein längeres Überleben erwarten. Diese Werte erzielten statistische Signifikanz (p-Wert <0,05).

## 4. Diskussion

### 4.1 Zum Patientenlientel

Die 105 in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten waren eine typische Population von Patienten mit Kopf-/Hals-Tumoren, wie sie sich in der Abteilung für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der Universitätsklinik Frankfurt am Main vorstellen.

Mit 15% weiblichen und 85% männlichen Patienten ergab sich eine ähnliche Geschlechterverteilung wie bei einer Studie aus Sao Paulo in die 427 Patienten eingeschlossen waren, davon 14% weiblich und 86% männlich (Alvarenga et al., 2008). Mit einem Verhältnis von 5,6:1 spiegelte sich in dieser Population wieder, dass Männer nach wie vor häufiger an Kopf-/Hals-Tumoren erkranken als Frauen. In neueren Studien lag die Männer:Frauen Inzidenzrate bei ungefähr 2,4:1 (Abreu et al., 2010; Sharma et al., 2010). 1956 waren Männer noch ungefähr 14,9-mal häufiger von Lungenkrebs und Kopf-/Hals-Tumoren betroffen als Frauen (Bross et al., 1956; Wynder et al., 1956; Wynder et al., 1957). Vermutlich durch den zunehmenden Nikotinkonsum bei Frauen steigt deren Inzidenz für solche Tumore an. Insgesamt ist der Inzidenzunterschied der Geschlechter nur durch den unterschiedlichen Nikotin- und Alkoholkonsum aber nicht ausreichend erklärt. Frauen scheinen pro kumulativer Dosis von Zigarettenrauch ein höheres Risiko zu haben an Krebs zu erkranken als Männer (Zang und Wynder, 1996) und empfindlicher für die Karzinogene des Zigarettenrauchs zu sein (Ryberg et al., 1989; Muscat, Carmella et al., 1996). 40 Packyears erhöhten das Risiko für oralen Krebs bei Männern zweifach und bei Frauen fünffach im Vergleich zu Nichtrauchern (Blot et al., 1988; Muscat, Richie et al., 1996). Außerdem gibt es Hypothesen, dass hormonelle Einflüsse eine Rolle spielen könnten. Bisher ist die Literatur diesbezüglich aber spärlich. In einer aktuellen Fall-Kontroll-Studie wurden verschiedene hormonelle Faktoren bezüglich des Risikos für ein Plattenepithel-Karzinom untersucht. Es konnten keine Korrelationen nachgewiesen werden (Langevin et al., 2011). Ein weiterer Anstieg der Inzidenzrate bei Frauen und somit ein höherer Anteil an Frauen in zukünftigen Studien sollte in den nächsten Jahren zu erwarten sein. Die Altersverteilung bei Erstdiagnose zeigte auch eine typische Verteilung mit den meisten Neuerkrankungen zwischen 41 und 70 Jahren und einem Gipfel

zwischen 51 und 60 Jahren. Eine ähnliche Altersstruktur wurde in vergleichbaren Studien beschrieben (Kreppel et al., 2012) und entsprach auch den Ergebnissen der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland von 2002. Nach Strutz und Mann lag der Altersgipfel für die Kopf-/Hals-Tumore ebenfalls zwischen 50 und 60 Jahren (Strutz und Mann, 2010). In letzter Zeit wurden aber auch zunehmend jüngere Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle vorstellig (Kübler et al., 2004). Häufig zeigte sich dann eine Assoziation mit HPV-Infektionen (van Monsjou et al., 2011). Insbesondere zeigte sich eine solche Häufung bei Oropharynx-Karzinomen und Tonsillen-Karzinomen (Wang et al., 2011). Es wurde vermutet, dass HPV-assoziierte Tumore der Kopf-/Hals-Region die bisherige Demographie dieses Patientenkontingents in Zukunft deutlich verändern könnten (Fakhry und Gillison, 2006).

Die Lokalisation der Primären ließ mit den drei Hauptlokalisationen Larynx (28%), Hypopharynx (10%) und Oropharynx (25%) eine typische Verteilung erkennen. Die anderen Lokalisationen waren seltener vertreten. Der häufigste bösartige Tumor des oberen Aerodigestivtraktes, wie auch diese Arbeit bestätigte, ist das Larynx-Karzinom. Sein Anteil an allen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich wurde mit ca. 25-30% und an allen bösartigen Tumoren immerhin mit 1% beschrieben (Strutz und Mann, 2010). Einen Anteil von 10% an allen Kopf-Hals-Tumoren hatte das Oropharynx-Karzinom, während das Hypopharynx-Karzinom 5% einnahm (Strutz und Mann, 2010).

Die TNM- und UICC-Klassifikation zeigten, dass bei den meisten Patienten dieser Population ein Tumorstadium T4, einen Lymphknotenbefall N2c und das UICC Stadium IVA vorlag. Nach wie vor scheint es typisch, dass sich die Patienten mit Kopf-/Hals-Tumoren meist bereits mit einem sehr fortgeschrittenen Tumorstadium vorstellen (Vermorken und Specenier, 2010). So befanden sich 2/3 der Patienten auch in anderen Studien bereits in UICC-Stadium III oder IV (Lang et al., 2002). Nur bei drei Patienten der vorliegenden Arbeit lagen bereits Fernmetastasen vor, was circa 3% entsprach. Die in der Literatur veröffentlichten Zahlen für die Inzidenz von Fernmetastasen waren breit gefächert und schwankten stark (Hauswald et al., 2011). So gab es Angaben von 8,5% aus einer Larynx- und Hypopharynxkarzinom-Patientengruppe, die mehr als 2500 Patienten enthielt (Spector et al., 2001) und 55% aus einer UICC Stadium VI Patientengruppe (Kotwall et al., 1987). Die

Inzidenz von Fernmetastasen scheint durch das Tumorstadium, insbesondere den Lymphknotenbefall, die histologische Konstellation und die lokoregionale Tumorkontrolle beeinflusst zu werden (Garavello et al., 2006).

Das histologische Grading zeigte am häufigsten das Stadium des mäßig differenzierten Tumors. Da bei der überwiegenden Anzahl der Patienten der hier untersuchten Population ein bereits fortgeschrittenes Stadium sowie Lymphknotenmetastasen vorlagen, war es kein überraschendes Ergebnis, dass in den meisten Fällen ein mäßig oder gering differenzierter Tumor nachzuweisen war. So gingen Lymphknoten-Metastasen auch in einer anderen Arbeit mit einem eher entdifferenzierten Tumorstadium einher (Magnano et al., 1999).

Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass eine hinsichtlich Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Staging und histologischem Grading typische Patientenpopulation mit Kopf-/Hals-Tumoren vorlag, die für die Auswertung der in dieser Arbeit gestellten Fragestellung durchaus repräsentative Ergebnisse liefern konnte.

## **4.2 Zu den Auszählungsergebnissen**

Für alle 105 in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten wurden die histologischen Präparate aus dem Staging vor und dem Restaging nach der Chemotherapie vom Senckenbergischen Institut für Pathologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main bestellt, geschnitten und bearbeitet. Allerdings waren die entnommenen Präparate nach der Chemotherapie meist sehr viel kleiner und zu einem sehr großen Prozentsatz tumorfrei. Es konnten von allen 105 Patienten repräsentative Präparate vor der Chemotherapie ausgewertet werden. Nach der Chemotherapie konnten aber nur von 17 Patienten überhaupt Schnitte angefertigt werden, die Tumoranteile enthielten. Diese Präparate waren zumeist sehr klein, so dass oft nicht zehn Gesichtfelder auszählbar waren. Somit waren sie nur wenig repräsentativ und wurden deshalb nicht zur weiteren Auswertung herangezogen.

Auf der einen Seite bewies der hohe Prozentsatz an tumorfreien Präparaten nach der Chemotherapie die gute Wirksamkeit der angewendeten TPF-Induktionschemotherapie, die sich auch in anderen Studien bereits bestätigte (Mumme et al., 2010; Paccagnella et al., 2010). Auf der anderen Seite war es

bedauernd, dass mit den wenigen Tumorpräparaten nach Chemotherapie keine Auswertung möglich war. Ergebnisse, die Aufschlüsse über die Verteilung der Marker nach einer Chemotherapie liefern würden, könnten eventuell auch interessante Ergebnisse erbringen. So hatte sich in einer Studie zum Ösophagus-Karzinom gezeigt, dass die intratumorale Dichte an Kapillaren angefärbt mit dem Gefäßmarker CD31 nach einer Radiochemotherapie beim Plattenepithelkarzinom signifikant niedriger war als bei Patienten ohne diese Therapie und dass somit die Angiogenese deutlich gesenkt worden war (Torres et al., 1999). In einer Studie bei Brustkrebspatienten wurde nachgewiesen, dass der Ki67-Index nach aber nicht vor einer neoadjuvanten Chemotherapie ein prognostischer Prädiktor war (Tanei et al., 2010). Bei höheren Fallzahlen sollte also unbedingt auch eine Auswertung der Präparate nach Chemotherapie durchgeführt werden.

Die Auszählungsergebnisse für die einzelnen Marker lagen in dieser Patientenpopulation bezogen auf den Proliferationsindex (Ki67-positive Zellen) zwischen 30 und 100% mit einem Maximum zwischen 60 und 80%. In einer Studie zu oralen epithelialen Dysplasien wurden in Dysplasien, die sich später zu einem Plattenepithelkarzinom entwickelten, als Mittelwert bereits 59% Expression von Ki67 nachgewiesen, während der Mittelwert bei normaler Mucosa bei 23% lag (Torres-Rendon et al., 2009).

Bei der Auswertung der Population hinsichtlich der EGFR-Expression waren die Gruppen 3 und 4 am häufigsten vertreten, während die Gruppen 1 und 2 deutlich seltener vorkamen. In einer Studie zum Nasopharynx-Karzinom wiesen die meisten Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium eine hohe Expression für EGFR auf (Zheng et al., 1994). Dies ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vereinbar, denn die meisten Patienten befanden sich in einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium. Dementsprechend waren auch viele EGFR-positive Fälle zu erwarten. Für die Patienten mit erhöhter EGFR-Expression wäre eine mit Cetuximab kombinierte Therapie eventuell auch in Frage gekommen und hätte vielleicht auch gute Therapieergebnisse erbringen können (Vermorken und Specenier, 2010). Interessant wäre, ob nach TPF-Chemotherapie gerade die Patienten keine komplette Remission haben, die eine hohe oder niedrige EGFR-Expression aufweisen. Zu dieser Frage fanden sich in der aktuellen Literatur keine Antworten.

In den Präparaten dieser Patientenpopulation waren mittels der vWF-Anfärbung zwischen 0 und 40 Gefäßen pro Gesichtsfeld auszuzählen mit einem Maximum bei 16 bis 20 Gefäßen. In einer Studie zum supraglottischen Plattenepithelkarzinom des Larynx lag die durchschnittliche Kapillardichte im Primärtumor bei  $72\pm 34$  Gefäße/mm<sup>2</sup> und  $58.5\pm 31.5$  Gefäße/mm<sup>2</sup> in Lymphknotenmetastasen (Rodrigo et al., 2009). In einer Studie zum oralen Plattenepithelkarzinom lag die höchste Dichte an Gefäßen bei ungefähr 30 Gefäßen pro Gesichtsfeld in Randbereichen des Tumors und in zentralen Tumorgebieten im Durchschnitt bei ungefähr 10 Gefäßen (Margaritescu et al., 2008). Insgesamt ließ sich für die Auswertung von den mit vWF angefärbten Gefäßen, die pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt wurden, festhalten, dass die absoluten Zahlen bei dieser Auszählmethode schlecht mit Ergebnissen anderer Studien vergleichbar waren. Bisher gibt es keine einheitliche Methode für solche Auswertungen. Zum Teil wird pro Quadratmillimeter ausgezählt, zum Teil pro Gesichtsfeld, wobei hier dann noch verschiedene Vergrößerungen gewählt werden. Eine einheitliche Vorgehensweise wäre für zukünftige Studien wünschenswert. Insgesamt gesehen passten die erhobenen Ergebnisse aber zu den bisher in der Literatur veröffentlichten Werten.

#### **4.3 Zur Korrelationsübersicht mit T-, N- und UICC-Stadium sowie dem histologischen Grading**

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem T-, N-, und UICC-Stadium mit den drei erhobenen Markern.

Bei einer Studie zum undifferenzierten Nasopharynx-Karzinom korrelierte erhöhte EGFR-Expression mit höherem T-Stadium (Ma et al., 2003). Die Anzahl Ki67-positiver Zellen korrelierte in einer weiteren Studie zum Nasopharynx Karzinom mit dem T-Stadium (Zheng et al., 1994). Dabei wurde eine starke Expression von EGFR bei Patienten mit UICC-Stadium III und IV regelmäßig beobachtet und korrelierte mit einer hohen Anzahl Ki-67 positiver Zellen. Außerdem war bei Fällen positiv für das Epstein-Barr-Virus die EGFR-Expression besonders stark und eine hohe Anzahl Ki67-positiver Zellen nachzuweisen. Das deutet laut den Autoren (Zheng et al., 1994) auf einen möglichen Effekt der EBV-Infektion bei der Proliferation von Tumorzellen des



Nasopharynx-Karzinoms hin. Einen ähnlichen Effekt vermutet man inzwischen auch für die HPV-Infektion. Die erhöhte Expression von EGFR und Ki67 bei fortgeschrittenen Tumorstadien beim Nasopharynx-Karzinom gab Hinweise auf einen möglichen Nutzen dieser Werte bei der Prognose auch von anderen Kopf-/Halstumoren.

