

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Komm. Direktorin: PD Dr. med. Gabriele Hänsgen)

Optimierung der Strahlentherapie von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich: Biologische und technische Entwicklungen

Habilitation

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. habil.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Thomas Kuhnt geboren am 08. Juli 1967 in Bad Frankenhausen

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Schubert (Halle)
- 2. Prof. Dr. med. Th. Wendt (Jena)
- 3. Prof. Dr. med. M. Flentje (Würzburg)

Datum der Verteidigung: 15.01.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013137

[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013137]

Referat und bibliographische Beschreibung

Einleitung: Die Radiotherapie (RT) ist neben der Operation die wichtigste Therapieoption in der Behandlung von Kopf- Hals- Tumoren und eine der effektivsten Methoden, Tumorzellen zu vernichten. Die modernen Möglichkeiten der Strahlentherapie erlauben eine verbesserte Dosisverteilung und höhere Dosiskonformität im Tumor (Erhöhung TCP) und im Gegenzug einen besseren Schutz des gesunden Normalgewebes im Strahlengang (Verringerung NTCP). Die kumulative Arbeit stellt klinische und experimentelle Ergebnisse vor, die in den letzten Jahren bei der Verbesserung der Strahlenbehandlung von Kopf-Hals-Tumoren erhoben wurden.

<u>Zielstellung:</u> Darstellung der Entwicklung neuer Methoden zur Radiochemo- und Targeted-Therapie sowie Strategien zur Vermeidung langfristiger, therapiebedingter Nebenwirkungen einer kurativen Radiotherapie im Kopf- Hals- Bereich. Zudem soll eine Einführung und Präsentation erster Ergebnisse zu zellbiologischen Untersuchungen der metabolisch-respiratorischen Störungen von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals-Bereich mit Relevanz für die zukünftige Behandlung gegeben werden.

Material und Methoden: Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich an Patienten mit lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals- Bereich.

Entwicklung zweier prospektiver, klinischer Studien einerseits zur intensivierten Radiochemotherapie (RCXT) und andererseits zur Radiochemoimmuntherapie (RCXIT) jeweils als Phase-I-Studien zur Bestimmung dosislimitierender Toxizitäten (DLT) sowie maximaler tolerabler Dosen (MTD) mit nachfolgender Phase II zur Ermittlung des ereignisfreien und Gesamtüberlebens nach 5 Jahren.

Zur Quantitätsbestimmung des Speichels während und nach RT wurde die Reizspeichelmenge pro ml/ 5min eingesetzt. Die Datenerhebung erfolgte bei Patienten, die mit alter 2D-RT oder neuer 3D-RT kurativ im Kopf-Hals-Bereich bestrahlt wurden. Anhand der Planungs-DVHs wurde der Dosismittelwert beider Parotiden (D_{mean}-Parotis) in Gy für die Gesamtbehandlung bestimmt und zur Speichelfließrate korreliert. Die NTCP-Berechnung der Parotis erfolgte zunächst auf der Basis des "Mean dose"-Modells mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Schätzung. Die Daten bildeten die Grundlage für die Erstellung eines neuen NTCP-Computerprogramms.

Einsatz der CT-Volumetrie zur Bestimmung der prognostischen Wertigkeit von Tumor (TV)- und Nekrosevolumen (NV).

Zur Charakterisierung metabolisch-respiratorischer Funktionen von prä-und malignen Geweben wurden hochauflösende Respirometrie, "skinned fiber"-Technik, Multiple Substrat-Inhibitor-Technik sowie Photospektroskopie verwendet. Des Weiteren wurde mittels PCR und Sequenzanalyse nach somatischen mtDNA-Mutationen geforscht.

Ergebnisse: In der RCXT-Phase-I wurde die MTD nach 12 Patienten unter 2 x wöchentlicher Paclitaxelgabe bei 30 mg/m² KOF gefunden. Die DLTs äußerten sich als zwei Erytheme im CTC- Grad 4 und eine febrile Neutropenie im CTC-Grad 3. Das 5-JÜL betrug 50% und das 5-Jahres-krankheitsfreie Überleben 43%. Die RCXIT läuft noch. Nach 9 Patienten trat keine DLT auf, so dass die MTD für Cisplatin bisher nicht gefunden wurde.

Patienten, die mit 3D-RT behandelt wurden, wiesen während der RT bis 12 Monate nach RT im Mittel höhere Speichelfließraten bei niedrigeren D_{mean} -Parotis-Werten auf als Patienten, die mit alter 2D-RT behandelt wurden. Nach Maximum-Likelihood-Schätzung betrug die TD50 für beide Parotiden 37Gy und konnte mit neuem Computerprogramm unter Anwendung des LYMAN-Ansatzes bestätigt werden.

Hohes intratumorales NV konnte als ungünstiger, unabhängiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben ermittelt werden und war als prädiktiver Faktor wichtiger als ein großes TV. Die Korrelation zwischen NV und schlechtem Überleben ging verloren, wenn die Patienten einer intensiven RCXT unterzogen wurden.

Mitochondrien humaner Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches wiesen charakteristische OXPHOS-Störungen auf. Als Ursache dafür konnten keine spezifischen mtDNA-Mutationen gefunden werden. Eine Komplex-I-Defizienz in Tumoren ging mit einer Verringerung des Cytochrom-c- Ausstromes im Vergleich zu Normalzellen einher.

Schlussfolgerungen: Die Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bleibt eine Herausforderung. Die simultane RCXT ist eine der effektivsten Methoden, diese Tumoren zu behandeln, und muss zukünftig mit den Targeted-Therapieansätzen verfeinert werden. Die Verbesserung der Lebensqualität durch Anwendung moderner Radiotherapietechniken ist möglich und eine Implementierung in die Routine dringend erforderlich. Tumormikromilieu- und - stoffwechselfaktoren sind heterogen, besitzen aber einen höheren prädiktiven Wert für das Überleben als das Tumorvolumen alleine, so dass deren sichere Identifizierung wichtig für die Therapieentscheidung ist.

Kuhnt, Thomas

Optimierung der Strahlentherapie von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich: Biologische und technische Entwicklungen

Halle, Univ., Med. Fak. Habil., 117 Seiten, 2007

Inhaltsverzeichnis

| 1 | Einleitung | 1 |
|-------|---|-----|
| 1.1 | Einführung | 1 |
| 1.2 | Einsatz von Radio-/ Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren | 9 |
| 1.2.1 | Sequentielle Chemo-Radiotherapie | 11 |
| 1.2.2 | Simultane Radiochemotherapie | 13 |
| 2 | Erhöhung der Radiosensibilisierung von Kopf-Hals-Tumoren | 17 |
| 2.1 | Intensive simultane Radiochemotherapie | 17 |
| 2.2 | Radiotherapie in Kombination mit ErbB-Rezeptor-Inhibitoren | 23 |
| 3 | Optimierung der Radiotherapietechnik zur Nebenwirkungsreduktion | 29 |
| 4 | Tumornekrosevolumen, ein prädiktiver Faktor für das Überleben | 48 |
| 5 | Metabolisch-respiratorische Störungen in Tumoren | 55 |
| 5.1 | Mechanismen der metabolischen Verschiebung | 55 |
| 5.2 | Metabolische OXPHOS- Störungen in Plattenepithelkarzinomen | 58 |
| 5.3 | Metabolische OXPHOS-Störungen und mtDNA-Mutationen | 66 |
| 6 | Zusammenfassung | 76 |
| 7 | Literatur | 81 |
| 8 | Liste der Originalarbeiten zur kumulativen Habilitationsschrift | 110 |
| 9 | Thesen | 112 |
| 10 | Lebenslauf | |
| 11 | Erklärungen | |
| 12 | Danksagung | |

Abkürzungen

3D 3 dimensional

CTC Klassifikation der Akuttoxizitäten (common toxicity criteria)

CTV Klinisches Zielvolumen (clinical target volume)

DLT Dosislimitierende Toxizität

Dmean Mediane Dosis

DVH Dosis- Volumen- Histogramm

EGFR Epithelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor)

erbB Familie von Rezeptortyrosinkinasen

HART Hyperfraktioniert- akzelerierte Radiotherapie

ICRU Internationale Kommission der radiologischen Einheiten

IGRT Bildgeführte Radiotherapie (image guided radiotherapy)

IMRT Intensitätsmodulierte Radiotherapie

KPS Karnofsky Performance Status

mAK Monoklonaler Antikörper

MTD Maximale tolerable Dosis

NTCP Normalgewebekomplikationswahrscheinlichkeit

OXPHOS Oxidative Phosphorylierung

PCR Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

PTV Planungszielvolumen (planning target volume)

rCRS Revidierte Cambridge Referenz Sequenz der mtDNA

RCXT Radiochemotherapie

ROS Reaktive Oxigene Spezies

TCP Tumorkontrollwahrscheinlichkeit

TD Toleranzdosis

TKI Tyrosinkinaseinhibitor

UICC Internationale Vereinigung zur Klassifizierung bösartiger Tumoren

1 Einleitung

1.1 Einführung

Krebserkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches umfassen ätiologisch und histologisch sehr verschiedene bösartige Neubildungen der Lippe, Mundhöhle, Nasen-Nasennebenhöhlen, Hypopharynx des Nasopharynx, Oropharynx, Larynx einschließlich der Tumoren der Speicheldrüsen. Aus dem englischen Sprachgebrauch von "Head and Neck Cancer" abgeleitet, handelt es sich häufig um Tumoren, die von den Epithelien des oberen Aerodigestivtraktes ihren Ausgang nehmen. Zumeist werden jedoch unter diesem Terminus die Tumoren der Mundhöhle, des Oropharynx, des Larynx und Hypopharynx verstanden, allein aus der Tatsache, dass diese Tumoren eine vergleichbare Ätiologie besitzen und mit deutlichem zahlenmäßigen Übergewicht in der Kopf-Hals-Region vorkommen. In der Arbeit sollen explizit die Ergebnisse der Radiochemotherapie dieser Tumoren einschließlich Targeted-Therapie besprochen werden. Der prozentuale Anteil z.B. von Mundhöhlenkarzinomen an den gesamten Krebserkrankungen variiert geographisch erheblich. Die Inzidenz schwankt in den westlichen Industrieländern zwischen 2,0 in Finnland und 20,0 in Nordfrankreich, in bestimmten Regionen Indiens liegt sie um 12,0 und in Afrika bei nur 1,2/100 000 Einwohner und Jahr (Franceschi et al. 2000). Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen an der Erkrankungsrate beträgt in den westlichen Industrieländern circa 4 : 1 (Boyle et al. 1990). Nach ursprünglich stetiger Zunahme der Inzidenz, vor allem bei Männern in früheren Jahren, beobachtet man entgegen der Annahme seit ungefähr einem Jahrzehnt kaum mehr Veränderungen bei beiden Geschlechtern. Laut Schätzungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut handelt es sich beim Mundhöhlen- und Rachenkarzinom mit jährlich 7 800 Neuzugängen und einer altersstandardisierten Inzidenz von circa 17/100 000 Einwohner um die siebthäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern, hingegen stehen diese Tumoren bei Frauen mit 2 600 Neuerkrankungen und der Inzidenz von eirea 4/100 000 Einwohner im Jahre 2002 an fünfzehnter Stelle in Deutschland (Bertz et al. 2006). Mit geschätzten 4700 Fällen beider Geschlechter lag der prozentuale Anteil an der Zahl aller Krebssterbefälle im Jahr 2002 bei knapp 4,5%. Die höchsten Erkrankungsraten werden bei Männern in den Altersgruppen zwischen 55 und 65 Jahren registriert, wobei das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 61 und für Frauen bei 69 Jahren liegt.

Aus den o.g. geographisch unterschiedlichen Tumorhäufigkeiten lässt sich ableiten, dass Umweltfaktoren eine pathogenetisch bedeutsame Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Exogene Noxen, wie das Rauchen und hoher Alkoholkonsum, gelten Hauptrisikofaktoren. Raucher erkranken bis zu sechsmal häufiger an bösartigen Neubildungen des Mundes und Rachens als Nichtraucher, wobei die Kombination Rauchen und Alkohol das Risiko dramatisch erhöht (Keller & Terris 1965, Moore 1971, Marshall et al. 1992). Zu den Risikofaktoren zählen weiterhin chronisch-mechanische Reizungen und Entzündungen der Mundhöhle, z.B. durch schlecht sitzende Zahnprothesen oder scharfkantige Füllungen sowie vernachlässigte Mundhygiene und Drogenkonsum (Maier et al. 1991). Des Weiteren konnten das humane Papilloma-Virus (HPV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV) als ätiologisch bedeutend für die Karzinomentstehung herausgefunden werden (Sand et al. 2002, Smith et al. 1998). Berufsbedingte Faktoren, wie das Arbeiten ohne Schutzvorrichtungen in der Farben- und Lackindustrie oder das Inhalieren von Holzstäuben bei Tischlern, wurden ebenso als krebsauslösend eingestuft, so dass einige Krebserkrankungen im Kopf-Hals-Bereich als Berufskrankheiten in der Bundesrepublik Deutschland anerkannt werden (Tisch et al. 1996, Maier et al. 2002).

Über 90% aller Karzinome im Kopf-Hals-Bereich sind histologisch Plattenepithel-karzinome mit den besonderen Charakteristika großer Tumorvolumina und frühzeitiger regionärer Lymphknotenmetastasierung, begründet in einer raschen Tumorproliferation (sehr kurze potenzielle Tumorverdopplungszeiten von nur wenigen Tagen sind bekannt) sowie einer schon etwa 3 Wochen nach Beginn der Strahlentherapie einsetzenden, akzelerierten Repopulierung von Tumorzellen, Abb. 1.

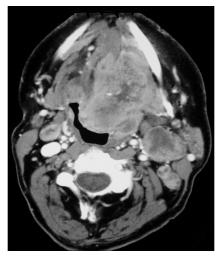


Abb. 1: Kontrastmittel-Computertomogramm (CT) eines Plattenepithelkarzinoms im linken Mundboden T4 N2c M0 im intermediären UICC-Stadium IV B. Besonders charakteristisch für diese Tumoren sind große Tumorvolumina, eine frühzeitige regionäre Lymphknotenmetastasierung und ausgedehnte intratumorale Nekrosen.

Die Strahlentherapie gilt heute neben der Operation als die wichtigste Therapieoption in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren und stellt eine der effektivsten Methoden dar, Tumorzellen zu vernichten. Das therapeutische Vorgehen richtet sich nach der TNM-Klassifikation der UICC und den daraus abgeleiteten Stadien (Wittekind et al. 2005). Bei Tumoren der frühen Stadien I und II gilt die primäre Radiotherapie (RT) als Alternative zur Operation. In der Adjuvanzsituation wird bei den operablen intermediären Stadien III und IV A,B eine Radio- bzw. Radiochemotherapie (RCXT) empfohlen und für die lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Stadien III und IV A,B gilt dagegen die definitive Radiochemotherapie als die Therapie der Wahl. Ist eine zusätzliche Chemotherapie aus Gründen der Multimorbidität oder verminderter Patientencompliance nicht möglich, so sollte nur eine unkonventionell-fraktionierte (hyperfraktioniert und/oder akzeleriert) Radiotherapie bestritten werden. Und noch im späten Stadium IV C oder im Fall eines lokoregionalen Rezidivs kann die Radio(chemo)therapie mit gutem Palliativeffekt, vor allem zur Schmerzlinderung oder Blutungsstillung, appliziert werden. Ein besonderer Vorteil der R(CX)T liegt in der Möglichkeit, die Tumorerkrankung organ- und funktionserhaltend zu behandeln.