In einer Studie zum Larynx-Karzinom wurden die Gefäße mit CD 105 markiert und ausgezählt. Es fand sich eine Korrelation der Kapillardichte zur Tumorgröße (=T-Stadium) aber keine Korrelation zu Lymphknotenmetastasen (=N-Stadium) (Gu et al., 2006).

Dass in der hier vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen dem T-, dem N- und dem UICC-Stadium mit den erhobenen Werten vorlag, könnte eventuell an den sehr niedrigen Fallzahlen von Patienten mit frühen Tumorstadien liegen.

Es zeigte sich allerdings eine Korrelation zwischen dem T- und dem N-Stadium. So bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass ein größerer Primärtumor häufiger mit Lymphknotenmetastasen einhergeht, wie in der Literatur bereits beschrieben wurde (Olzowy et al., 2011).

Das histologische Grading zeigte in dieser Arbeit keine Korrelation mit den vorliegenden Werten. In einer Studie zum kutanen Plattenepithelkarzinom bei Hunden zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Proliferationsindex (Ki67-positive Zellen) und dem histologischen Grading (Al-Dissi et al., 2007). Eine Korrelation zwischen dem Grading und der Kapillardichte konnte hier nicht nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde zur Erhebung der Kapillardichte ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit vWF zur Färbung der Gefäße verwendet (Al-Dissi et al., 2007). Natürlich ist es zu hinterfragen, ob diese Ergebnisse mit denen beim Menschen verglichen werden dürfen. Der Proliferationsindex nachgewiesen mit Ki67 korrelierte aber auch beim Menschen mit der Differenzierung der Tumorzellen und dem histologischen Grading (Azzimonti et al., 2004). In einer Studie, bei der zur Bestimmung der Kapillardichte CD 31 verwendet wurde, konnte eine Korrelation zwischen dem histologischen Grading und der Kapillardichte nachgewiesen werden (Maiolino et al., 2001). In einer Studie zum Tonsillenkarzinom in der ebenfalls CD31 verwendet wurde, zeigte sich bei einer höheren Kapillardichte im Tumorbereich signifikant ein schlechterer Differenzierungsgrad des Tumors (Fei et al., 2009). Auch zwischen der Expression von EGFR und dem histologischen Grading konnte bei Kopf-

/Hals-Tumoren eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. So ging eine hohe Expression von EGFR eher mit einer guten bis mäßigen Differenzierung der Tumorzellen einher (Eriksen et al., 2005). Das keine dieser Korrelationen innerhalb dieser Arbeit bestätigt werden konnte, ist eventuell auf die ungleiche Verteilung der Werte beim Grading zurückzuführen, bei dem kaum gut differenzierte Tumore vorlagen.

#### **4.4 Zur Korrelation und Regression der Marker untereinander**

Zwischen dem Proliferationsindex (Ki67-positive Zellen) und der Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße zeigte sich eine signifikante positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,27 ( $p = 0,007$ ). Da Ki67 ein Proliferationsmarker ist und eine steigende Anzahl an Gefäßen im Tumor für eine hohe Kapillardichte im Tumor und eventuell auch Angiogenese spricht, kann man das Ergebnis so interpretieren, dass bei zunehmender Proliferation auch die Kapillardichte und Angiogenese zunehmen oder das auf Grund zunehmender Kapillardichte und Angiogenese eine höhere Proliferation möglich ist. Dass Proliferation und Kapillardichte bzw. Angiogenese in engem Zusammenhang stehen und voneinander abhängen, wurde bereits durch verschiedene Arbeiten belegt. Beim Plattenepithelkarzinom der Lunge zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Kapillardichte im Tumor und ILK (Integrin linked kinase), einem Protein, das das Zellüberleben, die Zelldifferenzierung und Zellproliferation steuert (Yu et al., 2011). In einer Studie zum kutanen Plattenepithelkarzinom bei Hunden konnte eine Korrelation zwischen dem Proliferationsindex (Ki67) und der Expression von VEGF, ein Marker der Angiogenese, festgestellt werden (Al-Dissi et al., 2007). Allerdings wurden in dieser Arbeit auch die Gefäße mit vWF markiert und ausgezählt und die so herausgefundene Kapillardichte korrelierte nicht mit dem Proliferationsindex, also Ki67, und auch nicht mit VEGF (Al-Dissi et al., 2007). Zur Korrelation zwischen VEGF und der Kapillardichte gibt es widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur. Durch manche Arbeitsgruppen wurde ein Zusammenhang festgestellt (Koide et al., 1999) und durch andere nicht (Ahn et al., 2002; Uchida et al., 1998). In einer Studie zum Larynx-Karzinom wurden die Gefäße mit CD 105 gefärbt und ausgezählt. Hier fand sich eine Korrelation zwischen der

Anzahl an Gefäßen und der Tumorgroße assoziiert mit erhöhter Proliferation (Gu et al., 2006).

Auch zwischen der Expression von EGFR und der Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße bestand eine signifikante positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,29 ( $p = 0,003$ ). EGFR ist der Epidermal growth factor receptor (EGFR), dessen Expression mit einer verstärkten Proliferation des Gewebes einhergeht. Man kann das vorliegende Ergebnis erneut so interpretieren, dass bei zunehmender Proliferation auch die Kapillardichte zunimmt oder dass auf Grund zunehmender Kapillardichte eine höhere Proliferation möglich ist. In einer Studie zum nicht kleinzelligen Lungenkarzinom zeigte sich bei den Plattenepithelkarzinomen besonders häufig eine Überexpression von EGFR. Diese korrelierte mit der Kapillardichte im Tumor (Brattstroem et al., 2004). Dass EGFR-Expression einen Einfluss auf die Durchblutung eines Gewebes haben muss, wurde z.B. beim kutanen Plattenepithelkarzinom nachgewiesen. Eine Therapie mit Cetuximab, also eine Blockierung des EGFR-Rezeptors, führte zu reduzierter Proliferation, reduzierter Kapillardichte im Tumor und gesteigerter Apoptose (Galer et al., 2010). Auch in einem Mausmodell zum Plattenepithelkarzinom der Kopf-/Hals-Region zeigte sich nach dem Einsatz von Vandetanib eine geringere Phosphorylierung von EGFR, sowie eine verminderte Proliferation und erhöhte Apoptose (Sano et al., 2010). Beim Plattenepithelkarzinom der Tonsille konnte keine signifikante Korrelation zwischen VEGF-Expression oder Kapillardichte mit Alter, Geschlecht, TNM-Stadium, EGFR-Expression oder HPV-Expression nachgewiesen werden. Die starke VEGF-Expression korrelierte aber mit einer hohen Kapillardichte im Tumor (Fei et al., 2009). Bei anderen Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals korrelierte die Expression von EGFR signifikant mit der Kapillardichte im Tumor (Bentzen et al., 2005).

Zwischen den Expressionen von Ki67 und EGFR war in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation nachzuweisen ( $p = 0,472$ ). Auf den ersten Blick war es überraschend, dass sich zwischen diesen beiden Markern keine Korrelation zeigte. Zum einem da sie beide eine positive Korrelation mit der Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße zeigten. Zum anderen, weil es sich bei beiden um Proliferationsmarker handelt. Lag also eine hohe Proliferation vor, sollten doch beide auch hoch ausgeprägt sein. Eventuell war eine Korrelation, die vielleicht nur gering war, durch die Einteilung von EGFR in nur vier Grade nicht so leicht

herauszufinden wie bei stetigen Faktoren, in dieser Arbeit beispielsweise Ki67 und die Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße. Andererseits lag dieses Phänomen auch bei der Korrelation zwischen EGFR und VWF vor, bei der sich eine signifikante Korrelation nachweisen und auch im Diagramm erkennen ließ. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass auf molekularer Ebene kein Zusammenhang zwischen diesen beiden Markern besteht. Sie müssen nicht von einander abhängig sein. Zwar korrelierte in einer Studie zum Nasopharynx-Karzinom eine hohe EGFR-Expression mit einer hohen Ki-67-Expression und fortgeschrittenem T-Stadium (Zheng et al., 1994). Aber andere Quellen konnten bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Hals-Region ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen EGFR und Ki67 finden (Bentzen et al., 2005). Auch bei einer Studie an oralen Plattenepithelkarzinomen der Katze konnte keine Korrelation zwischen Ki67 und EGFR nachgewiesen werden (Bergkvist et al., 2011). Während Ki67 ein Proliferationsmarker ist, ist EGFR ein Wachstumsfaktorrezeptor, der über autokrine Mechanismen aktiviert zu werden scheint. Ein molekularer Zusammenhang konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

#### **4.5 Zur Korrelation der Marker mit dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie**

Nach der TPF-Induktionschemotherapie hatten in dieser Patientenpopulation 43% der Patienten eine komplette Remission, 35% eine partielle Remission, 6% eine stabile Erkrankung und 10% eine progressive Erkrankung. 6% der Patienten wurden in diesem Teil der Auswertung nicht berücksichtigt, da der Grad der Remission aus verschiedensten Gründen nicht bestimmbar war. Zusammengefasst kann man also sagen, dass bei 78% der Patienten die Induktionschemotherapie angeschlagen hatte und nur bei 16% der Patienten keine Wirkung zeigte. Es wurden die bislang sehr erfolgsversprechenden Ergebnisse, die mit dieser Art von Chemotherapie erzielt wurden (Baghi et al., 2006; Posner et al., 2007 und 2011; Lorch et al., 2011), bestätigt.

Zwischen dem Proliferationsindex (Ki67-positive Zellen) und dem Remissionsgrad nach der TPF-Induktionschemotherapie lag eine signifikante negative Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,22 ( $p = 0,026$ ) vor. Bei höherem Proliferationsindex wurde eine vollständigere Remission

erzielt. Dieses Ergebnis erklärt sich wohlmöglich durch den Wirkungsmechanismus der Chemotherapeutika, der meist nur auf die proliferierenden Zellen zielt (siehe dazu Erklärungen in der Einleitung). Auch bei anderen Karzinomen wurden vergleichbare Ergebnisse erlangt. Beim Ösophagus-Karzinom folgte einer Überexpression von Ki67 ein gutes Ansprechen auf die durchgeführte Chemotherapie (Ressiot et al., 2008). Brustkrebspatienten mit starker Ki67-Expression zeigten ein besseres Ansprechen auf neoadjuvante Therapie und auch eine insgesamt verbesserte Prognose (Fasching et al., 2011). Beim Rektal-Karzinom erzielten Patienten mit erhöhter Ki67-Expression die besten Ergebnisse bei neoadjuvanter Radiochemotherapie (Carlomagno et al., 2011), obwohl eine erhöhte Ki67 Expression in anderen Studien mit einer Radioresistenz einherging (Sheridan et al., 1997).

Zwischen der Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße und dem Remissionsgrad nach der TPF-Induktionschemotherapie lag auch eine signifikante negative Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $-0,27$  ( $p = 0,008$ ) vor. Bei einer höheren Anzahl an Gefäßen im Präparat wurde eine vollständigere Remission erzielt. Die höhere Kapillardichte in malignen Tumoren spricht für eine gute Vaskularisierung des Gewebes und somit gute Möglichkeiten für die Chemotherapeutika den Tumor zu erreichen und dort wirken zu können. Bezogen auf die TPF-Induktionschemotherapie gibt es bisher keine direkt vergleichbaren Daten. In einer Studie mit Plattenepithelkarzinom-Patienten der Kopf-/Hals-Region sprach eine hohe Gefäßdichte für ein schlechtes Ansprechen auf Radiochemotherapie (Gasparini et al., 1995). Ähnliche Ergebnisse bestätigte eine Studie zum Ovarialkarzinom (Hollingsworth et al., 1995). Eine hohe Vaskularisation von soliden Tumoren schien mit einem schlechten Ansprechen auf die konventionellen Therapien einherzugehen und neue Therapien sollten deshalb anti-angiogene Strategien einbeziehen (Hasan et al., 2002). Der Einfluss der Vaskularisation des Tumorgewebes auf die Effektivität der TPF-Induktionschemotherapie sollte in weiteren Arbeiten hinterfragt werden. Bislang sind die Ergebnisse verschiedener Studien auf Grund der unterschiedlichen Methoden zur Beurteilung des Gefäßstatus auch schwierig vergleichbar.

Zwischen der EGFR-Expression und dem Remissionsgrad nach der TPF-Induktionschemotherapie zeigte sich keine signifikante Korrelation, viel mehr

bestand eine Grade, die belegte, dass in allen Remissionsgruppen am häufigsten eine relativ starke Ausprägung von EGFR vorlag. Bei verschiedenen menschlichen Tumoren korrelierte eine hohe Expression von EGFR mit Zellproliferation, Invasion, Metastasen, Radiochemotherapieresistenz und schlechter Prognose (Sheridan et al., 1997; Hara et al., 2005). Bei einer Studie zum Rektal-Karzinom zeigten die Patienten eine bessere Remission mit niedriger EGFR-Expression (Carlomagno et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit war diese in der Literatur beschriebene Korrelation nicht nachzuweisen. Eine Schlüsselrolle soll EGFR bei der Antwort von Plattenepithelkarzinomen auf fraktionierte Radiotherapie zukommen. Die Patienten mit hoher EGFR-Expression profitierten mehr von einer hyperfraktionierten Radiotherapie als die Patienten mit einer niedrigen EGFR Expression (Bentzen et al., 2005). Interessant ist, dass die erhöhte Expression von EGFR nicht mit einem besseren Ansprechen auf eine Therapie mit EGFR-Inhibitoren korrelierte (Sharafinski et al., 2010). Auch dort forscht man noch an molekularen Mechanismen bzw. Strukturen, die die Patienten kennzeichnen, die von einer solchen Therapie profitieren. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist die Effektivität der TPF-Induktionschemotherapie unabhängig vom EGFR-Rezeptorstatus.