Die Tabelle 1 zeigt in Kurzform die aus den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) entnommene, derzeitig gültige Stadieneinteilung und mit den sich daraus ergebenden Empfehlungen der Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der UICC mit den derzeitig gültigen Therapieempfehlungen der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). T: Tumor; N: Lymphknoten; M: Fernmetastasen; OP: Operation; RT: Radiotherapie; RCXT: Radiochemotherapie; CXT: Chemotherapie.

| Frühe Stadien | Intermedi | Spätes Stadium | | |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|----------------|--|
| T1-2 N0 | T3-4 N0, | T4 N0, | jedes T, | |
| | jedes T N1-3 | jedes T N1-3 | jedes N, | |
| | (funktionell operabel | (funktionell inoperabel | M1 | |
| (Stadium I+II) | Stadium III/IV A,B) | Stadium III/IV A,B) | (Stadium IV C) | |
| | | | | |
| OP | OP | RCXT | CXT | |
| (+ RT fakultativ) | + | <u>+</u> | <u>+</u> | |
| oder | RT/ RCXT | (Salvage- OP N) | RT | |
| alternativ | | | | |
| RT | | | | |

Waldfahrer et al. (1999) konnten anhand des eigenen Krankengutes von über 3 200 Patienten für die Lokalisationen Mundhöhle, Oropharynx, Larynx und Hypopharynx bei durchschnittlich 22% ein Stadium III und bei etwa 41% ein lokal fortgeschrittenes Stadium

IV A,B nach UICC registrieren, in denen, selbst bei operationstechnisch und tumorbiologisch noch sinnvoll erscheinenden Resektionen, die funktionell vertretbaren Grenzen meist überschritten sind. Die krankheitsfreien Überlebensraten dieser Tumoren nach 5 Jahren, vor allem ab UICC-Stadium IV A, liegen unter 32% und sind leider immer noch sehr unbefriedigend, siehe Abb. 2.

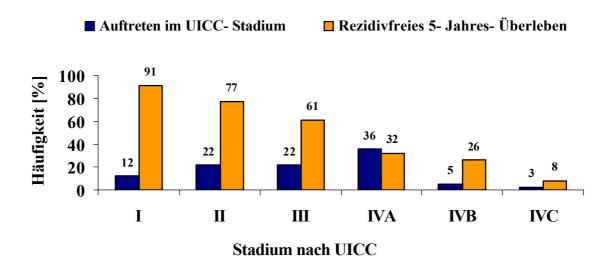


Abb. 2: Rezidivfreies 5-Jahres-Überleben von circa 3200 Patienten in Abhängigkeit vom UICC-Stadium der aktuell gültigen TNM-Klassifikation. Häufigkeiten erstellt nach Waldfahrer et al. (1999).

Dieses schlechte Ergebnis des krankheitsfreien Überlebens hängt vor allem damit zusammen, dass neben den 20 - 30% lokoregionären Rückfällen auch 20% Fernmetastasierungsraten registriert werden, die heute immer noch praktisch ohne Chance auf Heilung sind. Außerdem tragen die Patienten dieser Stadien ein besonders hohes Risiko einer Zweitmalignomerkrankung in den tieferen Abschnitten des Aerodigestivtraktes. So bleibt die therapeutische Herausforderung, vor allem für diese fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV A,B, die lokale Behandlungsoption der Strahlentherapie weiter zu optimieren und sie frühzeitig mit den Möglichkeiten der neuen systemischen Therapieansätze zu kombinieren, um die lokoregionären Kontrollraten zu verbessern und der fatalen Fernmetastasierung wirksamer entgegentreten zu können.

Die vorliegende Arbeit ist in 4 Kapitel gegliedert, in denen eigene Ergebnisse anhand von Originalpublikationen im Kontext zum aktuellen Stand der Forschung der multimodalen Therapie von lokal fortgeschrittenen, nicht operablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich dargestellt werden.

Bei den Tumoren der intermediären UICC-Stadien III und IV A,B gilt heute die definitive simultane Radiochemotherapie als Behandlung der ersten Wahl. So zeigt Kapitel 2 zwei mögliche Strategien auf, die therapeutische Wirksamkeit von ionisierender Strahlung zu erhöhen.

Zum einen kann die Therapieintensität durch eine Kombination von zwei eigenständig wirksamen Zytostatika in dosisdichter und simultaner Gabe zur unkonventionellen Radiotherapie ohne Therapiepause gesteigert werden. Cisplatin (1.Generation) hatte sich bereits in klinischen Studien als eines der effektivsten Medikamente gegenüber Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich erwiesen. Das zur Gruppe der Taxane gehörende Paclitaxel (Taxol®, 2. Generation) schien ein weiteres, vielversprechendes Medikament zu sein. Die abschließenden Daten der eigenen Phase-I/II-Studie sollen im Ergebnisteil vorgestellt und diskutiert werden. Grundsätzlich stellt das Vorgehen der simultanen Kombination von Radiotherapie mit hocheffektiven, an unterschiedlichen Orten des Zellzyklus angreifenden Zytostatika eine sehr gute Strategie dar, jedoch verhindern die dabei auftretenden, außerordentlich hohen Akuttoxizitäten an Mundschleimhaut und Knochenmark den Weg ausschließlich in dieser Richtung weiter zu verfolgen.

Zum anderen können neue, molekulare Therapieansätze angewendet werden, die vor allem als Zielstruktur den erbB1-Rezeptor im Visier haben. Das "molekulare Targeting" als Strategie in der Krebstherapie unterscheidet sich vom Ansatz erheblich von den bisher erprobten und etablierten Methoden der antiproliferativen Chemotherapie, indem hier versucht wird, tumortypische Signalwegsveränderungen als spezifische Therapieziele zu nutzen. Die pharmakologische Hemmung von Tyrosinkinase-Rezeptoren aus der EGFR-Familie stellt gegenwärtig ein vieldiskutiertes Beispiel dieser Strategie dar. Eine Reihe von Hemmern aus den zwei bisher bekannten Kategorien der monoklonalen erbB-Rezeptor-Antikörper (mAK) und mehr oder weniger Rezeptor-spezifischen, kleinmolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) haben ihre Wirksamkeit bereits in der klinischen Behandlung einiger menschlicher Karzinome gezeigt. Dabei sind vor allem Rezeptor-Mutationen für ein Ansprechen auf das Targeting als bedeutsam ermittelt worden. Die Integration der EGFR-Blockade in Krebsbehandlungsregime steht dennoch erst am Beginn. Aus präklinischen Untersuchungen ist bekannt, dass die EGFR-Überexpression auf Tumorzellen einer der bedeutendsten Marker für eine Radioresistenz in vitro und in vivo ist. Mit der Blockade der erbB-Rezeptoren kann diese Radioresistenz aufgehoben werden. Die bisher hervorstechendsten klinischen Resultate wurden vor Kurzem durch Bonner et al. (2006) in einer Phase-III-Studie an Patienten mit lokal fortgeschrittenem, inoperablen Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich belegt, wo die

Strahlenbehandlung unter EGFR-Blockade durch den chimären, monoklonalen Antikörper Cetuximab (RTCET) gegenüber einer alleinigen Radiotherapie (RT) geprüft und das mediane Überleben durch die Kombination signifikant gesteigert wurde (54 Monate vs. 28 Monate; p = 0.02). Die klinischen Fortschritte auf dem Gebiet des molekularen Targeting sind aber insgesamt noch gering. Im theoretischen Ansatz scheint das Kombinieren eines Tyrosinkinasehemmers und eines Chemotherapeutikums simultan zur Radiotherapie einen zusätzlichen additiven antitumoralen Effekt zu besitzen. Zur Abklärung wurde der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung des Autors die einzige europaweite Phase-I/II-Studie im Rahmen der Behandlung von inoperablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich übertragen. Die präliminären Daten der Phase I sind durchaus vielversprechend, um Hoffnungen auf verbesserte Therapieergebnisse zu erfüllen. Dabei bleibt jedoch noch viel, hinsichtlich Rationale und möglicher Langzeitnebenwirkungen, zu untersuchen. Es spielt u.a. die Tatsache eine Rolle, dass die EGFR-Blockadestrategien nicht nur einen Rezeptor angreifen, sondern die gesamte EGF-Rezeptorfamilie und eine Vielzahl nachfolgender Signalwege mit einbeziehen.

Das Kapitel 3 befasst sich mit der Senkung radiogener Spätfolgen durch den konsequenten Einsatz moderner Radiotherapietechniken. Obwohl die Risiken einer Radiotherapie vergleichsweise gering und schwere Komplikationen selten geworden sind, so gibt es dennoch langfristige, den Patienten meist stark guälende, chronische Therapiefolgen, wie z.B. die Mundtrockenheit, die Xerostomie. Der Nachteil der heute noch gebräuchlichen Bestrahlungstechniken, die auf der 2D-Bestrahlungsplanung basieren, ist die fehlende Schonung der Glandulae parotideae, was sich in einer mangelnden Speichelfließrate manifestiert. So wurde eine neue, 3D-konformale Bestrahlungstechnik entwickelt, die zumindest einen partiellen Funktionserhalt der Parotiden ermöglicht. Es werden die Technik, als auch die Daten vergleichender Messungen der Speichelfließraten zwischen alter und neuer Radiotherapie vorgestellt. Gleichzeitig soll der Stand der derzeitigen technischen Möglichkeiten zur weiteren Verbesserung der Bestrahlungskonformität mithilfe der intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) und die neuen Möglichkeiten der bildgestützten Radiotherapieplanung (IGRT) durch die Implementierung von MRT oder PET besprochen werden, die nicht nur eine Erhöhung der Tumorzellvernichtung (Erhöhung der Tumorkontrollwahrscheinlichkeit - TCP), sondern auch die Verminderung am Normalgewebe (Verminderung Nebenwirkungen der Normalgewebevon komplikationswahrscheinlichkeit - NTCP) erhoffen lassen.

Aus der Verbindung von klinischen Daten, in unserem Fall gewonnen aus der Speichelfließrate unter und nach der Radiotherapie, und den aus der physikalischtechnischen Bestrahlungsplanung erzeugten Dosis-Volumen-Histogrammen (DVHs) lassen sich Schadenswahrscheinlichkeiten der sich im Strahlengang befindlichen Normalgewebe vorausbestimmen. Gerade für die Glandula parotis liegen in der Literatur keine konsistenten Daten vor, ab welcher Dosis über das gesamte Organ ein bleibender Funktionsverlust unter einer kurativen Radiotherapie zu erwarten ist. Ein auf den Daten eigener Untersuchungen beruhendes, neu entwickeltes, klinikeigenes Computerprogramm erlaubt die Erstellung mehrerer NTCP-Modelle nun auch für die Glandula parotis.

Kapitel 4 soll den Stand der eigenen Forschung zur Bedeutung von Tumormikromilieufaktoren für eine Radiotherapie beschreiben. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich zeichnen sich zumeist durch ein großes Tumorvolumen des Primärherdes sowie der infiltrierten, regionalen zervikalen Lymphknoten aus. Dieses große Gesamttumorvolumen stellt einen ungünstigen prognostischen Faktor für das Überleben dar. Dies konnte zweifelsfrei an Patienten belegt werden, die einer alleinigen kurativen Strahlenbehandlung unterzogen wurden. Der negative Zusammenhang wurde aufgelöst, sobald die Patienten zusätzlich mit einer intensiven Chemotherapie behandelt wurden. Dies führt zwangsläufig zu dem Schluss, dass nicht nur die Anzahl klonogener Tumorzellen und deren intrinsische Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung für die Prognose entscheidend ist, sondern diese ebenso von intratumoralen Milieufaktoren abhängt. Aus gemeinsamen Voruntersuchungen mit Becker et al. (2001) liegen experimentelle Daten über den intratumoralen Sauerstoffpartialdruck (Tumor-pO₂) und dessen prognostische Bedeutung bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich vor. Dabei konnten die tumorassoziierte Anämie und das intratumorale hypoxische Subvolumen als prognostisch wichtige Marker identifiziert werden. Der quantitative Wert des Tumor-pO₂ hängt von einer ganzen Anzahl tumor- und patienteneigener Parameter ab. Aber er ist weitgehend unabhängig von Tumorgröße oder Tumorgrading, so dass der Tumor-pO₂ neben anderen Faktoren einen weiteren, unabhängigen Surrogatmarker für das Überleben darstellt. Weil die Messung der intratumoralen Hypoxie mit dem Eppendorf-pO₂-Histographen, wie in den Jahren 1998-2001 im Rahmen von Studien angewandt, durch ihre Invasivität erheblich belastet ist, wurde nach Wegen gesucht, mithilfe einfacherer, und wenn möglich, non-invasiver Verfahren in gleichem Maße verlässliche Aussagen über das prognoserelevante tumorale Mikromilieu zu erlangen. Die im kontrastmittelverstärkten Computertomogramm sichtbare intratumorale Nekrose stellte sich in unserer Untersuchung

als ein möglicher, äquivalenter Marker zur Tumorhypoxie heraus. Die Nekrosezone wurde volumetrisch im prätherapeutischen Routine- Computertomogramm vermessen und mittels Cox-Regressionsmodell auf ihre vorhersagende Wertigkeit für das ereignisfreie Überleben überprüft. Diese Ergebnisse werden vorgestellt und ihre eventuelle Bedeutung für zukünftig zu planende klinische Studien dargelegt.

Im Kapitel 5 werden experimentelle Ergebnisse präsentiert, die in Zusammenarbeit mit dem Muskellabor der Universitätsklinik für Neurologie, dem Institut für Pathologie und der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheikunde, Kopf- und Halschirurgie der Halle-Wittenberg Martin-Luther-Universität erhoben wurden. Die intensiven Voruntersuchungen zum Tumormikromilieu sollten durch Grundlagenversuche der Pathobiochemie und Pathogenetik von Tumorzellen ergänzt werden. Zunächst wurde versucht, die Methoden der respiratorischen Funktionsdiagnostik, etabliert vor allem zur Diagnostik von Muskelzytopathien, auf Tumorgewebe zu übertragen. Die Untersuchungen Tumorzelllinien sowie an einem Tiertumormodell, begannen an Rhabdomyosarkom der Ratte, und wurden nach erfolgreichem Abschluss an humanen Tumorgeweben eingesetzt. Da die Messung metabolisch-respiratorischer Funktionen immer vergleichend zu den entsprechenden nichtmalignen Ausgangsgeweben auszuführen sind, lag es nahe, aufgrund der vorhanden klinischen Daten des Mikromilieus von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, die Untersuchungen auf die Tumorprogression von der Normalzelle über prämaligne Vorstufen bis hin zum invasiven Karzinom auszudehnen. Es gelang, wie beim R1H-Rhabdomyosarkom, in den Plattenepithelkarzinomen sowie in deren prämalignen Vorstufen eine Reihe von spezifischen Funktionsstörungen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), der mitochondrialen Membranen und der Glykolyse im Vergleich zu ihren gesunden Ausgangsgeweben aufzuzeigen. Die Daten der Literatur gaben außerdem Hinweise, dass multiple somatische mitochondriale DNA-Mutationen bei Patienten mit Dysplasien, Carcinomata in situ und invasiven Karzinomen obligat vorhanden sind. Ob sie ursächlich für die nachgewiesenen funktionellen Störungen der OXPHOS sein könnten, sollte mit der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Diese Ergebnisse sind jedoch als präliminär zu betrachten, stellen aber die Ausgangslage dar für weitere Fragen der Forschung auf diesem Gebiet.