#### **4.6 Über die multinominale logistische Regression zum Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie**

Mit Hilfe der multinominalen logistischen Regression wurden zwei Modelle zur Vorhersage des Remissionsgrades angepasst. Ein solches Modell, das auf Grund einer bestimmten Konstellation von klinischen und histologischen Werten einem Patienten sein mögliches Therapieergebnis vorhersagt, wäre für die Therapieplanung und die Prognose ein Durchbruch. Als signifikante Werte für das Modell zeigten sich in dieser Arbeit das T-Stadium ( $p = 0,001$ ), das N-Stadium ( $p = 0,01$ ), der Proliferationsindex (Ki67-positive Zellen) ( $p = 0,025$ ), die Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße ( $p = 0,035$ ) und die EGFR-Expression ( $p = 0,03$ ).

Es wurde ein Modell mit allen signifikanten Werten erstellt und eines in dem außer dem T- und dem N-Stadium nur der Proliferationsindex (Ki67) berücksichtigt wurde. Insgesamt gesehen kann nur Einzug in den Klinikalltag

halten, was wenig zeitaufwendig und kostengünstig ist. So wäre es natürlich wünschenswert, dass nur wenige Parameter in das Modell einbezogen werden müssten. Alle drei in dieser Arbeit untersuchten Marker für jeden Patient zu erheben und auszuwerten wäre sehr aufwendig und würde hohe Kosten erzeugen. Deshalb wurde ein Modell erstellt, in das neben den klinisch erhobenen Werten des T- und N-Stadiums nur der Marker mit dem größten Effekt einbezogen werden sollte. Das war in dieser Arbeit der Proliferationsindex (Ki67).

Beide Modelle hatten eine hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit für die Remissionsgrade 1 (CR) und 2 (PR), aber eine schlechte für die Remissionsgrade 3 (SD) und 4 (PD). Da in der vorliegenden Arbeit die Chemotherapie bei 78% der Patienten angeschlagen hatte und nur bei 16% der Patienten gar keine Wirkung gezeigt hatte, wäre allerdings eine Vorhersage gerade bei diesen 16% besonders interessant. Die TPF-Chemotherapie hat bei diesen Patienten keinen Nutzen, sondern es entsteht nur toxischer Schaden. Durch die sofortige Operation könnte diese Toxizität und ein zusätzlicher Zeitverlust vermieden werden. Zumal besonders bei den Patienten mit einer progressiven Erkrankung unter der Chemotherapie mögliche Lymphknoten- oder Fernmetastasen entstehen könnten und der Tumor noch an Größe gewinnt.

Beide Modelle sagten eher bessere Remissionsgrade vorher. Doch es wurde auch einem bzw. zwei Patienten eine progressive Erkrankung vorhergesagt, die tatsächlich eine Vollremission hatten. Eine solche Vorhersage ist für das Schicksal von Patienten besonders fatal, denn so würde ihnen bei Verwendung eines solchen Modells im klinischen Alltag sofort eine radikale Operation zuteil, obwohl ihre Chancen bei der Chemotherapie sehr gut gewesen wären und eine anschließende funktionserhaltende Operation möglich.

Bis solche Modelle bei Kopf-/Halstumoren soweit sind, dass ihr Einsatz im klinischen Alltag denkbar wäre, wird sicherlich noch sehr viel Zeit vergehen. Insgesamt muss ihr Einsatz ethisch sicherlich abgewogen werden, da Patienten dann eventuell auf Grund solcher Überlegungen Therapieoptionen vorenthalten würden, die ihnen eventuell doch nützen könnten.

In einer Studie wurde ein ähnliches Modell entwickelt, um die lokalen Rezidive nach Radiotherapie und das Gesamtüberleben bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Hals-Bereich vorherzusagen. In die Analyse

wurden klinische Parameter wie Tumorlokalisierung, T- und N-Stadium sowie vier molekulare Marker nämlich EGFR, p53, Ki67 und Kapillardichte im Tumor mit einbezogen. In dieser Studie zeigten Patienten mit einer höheren EGFR-Expression ein niedrigeres Gesamtüberleben und eine höhere lokale Rezidivrate. Von den vier analysierten Markern konnte nur mit Hilfe von EGFR eine Klassifikation der Patienten in drei Risikostufen für das Gesamtüberleben und die Rezidive ermittelt werden (Chung et al., 2011).

Auch bei anderen Tumoren, z.B. dem Hodgkin-Lymphom (Derenzini und Younes, 2011), dem Glioblastom (Weller et al., 2010), dem Magenkarzinom (Bataille et al., 2003) um nur einige zu nennen, werden an molekularen Zusammenhängen geforscht, die das Ergebnis verschiedenartiger Therapieformen vorhersagen können. In der Forschung zum Mamma-Karzinom ist man bereits deutlich weiter. Zur Evaluation der Notwendigkeit adjuvanter Therapien wurde ein Modell erstellt, das anhand der Ki67-Expression sowie der Zellkerngröße kombiniert mit dem Lymphknoten- und Progesteronrezeptor-Status die Patienten in Risikogruppen einteilte. Dabei konnte auch eine rezidivfreie Gruppe identifiziert werden. Außerdem zeigte sich auch eine Korrelation mit dem Gesamt- sowie dem krankheitsfreien Überleben (Kreipe und Wasielewski, 2005). Weitere Modelle wurden bereits für den klinischen Alltag erprobt, bei denen reelle Patientenfälle mit klinischen und molekularen Markern für bestimmte Therapien eingeteilt wurden, umso eine klinische Studie zu simulieren (Stamatakis et al., 2010).

#### **4.7 Zum Vergleich der Hauptlokalisationen**

Es wurde untersucht, ob hinsichtlich der Ausprägungen von Ki67 und EGFR sowie in der Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße und dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie Unterschiede zwischen den Hautlokalisationen der vorliegenden Studienpopulation bestanden. Als Hauptlokalisationen ergaben sich der Oropharynx mit 27 Patienten, der Hypopharynx mit 10 Patienten, Hypopharynx und Larynx gemeinsam betroffen bei 22 Patienten und der Larynx mit 29 Patienten.

Hinsichtlich der drei molekularen Marker waren zwischen den Lokalisationsgruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Bei den absoluten Werten hatte die Oropharynx-Gruppe die höchste Ausprägung für



Ki67 und EGFR. Die höchste Anzahl an mit vWF angefärbten Gefäßen lag bei der Larynx-Gruppe vor. Die niedrigsten Ausprägungen für Ki67, EGFR, und vWF (Anzahl der Gefäße) lag bei der Hypopharynx-+Larynx- und der Hypopharynx-Gruppe vor.

Die Datenlage, die sich mit molekularen Unterschieden zwischen den verschiedenen Tumorlokalisationen bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Hals-Region beschäftigt ist eher gering. Die Suppression des Retinoid-Säure-Rezeptor beta 2 korrelierte bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Hals-Region mit der Lokalisation des Primärtumors, dem histologischen Grading und dem Patientenalter (Olasz et al., 2007). Retinoide sind wichtige das Wachstum und die Differenzierung beeinflussende Agenzien. Auch die Cytokeratin 18 Expression variiert zwischen den verschiedenen Lokalisationen. So ist sie bei Larynx- und Hypopharynx-Karzinomen stärker als bei Oropharynx-Karzinomen (Balm et al., 1996).

Andere molekulare Marker konnten also durchaus Unterschiede zwischen den verschiedenen Lokalisationen zeigen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Marker waren aber keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen, wobei sich in den absoluten Werten durchaus ein Trend ablesen ließ, der eventuell bei größeren Fallzahlen Signifikanz erzielen könnte. Vielleicht waren die hier untersuchten Marker aber auch nicht zur Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Tumorlokalisationen geeignet.

Hinsichtlich der Remission nach Chemotherapie zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lokalisationsgruppen. Insgesamt gesehen hatten die Patienten der Larynx-Gruppe am häufigsten eine Vollremission. Bei Oropharynx- und Hypopharynx-+Larynx-Gruppe hatten ungefähr gleich viele Patienten eine komplette und partielle Remission. Bei der Hypopharynx-Gruppe hatte circa ein Drittel der Patienten eine progressive Erkrankung.

Die Prognose der Kopf-/Hals-Tumoren wurde auch in der Literatur nach Lokalisation differenziert. So hatten Larynx-Tumoren schon deshalb eine bessere Prognose als die meisten anderen Tumoren der Kopf-/Hals-Region, weil sie auf Grund der typischerweise auftretenden Heiserkeit früher erkannt wurden (de Bree, 2011). Anhand von histopathologischen Markern war das Verhalten von Tumoren in verschiedenen Lokalisationen bisher aber nicht vorherzusagen (Belbin et al., 2008). Allerdings konnten Vorhersagen über die

Aggressivität des Tumors anhand der Gen-Expression getroffen werden. Diese ist stark beeinflusst durch die anatomische Lokalisation des Primärtumors (Belbin et al., 2008). Bei der primären Strahlentherapie war die Tumorlokalisierung ein unabhängiger signifikanter Faktor zur Vorhersage der Tumor-Clearance (Griffin et al., 1984). In dieser Arbeit erzielten die Unterschiede zwar keine Signifikanz, es zeigte sich in den absoluten Zahlen aber der Trend, dass die Larynx-Tumore am besten ansprachen, während die Hypopharynx-Karzinome am schlechtesten ansprachen. Auch in einer Kölner Studie erzielte die Hypopharynx-Gruppe die schlechtesten Ergebnisse nach Induktionschemotherapie (Volling und Schröder, 1995).

Diese Arbeit kann hinsichtlich der Fragestellung, ob Plattenepithelkarzinome in verschiedenen Lokalisationen unterschiedlich auf die Chemotherapie ansprechen und ob sich eine unterschiedliche Expression von immunhistochemischen Markern nachweisen lässt, keine neuen Ergebnisse liefern. Insgesamt waren die einzelnen Fallzahlen der unterschiedlichen Gruppen vermutlich zu gering, um für die Fragestellung signifikante Ergebnisse erzielen zu können.

#### **4.8 Zur Überlebenszeitanalyse**

Es wurden Kaplan-Meier-Funktionen für die vier unterschiedlichen Remissionsgrade, die vier Hauptlokalisationsgruppen und die drei immunhistochemischen Marker erstellt.

Beim Remissionsgrad waren deutliche Unterschiede im Verlauf der Kurven zu erkennen. Die Patienten mit einer Vollremission und einer partiellen Remission hatten ein deutlich besseres Gesamtüberleben als die Patienten mit einer stabilen oder einer progressiven Erkrankung ( $p < 0,001$ ). Dieser Verlauf der Kurven erscheint logisch und wurde so schon in der Literatur beschrieben (Gregoire et al, 1991). Hohe Ansprechraten seien bei einer neoadjuvanten Behandlung von großer Bedeutung, da das Ansprechen des Tumors als der wichtigste prognostische Faktor gelte, weil das Downstaging des Tumors die chirurgische R0-Resektion erleichtern würde (Eich et al., 2008; Kreppel et al., 2012). Der Zustand der Resektionsränder sei ein prognostischer Marker für das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben (Kreppel et al., 2012).

Bei den Hauptlokalisationsgruppen zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Das schlechteste Überleben zeigte sich in der Hypopharynx-Gruppe. Die anderen drei Kurven verliefen ungefähr parallel, wobei die Oropharynx-Gruppe den besten und die Larynx-Gruppe einen geringfügig schlechteren Verlauf zeigte. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Multi-Center-Studie zum Lymphknoten-positiven Plattenepithelkarzinom aus Amerika mit insgesamt 8795 eingeschlossenen Patienten, bei der für das Oropharynx-Karzinom das 3-Jahres-Gesamtüberleben bei 68,2% und das 5-Jahres-Gesamtüberleben bei 57,5% lagen. Die in dieser Studie erreichten Werte waren hier sehr ähnlich. Beim Larynx-Karzinom lag das Gesamtüberleben nach 3 Jahren bei 49,6% und nach 5 Jahren bei 35,4%. Die in der vorliegenden Studie erreichten Werte lagen deutlich oberhalb dieser Werte und waren nur geringfügig schlechter als die des Oropharynx-Karzinoms. Das Hypopharynx-Karzinom schnitt mit 45,1% nach 3 Jahren und 31,6% nach 5 Jahren auch in der Studie aus Amerika am schlechtesten ab (Lavaf et al., 2008), wobei die Ergebnisse dieser Arbeit ein noch kürzeres Gesamtüberleben aufzeigten. Allerdings umfasste die Gruppe auch nur 10 Patienten und war deshalb weniger repräsentativ als die anderen. In diesem Zusammenhang ist außerdem zu sehen, dass die Tumorlokalisierung ein Risikofaktor für Fernmetastasen ist, die das Überleben auch verkürzen können. Das Larynx- und das Hypopharynx-Karzinom metastasieren schneller als das Oropharynx-Karzinom (Li et al., 2009).