1.2 Einsatz von Radio-/ Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren

Mit dem Einsatz hochenergetischer Photonenstrahlung in Form von Cobalt 60-Strahlern in den 60-er Jahren oder später durch den Bau moderner Linearbeschleuniger gelang es erstmalig, eine ausreichende Dosis auch im Körperinneren zu platzieren. Seit dieser Zeit wurde als Standard der Behandlung bei nicht-resektablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich die alleinige, normfraktionierte Radiotherapie mit 5-mal wöchentlich 1,8 oder 2 Gy bis 70 Gy über 7 bis 8 Wochen definiert. Die Ergebnisse waren jedoch mit weniger als 20% Gesamtüberleben nach 5 Jahren mehr als unbefriedigend (Mendenhall et al. 2000). Die Hauptursachen des Therapieversagens lagen vorwiegend in einer erneuten, schnellen, lokalen oder regionären Tumorprogression, was aufgrund zweier, mittlerweile bekannter tumorbiologischer Phänomene erklärbar ist. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich proliferieren einerseits sehr rasch (potenzielle Tumorverdopplungszeiten von circa 4,5 Tagen sind bekannt mit direkter Abhängigkeit zur EGF1-Rezeptor-Überexpression dieser Tumoren) und führen andererseits zur akzelerierten Repopulierung (beschleunigtes Wachstumsverhalten) von Tumorzellverbänden mit radiogen-induzierter EGF1-Rezeptor-Überexpression bereits drei Wochen nach Beginn einer Strahlentherapie (Petersen et al. 2001, Tarnawski et al. 2003). Gerade diese Zellfraktionen mit ihrem vermehrten EGFR-Besatz, die zudem mit einer hohen intratumoralen Hypoxie assoziiert sind, werden hauptverantwortlich für das schlechte lokale Ansprechen der Tumoren auf eine Radiotherapie gemacht. Aus diesem Grund war es notwendig, die alte normfraktionierte Radiotherapie grundlegend zu überdenken und alternative, d.h. unkonventionell-fraktionierte Radiotherapieregime zu entwickeln, die dann in den 1980erund 1990er-Jahren etabliert wurden (Bourhis et al. 2006). Dabei spielte die applizierte Dosis pro Zeiteinheit (Dosis-Zeit-Fraktionierungs-Beziehung) die ausschlaggebende Rolle. hyperfraktionierte Regime (HFRT) zeigten sich gegenüber Normfraktionierung mit einer signifikanten Erhöhung des Gesamtüberlebens um 8 % nach 5 Jahren als außerordentlich effektiv, was sich bei Einbeziehung aller unkonventioneller Fraktionierungen (hyperfraktioniert und akzeleriert - HART) insgesamt in einem Überlebensvorteil von 3,4 % (HART vs. NFRT 39,7 % vs. 36,3 %) nach 5 Jahren widerspiegelt, wie mit der von Bourhis et al. (2006) publizierten Metaanalyse belegt wurde. Eine Untersuchung von Fowler (2007), der Radiotherapieregime aus großen klinischen Studien unter Zuhilfenahme des Linear-Quadratischen Modells verglich, konnte zeigen, dass die höchsten Tumorzellabtötungsraten durch eine hyperfraktionierte Radiotherapie mit leichter Verkürzung der Gesamtbehandlungszeit (durch Akzelerierung)

auf 4 - 6 Wochen erreicht werden. Das an der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg seit 2001 verwendete unkonventionelle Schema zur Radiotherapie bei inoperablen Kopf-Hals-Tumoren zeigt die Abb. 3 (Kuhnt et al. 2003b).

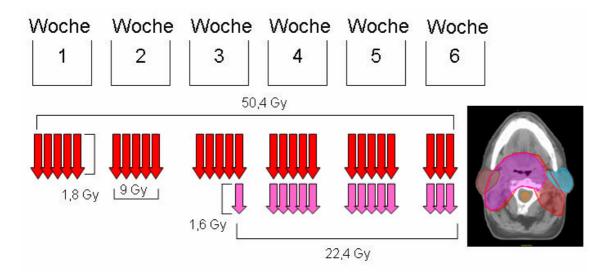


Abb.3: Standardschema einer unkonventionellen Fraktionierung ("concomitant Boost-Radiotherapie") der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angewendet bei definitiver Radiotherapie von lokal fortgeschrittenen, nichtresektablen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. Das Planungszielvolumen (im Planungs-CT rotes Volumen) wird über die gesamte Radiotherapiezeit einmal täglich bestrahlt. Nach circa 3 Wochen wird nachmittags mindestens im 6 Stunden Abstand eine zweite Fraktion mit leicht verringerter Dosis appliziert, die nur noch das kleinere Boostvolumen (im Planungs-CT pinkfarben dargestelltes Volumen, das in das Planungszielvolumen integriert ist) therapiert.

Einen grundlegend anderen Ansatz, Radioresistenz zu überwinden sowie die akzelerierte Repopulierung von Tumorzellen zu verhindern, verfolgt die Kombination von Strahlenund Chemotherapie. Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sind durchaus chemosensibel und zeigen hohe Remissionsraten nach neoadjuvanter Chemotherapie. Für die Behandlung der lokal fortgeschrittenen, inoperablen Plattenepithelkarzinome bestehen prinzipiell drei Varianten einer Kombination von Strahlen-und Chemotherapie. Die Chemotherapie kann einerseits als sogenannte Induktions- oder neoadjuvante Chemotherapie in sequentieller Abfolge vor der definitiven Radio(chemo)therapie/ Operation oder andererseits gleichzeitig mit der kurativen Radiotherapie als sog. simultane Radiochemotherapie verabfolgt werden. Zu diesen beiden Möglichkeiten liegen umfangreiche Studienergebnisse vor. Der dritte Ansatz wird vor allem bei Nasopharynxkarzinomen angewendet, wo nach einer kurativen simultanen Radiochemotherapie, manchmal auch mit vorheriger Induktionschemotherapie, eine adjuvante Erhaltungschemotherapie über einen Zeitraum von 6 Monaten angeschlossen wird. Dieses Vorgehen soll in seiner Rationale ein besseres Gesamtüberleben durch die

Vermeidung der metachronen Fernmetastasierung erbringen. Jedoch liegen bis dato keine eindeutig positiven Ergebnisse vor, so dass weitere Studien zur Klärung des Stellenwertes dieser Anwendung notwendig sind (Baujat et al. 2006). Da sich dieser Therapieansatz bei Karzinomen anderer Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches, so beim Mundhöhlen-, Oropharynx-oder Larynx-/ Hypopharynxkarzinomen, ohnehin nicht durchgesetzt hat, soll in der vorliegenden Arbeit nicht weiter darauf eingegangen werden.

1.2.1 Sequentielle Chemo-Radiotherapie

Theoretisch sollten sich über eine rasche Tumorschrumpfung nach initial verabreichter Chemotherapie die Ergebnisse einer nachfolgenden Strahlentherapie verbessern, da die Anzahl an Tumorzellen nominal kleiner geworden und sich diese dann leichter kontrollieren lassen. Sequentielle Chemo-Radiotherapie-Konzepte ("neoadjuvante" oder auch sog. Induktionschemotherapien vor definitiver Radiotherapie) wurden in den 1970erund 1980er-Jahren in zahlreichen Studien erprobt. In der ersten Metaanalyse dieser Studien von Pignon et al. (2000), die vor allem die frühen Studien im Therapiezeitraum 1965-1993 auswertete, zeigte sich jedoch nur ein geringer, nicht-signifikanter Überlebensvorteil durch die zusätzlich eingeführte, vorausgehende Chemotherapie. Als Gründe für das Versagen bzw. den lediglich geringen Effekt kommen folgende Erklärungsmöglichkeiten in Betracht:

• ineffiziente Wirkung der Chemotherapie auf Subpopulationen mit relativer Radioresistenz

Die Heilungswahrscheinlichkeit hängt im Wesentlichen vom Vorhandensein relativ resistenter Zellklone¹ ab. Unter der Hypothese, dass diese für die Heilung kritischen Tumorzell-Subpopulationen auch gegenüber Chemotherapeutika resistent sind, würde die vorgeschaltete Chemotherapie generell nur die auf beide Modalitäten empfindlichen (unkritischen) Zellen abtöten und so zu keinem zusätzlichen Gewinn führen.

beschleunigte Repopulierung durch Chemotherapie- induzierte Remission
 Eine durch chemotherapieinduzierte, unvollständige Tumorschrumpfung (partielle Remission) führt als Gegenreaktion der verbliebenen Tumorzellen zu einer erneuten, sogar beschleunigten Proliferation (sog. akzelerierte Repopulierung). So könnte der initial positive Effekt der raschen Tumorschrumpfung (Reduktion der

-

¹ Eine absolute Strahlenresistenz auf zellulärer Ebene gibt es nicht, da alle Zellen mit zunehmender Strahlendosis (im Gegensatz zur Behandlung mit Zytostatika) abgetötet werden können

Tumorzellzahl) schnell durch diesen Kompensationsmechanismus aufgehoben werden und letztendlich nur zur o.g. Selektion chemo- und radioresistenter Tumorzellklone führen. Diese These ist als Ursache für ein Versagen der Strahlentherapie sowie als Resistenzmechanismus auf die weitere Chemotherapie experimentell und klinisch eindeutig bereits belegt.

• Induktion von Strahlenresistenz durch Milieuveränderung

Eine wesentliche Änderung der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen durch die Vorbehandlung (Induktion) mit Zytostatika erscheint anhand experimenteller Daten eher unwahrscheinlich. Stattdessen ist die sekundäre Strahlenresistenz durch andere Mechanismen (z.B. verstärkte Tumorhypoxie durch chemotherapieinduzierte Anämie) in experimentellen Modellen belegt; die klinische Bedeutung jedoch unklar.

• ineffektive Chemotherapiesubstanzen

Vor allem die älteren Studien sind mit Chemotherapeutika der 1. Generation (z.B. 5-FU, Bleomycin oder Cisplatin) durchgeführt worden. Mit diesen Substanzen konnten keine hohen Remissionsraten (z.B. komplette Remissionen) erreicht werden.

In der jüngeren Vergangenheit gab es Hinweise, dass eine neoadjuvante Chemotherapie durchaus Teil der Therapie von lokal fortgeschrittenen, Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich sein könnte. Mit Zunahme der lokoregionären Kontrolle durch effektivere, simultane Radiochemotherapieregime, die ein längeres, lokoregionäres rezidivfreies Überleben ermöglichen, nahm auch die Häufigkeit einer Fernmetastasierung zu. Diese hat heute immer noch praktisch keine Chance auf Heilung. Um dieser systemischen Mikrometastasierung frühzeitig begegnen zu können, wurden neoadjuvant neue Medikamentenkombinationen in hoher Dosierung eingesetzt. Eine Phase-II-Studie, die eine intensive Taxan-basierte 2-fach-Kombinationsinduktionschemotherapie (wöchentlich Carboplatin AUC2 + Paclitaxel 135mg/m² KOF, beides über 6 Wochen) mit nachfolgender HFRT (Gesamtdosis 75 Gy) und simultaner Chemotherapie mit 5-FU + Hydroxyurea + Paclitaxel (100 mg/m² KOF), jeweils 5 Zyklen, konnte ein 3-Jahres-Gesamtüberleben von 70% erreichen und die Fernmetastasierung unter 10 % drücken (Vokes et al. 2003). In einer Phase-III-Studie, die eine Induktion als 3-fach-Kombination mit Paclitaxel (175mg/m² KOF Tag 1) + Cisplatin (100mg/m² KOF Tag 2) + 5-FU (1000 mg/m² KOF Dauerinfusion Tag 2-6) im Taxan-Arm gegenüber einer 2-fachKombination Cisplatin (100mg/m² KOF) + 5-FU (1000mg/m² KOF als Dauerinfusion Tag 1-5) im Taxan-freien-Arm, beide Regime jeweils im Abstand von 21 Tagen 3 mal appliziert, verglich, ließen sich in über 30 % komplette Remissionsraten (CR) im Taxan-Arm gegenüber 14% im 2-fach-Arm ohne Taxan schon vor Beginn der nachfolgenden und beidseits gleichen simultanen Radiochemotherapie (Normfraktionierung mit 2 Gy bis 70 Gy + Cisplatin 100mg/m² KOF Tag 1, 21, 42) erzielen (Hitt et al. 2005). Das Erreichen einer CR durch die Taxan-basierte Induktion war in der multivariaten Analyse der wichtigste prognostische Faktor für ein besseres Überleben, was sich auch als Vorteil im medianen Überleben bei den primär nicht-resektablen Patienten im Taxan-Arm vs. Cisplatin/5-FU-Arm mit 36 Monate vs. 26 Monate; p = 0,046, belegbar niederschlug.

Intensive neoadjuvante (Induktions-) Chemotherapien, basierend auf den bisher effektivsten Medikamenten Taxan, Platin und 5-FU, haben jedoch prinzipiell den Nachteil, dass sie ohnehin hohe Mukositis- (5-FU-Effekt), Nephro (Cisplatin-Effekt)- und Myelotoxizität (Kombinations-Effekt Cisplatin + Taxan) besitzen. Diese treffen zudem Patienten, die häufig zuvor schon durch exogene Noxen, wie Alkohol und Rauchen, bereits verringerte Organreserven aufweisen und deshalb eine nachfolgende simultane Radiochemotherapie lediglich mit schwacher Chemotherapie erlauben. Phase-III-Studien, die hochdosierte Taxan-basierte Induktionschemotherapien und schwacher nachfolgender Radiochemotherapie gegen hochdosierte, Taxan-basierte simultane Radiochemotherapien vergleichen, fehlen leider bisher. Diese müssten folgen, um die Wertigkeit einer Taxanbasierten Induktion im Hinblick auf ein verbessertes Überleben auch durch Senkung von Fernmetastasen zu belegen. Der Einsatz einer Induktionschemotherapie außerhalb von klinischen Studien bleibt somit weiter umstritten. Möglicherweise kann der Stellenwert der "alleinigen" Induktionschemotherapie sowieso nicht mehr vollständig geklärt werden, da bereits vermehrt Phase-II-Studien durchgeführt werden, die zur Induktionschemotherapie die neuen EGFR-Rezeptor-Inhibitoren, z.B. den monoklonalen Antikörper Cetuximab, also das molekulare Targeting, in die Schemata aufnehmen (Gibson & Forastiere 2006). So wird wahrscheinlich eine Risikostratefizierung Bedeutung gewinnen, die Patienten anhand wichtiger prognostischer Faktoren, wie z.B. Tumorvolumen, Mikromilieu oder molekulare Tumorcharakteristik, klassifiziert und sie entweder zunächst einer starken Induktionschemotherapie oder gleich einer definitiven, simultanen Radiochemotherapie zuführt.

1.2.2 Simultane Radiochemotherapie

Die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber ionisierender Strahlung variiert, abgesehen von der Dosis und der Dosis/Zeit (dose rate), von der Zellzyklus-Phase, in der sie sich gerade

befindet. Zusätzlich zu den Reparaturmechanismen (repair) überwachen auch spezielle Kontrollpunktsysteme (checkpoints) die Zellzyklus-Progression. Beschädigte Zellen halten den Zellzyklus in der späten G1-Phase vor der Replikation oder in der G2-Phase direkt vor der Teilung an, um für die Reparatur ein verlängertes Zeitfenster zu haben und damit das zelluläre Überleben zu steigern (Bache et al. 2001). Der G2/M-Kontrollpunkt ist ein Schutzmechanismus, der eine Teilung geschädigter, fehlerhafter DNA verhindern soll. Eine Option, die Radiotherapiewirkung lokal am Tumor zu verstärken, ist die Intensivierung der Strahlenwirkung durch radiosensibilisierende Substanzen. Dabei werden im Wesentlichen DNA-wirkende (z.B. mit Einfluss auf DNA-Reparatur oder Signalübertragung) von DNA-nicht-wirkenden Substanzen (z.B. mit Einfluss auf Reoxygenierung) unterschieden, wobei ein idealer Kombinationspartner für die Radiotherapie eine Substanz wäre, die selektiv nur im Tumor akkumuliert, selbst nicht toxisch ist und voraussagbar zeitabhängig pharmakologisch wirkt (Kvols 2005). Chemotherapeutika sind weithin Substanzen, die zumeist die DNA (Zellzyklus), aber auch das Zytoskelett oder die Membranen mit ihren Barrierefunktionen als ihre kritischen Zielstrukturen ansehen.

Eine Chemotherapie wird vorwiegend simultan zu einer Radiotherapie, d.h. zur lokalen Wirkungsverstärkung ("Radiosensibilisierung") eingesetzt. Die lokale Kombinationswirkung ist dann größer als die einfache Addition der Einzeleffekte (überadditive Wirkung, Schlagwort: 1 + 1 = 2,5). Um diesen überadditiven Effekt zu erreichen, müssen die Zytostatika in bestimmten Zeitabständen zu der täglichen Bestrahlungsfraktion (abhängig vom Wirkmechanismus der jeweiligen Substanz) während der Strahlentherapieserie (sog. simultane RCXT) appliziert werden (Dunst 2000). Die ersten Erkenntnisse stammten aus der schon zitierten Metaanalyse von Pignon et al. (2000), die Studien des Zeitraums 1965-1993 auswerteten, dass bei nicht-resektablen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches vor allem die simultane Gabe einer Chemotherapie zur Bestrahlung eine bessere lokale Tumorkontrolle und damit eine Verlängerung des rezidivfreien Überlebens sowie eine signifikante Erhöhung des Gesamtüberlebens erbringt. Als Medikamente wurden Mitomycin C, Bleomycin, 5-FU + Hydroxyurea + Leukovorin (LV) sowie später die Platinderivate Cisplatin und Carboplatin mit einer normfraktionierten Radiotherapie kombiniert. Begonnen wurde in den 1980er-Jahren mit einer medikamentösen Monotherapie, um die Radiotherapie nicht durch übermäßige akute Nebenwirkungen zu gefährden. Als wesentliche Fortschritte ausblieben, setzte man später etwas effektivere 2fach- Substanzkombinationen ein. Die Verbindung Cisplatin + 5-FU hat sich seitdem als "Goldstandard" durchgesetzt (Fietkau et al. 1991, Lavertu et al. 1999, Merlano et al. 1996). Neuere Studien geben Hinweise, dass über eine Intensivierung der Radiotherapie durch Anwendung unkonventioneller Fraktionierungen (HART) und simultaner Chemotherapie ein Überlebensvorteil um etwa 5-10 % gegenüber einer alleinigen unkonventionellen Radiatio erbracht werden kann. Zwei deutsche Studien der Arbeitsgemeinschaft Radioonkologie der Krebsgesellschaft (ARO) stützen mit gleichlautenden Ergebnissen diese Aussage (Budach et al. 2005, Staar et al. 2001, Semrau et al. 2006 update). Besonders das ARO-95-06-Schema von Budach et al. (2005) mit HART plus Mitomycin C + 5-FU erwies sich als gut verträglich, dabei unkompliziert anwendbar und der sogar 10 % höher dosierten, alleinigen Radiotherapie (CX-HART 70,6 Gy vs. HART 77,6 Gy) im 5-Jahres-Gesamtüberleben mit 29 % CX-HART gegen 25 % HART überlegen. Studien, die diese unkonventionellen gegen konventionell-fraktionierte Radiochemotherapieregime vergleichen, stehen noch aus, laufen aber derzeitig.