Die Patienten wurden anhand des Proliferationsindex (Ki67-positive Zellen) in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe mit einem hohen und eine Gruppe mit einem niedrigen Index, wobei die Grenze zwischen diesen Gruppen bei 65% Ki67-positive Zellen gewählt wurde. Die Kurve der Patienten mit dem hohen Index verlief über der mit dem niedrigen Index. Eine höhere Proliferationsfraktion ausgewertet mit Ki67 ging in dieser Arbeit also mit einem besseren Gesamtüberleben einher. In der Literatur sind diesbezüglich unterschiedliche Ergebnisse zu finden. Beim Oropharynx-Karzinom und Karzinomen der Mundhöhle belegte eine Studie bessere Überlebenszeiten bei niedrigerer Ausprägung von Ki67 (Ritta et al., 2009) und eine andere besseres krankheitsfreies Überleben bei einer hohen Expression (Klimowicz et al., 2012). Die prognostische Signifikanz von Ki67 bei Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals bleibt weiterhin unklar. Ein möglicher Grund für unterschiedliche

Ergebnisse könnte die unterschiedliche Vorgehensweise bei der Erhebung der Werte sein, weshalb eine einheitliche Vorgehensweise sicherlich wünschenswert wäre. Klimowicz schlägt die Auswertung der basalen Ki67-Expression mittels Digitalbildanalyse vor (Klimowicz et al., 2012).

Die vier Patientengruppen zur EGFR-Expression wurden zu zwei Gruppen zusammengefasst. Die Kurve der Gruppe mit der niedrigeren Ausprägung verlief unter der Kurve von den Patienten mit der höheren Ausprägung. Das Vorliegen einer starken EGFR-Expression ging also in dieser Arbeit mit einem besseren Überleben einher. Die Ergebnisse der Literatur sind in diesem Fall dem hier vorliegenden Ergebnis eher entgegengesetzt. Beim Plattenepithelkarzinom der Lunge hatte EGFR alleine keinen Einfluss auf das Überleben. Nur in Kombination mit HER2neu ließ sich ein Einfluss auf das Überleben im Sinne einer schlechten Prognose nachweisen (Brattstroem et al., 2004). In einer Studie zu Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals hatte die Expression von EGFR keinen signifikanten Effekt auf die Überlebensrate oder das Auftreten von Fernmetastasen (Bentzen et al., 2005). Bei einer Studie zum undifferenzierten Nasopharynx-Karzinom korrelierte erhöhte EGFR Expression mit schlechterem Gesamtüberleben, kürzerem krankheitsfreien Überleben und kürzerer Zeit zur Progression (Ma et al., 2003). In einer Studie zum Tonsillenkarzinom hatten die Patienten mit einer hohen EGFR- und VEGF-Expression die schlechteste Prognose (Fei et al., 2009). Generell geht die Literatur eher von einer schlechteren Prognose und einem kürzeren Gesamtüberleben bei hoher EGFR-Expression aus (Kong et al., 2009; Ang et al., 2002; Chung et al., 2011).

Auch bezüglich der mit vWF-angefärbten Gefäßen wurden die Patienten zu zwei Gruppen zusammengefasst, eine mit einer hohen Gefäßdichte (>16 Gefäße pro Gesichtsfeld) und eine mit einer niedrigeren Gefäßdichte (<16 Gefäße pro Gesichtsfeld). Die Kurve der Patienten mit mehr Gefäßen verlief über der Kurve von Patienten mit weniger Gefäßen. Die Gefäßdichte im Tumorgewebe dargestellt mit vWF war in dieser Arbeit also mit einem längeren Überleben korreliert. Auch hier sind die Ergebnisse der Literatur wieder kontrovers. In manchen Studien war kein Einfluss der Kapillardichte auf das Gesamtüberleben nachweisbar (Rodrigo et al., 2009). In einer Studie wurde die Kapillardichte mit Antikörpern einmal gegen CD34 und einmal gegen CD105 nachgewiesen. Nur die mit CD105 nachgewiesene Kapillardichte hatte

negativen Einfluss auf das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben, nicht die mit CD34 (Martone et al., 2005).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, die doch deutlich im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Ergebnissen stehen, lassen sich eventuell durch das angewendete Therapiekonzept erklären. Es könnte sein, dass bei der TPF-Induktionschemotherapie andere molekulare Profile im Tumor ein besseres Ansprechen auf die Therapie und damit auch ein längeres Überleben ermöglichen als beim konventionellen Therapiekonzept mit zuerst durchgeführter Operation und adjuvanter Radiochemotherapie. Eben solche Fragen, die es in Zukunft ermöglichen könnten eine Therapieentscheidung zu beeinflussen, erfordern weitere Aufklärung.

Das Gesamtüberleben wurde in der vorliegenden Patientenpopulation durch das N-Stadium, den Remissionsgrad nach Chemotherapie, das Tumolvolumen nach TPF-Chemotherapie und Ki67 signifikant beeinflusst. Das krankheitsfreie Überleben wurde durch keinen der überprüften Parameter signifikant beeinflusst.

Mittels der Cox-Regression wurde ein Modell erstellt, an dem für verschiedene Ausprägungen von Ki67 das zu erwartende Gesamtüberleben abgelesen werden konnte. Mit Hilfe solcher Modelle und unter Einbeziehung noch weiterer klinischer oder auch molekularer Werte könnte die Prognose für Patienten in Zukunft viel genauer werden. Zu diesem Schluss kam auch die Arbeitsgruppe um Baatenburg, die ein Cox-Regressionsmodell entwickelte, in das die Tumorlokalisation, das Alter bei Erstdiagnose, frühere Malignome und das TNM-Stadium mit einbezogen wurden. Im klinischen Alltag diene das Modell der Risikoeinschätzung, der Vorhersage des Gesamtüberlebens und der Entscheidungsfindung hinsichtlich der möglichen Therapiemodalitäten. Eine Erweiterung um andere mögliche prognostische Faktoren wäre möglich und sinnvoll (Baatenburg et al., 2001).

#### **4.9 Ausblick**

Insgesamt gesehen konnte diese Arbeit Ki67 als wichtigen prognostischen Marker bei den Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals belegen. Der Proliferationsmarker korrelierte in dieser Arbeit mit dem Remissionsgrad nach TPF-Induktionschemotherapie ( $p=0,026$ ) und dem Gesamtüberleben ( $p=0,036$ ).

Mit seiner Hilfe ließ sich ein Modell zur Vorhersage von Remissionsgraden nach der Chemotherapie erstellen, ebenso wie zur Vorhersage der Überlebenszeit. Seine Bestimmung ist nicht besonders aufwendig oder teuer und kann problemlos in den klinischen Alltag Einzug halten. Der genaue Nutzen seiner Bestimmung wird in weiteren Studien zu klären sein.

Die Kapillardichte, in dieser Arbeit nachgewiesen durch die Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße, sowie die EGFR-Expression hatten bezüglich der Remission und des Überlebens in den bisher veröffentlichten Studien entgegengesetzte Ergebnisse erbracht. Es bleibt unklar, ob bei der TPF-Induktionschemotherapie molekulare Profile unterschiedliche prognostische Aussagekraft haben könnten als bei anderen bisher häufiger eingesetzten Therapiemodalitäten. Dies sollte in weiteren Studien hinterfragt werden.

Besonders bei der Literaturrecherche zur Kapillardichte wurde auffällig, wie viele unterschiedliche Ansätze und Auswertungsmodalitäten es bisher gibt, deren Ergebnisse sich dann untereinander nur schwer vergleichen oder in Bezug zueinander bringen lassen. Eine einheitliche Bestimmung und Vorgehensweise sollte auf lange Sicht gesehen das Ziel sein.

Die Einteilung eines Merkmals in nur wenige Grade wie in dieser Arbeit hinsichtlich der EGFR-Expression zeigte Vor- und Nachteile. Vorteilhaft war die schnelle und einfache Auswertung der Präparate. Der Nachteil war in der statistischen Auswertung zu sehen. Stetige Merkmale, wie in der vorliegenden Arbeit Ki67 und die Anzahl der mit vWF-angefärbten Gefäße, erbrachten in dieser Arbeit bei Korrelation und Regression die deutlicheren Ergebnisse.

In zukünftigen Studien sollten weitere molekulare Marker zusätzlich bestimmt werden, so z.B. der HPV Status. Bei einer Studie zum Plattenepithelkarzinom der Tonsillen zeigte sich HPV als ein stärkerer prognostischer Marker als EGFR und VEGF. Außerdem wurde eine inverse Korrelation zwischen dem HPV-Status und der EGFR Expression nachgewiesen (Fei et al., 2009). Ständig werden weitere molekulare Faktoren nachgewiesen, die prognostischen Wert haben. Die Podoplanin-Expression zeigte sich bei Kopf-/Halstumoren als prädiktiver Faktor bezüglich neoadjuvanter Radiochemotherapie und als prognostisch bezüglich des Gesamtüberlebens und der Lokalrezidive (Kreppel et al., 2011b). Die Heparanase, eine Endoglykosidase der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche, korrelierte stark mit der Tumorgröße, erhöhter Kapillardichte, Progression von Kopf-/Hals-Tumoren sowie reduzierter

Überlebensrate und konnte Tumormetastasierung implizieren, in dem die EGFR-Aktivität und VEGF-Expression moduliert wurde (Cohen-Kaplan et al., 2008). Es scheinen auch verschiedene miteinander in Verbindung stehende Wachstumsfaktoren bei dieser Art von Tumoren prognostische Relevanz zu haben. So waren HGF-, bFGF- und G-CSF-Expression in Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals negative prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben (Montag et al., 2009). Erhöhte Expression von USP22, Ubiquitin spezifische Peptidase 22, war assoziiert mit schlechter Prognose in oralen Plattenepithelkarzinomen (Piao et al., 2012).

Des Weiteren muss bedacht werden, dass es zwischen dem Primärtumor und Lymphknotenmetastasen Unterschiede in der Expression der Marker geben kann. So wurden auch schon genetische Unterschiede bei vier chromosomalen Lokalisationen bei Plattenepithelkarzinomen von Kopf-/Halstumoren zwischen dem Primärtumor und seinen Metastasen nachgewiesen (Götte et al., 2002).

Die Zukunft der Prognose für Remission und Überleben sowie der Tumorthherapie selbst liegt in der Aufschlüsselung biochemischer und enzymatischer Abläufe und Zusammenhänge. Die Kenntnis des molekularen Profils eines Tumors vor Beginn der Therapie in Zusammenschau mit klinischen Werten, könnte zukünftig Therapieentscheidungen beeinflussen und eine bessere Prognose hinsichtlich des Therapieerfolgs und des Überlebens ermöglichen. Gegebenenfalls können dabei sogar Vorhersagemodelle wie sie in dieser Arbeit erstellt wurden eine Rolle spielen.

## 5. Zusammenfassung

### **Fragestellung:**

In Deutschland stehen maligne Tumoren des Kopf-/Halsbereiches an sechster Stelle in der Prävalenz aller Krebserkrankungen und in den nächsten Jahrzehnten wird von der Weltgesundheitsorganisation ein starker Anstieg der Inzidenz erwartet. Ab dem Tumorstadium T2 ist eine alleinige operative oder radiotherapeutische Behandlung nicht mehr erfolgsversprechend, so dass multimodale Therapiekonzepte zum Einsatz kommen sollten. Ein multimodaler Ansatz ist die TPF-Induktionschemotherapie, die bisher vielversprechende Ergebnisse geliefert hat. Eine Prognose hinsichtlich der Therapieerfolge ist bei Tumorpatienten generell schwierig. Um die Effektivität der Behandlung zu überprüfen muss das Ansprechen klinisch und histologisch evaluiert werden.

### **Patienten und Methoden:**

In dieser Arbeit wurden die histologischen Proben von 105 nicht vorbehandelten Tumorpatienten der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Frankfurt am Main vor Beginn der TPF-Induktionschemotherapie entnommen und untersucht. Es wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Ki67, Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) sowie mit von Willebrandt Faktor (vWF) angefärbt. Das Vorliegen tumorösen Gewebes wurde in den HE-Schnitten überprüft. Mittels Ki67 wurde der Proliferationsindex ausgewertet. Der Grad der EGFR-Ausprägung wurde in vier Grade eingeteilt. Bei 40-facher Vergrößerung wurde die Anzahl der mittels vWF angefärbter Gefäße pro Gesichtsfeld erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Als Verfahren kamen die Korrelations- und Regressions-Analyse, die multinominale logistische Regression, der Kruskal-Wallis-Test sowie Überlebenszeitanalysen zum Einsatz. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant gewertet.

### **Ergebnisse:**

Von den 105 Patienten waren 85% männlich und 15% weiblich. Das mittlere Alter lag bei 57,2 Jahren. Die am häufigsten vertretenen Lokalisationen waren Larynx, Oropharynx und Hypopharynx. Der Großteil der Patienten befand sich in einem fortgeschrittenen Tumorstadium (T4, N2c, UICC IVA) mit einem mäßig differenzierten Tumor (G2), während Fernmetastasen nur selten (3%) vorkamen. Der Proliferationsindex (Ki67) lag im Mittel zwischen 60-80%. Bei den meisten Patienten lag eine hohe EGFR-Expression vor. Die Anzahl der mit



vWF angefärbten Gefäße lag zwischen 16 und 20 pro Gesichtsfeld. T-, N- und UICC-Stadium sowie das histologische Grading zeigten keine signifikante Korrelation mit einem der Marker. Für die T- und N-Klassifikation fand sich eine statistisch signifikante Korrelation ( $p=0,035$ ). Mit der Anzahl der vWF angefärbten Gefäße korrelierten Ki 67 ( $p=0,007$ ) sowie EGFR ( $p=0,003$ ) signifikant. Zwischen Ki67 und EGFR bestand keine signifikante Korrelation. Bei höherer Ausprägung von Ki67 ( $p=0,026$ ) sowie bei höherer Anzahl vWF angefärbter Gefäße ( $p=0,008$ ) wurde ein höherer Remissionsgrad erzielt. Zwischen dem Remissionsgrad und EGFR bestand keine signifikante Korrelation. Mit den Parametern T, N, Ki67, EGFR und vWF wurden zwei Modelle zur Vorhersage des Remissionsgrades angepasst. Hinsichtlich der Hauptlokalisationen ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der drei erhobenen Marker oder dem Remissionsgrad. Das Gesamtüberleben sank mit schlechterem Remissiongrad ( $p<0,001$ ). Hinsichtlich der Tumorlokalisation gab es keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben. Bei niedriger Ausprägung von Ki67 und EGFR und geringerer Anzahl an vWF angefärbten Gefäßen war die Überlebenszeit kürzer, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen.

#### **Diskussion:**

Hinsichtlich Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Staging und histologischem Grading lag eine repräsentative Patientenpopulation vor. Die Ergebnisse bezüglich Ki67-, EGFR-Ausprägungsgrad und der Anzahl der Gefäße fügen sich in die bisherige Datenlage ein. Die Korrelation zwischen Ki67 bzw. EGFR mit der Anzahl der Gefäße bestätigt den Zusammenhang zwischen Proliferation und Vaskularisation. Die fehlende Korrelation zwischen Ki67 und EGFR untermauert das Nebeneinander von verschiedenen Proliferationsmechanismen ohne molekularen Zusammenhang. Die Ergebnisse belegen einen besseren Erfolg der Chemotherapie bei hohem Proliferationsindex (Ki67) und guter Vaskularisation (vWF), während der Ausprägungsgrad von EGFR ohne Einfluss darauf ist. Mit Hilfe klinischer Daten (hier T- und N-Status) und molekularer Daten (hier Ki67, EGFR, und vWF) sind Vorhersagemodelle für das Ansprechen auf eine TPF-Induktionschemotherapie möglich. Mittels der Cox-Regression konnte ein Modell erstellt werden, an dem für verschiedene Ausprägungen von Ki67 das zu erwartende Gesamtüberleben abgelesen werden kann. Die Zukunft neuer Therapiestrategien und deren Erfolgsprognose liegen auf molekularer Ebene.

## **7. Abstract**

### **Purpose:**

In Germany malignant tumours in the head and neck area rank in sixth place in prevalence of all cancers. In the forthcoming decades an increasing incidence is expected by the World Health Organisation (WHO). Beginning with tumour stage T2 an operational or radio-therapeutic treatment alone is no longer promising. Therefore multimodal treatment concepts should be applied. A multimodal approach is the TPF-Inductionchemotherapy, which has delivered promising results so far. Predicting treatment outcome is generally difficult in tumour patients. To determine the effectiveness of the therapy, the treatment response has to be evaluated clinically and histologically.

### **Patients and Methods:**

In this work the histological samples of 105 treatment naïve patients with head and neck carcinoma treated at the Department of Oto-Rhino-Laryngology and Head Neck Surgery of the University Hospital Frankfurt am Main have been collected and examined prior to TPF-Induction-chemotherapy. Paraffin sections were made and stained with Hematoxylin-eosin (HE), Ki67, epithelial growth factor receptor (EGFR) and von Willebrandt factor (vWF). The existence of tumorous tissue was confirmed in the HE sections. The proliferation index was evaluated by analysing Ki67 expression. EGFR expression was divided into four grades. The number of vessels per field of vision stained with vWF was evaluated at at 40-fold magnification. Statistical analysis was carried out using SPSS. We used correlation and regression analysis, multi-nominal logistic regression, the Kruskal-Wallis test, as well as survival-analysis. P values less than 0.05 were considered significant.

### **Results:**

85% of the 105 patients were male and 15% female. The mean age was 57.2 years. The most frequent primary tumour sites were larynx, oropharynx and hypopharynx. The majority of patients presented with an advanced tumour stage (T4, N2c, UICC IVA) showing a moderate differentiation (G2), while metastasis occurred rarely (3%). On average the proliferation index was between 60% and 80%. Most patients displayed high levels of EGFR expression. The number of vessels stained with vWF ranged from 16 to 20 per field of vision. T-, N-, M-, and UICC- classification as well as the histological grading showed no significant correlation with one of the markers. For T- and N-

classification a statistically significant correlation was found ( $p=0,035$ ). For Ki67 and the number of vWF stained vessels ( $p=0,007$ ), as well as for EGFR and the number of vWF stained vessels ( $p=0,003$ ) a significant correlation was found. There was no significant correlation between Ki67 and EGFR. A higher degree of remission was achieved in patients with a higher Ki67 proliferation index ( $p=0,026$ ) and higher number of vWF stained vessels ( $p=0,008$ ). There was no significant correlation between the degree of remission and EGFR. Two regression models were adjusted with the parameters T, N, Ki67, EGFR and vWF. Between the tumour localizations no significant differences in the three markers and the degree of remission were found. The survival decreased with worse degree of remission ( $p<0,001$ ). There were no significant differences in survival time according to tumour localizations. At low expression of Ki67 and EGFR and lower number of vWF stained vessels the survival time was shorter but no significance was reached.

#### **Conclusion:**

The population of patients in this study is representative regarding gender, age, tumor localization, staging and histological grading. The results of Ki67-, EGFR-expression and the number of stained vessels confirm the results previously published. The correlation between Ki67 as well as EGFR and the number of vessels confirms the relationship between proliferation and neovascularization. The missing correlation between Ki67 and EGFR underlines the side by side of various unrelated molecular proliferation mechanisms. The results show a better success of chemotherapy in patients with a high proliferation index (Ki67) and good neovascularization (vWF) while the expression of EGFR does not have a significant impact on treatment response. Using clinical data (here T- and N-status) and molecular data (here Ki67, EGFR, und vWF) regression models for the effect of TPF-Inductionchemotherapy are possible. The survival is significantly influenced by Ki67 and a Cox regression model was created where the survival time can be determined according to the different levels of Ki67 expression. The future of new treatment strategies and their prediction of success can be found on the molecular level.

## 8. Literaturverzeichnis

Abreu, Kruger, Tennant. (2010) Oral cancer in Western Australia, 1982-2006: A retrospective epidemiological study. *J Oral Pathol Med*; 39(5):376-81.

Advani, Fakhri. (2011) 5-FU-induced Hyperammonemic Encephalopathy in a Case of Metastatic Rectal Adenocarcinoma Successfully Rechallenged with the Fluoropyrimidine Analog, Capecitabine. *Anticancer Res.*; 31(1):335-8.

Agrawal, Koch, Xiao, Westra, Trivett, Symer, Gillison. (2008) Oral human papillomavirus infection before and after treatment for human papillomavirus 16-positive and human papillomavirus 16-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*; 14(21):7143-50.

Ahn, Jang, Park, Choi, Oh, Lee, Paik, Park. (2002) Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density, and p53 expression in esophageal carcinomas. *J Korean Med Sci*; 17:201–207.

Al-Dissi, Haines, Singh, Kidney. (2007) Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. *Vet Pathol*; 44(6):823-30.

Alvarenga, Ruiz, Pavarino-Bertelli, Ruback, Maniglia, Goloni-Bertollo. (2008) Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Braz J Otorhinolaryngol*; 74(1):68-73.

Alvi, Johnson. (1996) Extranodal spread in the clinically negative neck (N0): implications and outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 114: 65-70.

Ang, Berkey, Tu, Zhang, Katz, Hammond, et al. (2002) Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*;62:7350–6.

Ankathil, Mathew, Joseph. (1996) Is oral cancer susceptibility inherited? Eur J Cancer B Oral Oncol;32B:63-7.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. (2002) Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 3.aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken.

Argiris, Eng. (2003) Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. Cancer Treat Res;114:15-60.

Azzimonti, Pagano, Mondini, De Andrea, Valente, Monga, Tommasino, Aluffi, Landolfo, Gariglio. (2004) Altered patterns of the interferon-inducible gene IFI16 expression in head and neck squamous cell carcinoma: immunohistochemical study including correlation with retinoblastoma protein, human papillomavirus infection and proliferation index. Histopathology.;45(6):560-72.

Baatenburg de Jong, Hermans, Molenaar, Briaire, le Cessie. (2001) Source Prediction of survival in patients with head and neck cancer. Head Neck.;23(9):718-24.

Baghi, Hambek, Wagenblast, May, Gstoettner, Knecht. (2006) A phase II trial of docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). Anticancer Res.; 26(1B):585-90.

Balm, Hageman, van Doornewaard, Groeneveld, Ivanyi. (1996) Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur Arch Otorhinolaryngol.;253(4-5):227-33.

Bast, Kufe, Pollock, Weichselbaum, Holland, Frei. (2000) Holland-Frei Cancer Medicine. 5.Ausgabe. Hamilton (ON), BC Decker. Kapitel 50: Microtubule-Targeting Anticancer Drugs Derived from Plants and Microbes: Vinca Alkaloids, Taxanes, and Epothilones

Bataille, Rümmele, Dietmaier, Gaag, Klebl, Reichle, Wild, Hofstädter, Hartmann. (2003) Alterations in p53 predict response to preoperative high dose chemotherapy in patients with gastric cancer. *Mol Pathol.*;56(5):286-92.

Belbin, Schlecht, Smith, Adrien, Kawachi, Brandwein-Gensler, Bergman, Chen, Childs, Prystowsky. (2008) Site-specific molecular signatures predict aggressive disease in HNSCC. *Head Neck Pathol.*;2(4):243-56.

Bentzen, Atasoy, Daley, Dische, Richman, Saunders, Trott, Wilson. (2005) Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*; 20;23(24):5560-7.

Bergkvist, Argyle, Morrison, MacIntyre, Hayes, Yool. (2011) Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Ki67 in feline oral squamous cell carcinomas (FOSCC). *Vet Comp Oncol.*;9(2):106-17. doi: 10.1111/j.1476-5829.2010.00239.x.

Bernier, Domette, Ozsahin, Matuszewska, Lefèbvre, Greiner, Giralt, Maingon, Rolland, Bolla, Cognetti, Bourhis, Kirkpatrick, van Glabbeke. (2004) European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22931. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*; 6;350(19):1945-52.

Bernier. (2009) Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation. *Semin Radiat Oncol*;19:3-10

Bier, Howaldt, Pitz. (1992) IV.DÖSAK-Therapie-Studie. Prospektive, randomisierte, klinische Studie für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle: "Radikale Neck dissection versus konservative Neck dissection". *Fortschr Kiefer Gesichtschir*;37:108-10.

Bier, Schlums, Metelmann, Howaldt, Pitz. (1993) A comparison of radical and conservative neck dissection. *Int J Oral Maxillofac Surg*;22:102-7.

Blot, McLaughlin, Winn, Austin, Greenberg, Preston-Martin, Bernstein, Schoenberg, Stemhagen, Fraumeni. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *CancerRes*; 48:3282-3287.

Bocca, Pignataro, Oldini, Cappa. (1984) Functional neck dissection: an evaluation and review of 843 cases. *Laryngoscope*; 94(7):942-5.

Bockmühl, Küchler, Petersen. (2000) Improved prognostic assessment of head-neck carcinomas by new genetic markers. *HNO*. 2000; 48(6):451-6.

Böcker, Denk, Heitz. (2001) *Allgemeine Tumorpathologie. Pathologie, 2.Auflage*, Urban & Fischer, München: 163-212.

Bonner, Harari, Giralt, Azarnia, Shin, Cohen, Jones, Sur, Raben, Jassem, Ove, Kies, Baselga, Youssoufian, Amellal, Rowinsky, Ang. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*; 9;354(6):567-78.

Brattstroem, Wester, Bergqvist, Hesselius, Malmström, Nordgren, Wagenius, Brodin. (2004) HER-2, EGFR, COX-2 expression status correlated to microvessel density and survival in resected non-small cell lung cancer. *Acta Oncol*; 43(1):80-6.

Braz, Ribas, Dedivitis, Nishimoto, Barros. (2005) Quality of life and depression in patients undergoing total and partial laryngectomy. *Clinics (Sao Paulo)*; 60(2):135-42.

de Bree. (2011) Early detection of laryngeal carcinoma: limited improvement possible. *Ned Tijdschr Geneeskd.*:155:A3045.

Bross, Cornfield, O'Donnell, Wynder. (1956) Lung cancer in women; a study of environmental factors. *N Engl J Med*; 13;255(24):1111-21.

Bruhn, Fölsch, Kneba, Löffler (2003) Onkologische Therapie. Aus: Behandlung von Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren. Schattauer-Verlag, Stuttgart, 89-129.