Anhand der neuesten Metaanalyse von Budach et al. (2006) konnte nach der Dauerinfusion von 5-FU auch die simultane Gabe des Medikamentes Cisplatin, ein Medikament der 1. Zytostatikageneration, zu einer hyperfraktioniert-akzelerierten Radiotherapie als Therapieempfehlung für lokal fortgeschrittene, primär inoperable Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches ausgesprochen werden. Die Daten basieren im Wesentlichen auf vier prospektiv-randomisierten Phase-III-Studien, siehe Tabelle 2, modifiziert nach Brizel & Esclamado (2006).

Tabelle 2: Vier Phase-III-Studien mit simultaner Radiochemotherapie getestet gegen eine alleinige unkonventionelle Radiotherapie. Es wurden innerhalb der Studien sehr unterschiedliche Zyklen und Dosierungen von Cisplatin eingesetzt, so dass kein Standard einer Cisplatinanwendung derzeitig daraus definiert werden kann. 5-JÜL: 5-Jahres-Gesamtüberleben; Cis: Cisplatin; RCXT: simultane Radiochemotherapie; CXT: Chemotherapie; Gy: Gray; d: Tag; FNCLCC: Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer; RT: Radiotherapie; 5-FU: 5 Fluorouracil; KOF: Körperoberfläche; Wo: Woche.

| Phase III- | RC | XT | R' | Γ | CXT | Cisplatin | 5-JÜL | p- Wert |
|---------------|----|----|----|----|-----------|------------------------------|-----------|---------|
| Studie | Gy | Wo | Gy | Wo | | Dosis | (%) | |
| Duke | 70 | 7 | 75 | 6 | Cis/5-FU | 12 mg/m ² /KOF/d | 40 vs. 29 | 0,05 |
| Univ. USA | | | | | | d 1-5; Wo 1,5 | | |
| (n=122) | | | | | | | | |
| Yugoslavische | 77 | 7 | 77 | 7 | Cisplatin | 6 mg/m ² /KOF/d | 46 vs. 25 | 0,008 |
| Studiengruppe | | | | | | täglich | | |
| (n=171) | | | | | | | | |
| FNCLCC | 80 | 7 | 80 | 7 | Cis/5-FU | 100 mg/m ² /KOF/d | 48 vs. 36 | 0,05 |
| Frankreich | | | | | | d 1,21,42 | | |
| (n=171 | | | | | | | | |
| Schweizer | 74 | 6 | 74 | 6 | Cisplatin | 20 mg/m ² /KOF/d | 46 vs. 32 | 0,15 |
| Studiengruppe | | | | | | d 1-5; Wo 1,5 | | |
| (n=224) | | | | | | | | |

Jedoch kann eine allgemeine Empfehlung einer standardisierten Cisplatindosierung aus diesen Studien nicht abgeleitet werden, da ein besonderer Nachteil der Studien in den sehr unterschiedlich verwendeten Cisplatinzyklen mit höchst variablen Dosierungen liegt. Eine diesbezügliche Klärung ist erforderlich. Doch, abgesehen von der noch zu ermittelnden optimalen Vorgehensweise der simultanen, cisplatinhaltigen Radiochemotherapie, können nicht alle Patienten einer so belastenden Therapie unterzogen werden. Denn unabhängig von den tumorassoziierten Risiken, ist der Einsatz dieser Therapie von einer Reihe patientenbezogener Ausgangsfaktoren abhängig. Hohes Alter, ein KSP < 60% sowie Folgeerkrankungen durch fortgesetzten Missbrauch von Alkohol und Nikotin stellen Kontraindikationen gegen eine cisplatinhaltige Radiochemotherapie dar. Nicht zuletzt wirkt sich häufig eine mangelnde Kooperation der Patienten erschwerend aus. All dies muss in die medizinische Entscheidung, ob der Patient einer intensiven Therapie zugeführt werden kann oder nicht, mit einfließen.

2 Erhöhung der Radiosensibilisierung von Kopf-Hals-Tumoren

2.1 Intensive simultane Radiochemotherapie

Für Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich in sehr gutem Allgemeinzustand (KPS 90-100 %) und ohne therapierelevante Begleiterkrankungen blieb zu prüfen, ob durch die Intensivierung der Chemotherapie mit Anwendung neuer Zytostatika weitere Steigerungen Therapieeffekts möglich sind. In ersten klinischen Studien zeigte Paclitaxel (Taxol®), ein Medikament der 2. Zytostatikageneration, bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich eine gute antitumorale Aktivität (Forastiere et al. 1998, Vokes et al. 1995). Es leitet als pflanzliches Alkaloid eine durch pathologische Bildung und Stabilisierung der Mitosespindel einen Mitosearrest (M-Phase des Zellzyklus) ein, wird hepatisch abgebaut und zu über 80% biliär eliminiert. Mittlerweile liegen mehrere Phase-I/II-Studien vor, die eine HART mit einer Paclitaxel-basierten Chemotherapie verbunden haben (Kies et al. 2001, Machtay et al. 1999). Das 3-Jahres-Überleben in diesen Studien lag bei 60%, womit die außerordentliche Effektivität dieser Kombinationstherapie sowohl lokal als auch hinsichtlich der Fernmetastasenraten bewiesen wurde. In unserer Studie sollte, im Gegensatz zu Studien der Nordamerikanischen Radiotherapie- und Onkologie-Gruppe (RTOG), der Ansatz verfolgt werden, ob viele kleine, dosisdichte Applikationen einer zweier Kombinationschemotherapie hocheffektiver, unterschiedlich wirkender Chemotherapeutika mit einer HART die Responseraten noch weiter erhöhen können (Radiosensibilisierung durch ständige Anwesenheit von zytotoxischen Medikamenten analog einer Dauerinfusion im Vergleich zu Monotherapien mit wenigen, sehr hochdosierten und somit nur im 3-Wochen-Rhythmus verabreichbaren Zyklen).

Im Jahr 1998 wurde in der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eine Therapieoptimierungsstudie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, die Taxol-Studie, gestartet (Kuhnt et al. 2003a). In Anbetracht der damaligen experimentellen Datenlage war voraussagbar, dass wohl Cisplatin, ein Zytostatikum der 1. Generation mit zellzyklusspezifischer G1-/S-Phase-Wirksamkeit durch kovalente Bindung von Platinkomplexen an DNA und Proteine, als sog. Platin-DNA-Addukte oder "cross-linking" mit 90% iger renaler Elimination, eines der effektivsten Chemotherapien bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu sein schien. Es wurde zusätzlich als neue Substanz Paclitaxel (Taxol®) dem Cisplatin hinzugefügt, um die unterschiedlichen intrazellulären Angriffspunkte beider Medikamente auszunutzen. Außerdem werden von verschiedenen Eliminationssystemen aus dem Körper ausgeschieden, so dass auch eine Leber und Niere vorliegt. Da es sich um eine Spreizung der Toxizitäten auf Erstanwendung von den zwei intensiv wirksamen Chemotherapeutika Cisplatin (CIS) und Paclitaxel (PAC) in Kombination mit einer kurativen, unkonventionellen Radiotherapie Radiotherapiepause handelte, stand zunächst ohne prospektiv Verträglichkeitsprüfung der Therapie an. Eingeschlossen wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich der intermediären Stadien III und IV A,B mit (a) Alter 18 bis 75 Jahre, (b) Karnofsky-Performance-Status > 70 %, (c) messbarem Tumor, (d) Fehlen schwerer Begleiterkrankungen und (e) unterschriebenem Einverständnis zur Studie. Als Ausschlusskriterien galten Kontraindikationen gegen eines der beiden Chemotherapeutika, Nasopharynxkarzinome und ein bereits zum Erstdiagnosezeitpunkt nachgewiesenes M1-Stadium. In dieser Studie wurde eine hyperfraktioniert-akzelerierte Radiotherapie (HART) bis zu einer Gesamtdosis von 70,6 Gy eingesetzt, die schon zuvor in einer anderen randomisierten Studie geprüft worden war, wobei damals zur Radiotherapie gleichzeitig die Kombinationen 5-FU / Mitomycin C appliziert wurde (Budach et al. 2005). Während die Cisplatin-Dosierung mit 20 mg/m² Körperoberfläche (KOF) an 5 aufeinander folgenden Tagen in der 1. und 5. Therapiewoche unverändert blieb, wurde die Paclitaxel-Dosis ab 20mg/m² KOF zweimal wöchentlich in Phase I eskaliert. Die Dosissteigerung von Paclitaxel betrug in den nächsten Dosisstufen jeweils 5 mg/m² KOF. Pro Dosisstufe wurden 3 Patienten eingeschlossen. Der Studienplan wird in Abb. 4 gezeigt.

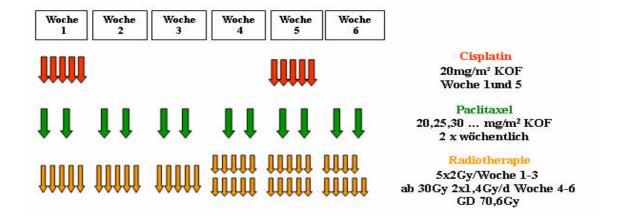


Abb. 4: Therapieschema der HART/CIS/PAC-Phase-I-Studie bei inoperablen Plattenepithel-karzinomen der intermediären Stadien III und IV A,B des Kopf-Hals-Bereiches. Die Dosiseskalation wurde für Paclitaxel vorgenommen. Begonnen wurde mit einer zweimal wöchentlichen Paclitaxeldosis von 20 mg/m² KOF. Trat keine DLT auf, wurde nach 3 Patienten Paclitaxel um 5 mg/m² KOF gesteigert. KOF: Körperoberfläche.

Die Zahl der Patienten in der Phase-I-Studie unterlag den auftretenden Toxizitäten auf den jeweiligen Dosisstufen. Für die Phase-II-Studie waren circa 20 Patienten vorgesehen mit einer Rekrutierungszeit von 24 Monaten.

Studienziele:

- Endpunkte der Phase-I-Studie waren die Ermittlung der maximal tolerablen Dosis (MTD) und die dosislimitierende Toxizität (DLT) für die Kumulation von Paclitaxel bei gleichbleibender Dosis von Cisplatin und Radiotherapie.
- Statistische Endpunkte der Phase-II-Studie waren das Gesamt- sowie das ereignisfreie Überleben.

In beiden Studienphasen wurden die Patienten in den ersten beiden Jahren vierteljährlich und dann im einhalbjährlichen Rhythmus über 5 Jahre nachbeobachtet.

Die endgültigen Daten der Phase-I-Studie liegen vor (Kuhnt et al. 2003a). In der Zeit von 09/1998 bis 09/1999 wurden 12 Patienten mit drei Dosisstufen für Paclitaxel eingeschlossen. Die MTD wurde für die zweimal wöchentliche Paclitaxelgabe mit 30mg/m² KOF gefunden. Die dafür verantwortlichen dosislimitierenden Toxizitäten (DLT) waren zwei Erytheme im CTC-Grad 4 und eine febrile Neutropenie im CTC-Grad 3. Zudem ereigneten sich zwei Todesfälle: eine Peritonitis nach PEG-Anlage in Woche drei der laufenden Behandlung und ein septisches Kreislaufversagen bei prolongierter Neutropenie, ausgelöst durch eine Fingerverletzung an einem rostigen Nagel. Durch die strenge Überwachung der Hb-Werte und die frühzeitige Erythrozytensubstitution mittels Transfusionen oder EPO-Gaben bei Werten unter 6,8 mmol/l (unter 11 g/dl) wurden frühzeitig schwerwiegende Toxizitäten der Erythropoese verhindert. Dieses Prozedere sah der Studienplan ausdrücklich so vor, da eine therapieassoziierte Anämie bei laufender Behandlung die Prognose negativ beeinflusst. Alle Patienten wurden maximal supportiv mit prophylaktischen Antibiotikagaben abgeschirmt und im Fall einer Neutropenie auch therapeutisch mit Antibiotika versorgt. Zur Absicherung gehörten zudem die strenge Elektrolytsubstitution und die Ernährung mit hyperkalorischer PEG-Sondennahrung. Prätherapeutisch war die gründliche Zahnsanierung Bedingung, Infektionsquellen zu beseitigen.

Die abschließenden Ergebnisse der Phase-II-Studie liegen gleichfalls vor (Kuhnt et al. 2006b). Zwischen 9/1999 bis 9/2002 konnten insgesamt 29 Männer und 3 Frauen im

mittleren Alter von 54,7 Jahren eingeschlossen werden. Das Gesamtüberleben nach 5 Jahren betrug 50%, siehe Abb. 5. Das krankheitsfreie Überleben lag bei 43% und war sehr gut, siehe Abb. 6.

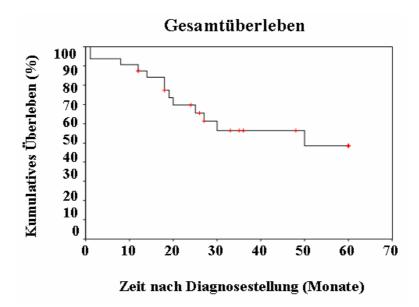


Abb. 5: HART/CIS/PAC-Phase-II-Studie bei inoperablen Plattenepithelkarzinomen der intermediären Stadien III und IV A,B des Kopf-Hals-Bereiches. Kaplan-Meier-Schätzung des Gesamtüberlebens. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben beträgt 50%.

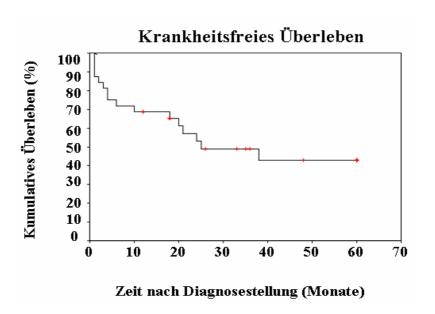


Abb. 6: HART/CIS/PAC-Phase-II-Studie bei inoperablen Plattenepithelkarzinomen der intermediären Stadien III und IV A,B des Kopf-Hals-Bereiches. Kaplan-Meier-Schätzung des erkrankungsfreien Überlebens. Das 5-Jahre-krankheitsfreie-Überleben beträgt 43%.

Gleichfalls muss mit 10% die sehr geringe Fernmetastasenrate erwähnt werden. Im Follow-up mit einem Median von 3 Jahren wurden keine erhöhten chronischen Strahlenfolgen an der Haut, Knochen oder Nerven registriert. Drei langzeitüberlebende

Patienten litten unter schmerzhaften, persistierenden Mukositiden. Fünf Patienten mussten aufgrund chronischer Xerostomie im Grad 3 und eingeschränkter Schluckfähigeit die PEG-Sonde länger als ein Jahr nach Therapie behalten.