Bryne, Boysen, Alfsen, Abeler, Sudbo, Nesland, Kristensen, Piffko, Bankfalvi. (1998) The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res*; 18: 4757-64.

Budach. (2000) Sequentielle und simultane Radiochemotherapie bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren. *Onkologe*; 7:533-549.

Bussian, Wollbrück, Danker, Herrmann, Thiele, Dietz, Schwarz. (2010) Mental health after laryngectomy and partial laryngectomy: a comparative study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 267(2):261-6.

Calais. (2010) TPF: a rational choice for larynx preservation? *Oncologist*.; 15 Suppl 3:19-24.

Carlomagno, Pepe, D'Armiento, D'Armiento, Cannella, De Stefano, Crispo, Giordano, De Placido. (2010) Predictive factors of complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Oncology*.;78(5-6):369-75.

Casiglia, Woo. (2001) A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent*;49:72-82.

Cawson, Odell. (2008) Oral cancer. Aus: *Cawson's Essentials of Oral Pathology and Oral Medicine*. 8. Auflage, Elsevier Verlag, London, 280-89.

Chen, Chang, Liao, Wang, Yen, Chiu, Lu, Li, Cheng. (2008) Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci*;99:1507-14.

Chen, Myers. (2000) Cancer of the oral cavity. *Curr. Probl. Surg*; 37: 633-731.



Choe, Chen, Klass, Zhang, Shin. (2007) Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity by blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 15;13(10):3015-23.

Christiansen, Weimbs, Bander, Rajasekaran. (2006) Differing effects of microtubule depolymerizing and stabilizing chemotherapeutic agents on t-SNARE-mediated apical targeting of prostate-specific membrane antigen. *Mol Cancer Ther.*; 5(10):2468-73.

Chung, Zhang, Hammond, Trotti, Wang, Spencer, Zhang, Cooper, Jordan, Rotman, Ang. (2011) Integrating epidermal growth factor receptor assay with clinical parameters improves risk classification for relapse and survival in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*;81(2):331-8.

Ciccolini, Gross, Dahan, Lacarelle, Mercier. (2010) Routine dihydropyrimidine dehydrogenase testing for anticipating 5-fluorouracil-related severe toxicities: hype or hope? *Clin Colorectal Cancer.*; 9(4):224-8.

Cohen, Carpenter, King. (1980) Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem*; 255(10):4834-42.

Cohen-Kaplan, Doweck, Naroditsky, Vlodaysky, Ilan. (2008) Heparanase augments epidermal growth factor receptor phosphorylation: correlation with head and neck tumor progression. *Cancer Res*; 68(24):10077-85.

Cojocariu, Huguet, Lefevre, Perie. (2009) Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers. *Bull Cancer.*;96(4):369-78.doi: 10.1684/bdc.2009.0777.

Corvò. (2007) Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol.*; 85(1):156-70.

Crile. (1906) On the Technique of Operations upon the Head and Neck. *Ann Surg.*; 44(6):842-50.

Curtis, Rowlings, Deeg, Shriner, Socie, Travis. (1997) Solid cancers after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*;336:897-904.

Demetrick, Inoue, Lester, Kingma, Duggan, Paul. (1990) Human papillomavirus type 16 associated with oral squamous cell carcinoma in a cardiac transplant recipient. *Cancer*;66:1736-1.

Derenzini, Younes. (2011) Predicting treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma: genomic advances. *Genome Med.*;3(4):26.

Dunsche, Härle. (2000) Precancer stages of the oral mucosa: a review. *Laryngorhinootologie*;79:423-7.

Eckhardt, Wegener, Karstens. (2006) Preoperative radiochemotherapy of advanced resectable cancer of the oral cavity with cisplatin vs paclitaxel/carboplatin. Analysis of two multimodality treatment concepts. *Mund Kiefer GesichtsChir*;10:30-6.

Edelman, Nemunaitis. (2003) Adenoviral p53 gene therapy in squamous cell cancer of the head and neck region. *Curr Opin Mol Ther.*; 5(6):611-7.

Ehrenfeld, Prein. (2002) Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich. In: Schwenzler, Ehrenfeld. *Spezielle Chirurgie, 3Auflage*. Thieme, Stuttgart: 99-182.

Eich, Lösckke, Scheer, Kocher, Bongartz, Wacker, Zöller, Müller. (2008) Neoadjuvant radiochemotherapy and radical resection for advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity. Outcome of 134 patients. *Strahlenther Onkol*;184:23-9.

El Husseiny, Kandil, Jamshed, Khafaga, Saleem, Allam, Al Rajhi, Al Amro, Rostom, Abuzeid, Otieschan, Flores. (2000) Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 38: 193-199.

Endl, Gerdes. (2000) The Ki67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell; Res* 257(2): 231-237.

Eriksen, Steiniche, Overgaard; Danish Head and Neck Cancer study group (DAHANCA). (2005) The role of epidermal growth factor receptor and E-cadherin for the outcome of reduction in the overall treatment time of radiotherapy of supraglottic larynx squamous cell carcinoma. *Acta Oncol.*;44(1):50-8.

Erisen, Basut, Tezel, Onart, Arat, Hizalan, Coskun. (1996) Regional epidemiological features of lip, oral cavity, and oropharyngeal cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 15: 225-229.

Fakhry, Gillison. (2006) Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol.*;24(17):2606-11

Fasching, Heusinger, Haberle, Niklos, Hein, Bayer, Rauh, Schulz-Wendtland, Bani, Schrauder, Lux, Strehl, Hartmann, Dimmler, Beckmann, Wachter. (2011) Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer.*;11(1):486.

Fei, Hong, Dobbins, Jones, Lee, Loo, Al-Ghamdi, Harnett, Clark, O'Brien, Rose. (2009) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinomas of the tonsil in relation to human papillomavirus status and epidermal growth factor receptor. *Ann Surg Oncol*; 16(10):2908-17.

Flaitz, Nichols, Adler-Storthz, Hicks. (1995) Intraoral squamous cell carcinoma in human immunodeficiency virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;80:55-62.

Forastiere, Koch, Trotti, Sidransky. (2001) Head and neck cancer. *N Engl J Med*; 345(26):1890-900.

Forastiere, Goepfert, Maor, Pajak, Weber, Morrison, Glisson, Trotti, Ridge, Chao, Peters, Lee, Leaf, Ensley, Cooper. (2003) Concurrent chemotherapy and

radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. N Engl J Med; 27;349(22):2091-8.

Fremgen, Bland, McGinnis, Eyre, McDonald, Menck, Murphy. (1999) Clinical highlights from the National Cancer Data Base. CA Cancer J Clin; 49(3):145-58.

Fries, Platz, Wagner, Stickler, Grabner, Kränzl. (1979) Karzinome der Mundhöhle. Zur Frage der Abhängigkeit der Prognose von Alter und Geschlecht. Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir 3: 193-200.

Fröhlich, Berstein, Metelmann, Möhner. (1992) Zur Epidemiologie der Lippen- und Mundhöhlenkarzinome. Fortschr Kiefer Gesichtschir;37:1-3.

Galer, Corey, Wang, Younes, Gomez-Rivera, Jasser, Ludwig, El-Naggar, Weber, Myers. (2010) Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor I: Reduction of angiogenesis and tumor growth in cutaneous squamous cell carcinoma. Head Neck.

Garavello, Ciardo, Spreafico, Gaini. (2006) Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 132:762-766.

Gasparini, Bevilacqua, Bonoldi, Testolin, Galassi, Verderio, Boracchi, Gugliemi, Pezzella. (1995) Predictive and prognostic markers in a series of patients with head and neck squamous cell invasive carcinoma treated with concurrent chemoradiation therapy. Clin Cancer Res 1: 1375 – 1383

Gellrich, Zizelmann. (2004) Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgische Aspekte des Mundhöhlenkarzinoms. In: Kielbassa. Strahlentherapie im Kopf-Hals Bereich, 1.Auflage, Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover: 11-26.

Geney, Chen, Ojima. (2005) Recent advances in the new generation taxane anticancer agents. Med Chem.; 1(2):125-39.

Gerdes, Dallenbach, Lennert. (1983) Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 2:365-71

Gerdes, Lemke, Baisch, Wacker, Schwab, Stein. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5

Ghadjar, Simcock, Schreiber-Facklam, Zimmer, Gräter, Evers, Arnold, Wilkens, Aebersold. (2010) Incidence of small lymph node metastases with evidence of extracapsular extension: clinical implications in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*;78(5):1366-72.

Giacomarra, Tirelli, Papanikolla, Bussani. (1999) Predictive factors of nodal metastases in oral cavity and oropharynx carcinomas. *Laryngoscope*;109:795-9.

van Gijn, Gijssels. (2011) Von Willebrand and his factor. *Ned Tijdschr Geneesk.*;155:A2022.

Götte, Riedel, Schäfer, Coy, Hörmann. (2002) Genetic discordance between primary tumours and metastases of head and neck cancer detected by microsatellite analysis. *Oncol Rep.*;9(4):829-34.

Grandis, Melhem, Gooding, Day, Holst, Wagener, Drenning, Tweardy. (1998) Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*; 90(11):824-32.

Grandis, Tweardy. (1993) Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.*; 53(15):3579-84.

Grégoire, Beauduin, Humblet, Hamoir, Longueville, Majois, Remacle, Rousseau, Salamon, Wambersie, et al. (1991) A phase I-II trial of induction chemotherapy with carboplatin and fluorouracil in locally advanced head and

neck squamous cell carcinoma: a report from the UCL-Oncology Group, Belgium. *J Clin Oncol.*;9(8):1385-92.

Griffin, Pajak, Gillespie, Davis, Brady, Rubin, Marcial. (1984) Predicting the response of head and neck cancers to radiation therapy with a multivariate modelling system: an analysis of the RTOG head and neck registry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*;10(4):481-7.

Grimm. (1990) Geschwülste im Mund- und Kieferbereich. Zahn-Mund-und Kieferheilkunde, Band 2. Herausgegeben von: Schwenger, Grimm. Thieme-Verlag, Stuttgart, 253-357.

Gu, Xu, Wu, Xu. (2006) Relationship between CD105 and angiogenesis and biological behaviors in squamous carcinoma of larynx. *20(3):125-8.*

Hadden, Verastegui, Hadden. (2007) IRX-2 and thymosin alpha1 (Zadaxin) increase T lymphocytes in T lymphocytopenic mice and humans. *Ann N Y Acad Sci.*;1112:245-55.

Hall. (2000) The oxygen effect and reoxygenation. In: Hall. *Radiobiology for the radiologist*. 5.Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 133-52.

Hall, Groome, Irish, O'Sullivan. (2009) TNM-based stage groupings in head and neck cancer: application in cancer of the hypopharynx. *Head Neck.*; 31(1):1-8.

Hara, Aoe, Doihara, Taira, Shien, Takahashi, Yoshitomi, Tsukuda, Toyooka, Ohta, Shimizu. (2005) Antitumor effect of gefitinib ('Iressa') on esophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Lett*; 8;226(1):37-47.

Hasan, Byers, Jayson. (2002) Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer.*;86(10):1566-77.

Hausamen. (2004) Tumor surgery. *Mund Kiefer GesichtsChir*; 4:142-54.

Hauswald, Simon, Hecht, Debus, Lindel. (2011) Long-term outcome and patterns of failure in patients with advanced head and neck cancer. *Radiat Oncol.*;6:70.

van Herpen, van der Voort, van der Laak, Klasen, de Graaf, van Kempen, de Vries, Boer, Dolstra, Torensma, van Krieken, Adema, De Mulder. (2008) Intratumoral rhIL-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients induces B cell activation. *Int J Cancer.*;123(10):2354-61.

Hitt, et al. (2008) Docetaxel-cisplatin-based induction chemotherapy (ICT) in locally advanced head and neck cancer (LAHNC): A meta-analysis of randomized controlled trials using indirect comparisons. ESMO Poster 695PD, *Ann Oncol* 2008; 19 (Suppl. 8): VIII219

Hollingsworth, Kohn, Steinberg, Rothenberg, Merino. (1995) Tumour angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 147: 33 – 41

Ibrahim, Aarsaether, Holsve, Kross, Heimdal, Aarstad, Liavaag, Elgindi, Johannessen, Lillehaug, Vasstrand. (2003) Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosal tissues from black Africans and white Caucasians: the case of the Sudan vs. Norway. *Oral Oncol.* 39: 37-48.

Jones, Browman, Goodyear, Marcellus, Hodson. (1993) Comparison of the addition of T and N integer scores with TNM stage groups in head and neck cancer. *Head Neck*;15:497-503.

Kleist, Bankau, Lorenz, Poetsch. (2001) Multiple chromosomal underrepresentations detected by interphase cytogenetics – Possible prognostic markers in head and neck tumors? *Pathology Oncology Research.* Vol 7, No 1.

Klimowicz, Bose, Nakoneshny, Dean, Huang, Chandarana, Magliocco, Wayne Matthews, Brockton, Dort. (2012) Basal Ki67 expression measured by digital

image analysis is optimal for prognostication in oral squamous cell carcinoma. Eur J Cancer.

Klug, Wutzl, Kermer, Voracek, Kornek, Selzer, Glaser, Poeschl, Millesi, Ewers. (2005) Preoperative radiochemotherapy and radical resection for stages II-IV oral and oropharyngeal cancer: outcome of 222 patients. Int J Oral Maxillofac Surg;34:143-8.