Die Ergebnisse belegen, dass die Kombination von zwei eigenständig wirksamen Zytostatika in einzeldosisverminderter, jedoch dosisdichter Gabe mit einer intensivierten, zeitverkürzten Radiotherapie auch im Kopf-Hals-Bereich möglich ist und die Therapieansprechraten sowie das Überleben verbessern kann. Garden et al. (2004) veröffentlichten die Ergebnisse der Nordamerikanischen Radiotherapie und Onkologie Gruppe in der RTOG-97-03-Studie, die im dritten Arm der 3-armigen Studie (Arm 1 Cisplatin + 5-FU, Arm 2 Hydroxyurea + 5-FU) die Kombination Cisplatin + Paclitaxel in niedriger, wöchentlicher Dosierung testeten. Für die Radiotherapie wurde, im Unterschied zu unserer Studie, eine normfraktionierte Radiotherapie mit 2 Gy täglich bis 70 Gy Gesamtdosis gewählt. Die Ergebnisse belegen mit 47% lokaler Kontrolle und einem Gesamtüberleben von 67% jeweils nach 3 Jahren die Effektivität der Kombination. Die akuten Toxizitäten waren denen unserer Studie vergleichbar. Die Autoren schließen aus den Ergebnissen, dass die Kombination von Radiotherapie + Cisplatin + Paclitaxel wegen der besonderen Effektivität als Experimentalarm in zukünftigen Phase-III-Studien einzusetzen sei. Eine erst jüngst veröffentlichte amerikanische Phase-II-Studie, die eine hyperfraktionierte Radiotherapie mit simultaner Gabe von 5-FU + Cisplatin + Paclitaxel als Therapieschema wählte, konnte eine 3-Jahres-Überlebensrate von 66% und 71% komplette Remissionen (CR) erreichen (Abitbol et al. 2005). Patienten mit CR wiesen zudem mit 77% im 2-Jahres-Überleben ein exzellentes Ergebnis auf. Die Grad-3/4-Akutnebenwirkung einer Mukositis war mit 84% die vorherrschende Toxizität und lag prozentual in Übereinstimmung zu unserer Studie. Daraus resultierte eine prolongierte posttherapeutische Abhängigkeit der Ernährung von der elektiv gelegten PEG-Sonde. Daneben konnten febrile Neutropenien und leichtgradige toxische Nephropathien Vergleiche werden. Weitere Untersuchungen und insbesondere registriert normfraktionierter gegenüber hyperfraktioniert-akzelerierter Radiotherapien mit der Substanzkombination Cisplatin + Paclitaxel oder der Vergleich Cisplatin + 5-FU in Verbindung mit der unkonventionellen Radiotherapie (HART) in Phase-III-Studien sind nötig, um diese Ergebnisse abzusichern. Letzteres Protokoll wurde bereits zur Förderung bei der Deutschen Krebshilfe als deutschlandweite Multizenterstudie eingereicht und positiv beantwortet. Somit wird erstmalig die Kombinationsbehandlung Cisplatin + Paclitaxel zu einer hyperfraktioniert-akzelerierten Radiotherapie auch in einer Phase-III-

Studie im multizentrischen Ansatz überprüft. Der Studienbeginn wird für Mitte 2007 erwartet. Unabdingbar für die Durchführung solcher Regime ist eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit, da vor allem auch die Möglichkeit einer "Rettungsoperation" am Primärtumor sowie an den residualen regionären Lymphknoten ausdrücklich mit im Protokoll überprüft werden soll.

Einer weiteren Intensivierung der simultanen Radiochemotherapie im Kopf-Hals-Bereich durch noch effektivere oder höherdosierte Chemotherapeutika muss jedoch mit großer Skepsis begegnet werden. Vor allem die außerordentlich hohe Akuttoxizität Mukositis ist eine nicht zu unterschätzende, schwere Komplikation. Zwar konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Häufigkeit einer Mukositis Grad 3 mit einem besseren Gesamtüberleben hergestellt werden, was die Effektivität der Therapie auf den epithelialen Stammzellpool zu belegen scheint, jedoch sind gehäufte Übergänge in schwere, sehr schmerzhafte, chronische Mukositiden zu beobachten gewesen (Kuhnt et al. 2006b). Unter diesen toxischen Kombinationen scheint das Regenerationspotenzial der Schleimhautstammzellen ausgeschöpft zu sein, so dass die Lebensqualität der Patienten zunehmend durch die Verschärfung der Behandlungsintensität bedroht wird. Abhilfe könnten hier neue Substanzen schaffen, die selektiv vornehmlich die Tumorzellen angreifen.

Von den derzeitig in klinischen Studien geprüften neuen Therapieansätzen eignen sich einige speziell auch für die Kombination mit der Radiotherapie. Hier sind vor allem Methoden der Beeinflussung der Angiogenese (Synergismus von antiangiogenen Therapien und Strahlentherapie sind in experimentellen Modellen bereits belegt) zu nennen. Ferner sind Methoden und Substanzen interessant, die gezielt die intrazelluläre Tumorhypoxie bekämpfen, wie selektiv anti-hypoxisch wirkende Radiosensibilisierer (z.B. Tirapazamin, wird z.Zt. in Phase III mit Radiochemotherapie auch in unserem Zentrum geprüft) oder Methoden zur direkten Verbesserung der Tumoroxygenierung (Hyperbare Oxygenierung - HBO) oder Therapien gegen den Hypoxie-induzierenden Faktor-1a (HIF-1a). Die präklinische, aber auch die klinische Forschung hat sich neuen, molekularen Therapien zugewendet, die insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich die Zelloberflächenrezeptoren der erbB-Familie ins Visier nehmen.

2.2 Radiotherapie in Kombination mit ErbB-Rezeptor-Inhibitoren

Das "molekulare Targeting" als Strategie in der Krebstherapie unterscheidet sich vom Ansatz gegenüber den bisher erprobten und etablierten Methoden der antiproliferativen Chemotherapie erheblich, weil hier versucht wird, tumortypische Signalwegsveränderungen als spezifische Therapieziele zu nutzen (Bild et al. 2006, Ono & Kuwano 2006). Die pharmakologische Hemmung von Tyrosinkinase-Rezeptoren aus der EGFR-Familie stellt gegenwärtig ein vieldiskutiertes Beispiel dieser Strategie dar (Ang et al. 2002, Quynh-Thu & Giaccia 2003). Eine Reihe von Hemmern aus zwei bisher bekannten Kategorien, zum einen monoklonale erbB-Rezeptor-Antikörper (mAK) und zum anderen mehr oder weniger rezeptorspezifische, kleinmolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), haben ihre Wirksamkeit bereits in der klinischen Behandlung einiger menschlicher Karzinome gezeigt (Huang et al 1999, Johnston et al. 2006).

Epitheliale oder mesenchymale Zellen exprimieren Rezeptoren der erbB-Familie. Überaktivierungen innerhalb des erbB-Signalnetzwerkes werden bei vielen Malignomen des Menschen in hohem Prozentsatz gefunden und sind mit erhöhter Aktivität von proliferativen, metastatischen und Prosurvival-Signalwegen assoziierbar (Marmor et al. 2004, Normanno et al. 2005). Derartige erbB-Überaktivitäten können von Überexpression der Liganden oder Rezeptoren sowie von konstitutiver Rezeptoraktivierung herrühren und durch Gen-Duplikation, Gen-Rearrangements oder Mutationen/ Deletionen bedingt sein (Jones et al. 2006, Sweeney & Carraway 2004, Warren & Landgraf 2006). In zellbiologischen Studien ist meist indirekt auf das onkogene Potential von Hyperaktivitäten im erbB- Signalnetz geschlossen worden (Harari 2004, Holbro et al. 2003, Jorissen et al. 2003). Aus präklinischen Untersuchungen ist außerdem bekannt, dass die gesteigerte EGFR-Expression eine der bedeutendsten Indikatoren für eine Radioresistenz maligner transformierter Zellen in vitro als auch in vivo ist (Akimoto et al. 1999, Balaban et al. 1996, Sheridan et al. 1997). Durch die Blockade von erbB-Rezeptoren (z.B. mit ZD 1839 = Gefinitib) kann in Tumorzellen eine derartige Radioresistenz überwunden werden. Zudem konnte eine mit der Dosis der erbB-Blockade steigende Apoptoserate in Tumorzelllinien induziert sowie synergistische Effekte von Tyrosinkinase-Inhibitoren und der Strahlungsdosis belegt werden (Bianco et al. 2002, Solomon et al. 2003). Zur Überwindung von Radioresistenz sind nicht nur erbB1-Antagonisten, sondern auch unspezifische TKIs einsetzbar (Damiano et al. 2005). Ein wichtiger Resistenzfaktor gegenüber ionisierender Bestrahlung stellt die Tumorhypoxie dar. Experimentelle Daten belegen die gleichgerichtete Beziehung zwischen hoher Tumorhypoxie und gesteigerter erbB-Rezeptor-Expression (Swinson & O'Byrne 2006).

Eine klinisch wichtige Manifestation der Radioresistenz während einer fraktionierten Radiotherapie ist die Tumorzellrepopulation, die entweder auf einem übermäßig beschleunigten Wachstum überlebender Tumorzellen oder einer verminderten Sterberate radioresistenter Tumorzellen beruht (Schmidt-Ullrich et al. 1999, Tarnawaki et al. 2002). Am Modell des FaDu-Tumors, einem Plattenepithelkarzinom der Nacktmaus, konnte der Zusammenhang zwischen einer Induktion von EGFR während einer fraktionierten Radiotherapie und der Tumorzellrepopulation zweifelsfrei belegt werden (Petersen et al. 2001). Dieses Ergebnis bestätigte eine klinische Studie an Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, welche die Höhe der EGFR-Expression zur Gesamtradiotherapiezeit und zur lokalen Tumorkontrolle gegenüberstellte (Eriksen et al. 2005).

Da die Signalaktivität der erbB-Rezeptor-Familie über multiple Signalwege mit Überlebens-Aktivierung Apoptoseunterdrückung und während embryonaler Organentwicklung, bei Funktionserhalt adulter Gewebe und bei Tumor-Entwicklung sowie -Progression verbunden ist, kann die Abschwächung der strahlungsinduzierten Tumorzellapoptose als Mechanismus der Radioresistenz bei ErbB-Rezeptor-Induktion plausiblerweise angenommen werden (Danielsen & Maihle 2002, Kabore et al. 2004, Teraishi et al. 2005). Dazu passend gibt es viele Beispiele von Apoptose-Aktivierung durch erbB-Rezeptor-Hemmung in Tumormodellen (Dubska et al. 2005). Mitochondrien fungieren als Integratoren einer Fülle von unterschiedlichen apoptotischen Signalwegen und weisen in unbehandelten Tumorzellen eine Tendenz zum erhöhten Innenmembranpotential auf, während die apoptotische Signalaktivierung mit Reduktion der mitochondrialen Polarisierung und Störungen in der Atmungsketten-Maximalaktivität verbunden ist (Danial & Korsmeyer 2004, Gross et al. 1999, Mootha et al. 2001, Summerhayes et al. 1982). Die Erfassung von Mitochondriendepolarisierung und Atmungskettenkomplexaktivität kann deshalb als Indikator von pro-apoptotischer Wirkung der erbB-Hemmung genutzt werden. Die Diskrepanz zwischen eindrucksvollen vorklinischen Ergebnissen und den z.T. weniger eindrucksvollen klinischen Daten liegt möglicherweise darin, dass ein einzelnes EGFRblockierendes Medikament allein nicht ausreicht, um eine vollständige Tumorkontrolle zu erreichen, da es weiter abwärts gelegene Signalwege gibt, die die EGFR-Blockade ersetzen. Der Beeinflussung von abwärts gelegenen Wegen kann möglicherweise mit Kombinationen von Hemmstoffen entgegengewirkt werden, die sowohl anti-EGFR-

Blocker mit verschiedenen Mechanismen (mAK + TKI), als auch kritische abwärts gelegene Moleküle wie Stat-3, Raf, Ras, oder die mitogen-aktivierten Proteinkinasen ins Visier nehmen.

Der Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Tumorzelloberfläche, im Besonderen die der erbB1-4-Gruppe auch bei Kopf-Hals-Tumoren, wird eine prognostische Wertigkeit zugeschrieben. Bei diesen Tumoren findet sich in circa 90-100% eine Überexpression von EGFR-RNA und/oder Protein, welches als unabhängiger, ungünstiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und für die Rate an lokoregionären Rezidiven identifiziert werden konnte (Harari & Huang 2005). Gefunden wurden mannigfaltige Induktionen der erbB-Rezeptoren, welche zu einer Überkreuz-Verständigung mit downstream-Wegen und Genen führt, die dann auf der transkriptionalen sowie der posttranskriptionalen Ebene wirken. Überlappungen der Signalauslösung der verschiedenen erbB-Rezeptoren implizieren vielfältige Interferenzen innerhalb der Familie und nicht nur speziell zielgerichtet auf den erbB1 in Tumorzellen. Der erbB2-Rezeptor spielt eine außerordentlich bedeutsame Rolle bei der Targeted-Therapie des Mammakarzinoms. Die Höhe der Expression bestimmt die maligne Proliferation und ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben. Die Überexpression der erbB2-Rezeptoren in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches beträgt circa 20% (Field 1992). Seine Hochregulation führt zu einem erhöhten Risiko für Lymphknotenmetastasen und somit zu einem verschlechterten Überleben. Dies konnte am Beispiel von Mundhöhlenkarzinomen gezeigt werden (Xia et al. 1997). Gleiches konnte für den erbB3-Rezeptor gefunden werden, der in etwa der Hälfte der Fälle bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich überexprimiert wird (Shintani et al. 1995). Eine erbB4-Rezeptor-Überexpression kann ebenfalls bis zu 50% bei diesen Patienten vorliegen, wobei seine Bedeutung bisher noch unklar ist.

Demnach besteht ein neuer, interessanter Ansatz für die Therapie maligner Tumoren in der Blockade der EGFR-Signalübertragungswege. Bisher sind zwei Wege der Blockade des EGFR bekannt und bereits im klinischen Einsatz. Zum einen kann der Rezeptor von extrazellulär durch Bindung mit einem Antikörper von seinen Liganden, z.B. EGF oder TGF-alpha, getrennt werden. Zum anderen dringen sog. kleine Moleküle (small molecules) in die Zelle ein und hemmen das Enzym Tyrosinkinase am intrazellulären Ende des EGFR und verhindern so den weiter abwärts gerichteten Signalweg. Die meiste klinische Erfahrung besteht bisher mit dem rekombinanten, chimären, monoklonalen Antikörper C225 (Cetuximab, Erbitux®). Die Verträglichkeit dieses Antikörpers ist außerordentlich

gut. In einer randomisierten Phase-III-Studie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen, inoperablen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches konnte durch die Kombination von Cetuximab mit Strahlentherapie versus alleiniger Strahlentherapie die 2-Jahres-Überlebensrate auf 62% im Gegensatz zu 55% verbessert werden (Bonner et al. 2006).

Mit der zusätzlichen Gabe von Cisplatin, dessen Wirksamkeit in Kombination mit einer Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren schon eindeutig belegt ist, und dem chimären, monoklonalen AK Cetuximab zu einer HART gelang es in einer amerikanischen Phase-II-Studie, nach 2 Jahren sogar eine progressionsfreie Überlebensrate von 76% zu erzielen (Pfister et al. 2006). Damit konnte ein Synergismus der Wirkungen durch die Kombination von Strahlentherapie, simultan appliziertem Cisplatin (additiver, radiosensibilisierender Effekt) und eines EGFR-Blockers (Überwindung der tumoreigenen Radioresistenz und Verhinderung der akzelerierten Tumorzellproliferation) angenommen werden. Allerdings war die akute Toxizität inakzeptabel hoch, vermutlich der Cisplatindosis von 2-3 mal 100mg/m² KOF geschuldet, so dass die Studie abgebrochen werden musste. Aus präklinischen Daten ist bekannt, dass die Affinität des Antikörpers zum EGF-Rezeptor hoch und mit einer bereits ermittelten Standarddosierung ausreichend abgesättigt ist. Offen ist bisher, da die o.g. Studie mit sehr hoher Cisplatindosis arbeitete und keine Titrierung des Medikamentes vornahm, welche Cisplatindosis in Kombination mit der EGFR-Blockade und einer Strahlentherapie optimal ist bei lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Die Leitung der klinischen Prüfung der bisher einzigen europäischen Multizenter-Studie zu diesem Thema wurde unserer Arbeitsgruppe übertragen (Kuhnt 2006a). Die Zahl der Patienten in der Phase-I-Studie ist abhängig von den auftretenden Toxizitäten auf den jeweiligen Dosisstufen. Für die Phase-II-Studie sind 74 Patienten vorgesehen mit einer Rekrutierungszeit von 19 Monaten. Für beide Studienphasen wird im Abstand von 3 Monaten in den ersten beiden Jahren und danach im halbjährlichen Abstand über insgesamt 60 Monate nachbeobachtet.