Klussmann, Preuss, Speel. (2009) Human papillomavirus and cancer of the oropharynx. Molecular interaction and clinical implications. HNO.; 57(2):113-22.

Koch, Patel, Brennan, Boyle, Sidransky. (1995) Squamous cell carcinoma of the head and neck in the elderly. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 121: 262-265.

Koch, Brennan, Zahurak, Goodman, Westra, Schwab, Yoo, Lee, Forastiere, Sidransky. (1996) p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst.; 88(21):1580-6.

Koide, Nishio, Kono, Yazawa, Igarashi, Watanabe, Nimura, Hanazaki, Adachi, Amano. (1999) Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. Hepatogastroenterology; 46:952-958.

Kong, Narasimhan, Cao, Kwok, Erickson, Koong, et al. (2009) The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys;74:553-61.

Kotwall, Sako, Razack, Rao, Bakamjian, Shedd. (1987) Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg,154:439-442.

Kovacs, Megahed, Scholz, Sader. (2007) Überlebensverbesserung eines unizentrischen Gesamtkollektivs aus 20 Jahren - 1038 Patienten mit oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen 1983-2004. Mund Kiefer Gesichtschir;11:267-83.



Kreipe, von Wasielewski. (2005) Tissue-based markers of prognosis in breast cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol.*;89:52-8.

Kreppel, Eich, Kübler, Zöller, Scheer. (2010) Prognostic value of the sixth edition of the UICC's TNM classification and stage grouping for oral cancer. *J Surg Oncol.*;102(5):443-9.

Kreppel, Drebber, Rothamel, Eich, Kübler, Scheer, Zöller. (2011a) Prognostic impact of different TNM-based stage groupings for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011 Oct;33(10):1467-75. doi: 10.1002/hed.21630.

Kreppel, Drebber, Wedemeyer, Eich, Backhaus, Zöller, Scheer. (2011b) Podoplanin expression predicts prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant radiochemotherapy. *Oral Oncol.*;47(9):873-8. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.06.508.

Kreppel, Danscheid, Scheer, Lüers, Eich, Zöller, Guntinas-Lichius, Beutner. (2012) Neoadjuvant chemoradiation in squamous cell carcinoma of the maxillary sinus: a 26-year experience. *Chemother Res Pract.*:413589. doi: 10.1155/2012/413589.

Kübler, Scheer, Zöller. (2004) Photodynamic therapy of head and neck cancer. *Onkologie*;24:230-7.

Lang, Wollenberg, Dellian, Steuer-Vogt, Schwenze, Sautier, Chucholowski, Eckel, Faas, Wilmes, Ehrenfeld, Arnold, Kastenbauer, Hölzel. (2002) Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Laryngo-Rhino-Otol*; 81: 499-508.

Langendijk, Ferlito, Takes, Rodrigo, Suárez, Strojan, Haigentz, Rinaldo. (2010) Postoperative strategies after primary surgery for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.*; 46(8):577-85.

Langevin, Grandis, Taioli. (2011) Female hormonal and reproductive factors and head and neck squamous cell carcinoma risk. *Cancer Lett.*;310(2):216-21.

Lavaf, Genden, Cesaretti, Packer, Kao. (2008) Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.*; 112(3):535-43.

Li, Di, Shang, Zhou, Cheng, He. (2009) Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur J Surg Oncol.*;35(12):1348-53.

Licciardello, Spitz, Hong. (1989) Multiple primary cancer in patients with cancer of the head and neck: second cancer of the head and neck, esophagus, and lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*;17:467-76.

Licitra, Perrone, Bossi, Suardi, Mariani, Artusi Oggionni, Rossini, Cantù, Squadrelli, Quattrone, Locati, Bergamini, Olmi, Pierotti, Pilotti. (2006) High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.*; 24: 5630-36.

Liu, Zhang, Taylor, Roth, Goepfert, Clayman. (1994) Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. *Cancer Res.*; 54(14):3662-7.

Löffler, Petrides. (2001) Tumorgewebe. Aus: Biochemie und Pathobiochemie. 6.Auflage. Springer-Verlag, Berlin: 1089-114.

Lokich, Anderson. (1998) Carboplatin versus Cisplatin in solid tumors: An analysis of the literature. *Ann Oncol*;9:13-21.

Lorch, Goloubeva, Haddad, Cullen, Sarlis, Tishler, Tan, Fasciano, Sammartino, Posner; TAX 324 Study Group. (2011) Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*;12(2):153-9.

Ma, Poon, To, Zee, Mo, Chan, Ho, Teo, Johnson, Chan. (2003) Prognostic significance of tumor angiogenesis, Ki 67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma--a prospective study. *Head Neck*; 25(10):864-72.

Macfarlane, Zheng, Marshall, Boffetta, Niu, Brasure, Merletti, Boyle. (1995) Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.* 31B: 181-187.

Magnano, Bongioannini, Lerda, Canale, Tondolo, Bona, Viora, Gabini, Gabriele. (1999) Lymphnode metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables. *J Exp Clin Cancer Res.*;18(1):79-83.

Maiolino, Papparella, Restucci, De Vico. (2001) Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: an immunohistochemical and quantitative analysis. *J Comp Pathol*; 125:117–121.

Mandapathil, Parikh, Isselstein, Pöttgen, Hoffmann, Sommer, Zeidler, Whiteside, Lang. (2009) Innovative Therapiestrategien bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs. *Journal Onkologie; Zeitschrift online – Ausgabe 04-09*

Mărgăritescu, Simionescu, Mogoantă, Badea, Pirici, Stepan, Ciurea. (2008) Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*; 49(3):321-6.

Martone, Rosso, Albera, Migliaretti, Fraire, Pignataro, Pruneri, Bellone, Cortesina. (2005) Prognostic relevance of CD105+ microvessel density in HNSCC patient outcome. *Oral Oncol.*;41(2):147-55.

Mashberg, Samit. (1995) Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin*;45:328-51.

Massano, Regateiro, Januario, Ferreira. (2006) Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;102:67-76.

van der Meij, Schepman, Smeele, van der Waal, Bezemer, van der Waal. (1999) A review of the recent literature regarding malignant transformation of the oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;88:307-10.

Metelmann, Kaduk. (2007) Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. In: Horsch. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. München: Elsevier,;670-753.

Michalides, van de Brekel, Balm. (2002) Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. *Head Neck*; 24(7): 694-704.

Minami, Kawada, Sasaki, Tahara, Igarashi, Itoh, Fujii, Saeki, Ozawa, Sato. (2009) Population pharmacokinetics of docetaxel in patients with hepatic dysfunction treated in an oncology practice. *Cancer Sci.*; 100(1):144-9.

Miura, Suzuki, Nakamura, Yamada, Miura, Yanagi, Usuda, Emura, Takahashi. (2010) Hepatocellular carcinoma, with portal thrombus after viral eradication, disappeared by 5-fluorouracil and interferon. *World J Hepatol*.27;2(11):416-8.

Mohr, Bohndorf, Gremmel, Härle, Hausamen, Hirche, Molls, Renner, Reuther, Sack, Schettler, Scheunemann, Thelen. (1994) Preoperative radiochemotherapy and radical surgery of advanced head and neck cancers - results of a prospective, multicenter DÖSAK study. *Recent Results Cancer Res*;134:155-63.

van Monsjou, van Velthuysen, van den Brekel, Jordanova, Melief, Balm. (2011) Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*.;10.1002/ijc.26195.

Montag, Dyckhoff, Lohr, Helmke, Herrmann, Plinkert, Herold-Mende. (2009) Angiogenic growth factors in tissue homogenates of HNSCC: expression pattern, prognostic relevance, and interrelationships. *Cancer Sci*;100(7):1210-8.

Muir, Waterhouse, Mack. (1988) Cancer incidence in five continents. 5.. IARC.

Mumme, Reitmeier, Knecht. (2010) The current value of induction chemotherapy. ASCO Congress 2010. HNO; 58(12):1156, 1158, 1160-2.

Muscat, Carmella, Scott, Hecht, Richie. (1996) Gender differences in the metabolism of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). Proc. Am. Assoc. Cancer Res; 37: 253.

Muscat, Richie, Thompson, Wynder. Division of Epidemiology, American Health Foundation, New York 10017, USA. (1996) Gender differences in smoking and risk for oral cancer. Cancer Res.15;56(22):5192-7.

Nahum, Mullally, Marmor. (1961) A syndrome resulting from radical neck dissection. Arch Otolaryngol;74:424-8.

Nemunaitis. (2008) Efficacy of adenoviral p53 gene therapy (advexin) in pivotal clinical trials for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. Meeting Abstract ASGT 2008

Noonan, Hegarty. (2010) The impact of total laryngectomy: the patient's perspective. Oncol Nurs Forum; 37(3):293-301.

Odell, Jani, Sherriff, Ahluwalia, Hibbert, Levison, et al. (1994) The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion. Cancer; 74: 789-794

Olasz, Juhász, Remenár, Engi, Bak, Csuka, Kásler. (2007) RAR beta2 suppression in head and neck squamous cell carcinoma correlates with site, histology and age. Oncol Rep.;18(1):105-12.

Olzowy, Tsalemchuk, Schotten, Reichel, Harréus. (2011) Frequency of bilateral cervical metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a retrospective

analysis of 352 cases after bilateral neck dissection. *Head Neck*;33(2):239-43.  
doi: 10.1002/hed.21436.

Ord, Blanchaert. (2001) Current management of oral cancer. A multidisciplinary approach. *J Am Dent Assoc*;132:19S-23S.

Outzen, Illum. (1995) CO<sub>2</sub>-laser therapy for carcinoma of the larynx. *J Laryngol Otol*. Feb;109(2):111-3.

Paccagnella, Mastromauro, D'Amanzo, Ghi. (2010) Induction chemotherapy before chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer: the future? *Oncologist*;15 Suppl 3:8-12.

Pan, Gorin, Teknos. (2009) Pharmacotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Pharmacother*.; 10(14):2291-302.

Parker, Stivers. (2011) Dynamics of uracil and 5-Fluorouracil in DNA. *Biochemistry*. 8;50(5):612-7.

Peng. (2005) Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*.; 16(9):1016-27.

Piao, Liu, Hu, Guo, Ma, Sun, Zhang. (2012) USP22 Is Useful as a Novel Molecular Marker for Predicting Disease Progression and Patient Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*.;7(8):e42540.

Pignon, Bourhis, Domenge, Designe. (2000) Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet*; 355(9208):949-55.

Pignon, Baujat, Bourhis. (2005) Individual patient data meta-analyses in head and neck carcinoma: what have we learnt? *Cancer Radiother*;9:31-6.

Platz, Fries, Hudec, Tjoa, Wagner (1982) Retrospektive DÖSAK-Studie über Karzinome der Mundhöhle. Analyse verschiedener prätherapeutischer Klassifizierungen. Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 6: 5-20.

Posner, Hershock, Blajman, Mickiewicz, Winqvist, Gorbounova, Tjulandin, Shin, Cullen, Ervin, Murphy, Raez, Cohen, Spaulding, Tishler, Roth, Viroglio, Venkatesan, Romanov, Agarwala, Harter, Dugan, Cmelak, Markoe, Read, Steinbrenner, Colevas, Norris, Haddad; TAX 324 Study Group (2007) Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. N Engl J Med; 357(17):1705-15.

Posner, Norris, Wirth, Shin, Cullen, Winqvist, Blajman, Mickiewicz, Frenette, Plinar, Cohen, Steinbrenner, Freue, Gorbunova, Tjulandin, Raez, Adkins, Tishler, Roessner, Haddad; TAX 324 Study Group. (2009) Sequential therapy for the locally advanced larynx and hypopharynx cancer subgroup in TAX 324: survival, surgery, and organ preservation. Ann Oncol.; 20(5):921-7.

Posner, Lorch, Goloubeva, Tan, Schumaker, Sarlis, Haddad, Cullen. (2011) Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. Ann Oncol.;22(5):1071-7.

Ressiot, Dahan, Liprandi, Giorgi, Djourno, Padovani, Alibert, Ries, Laquière, Laugier, Thomas, Seitz. (2008) Predictive factors of the response to chemoradiotherapy in esophageal cancer. Gastroenterol Clin Biol; 32(6-7):567-77.

Rittà, De Andrea, Mondini, Mazibrada, Giordano, Pecorari, Garzaro, Landolfo, Schena, Chiusa, Landolfo. (2009) Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression. Head Neck.;31(3):318-27.

Rodrigo, Cabanillas, Chiara, García Pedrero, Astudillo, Suárez Nieto. (2009) Prognostic significance of angiogenesis in surgically treated supraglottic squamous cell carcinomas of the larynx. Acta Otorrinolaringol; 60(4):272-7.

Roland, Caslin, Nash, Stell (1992) Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 14: 224-229.

Roland, Rothstein, Mittal, Persky. (1993) Squamous cell carcinoma in HIV positive patients under age 45. *Laryngoscope*;103:509-11.

Rose, Thompson, Tattersall, O'Brien, Cossart. (2000) Squamous carcinoma of the head and neck: molecular mechanisms and potential biomarkers. *Aust N Z J Surg.*; 70(8): 601-606.

Rothman, Keller. (1972) The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chronic Dis*;25:711-6.

Rudert. (1992) Maligne Tumoren der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. In: Naumann, Helms, Herberhold, Kastenbauer. *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis*. Stuttgart: Thieme Verlag,;648-69.