Das Studiendesign sieht die Kombinationstherapie über 6 Wochen vor. Eine Woche vor Beginn der Radiochemotherapie (Woche -1) erfolgt eine Einmalgabe von 400 mg/m² KOF des Antikörpers Cetuximab (CET), die als sog. "loading dose" eine erste Absättigung der vorhandenen erbB1-Rezeptoren bewirken soll. Danach ist die Fortführung mit 250 mg/m² KOF einmal wöchentlich über den gesamten Bestrahlungszeitraum vorgesehen. Für die Strahlentherapie (HART) werden in den ersten 3 Wochen je 5 x 2 Gy und danach 2 x 1,4 Gy täglich, 5 mal wöchentlich bis zu einer Gesamtdosis von 70,6 Gy verabreicht. Cisplatin

(CIS) wird in der Phase-I-Studie nach dem Eskalationsschema beginnend mit 20 mg/m² KOF und Steigerung zur nächsten Dosisstufe von 5 mg/m² KOF gegeben. Für die Phase-II-Studie wird die aus der Phase-I-Studie ermittelte maximal tolerable Dosis um eine Dosisstufe reduziert und diese als empfohlene Dosis weiter verwendet, siehe Abb. 7.

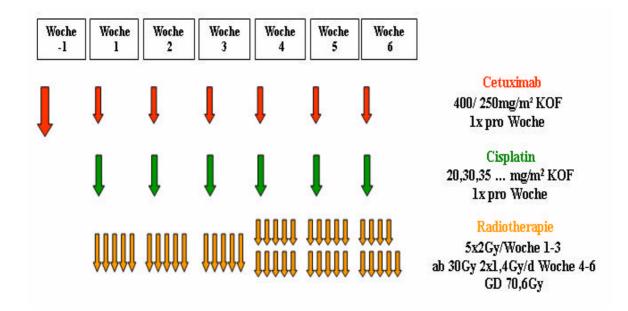


Abb. 7: Therapieschema der multizentrischen HART/CIS/CET-Phase-I-Studie bei inoperablen Plattenepithelkarzinomen der intermediären Stadien III und IV A,B des Kopf-Hals-Bereiches. Die Dosiseskalation wird für Cisplatin vorgenommen. Begonnen wurde mit einer wöchentlichen Cisplatindosis von 20 mg/m² KOF. Tritt keine DLT auf, wird nach 3 Patienten Cisplatin um 5 mg/m² KOF gesteigert. KOF: Körperoberfläche.

Studienziele:

- Ziel der vorliegenden Phase-I-Studie (innerhalb der Radiochemotherapie mit Cetuximab) ist die Dosisfindung (MTD = maximal tolerable Dosis) für Cisplatin durch eine konventionelle Dosiseskalation, beginnend bei 20 mg/m² KOF in wöchentlicher Gabe. Sekundäre Endpunkte der Phase-I-Studie sind die Ermittlung der dosislimitierenden Toxizität (DLT), die Rate des objektiven Tumoransprechens sowie die Raten des progressionsfreien (lokal/ regionär und systemisch- fern) Überlebens und des Gesamtüberlebens nach 1, 2 und 5 Jahren.
- Primäres Ziel der Phase-II-Studie ist die Bestimmung der Rate des progressionsfreien (lokal) Überlebens nach 2 Jahren. Sekundäre Endpunkte der Phase-II- Studie sind das progressionsfreie Überleben nach 1 und 5 Jahren und das

Gesamtüberleben nach 1, 2 und 5 Jahren, die Rate des objektiven Tumoransprechens und die Bestimmung der Toxizität.

Erwartet wird eine Steigerung des lokalen progressionsfreien Überlebens von 10% gegenüber einer herkömmlichen Radiochemotherapie (Cisplatin + 5-FU). Dies soll zudem mit einer deutlichen Verringerung der Akuttoxizitäten, vor allem der Mukositis, aber auch der spezifischen, chemotherapieassoziierten hämatologischen Nebenwirkungen erreicht werden. Bisher wurden elf männliche Patienten von 09/2005 bis 10/2006 in die Phase-I-Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter betrug 53 Jahre (Spanne 44 bis 62 Jahre) und der Karnofsky Performance Status 90 bis 100%. Die Tumorlokalisationen lagen bei drei Patienten im Oropharynx, bei vier Patienten im Hypopharynx und bei weiteren vier Patienten im Larynx. Die Stadienzuordnung war verteilt mit einem Patienten im Stadium III und 10 Patienten im Stadium IV, mit T3 ein Patient, T4 zehn Patienten, N1 ein Patient und N2/3 zehn Patienten. Zwei Patienten fielen vor Beginn schon aus der Studie (ein Patient wegen kurz davor diagnostiziertem Zweitkarzinom und ein Patient wegen Cetuximab-abhängiger allergischer Reaktion Grad 2 bei loading dose). Während der Therapiephase erlitt ein Patient eine Magenperforation in Radiotherapiewoche 3 und wurde nach erfolgter chirurgischer Intervention ohne CET und CIS nur weiter bestrahlt. Bei acht Patienten, die die volle Therapie erhalten hatten, traten folgende akute Toxizitäten Grad 3-4 auf: akneiformer Ausschlag Grad 3 (2 Patienten), Mukositis Grad 3 (3 Patienten), Dysphagie Grad 3 (2 Patienten), radiogene Dermatitis Grad 3 (1 Patient) und Neutropenie Grad 3 (1 Patient). Bis Dosisstufe III mit Cisplatin 35 mg/m² KOF wurde keine DLT erreicht. Die Nachbeobachtungszeit war für die Responsebeurteilung noch zu kurz. Die endgültigen Ergebnisse der Phase-I-Studie mit Responseraten werden Mitte 2007 erwartet. Die ersten Ergebnisse liegen bereits in Abstract-Form vor und werden zum Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) im Juni 2007 vorgestellt, Kuhnt et al. 2007b.

3 Optimierung der Radiotherapietechnik zur Nebenwirkungsreduktion

Radiogene Spätfolgen der Normalgewebe bleiben ein großes Problem der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich und tragen in erheblichem Maße zu einer immer noch schlechten Akzeptanz der Therapie bei, obwohl die Risiken einer modernen Bestrahlungsbehandlung vergleichsweise gering und schwere Komplikationen selten geworden sind. Dennoch gibt es langfristige, den Patienten meist auch sehr belastende Nebenwirkungen, so die quälende Mundtrockenheit, die Xerostomie, die als Folge einer Hyposalivation aus dem radiogenen Speicheldrüsenfunktionsausfall entsteht. Die Xerostomie schränkt nicht nur erheblich die Lebensqualität ein wegen der Unfähigkeit, bestimmte Speisen essen zu können, sondern sie kann auch die Berufsfähigkeit stark behindern, z.B. in "sprechenden" Berufen wie Lehrer. Weiterhin ist belegt, dass die Hyposalivation die radiogene Karies der Zahnhälse mit verursacht. Eine Senkung dieser radiogenen Karies durch Schonung der Speicheldrüsen sowie der normalen mikrobiellen Mundflora kann zweifelsfrei die Rate an Zahnextraktionen mit nachfolgenden, schwerwiegenden infizierten Osteoradionekrosen vermindern (Eisbruch et al. 2001, Eisbruch et al. 2003a, Gernhardt et al. 2001, 2003, Grötz et al. 2001). Die Vermeidung der Xerostomie bedeutet für die Patienten deshalb eine wesentliche psychosoziale Entlastung, können sie doch nach Abklingen der Akutnebenwirkungen wieder ungestört essen und schlucken. Die danach eintretende Gewichtszunahme wäre ein weiterer Erfolg der erhaltenen Speichelfunktion. Die Bestrebungen der Forschung sollten sich daher auch auf die weitere Verbesserung der Bestrahlungstechniken zum Schutz der Speicheldrüsen und Mundschleimhaut fokussieren. Im nachfolgenden Kapitel sollen Lösungsansätze zu diesem Thema aufgezeigt werden.

Jede Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich führt zur dosisabhängigen Veränderung des quantitativen Speichelflusses und der Speichelqualität, u.a. des pH-Wertes, der Pufferkapazität und Besiedlung mit der pathogenen Mundflora Lactobacillus und Streptokokkus mutans (Attin et al. 1999, Beer et al. 2002). Der Speichel wird von den drei großen Mundspeicheldrüsen (Glandula parotis, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis) sowie von mehreren hundert kleinen Speicheldrüsen in der gesamten Mund-/Pharynxschleimhaut produziert. Täglich werden etwa 1 - 1,5 Liter Speichel gebildet. Die kleinen Speicheldrüsen in der Mund- und Pharynxschleimhaut lassen sich bei der Bestrahlung von Mundhöhlen-und Oropharynxkarzinomen leider nicht schonen, da sie Teil des mukosalen Zielvolumens sind. Von den großen Speicheldrüsen kann die Glandula submandibularis ebensowenig ausgespart werden, da sie inmitten des Levels I liegt. Die

Schonung der Glandula sublingualis dagegen ist eher möglich, doch trägt diese Drüse nur einen sehr kleinen Teil zur Gesamtspeichelmenge bei. Die Hauptbemühungen zur Speicheldrüsenschonung während einer Radiotherapie konzentrieren sich deshalb auf die größte Speicheldrüse, die Glandula parotis, die, von Ausnahmen abgesehen, nicht Teil des Zielvolumens ist oder zumindest aufgrund ihrer anatomischen Lagebeziehungen zu den Lymphknotenstationen meistens nur am Rand des Zielvolumens liegt. Doch mit der älteren, üblichen Radiotherapietechnik, die im Wesentlichen auf der Basis der 2D-Technik beruht, wurden Karzinome der Mundhöhle, des Oropharynx sowie des Larynx-/Hypopharynx-Bereiches über laterale Photonen-und Elektronenfelder bestrahlt, die eine Schonung der Glandulae parotideae nicht zuließ, weil die Drüsen automatisch im Zielvolumen integriert waren. Das Resultat war ein vollständiges Sistieren des Speichelflusses mit katastrophalen Folgen für die Patienten.

Aus diesem Grund wurde eine neue 3D-Konformationsbestrahlung (3D-RT) bei Kopf-Hals-Tumoren entwickelt und gegenüber älteren 2D-Bestrahlungstechniken so optimiert, dass eine messbare Reduktion der Dosisbelastung an den Parotiden resultierte. Nähere Ausführungen und der Vergleich mit Vorteilen der entwickelten Technik, insbesondere im Schutz der Risikoorgane Rückenmark und Glandulae parotideae, gegenüber älteren Techniken, siehe Kuhnt et al. (2006c). Die neu entwickelte 3D-Technik wird in Abb. 8 schematisch dargestellt.

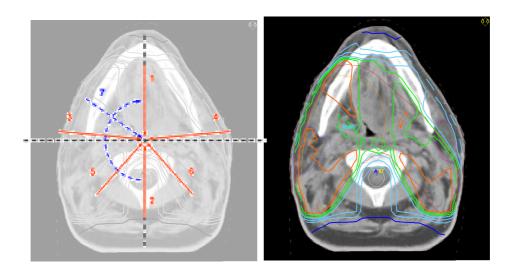


Abb. 8: Schematische Feldanordnung (links) und Isodosenplot (rechts) der komplexen 3D-Konformationstechnik. Die Zahlen 1 bis 6 geben die Stehfelder und die Einstrahlrichtungen an, das Feld 7 (blaue gestrichelte Linie) beschreibt das Pendelfeld mit Auslastung im Retropharyngealraum. Die farbigen Linien im rechten Bild bezeichnen das jeweilig eingeschlossene Volumen mit der gleichen applizierten Dosis (Isodosen) in Prozent. Die orangefarbene Linie umfaßt 107%, die zweite grüne Linie 95% und die erste hellblaue Linie 90% der verschriebenen Dosis im PTV (dünne rote Linie).

Die 3D-Technik kombiniert eine komplexe Stehfeld- mit einer Pendelbestrahlung. Im Planungsbeispiel zeichnet sich die komplexe 3D-RT durch eine inhomogene Dosisverteilung besonders in der kontralateralen Parotis aus, und sie ist in den Parametern D_{min} - und D_{mean} -Parotis den älteren 2D-Techniken signifikant überlegen, so dass insbesondere die D_{mean} -Parotis kontralateral mit 32,6 Gy unterhalb der angenommenen TD50 von 37 Gy lag, Abb. 9 (Kuhnt et al. 2005a).

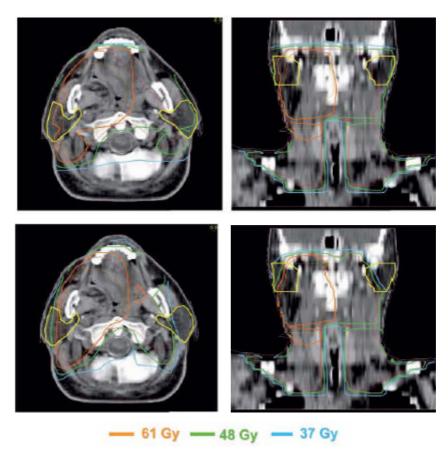


Abb. 9: Isodosenplots axial (links) und coronare 3D- Rekonstruktion (rechts) der alten 2D-RT-Technik mit lateralen Photonen- und Elektronenfeldern (obere Reihe) und der neuen 3D-RT (untere Reihe). Deutlich erkennbar ist die Schonung des oberen Pols der rechten Parotis sowie die fast vollständige Schonung der gesamten linken Glandula parotidea (gelbe Markierungen) durch die 3D- RT.

Ein Funktionserhalt der so geschonten kontralateralen Glandula parotis wäre mit solch einer Dosisverteilung demnach möglich (Beer et al. 2002). Die neu entwickelte komplexe 3D- konformale Bestrahlungstechnik hat den Vorteil der guten Reproduzierbarkeit und kann auch mit den flächendeckend verfügbaren Planungs- und Bestrahlungsausstattungen überall angewendet werden. Sie bietet sich prinzipiell für alle Kliniken an, die nicht über ein IMRT-Equipment verfügen. Selbst für Kliniken, die nur 10 – 20 % ihrer Kopf-Hals-Patienten mit der aufwändigeren IMRT-Technik behandeln, alle anderen Patienten aber traditionell, wäre die entwickelte 3D-Bestrahlungstechnik eine gute Alternative.

Zur Prüfung der Wertigkeit der neu entwickelten 3D-konformalen Radiotherapie (3D-RT) mit Sicht auf die tatsächlich zu erhaltenen Speichelfließraten wurde sie der alten konventionellen Radiotherapietechnik (2D-RT) gegenübergestellt. Die Untersuchungen zur Quantität und Qualität des Speichels im Vergleich beider Bestrahlungstechniken liefen prospektiv gemeinsam in einem Projekt mit der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg anhand bis dato relevanten Parametern der Speicheltestung (Kuhnt et al. 2005a). Es wurden zur besseren Vergleichbarkeit von Dosis und Fraktionierung nur postoperative Patienten eingeschlossen, die eine normfraktionierte Radiotherapie mit 2 Gy bis mindestens 54 Gy erhielten.

Die Mundtrockenheit, Xerostomie, tritt bei Hyposalivation im höheren Senium, als Nebenwirkung von ca. 400 Arzneimitteln sowie bei verschiedenen Allgemeinerkrankungen auf. Das einzige objektive Verfahren zum Nachweis einer Xerostomie ist die sialometrische Bestimmung der Speichelfließrate. In der Literatur sind ml/min als Einheit üblich. Referenzbereiche wurden definiert, um den Grad der Einschränkung klassifizieren zu können. Die unterschiedlichen Angaben in der Literatur resultieren dabei aus veränderlichen biologischen Einflussfaktoren, wie Alter, Geschlecht, psychischer Zustand, Hydratationsgrad, biologischer Rhythmus, Drüsengröße und Lichtexposition. Das Ergebnis sind inter- und auch intraindividuelle Schwankungen der Speichelfließrate. Unter Einhaltung von standardisierten Bedingungen können jedoch reproduzierbare Messungen erzielt werden. Nach Dawes et al. (1987) werden folgende Referenzbereiche für vier verschiedene Fließratengruppen vorgeschlagen, Tabelle 3:

Tabelle 3: Referenzbereiche der Speichelfließraten und Einteilung in vier Gruppen nach Dawes et al. (1987).

| | Ruhespeichel | stimulierter Speichel |
|-----------------|-------------------|-----------------------|
| Hypersalivation | > 1 ml/min | > 3,5 ml/min |
| Normosalivation | 0,25 – 1 ml/min | 1,0 – 3,5 ml/min |
| Hyposalivation | 0,1 – 0,25 ml/min | 0,5 – 0,1 ml/min |
| Xerostomie | < 0,1 ml/min | < 0,5 ml/min |

Im Zeitraum von 04/2002 bis 09/2003 konnten 32 Patienten mit malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich für die Untersuchung rekrutiert werden. Bei allen Patienten erfolgten die Messungen der Speichelfließraten vor Beginn der Bestrahlung, nach 3 Wochen unter der Behandlung sowie 1, 6 und 12 Monate nach Abschluss der Radiotherapie. Mittels

Reizspeichelmethode (stimulierte Speichelfließrate) wurde der Speichelfluss durch Kauen auf einer geschmacksneutralen Paraffinkapsel (Vivadent®) angeregt, in einem Messbecher über 5 Minuten gesammelt und die Menge nach dem Aufziehen in einer Einwegspritze in Milliliter abgelesen. Die Angabe der Speichelfließrate erfolgte in ml/5min. Patienten mit alter 2D-RT hatten zu Beginn der Radiatio im Mittel etwas höhere, aber nicht signifikant unterschiedliche Speichelfließraten als Patienten mit 3D-RT (4,3 \pm 2,4 vs. 3,6 \pm 2,1 ml/5min, p < 0,39). Über den gesamten Untersuchungszeitraum lag der Speichelfluss unter moderner 3D-RT etwas oberhalb dem der 2D-RT, siehe Abb. 10.

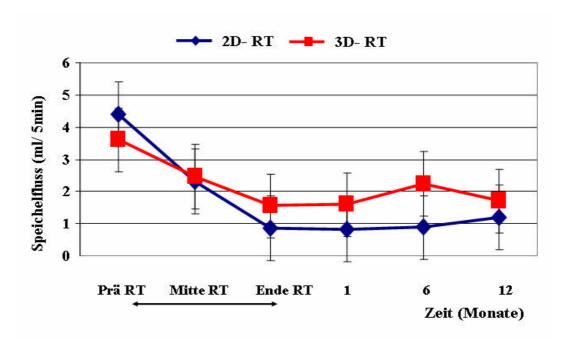


Abb. 10: Speichelfließraten in ml/5min der beiden Techniken über einen Zeitraum von 12 Monaten. Die Fließraten mit moderner 3D-Konformationstechnik liegen im gesamten Untersuchungsverlauf über denen der alten 2D-Technik.

Patienten, die mit 3D-RT und Tumorlokalisation im Hypopharynx/Larynx bestrahlt wurden, wiesen signifikant niedrigere gemittelte D_{mean}-Werte beider Parotiden auf als Patienten der 2D-RT bei gleicher Lokalisation. Im Gegensatz dazu lagen die gemittelten D_{mean}-Werte für beide Parotiden bei Tumorlokalisation in Höhe der Mundhöhle-/Oropharynx unabhängig von der Radiotherapietechnik gleich hoch, also konnte hier die 3D-RT keine Senkung der gemittelten D_{mean}-Parotisdosen erreichen. Des Weiteren wurden die Speichelfließraten aller Patienten, die mit moderner 3D-RT behandelt wurden, getrennt nach Tumorlokalisation untersucht. Patienten mit Lokalisation im Larynx/ Hypopharynx hatten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 12 Monaten im Mittelwert höhere Speichelflussraten als Patienten mit einem Tumor im Mundhöhlen-/ Oropharynxbereich. Einen Monat nach Abschluss der Radiotherapie konnte sogar ein signifikant höherer

Speichelfließratenwert mit 2.5 ± 1.9 vs. 0.73 ± 0.75 ml/5min (p = 0.026) gemessen werden, zu einem Zeitpunkt, an dem üblicherweise die Patienten die niedrigsten Werte aufweisen. Die günstigeren gemittelten D_{mean} -Werte beider Parotiden mit 3D-RT bei Hypopharynx-/Larynxkarzinomen resultierten gegenüber Patienten mit Mundhöhlen-/ Oropharynx-karzinomen logischerweise aus der Tatsache, dass sich das Boostvolumen anatomisch unterhalb der Region der Ohrspeicheldrüsen befand und somit nur ein geringer Teil der Boostdosis zur gesamten Parotisdosis beitrug.

Aber auch der Schutz nur einer Speicheldrüse konnte die Speichelfließraten positiv beeinflussen. Wurden die Gruppen anhand der D_{mean} -Parotis nach dem niedrigeren Wert beider aufgetragen, so konnten bei D_{mean} -Dosen < 25 Gy im gesamten Verlauf bis zu 24 Monaten nach Beendigung der Radiotherapie die höchsten Speichelfließraten registriert werden, siehe Abb. 11 (Kuhnt et al. 2006d).

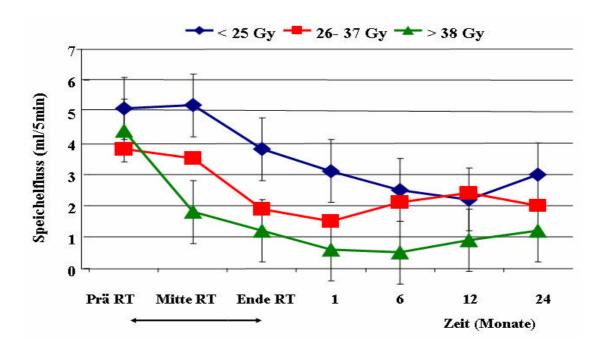


Abb. 11: Speichelfließraten in ml/5min von Patienten während und nach der kurativen Radiotherapie im Kopf-Hals-Bereich mit 3D-Technik über den Zeitraum von 24 Monaten. Die Gruppenbildung erfolgte nach dem kleinsten D_{mean} -Wert beider Parotiden. Konnte eine Parotis eine D_{mean} -Dosis \leq 25 Gy erhalten, so fielen die Speichelfließraten nur flach ab und erholten sich nach 24 Monaten leicht. Der Ausgangswert konnte jedoch nicht wieder erlangt werden. Lag die D_{mean} -Parotis über 38 Gy, fiel die Speichelfließrate am stärksten ab und es konnte keine wesentliche Verbesserung der Speichelfließrate nach 24 Monaten mehr erhoben werden.

Als ein weiteres wichtiges Ergebnis der Untersuchung konnten unter Anwendung der 3D-RT zudem verminderte Grad 3-Mukositiden und Pharyngitiden registriert werden (Daten hier nicht dargestellt). Dies könnte zum einen durch die partielle Aussparung von Arealen

der Mundschleimhaut, aber zum anderen auch durch die erhaltene Spülfunktion des Speichels erklärbar sein, was als eine weitere, positive Folge der leicht höheren Speichelfließraten anzusehen wäre. Auch Wendt et al. (2006) konnten mit einer intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) diesen Zusammenhang belegen. Zur Vermeidung bzw. Reduzierung der Xerostomie sowie der Mukositis enoralis/ Pharyngitis ergeben sich im Wesentlichen zwei Ansatzpunkte: Einerseits können neuere Bestrahlungsmethoden, wie die intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) oder schon konsequente Einsatz von 3D-Bestrahlungstechniken, gezielt Areale Mundschleimhaut und der Speicheldrüsen schonen und damit die physiologische Mundflora sowie den Speichelfluss besser erhalten. Andererseits könnte medikamentös auf die Regeneration wie den Schutz der Schleimhäute und Speicheldrüsen mit Amifostin®, EGF-oder Keratinozytenwachstumsfaktor (Palifermin®) schon während der Radiotherapie eingewirkt werden (Köstler et al. 2001, Marks 1997, Plevova 1999). Diese Substanzen werden derzeitig noch in Phase-III-Studien überprüft.

Die Daten der Heidelberger Arbeitsgruppe von Münter et al. (2007) zum direkten Vergleich der Speicheldrüsenfunktionen, gemessen mit der Speicheldrüsenszintigraphie, zwischen einer 3D-Konformationsbestrahlung mit zusätzlichem Radioprotektor Amifostin® und einer intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) allein, wurden kürzlich veröffentlicht. In dieser Arbeit konnte ein klarer Vorteil für die IMRT mit Blick auf die zu erreichende Funktionsleistung der Speicheldrüsen und Schonung der Mundschleimhaut aufgezeigt werden. Diese Daten belegen aber auch, dass eine an die Halslymphknoten-Level-Klassifikation der Kopf-Hals-Chirurgie adaptierte Radiotherapie mehr und mehr für die Reduzierung der Nebenwirkungen an Bedeutung gewinnen wird.

Intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT)

Das Verfahren der intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) wurde vor circa 20 Jahren in Deutschland entwickelt. Die erste klinische Anwendung erlangte sie 1997 jedoch in Nordamerika. Obwohl schätzungsweise in Deutschland bereits 5 000 Patienten damit behandelt wurden, steht diese Methode noch immer nur wenigen Zentren zur Verfügung (Thilmann et al. 2006). Mit diesem Verfahren können exaktere Dosisverteilungen in besonders kritischen Regionen, vor allem bei konkav geformten Zielvolumina um das Rückenmark/ Hirnstamm bei paraspinaler Tumorausdehnung, durch eine präzisere Anpassung der Strahlenfelder an diese unregelmäßig geformten Zielvolumina erreicht werden. Diese hohe Konformation (Formung der Isodosen an das 3D-Zielvolumen) wird

durch die Applikation von vielen kleinen Einzelfeldern aus unterschiedlichen Einstrahlrichtungen erreicht. Dabei wird der Grundsatz der homogenen Dosisquerverteilung über Feld verlassen. Durch die ein sog. "inverse Bestrahlungsplanung" wird es möglich, exakt die Dosis für die Tumorregion (und darin integriert verschiedene Volumina je nach Risiko der Tumorausbreitung) festzulegen und Höchstdosiswerte (entweder D_{max} oder D_{mean}) für die Risikoorgane besonders streng zu definieren. Das Planungsprogramm optimiert dann die Dosisverteilung für Tumor und Risikoorgane an das vorgegebene 3D-Volumen. Die Abb. 12 zeigt den Planungsvergleich einer konventionellen 3D-Konformationstherapie und einer IMRT eines Patienten mit Hypopharynxkarzinom. Besonders deutlich sichtbar wird die exaktere Konformität um das Zielvolumen und die Schonung der Parotiden mit IMRT.

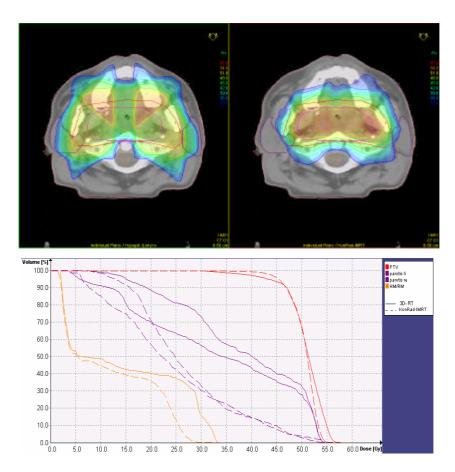


Abb. 12: CT-Bestrahlungsplaung eines Hypopharynxkarzinoms. Isodosenverteilung eines 3D-RT-Planes (links) gegenüber eines optimierten IMRT-Planes (rechts) in der oberen Bildreihe. Deutlich wird die bessere Konformität der Isodosen an das PTV und die Aussparung beider Glandulae parotideae im IMRT-Plan sichtbar. Im unteren Bild Darstellung der DVHs. Die gestrichelten Linien geben die optimierten Dosisverteilungen für das PTV (rot), die beiden Parotiden (lila) und das Rückenmark (gelb) an, berechnet mit KonRad® und importiert in Oncentra Master-Plan® Version 1.5. Gut sichtbar ist die Schonung der beiden Glandulae parotideae durch die IMRT (Linksverschiebung der DVH).

Die Abbildung 13 stellt am Beispiel eines Nasennebenhöhlenkarzinoms besonders gut die Möglichkeit der Aussparung der beiden Glandulae parotideae und die Schonung der Mundhöhle mit IMRT dar.

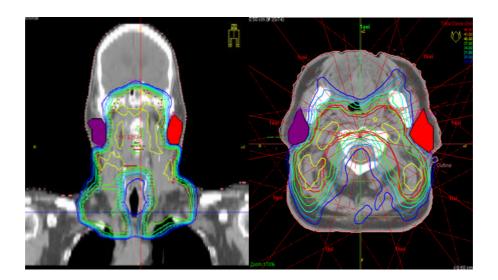


Abb. 13: Die linke Abbildung zeigt eine coronare Rekonstruktion und die rechte eine axiale Schicht in Höhe der beiden Glandulae parotideae (rechte Parotis lila, linke Parotis rot markiert) eines IMRT-Planes beim Nasennebenhöhlenkarzinom. Deutlich werden die Aussparung der beiden Speicheldrüsen und die Schonung der Mundhöhle durch die IMRT sichtbar.

Die entsprechenden gerätetechnischen Voraussetzungen (Linearbeschleuniger Oncor® der Fa. Siemens) und die physikalisch- planerischen Vorarbeiten wurden in der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg geleistet, so dass die IMRT seit Januar 2007 auch in den Routinebetrieb gelangte. Die Untersuchungen zur Überprüfung des angenommenen Überlegenheitsvorteils der IMRT gegenüber der 3D-Konformationsradiotherapie hinsichtlich Speichelfließraten und Schleimhauttoxizität laufen derzeitig in einem begleitenden Forschungsprojekt an unserer Universitätsklinik und werden durch die Deutsche Krebshilfe gefördert.

Bildgeführte Radiotherapie (image-guided radiotherapy - IGRT)

Zunehmend wird in der modernen Bestrahlungsplanung zur Definition des Planungszielvolumens nicht nur die anatomisch-morphologische Struktur der Tumoren durch die konventionelle Bildgebung der Computertomographie (CT) herangezogen, sondern auch die verbesserten Weichteilkontraste der Magnetresonanztomographie (MRT) genutzt, siehe Abb. 14. Diese besondere Form der Bestrahlungsplanung, "image guided radiotherapy" (IGRT) genannt, wird zunehmend auch in der Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Routinebehandlung eingesetzt.

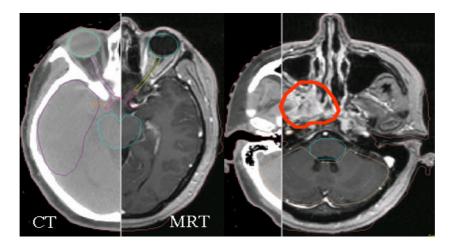


Abb. 14: Plattenepithelkarzinomrezidiv der Nasennebenhöhlen mit Infiltration der linken Orbita. Zustand nach Vortherapie mit einer simultanen Radiochemotherapie in kurativer Intention. Zwei axiale Schichten aus einer Fusion des Planungscomputertomogramms mit einem T1-gewichteten, kontrastmittelunterstützten MRT. Die linke Abbildung zeigt die Möglichkeit der genaueren Definition von Risikoorganen (Augen, Sehnerven, Chiasma, Hirnstamm, Arteria carotis rechts, Temporallappen rechts) im MRT durch den wesentlich höheren Weichteilkontrast. Im rechten Bild kann diese bessere Weichteilkontrastierung zur präziseren Definition des Rezidivtumorvolumens (roter Kreis) im zu behandelnden PTV genutzt werden.

Die präzisere Definition von Tumorvolumen und Risikoorganen kann die Möglichkeit eröffnen, sogar eine Zweitbestrahlung der Rezidivregion mit kurativer Dosis durchzuführen, ohne eventuell eine schwerwiegende radiogene Komplikation zu riskieren. Die Abb. 15 zeigt den dazugehörigen IMRT- Plan.