Ruggeri. (1991) Structure and function of von Willebrand factor: relationship to von Willebrand's disease. *Mayo Clin Proc.*;66(8):847-61.

Rustum, Cao, Zhang. (1998) Rationale for treatment design: biochemical modulation of 5-fluorouracil by leucovorin. *Cancer J Sci Am.*; 4(1):12-8.

Ryberg, Hewer, Phillips, Haugen. (1989) Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res*; 44:833-839.

Sadick, Schoenberg, Hoermann, Sadick. (2012) Current oncologic concepts and emerging techniques for imaging of head and neck squamous cell cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.*;11:Doc08. doi: 10.3205/cto000090.

Sano, Fooshee, Zhao, Andrews, Frederick, Galer, Milas, Morrow, Myers. (2010) Targeted molecular therapy of head and neck squamous cell carcinoma with the tyrosine kinase inhibitor vandetanib in a mouse model. *Head Neck*.



Schlüter, Duchrow, Wohlenberg, Becker, Key, Flad, Gerdes. (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*; 123(3): 513-522.

Schmelzeisen. (2003) Internetdokumentation von Tumoren in Gesicht und Mundhöhle. *ZM 93*: 87.

Schön, Bertz, Görsch, Haberland, Ziegler, Stegmaier, Eisinger, Stabenow. (2008) Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland, Gesundheitsberichterstattung für Deutschland: Schwerpunktbericht. Verlag Robert-Koch-Institut.

Schultze, Schillmöller, Roldan, Wiltfang, Kimmig. (2006) Die präoperative Radio-Chemo-Therapie beim fortgeschrittenen Mundhöhlenkarzinom - Die Kieler DÖSAK-Erfahrungen bezüglich Kurabilität und Lebensqualität. *Mund Kiefer GesichtsChir*;10:249-57.

Sharafinski, Ferris, Ferrone, Grandis. (2010) Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*.;32(10):1412-21.

Sharma, Saxena, Aggarwal. (2010) Trends in the epidemiology of oral squamous cell carcinoma in Western UP: an institutional study. *Indian J Dent Res*; 21(3):316-9.

Sheridan, O'Dwyer, Seymour, Mothersill. (1997) Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig*; 5(4):180-6.

Shimada, Imamura. (1996) Prognostic factors for esophageal cancer--from the viewpoint of molecular biology. *Gan To Kagaku Ryoho*; 23(8):972-81.

Shingaki, Nomura, Takada, Kobayashi, Suzuki, Nakajima. (2002) Squamous cell carcinomas of the mandibular alveolus: analysis of prognostic factors. *Oncology* 62: 17-24.

Shingaki, Takada, Sasai, Bibi, Kobayashi, Nomura, Saito. (2003) Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *The American Journal of Surgery*; 185: 278-284.

Shurin, Ferris, Tourkova, Perez, Lokshin, Balkir, Collins, Chatta, Shurin. (2005) Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo. *J Immunol.*;174(9):5490-8.

Silverman, Gorsky. (1997) Proliferative verrucous leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;84:154-7.

Spector, Sessions, Haughey, Chao, Simpson, El Mofty, Perez. (2001) Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope*, 111:1079-1087.

Stamatakos, Kolokotroni, Dionysiou, Georgiadi, Desmedt. (2010) An advanced discrete state-discrete event multiscale simulation model of the response of a solid tumor to chemotherapy: Mimicking a clinical study. *J Theor Biol.*;266(1):124-39.

Strutz, Mann. (2009) Maligne Tumoren. In: *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*. 2.vollständig überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 502-06, 626-39.

Tanei, Shimomura, Shimazu, Nakayama, Kim, Iwamoto, Tamaki, Noguchi. (2010) Prognostic significance of Ki67 index after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Eur J Surg Oncol*.

Tisch, Enderle, Zöller, Maier. (1996) Mundhöhlenkrebs bei Maschinenarbeitern. *Laryngo Rhino Otol*;75:759-63.

Torres, Wang, Turner, Shahsafaei, Odze. (1999) Prognostic significance and effect of chemoradiotherapy on microvessel density (angiogenesis) in esophageal Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*; 30(7):753-8.

Torres-Rendon, Roy, Craig, Speight. (2009) Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Clinical Dentistry, University of Sheffield, UK; Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas; *British Journal of Cancer* 100, 1128-1134.

Uchida, Shimada, Watanabe, Tanaka, Shibagaki, Miyahara, Ishigami, Imamura. (1998) In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer*; 77:1704–1709.

Vermorcken, Remenar, van Herpen, Gorlia, Mesia, Degardin, Stewart, Jelic, Betka, Preiss, van den Weyngaert, Awada, Cupissol, Kienzer, Rey, Desauois, Bernier, Lefebvre; EORTC 24971/TAX 323 Study Group. (2007) Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med*; 357(17):1695-704.

Vermorcken, Mesia, Vega, Remenar, Hitt, Kawecki, et al. (2007) Cetuximab extends survival of patients with recurrent or metastatic HNSCC when added to first line platinum based therapy-results of a randomized phase III (EXTREME) study. *ASCO 2007*

Vermorcken, Specenier. (2010) Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol*; 21 Suppl 7:VII252-VII261.

Volling, Schröder. (1995) Preliminary results of a prospective randomized study of primary chemotherapy in carcinoma of the oral cavity and pharynx. HNO.;43(2):58-64.

Wang, Lippard. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov.; 4(4):307-20.

Wang, Thomas, Zhang. (2011) Changing trends in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. Ann Diagn Pathol.

Weller, Wick, Hegi, Stupp, Tabatabai. (2010) Should biomarkers be used to design personalized medicine for the treatment of glioblastoma? Future Oncol.;6(9):1407-14.

Wenger. (1993) Marijuana und maligne Tumoren im oberen Aerodigestiv-Trakt bei jungen Patienten. Zur Risikobeurteilung von Marijuana. Laryngo Rhino Otol;72:264-7.

Wennerberg. (1996) Predicting response to therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck (review). Anticancer Res. 16: 2389-2396.

Werner, Dünne, Ramaswamy, Folz, Lippert, Moll, Behr. (2002) Sentinel node detection in N0 cancer of the pharynx and larynx. Br J Cancer. 23;87(7):711-5.

Whiteside. (2007) Anti-tumor vaccines in head and neck cancer: targeting immune responses to the tumor. Curr Cancer Drug Targets.;7(7):633-42.

Wynder, Bross, Day. (1956) Epidemiological approach to the etiology of cancer of the larynx. J Am Med Assoc; 160(16):1384-91.

Wynder, Bross, Feldman. (1957) A study of the etiological factors in cancer of the mouth. Cancer (Phila.), 10: 1300-1323.

Xu, Gimenez-Conti, Cunningham, Collet, Luna, Lanfranchi, Spitz, Conti. (1998) Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer* 83: 204-212.

Yu, Shi, Zhang, Wang, Qiu. (2011) Expression of integrin-linked kinase in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: correlation with E-cadherin expression, tumor microvessel density and clinical outcome. *Virchows Arch*; 458(1):99-107.

Zackrisson, Mercke, Strander, Wennerberg, Cavallin-Ståhl. (2003) A systematic overview of radiation therapy effects in head and neck cancer. *Acta Oncol*.; 42(5-6):443-61.

Zang, Wynder. (1996) Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J. Natl.CancerInst*; 88: 183-192.

Zheng, Hu, Chen, Christensson. (1994) Expression of Ki67 antigen, epidermal growth factor receptor and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein (LMP1) in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol*;30B(5):290-5.

## 9. Quellennachweis

**Abbildung 1:** Mundschleimhautepithel in der HE-Färbung

<http://labs.mmg.pitt.edu/sarkar/Images/Head%20and%20Neck%20Cancer.jpg>

Stand: 06.06.2013

**Abbildung 2:** Strukturformel von Cisplatin

[http://www.nature.com/nrd/journal/v4/n4/fig\\_tab/nrd1691\\_F3.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v4/n4/fig_tab/nrd1691_F3.html)

Stand: 06.06.2013

**Abbildung 3 links:** Strukturformeln der Pyrimidine Cytosin und Uracil

<http://library.med.utah.edu/NetBiochem/pupyr/pupy4.gif>

Stand: 06.06.2013

**Abbildung 3 rechts:** Strukturformel von 5-FU

<http://de.academic.ru/pictures/dewiki/70/Fluorouracil.png>

Stand: 06.06.2013

**Abbildung 4:** Strukturformeln von Docetaxel und Paclitaxel

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20816/figure/A11892/?report=objectonly>

Stand: 06.06.2013

**Abbildung 7:** Präparat angefärbt mit Ki67 bei 40-facher Vergrößerung

[http://www.rcpaqapa.netcore.com.au/notices/IH05-3/pictures/IHD05-04\\_Ki67\\_03.jpg](http://www.rcpaqapa.netcore.com.au/notices/IH05-3/pictures/IHD05-04_Ki67_03.jpg)

Stand: 06.06.2013

**Abbildung 8:** Vier unterschiedliche Bewertungsgrade bei der EGFR Färbung

[http://www.nature.com/modpathol/journal/v18/n8/fig\\_tab/3800438f1.html](http://www.nature.com/modpathol/journal/v18/n8/fig_tab/3800438f1.html)

Stand: 06.06.2013

**Abbildung 9:** Präparat angefärbt mit vWF bei 40-facher Vergrößerung

[http://jwi.charite.de/labore/histologie/paraffin\\_histologie/](http://jwi.charite.de/labore/histologie/paraffin_histologie/)

Stand: 06.06.2013

## Danksagung

Von ganzem Herzen möchte ich mich an dieser Stelle bei all jenen bedanken, die mich im Laufe meiner Dissertation unterstützt und so zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank allen Patienten, die unentgeltlich an den Studien der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde teilgenommen haben und deren Proben ich in meiner Arbeit verwenden durfte. Ihnen ist meine Arbeit gewidmet.

Ganz besonders danke ich Herrn Privatdozent Dr. M. Baghi für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung meiner Arbeit. Seine freundliche Art und Begeisterung für das Fach Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde haben mir große Motivation gegeben.

Meinen speziellen Dank schulde ich dem Team des Tumorlabors: Helena Baumann, Jeanne Dufreasne-Melchers und Erika Weith. Insbesondere Helena Baumann hat mich mit großem Elan in die Methoden meiner Arbeit eingearbeitet und mir im weiteren Verlauf mit jeder erdenklichen Unterstützung beigestanden. Auch der Onkologischen Arbeitsgruppe der HNO-Abteilung mit all ihren Beteiligten, die mir mit praktischer Hilfe, Tipps und Kritik zur Seite gestanden haben, danke ich sehr. Des Weiteren danke ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern der Klinik für Hals-, Nasen-Ohrenheilkunde, die die Patienten für meine Studie rekrutiert und sehr gut betreut haben. Ohne die durch ihre Arbeit gewonnen Proben, hätte ich kein Material zur Forschung gehabt.

Ich danke auch Tje Lin Chung aus dem Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung. Sie hat mir bei der Statistik dieser Arbeit von Anfang bis Ende zur Seite gestanden und viele gute Ideen miteingebracht.

Die abschließenden Dankworte gelten meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit mit viel Geduld und Verständnis unterstützt haben. Ihre Motivation hat mir immer wieder die Kraft gegeben weiter zu machen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Dr. med. Corinna Mühleib
Anschrift	Heimbacher Str. 28, 50937 Köln
Geburtsdatum und –ort	19.04.1983, in Mülheim an der Ruhr
Eltern	Margot Elisabeth und Dr. Horst Helmut Mühleib
Geschwister	Dr. Gesa Beatrice Sitter
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

1989 - 1993	Gemeinschaftsgrundschule Krähenbüschken in Mülheim an der Ruhr
1993 - 2002	Otto Pankok Gymnasium in Mülheim an der Ruhr
2002	Abitur

## Hochschulbildung

2002-2004	Vorklinischer Studienabschnitt der Humanmedizin Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt Main
Okt 2004	Physikum
2003-2005	Vorklinischer Studienabschnitt der Zahnmedizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt Main
2004-2007	Klinischer Studienabschnitt der Humanmedizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt Main
2007-2008	Praktisches Jahr: - an der Universitätsklinik Frankfurt am Main - am Royal North Shore Hospital in Sydney - am Universitätsspital Zürich
Dez 2008	Wahlfach: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
2008-2011	Staatsexamen der Humanmedizin Klinischer Studienabschnitt der Zahnmedizin, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt Main
2010	Promotion zum Dr. med. Johannes Gutenberg Universität, Mainz
2011	Staatsexamen der Zahnmedizin

## Famulaturen

August 2005	Famulatur in der MKG-Chirurgie St. Johannes Hospital, Duisburg Homberg
September 2005	Famulatur in der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde Krankenhaus München Schwabing
März 2006	Famulatur in der Orthopädie und Unfallchirurgie Kreiskrankenhaus Berchtesgaden
August 2006	Famulatur in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie Universitätsklinik Frankfurt am Main

## Beruflicher Werdegang

Seit Juli 2011	Assistenzärztin in der MKG-Chirurgie Universitätsklinik Köln
----------------	---



## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**“Immunologische Prognosefaktoren bei Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-/Hals-Tumoren nach TPF- Induktionschemotherapie“**

in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Betreuung und Anleitung von PD. Dr. Mehran Baghi ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation genannten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

Ort und Datum

---

Unterschrift