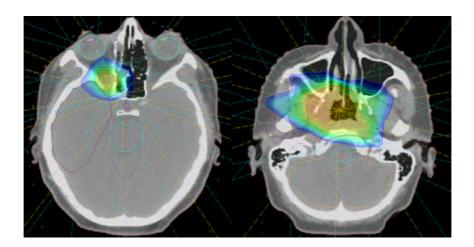


Abb. 15: Plattenepithelkarzinomrezidiv der Nasennebenhöhlen (siehe Abb. 14) mit Infiltration der linken Orbita nach kurativer simultaner Radiochemotherapie. Zwei axiale Schichten aus dem Planungscomputertomogramm mit den dazugehörigen Isodosen der IMRT. Das gelbe Volumen stellt den Hochdosisbereich in der Rezidivregion dar und die grünen und blauen Isodosen belegen den relativ steilen Dosisabfall zum umliegenden gesunden Gewebe.

Zudem können zusätzlich Informationen der Zellphysiologie durch Detektion charakteristischer, pathologisch-gesteigerter tumoraler Glukoseaufnahme in der Positronenemissionstomographie (PET) über Fusion in die Radiotherapieplanung direkt integriert werden. Die Fusion gelingt durch Anwendung komplizierter Matching-Algorithmen zur Anpassung der verschiedenen Untersuchungsdaten. Diese molekulare Ebene der Bildgebung liefert detaillierte Informationen des Tumorzellstoffwechsels (z.B. Glukosestoffwechsels mit ¹⁸Fluoro-Desoxyglukose), die zur Optimierung einer besseren Konformität des Planungszielvolumens nutzbar gemacht werden können (Schwartz et al. 2005a), siehe Abb. 16 modifiziert nach Kelloff et al. (2005) und Weissleder (1999).

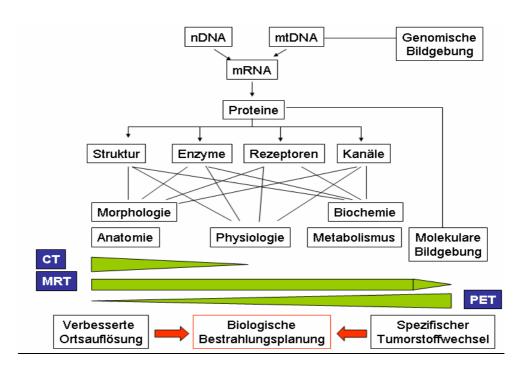


Abb. 16: Die Optimierung der biologisch-medizinischen Bestrahlungsplanung durch die Implementierung von MRT und PET zur Basis-CT. Die MRT /MR-Spektroskopie und die PET erlauben durch Einsatz spezifischer Tracer neben der hohen Ortsauflösung, eine Darstellung von Tumorstoffwechselaktivitäten sowie speziellen Mikromilieubedingungen, wie z.B. von Hypoxie- oder Nekrosezonen und damit eine exaktere Bestrahlungsplanung. So können durch Fokussierung höherer Dosen in kritische Tumorregionen eine Steigerung der Tumorkontrollwahrscheinlichkeit - TCP und durch Minimierung der Zielvolumina Normalgewebe besser geschont werden.

Die Abb. 17 zeigt eine axiale Schicht einer Fusion eines Basis-Planungs-CT mit einem ¹⁸Fluoro-Desoxyglukose (¹⁸FDG)-PET eines Patienten mit Nasopharynxkarzinom im Stadium T2bN2bM0. Von besonderem Wert sind die nachgewiesenen pathologischen Glukosespeicherungen in den tumorinfiltrierten Halslymphknoten, die bei Nasopharynxkarzinomen besonders häufig auftreten. Durch die präzise Detektion ist es

möglich, nur die tumorbefallenen Lymphknoten (nicht alle ≥ 1 cm vergrößerten Lymphknoten) mit in das Boostvolumen zu integrieren, was zur Reduktion von Nebenwirkungen beiträgt.

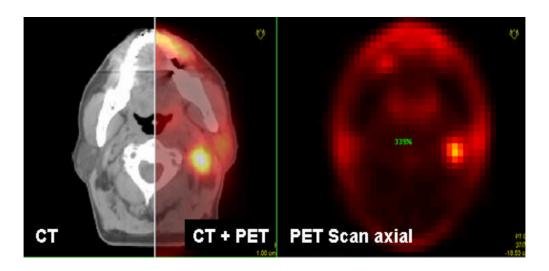


Abb. 17: Fusion des Basis-Planungs-Computertomogramms mit ¹⁸FDG-PET. Nachweis einer tumorinfiltrierten Halslymphknotenmetastase im Level II B links.

Durch den zusätzlichen Einsatz geeigneter zielgerichteter Tracer für die PET oder auch MRT (z.B. mit dem [¹8F] Fluoromisonidazol (F-MISO)-PET, ^{60/64}Cu-Diazetyl-bis(N⁴-Methylthiosemicarbazone (ATSM)-PET oder durch die "Blood oxygenation level dependent" (BOLD)-MRT) lassen sich für die Strahlentherapie besonders problematische Zonen innerhalb der Tumoren (Hypoxiezonen) detektieren (Padhani et al. 2007). Mit der intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) könnte innerhalb dieser Problemzonen eine präzise Dosissteigerung platziert werden, ohne eine Erhöhung von Normalgewebereaktionen zu provozieren (Chao et al. 2001a).

Der Einsatz molekularer Methoden kann zudem zur besseren bildlichen Auflösung subklinischer Krankheitsmerkmale, z.B. von prämalignen Vorstufen oder Frühformen maligner Erkrankungen (Einschluss auch dieser Gebiete in die Radiotherapie), sowie zur Bildgebung des Verlaufes oder Erfolges der antineoplastischen Therapie/ Radiotherapie beitragen. Sollte die Therapie keine Response am Tumor erwirken oder sich sogar ein Progress unter der laufenden Radiotherapie abzeichnen, könnte bereits frühzeitig z.B. eine operative Therapie eingeleitet werden.

Normalgewebekomplikationswahrscheinlichkeit (NTCP) der Parotis

Die klinische Radiobiologie beschäftigt sich mit den Beziehungen zwischen einer verabreichten Strahlendosis und der entsprechenden biologischen Anwort des Tumors und

der sich im Strahlengang befindlichen Normalgewebe. Dabei hängt das Reaktionsverhalten des Normalgewebes von therapiebedingten Parametern, wie Dosis pro Fraktion, Dosisleistung oder Gesamtradiotherapiezeit, sowie von patientenbezogenen individuellen Parametern, wie Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie, ab (Herrmann et al. 2006). Die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Parameter basiert häufig auf einer empirischen Bestimmung des Schadens als Funktion der Strahlendosis und setzt die Kenntnis von spezifischen Dosis-Wirkungsparametern für das geschädigte Organ voraus (Kutcher et al. 1991). Mithilfe kontinuierlich über den Bestrahlungsverlauf quantitativ bestimmbarer Variablen (biologische Schadensparameter) kann aus deren Veränderung unter steigender Strahlendosis in einem Organ die Wahrscheinlichkeit der zukünftigen Schädigung vorausberechnet werden. So wird z.B. anhand der aus klinischen Untersuchungen gewonnenen Speichelfließraten eines Patienten die NTCP der Mundspeicheldrüsen ermittelt. Exemplarisch wurde dies in unserem Patientengut für das Risikoorgan Parotis bei den Bestrahlungen im Kopf-Hals-Bereich betrachtet (Kuhnt et al. 2005a). Sagowski et al. (2003) konnten am Rattenmodell eine eindeutige Dosis-Zeit-Funktions-Beziehung der radiogenen Schädigung von Speicheldrüsen nachweisen. Höhere Einzeldosen (im klinischen Gebrauch > 2 Gy) verursachen gewünscht höhere Zellabtötungsraten an klonogenen Tumorzellen, aber auch unerwünschte Reaktionen an den Normalgeweben. Damit Untersuchungen zur NTCP vergleichbarer werden, entwickelte Niemierko (1997) das sog. Equivalent-Uniform-Dose (EUD)-Konzept, was zunächst eine komplexe Dosisverteilung in eine 2 Gy / Fraktion-Dosisverteilung transformiert. Zudem steht die Wahrscheinlichkeit von Strahlenfolgen eines Organs in Abhängigkeit zum maßgeblich bestrahlten Volumen, zur Dosisverteilung im bestrahlten Volumen, zur intrinsischen Strahlenempfindlichkeit, zur Reparaturkapazität, zum Einfluss zusätzlich schädigender Noxen, wie Chemotherapie, und zu der speziellen Vernetzung kleinster funktioneller Einheiten (functional sub-units = FSU), die innerhalb eines Organes oder Gewebes die Funktion aufrecht erhalten. Diese FSU können z.B. in Serie (seriell) verschaltet sein, so dass bei einer vollständigen Störung einer Untereinheit die nachfolgenden Einheiten funktionell ausfallen. Die in der Weise verschalteten Organe besitzen also einen sehr kleinen Volumeneffekt. Das klassische Beispiel hierfür ist die radiogene Myelitis mit Lähmung abwärts der Schädigung. Parallel vernetzte Organe dagegen, wie die Leber, kompensieren partielle radiogene Störungen durch die Funktionsübernahme nicht gestörter Einheiten. Viele Gewebe besitzen jedoch einen gemischten seriellen und parallelen Aufbau (Emami et al. 1991).

Für das Risikoorgan Parotis, mit einer weitgehend parallelen Organstruktur, werden gegenwärtig in der Literatur unterschiedliche mittlere Toleranzdosen (TD) angegeben, da diese u.a. von der Messmethode der Speichelfließraten sowie von den angewendeten Berechnungsmodellen abhängig sind (Emami et al. 1991, Gregoire 2005). Die Inhomogenität der Daten hängt wahrscheinlich auch damit zusammen, dass die Parotis als paariges Organ komplizierter in die Modelle zu involvieren ist als ein singuläres Organ. auszugehen, dass die Speicheldrüse Zudem davon hinsichtlich Reaktionsverhaltens auf ionisierende Strahlung Charakteristika eines früh-, aber auch spätreagierenden Organs besitzt, was die besondere Wichtigkeit für den Zeitpunkt der Speichelmessung und der Implementierung in ein Berechnungsmodell unterstreicht. In der Literatur wird ein a/β- Wert von 3 für die Speicheldrüsen angegeben (Herrmann 2006). Die bisher publizierten Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Schädigung der Glandulae parotideae lassen annehmen, dass die Toleranzdosen (TD) 5/5 und 50/5 niedriger liegen als früher vermutet wurde. Heute wird ein temporärer Ausfall nach Bestrahlung aller Speicheldrüsen unter Normfraktionierung mit 2 Gy bei Dosen von 10 - 20 Gy und eine auf Dauer bleibende Veränderung bei Dosen > 25 Gy auf das gesamte Organ angenommen (Herrmann 2006).

Die Radioxerostomie stellt wegen ihrer spezifischen Entstehung eine eigene Krankheitsentität dar, wobei die Abläufe der Schädigung in ihren Einzelheiten noch immer nur lückenhaft verstanden werden (Konings et al. 2005, Nagler 2002). Die Klinik verläuft in der Regel zweiphasig:

Initial (Tag 1-60) zeigt sich unter Radiatio eine akute Sialadenitis mit Permeabilitätserhöhungen der Endothelzellen periduktulärer Kapillaren für Wasser, eine cholinerge Rezeptoraktivierung (z.B. Muskarin-M3-Rezeptor) und nachfolgend ein periduktulär-interstitielles Ödem, was sich in einer Schwellung der Drüse äußert (Konings et al. 2005). Das Ödem komprimiert mechanisch kleine Speicheldrüsengänge mit der Folge einer obstruktiven Sialadenitis mit Destruktion von Gangepithelien. Als besonders strahlensensibel erweisen sich seröse Drüsenazini. Bei höherer Strahlendosis zeigen sich dann auch Veränderungen an den mukösen Drüsenendstücken.

Nach circa 120 Tagen findet sich als chronische Strahlenfolge eine progrediente interstitielle Fibrose mit Degeneration und Atrophie von Drüsenazini, Nerven, Gängen und schließlich eine Fibrose kleiner Gefäße. Trotz Ähnlichkeiten zu Sialadenitiden anderer Ätiologien, finden sich auch spezifische radiogene Veränderungen, wie die drastische Azinuszell-Verminderung (Apoptose von Progenitorzellen und Stammzellen), Kernatypien

in verbliebenen, gestörten Azinuszellen und duktalen Zellen und der Nachweis von "interlobular septa containing cells" (Harwood et al. 1973). Die seröse Glandula parotis ist bei diesen Prozessen am stärksten betroffen, gefolgt von den übrigen Speicheldrüsen (Nagler et al. 2002). Auch an den kleinen Mundspeicheldrüsen finden sich gleichartige Reaktionen (Eichhorn et al. 1993).

Die klinischen Speichelfließparameter unserer Untersuchung stammen alle von Patienten aus der Klinik für Strahlentherapie, die in Zusammenarbeit mit der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg einer kurativen Radiotherapie im Kopf-Hals-Bereich unterzogen wurden. Anhand der Dosis-Volumen-Histogramme (DVHs), die regelhaft während einer CT-Planung erstellt werden, wurden Dosismaximum (D_{max}), Dosisminimum (D_{min}) und Dosismittelwert (D_{mean}) in Gy der rechten und linken Parotis getrennt voneinander für die Gesamtbehandlung bestimmt. Im Anschluss wurden die beiden Mittelwerte halbiert und der Wert als die mittlere Parotisdosis (D_{mean}-Parotis) des Patienten definiert. Da die in der Literatur von Eisbruch et al. (2003b) oder auch von Roesnik et al. (2001) bisher für die Ohrspeicheldrüse angegebenen Daten stark variierten, wurde versucht, anhand der eigenen Daten zunächst auf der Basis des "Mean dose"-Modells nach LYMAN mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Schätzung die Dosis-Wirkungsparameter zu bestimmen (Gerlach et al. 2005, Lyman & Wolbarst 1989). Das LYMAN-Modell (1989) wird allgemein durch 3 Dosiswirkungsparameter (m. TD50, n) charakterisiert. Setzt man den volumenabhängigen Parameter n = 1, so lässt sich das Modell wie folgt modifizieren:

$$\frac{\text{Mean dose"-Modell (Spezialfall des LYMAN Modells)}}{(1/m*[(D_{mean}-TD50_{mean})/TD50_{mean}])}$$

$$NTCP=1/\sqrt{2p}*\int exp(-x^2/2)\ dx$$

$$-\infty$$

$$mit$$

$$D_{mean}=(\ \Sigma\,\nu_i*D_i^{1/n})^n$$

$$i$$

Die D_{mean} definiert die mittlere Parotisdosis, TD50_{mean} die Toleranzdosis, bei der der NTCP- Wert 50% beträgt, wenn das gesamte Organ mit dieser Dosis homogen bestrahlt würde, und m den Anstieg der Funktion bei TD50_{mean}. Das ?_i stellt das Relativvolumen jedes Dosisintervalls D_i im differenziellen Dosis-Volumen-Histogramm dar. Die

Schätzung der beiden noch in dem Modell enthaltenen Parameter m und TD50_{mean} erfolgte durch die Bestimmung des Maximums der

Log-Likelihood-Funktion

N

$$LL = \sum \{ep_i * ln[NTCP_i(m,TD50_{mean}(V=1))] + (1-ep_i) * ln[1 - NTCP_i(m,TD50_{mean}(V=1))] \}$$

$$i=1$$

für binäre Verteilungen auf der Basis der NELDER-MEAD-Simplexmethode. N beschreibt die Anzahl der untersuchten Patienten und ep den biologischen Endpunkt (Schaden "ja": $ep_i = 1$, Schaden "nein": $ep_i = 0$). Da nur stets die Gesamtspeichelmenge gemessen werden konnte, wurden die aus den DVHs der beiden Parotiden ermittelten Dmean-Werte halbiert und zur Berechnung verwendet. Für die Bestimmung der Konfidenzintervalle wurde das Profile-Likelihood-Verfahren gewählt. Als strahlentherapeutisch verursachte Komplikation entsprechend der WHO-Klassifikation eine posttherapeutische (ep) wurde Speichelreduktion auf < 25% zur Ausgangsspeichelfließrate betrachtet, wobei für den posttherapeutischen Untersuchungszeitpunkt der Wert 4 Wochen nach Abschluss der Radiotherapie gewählt wurde.

In den gewählten Dosisintervallen wurden zunehmend Schäden (nach WHO-Klassifikation Verminderung der Speichelfließrate auf $\leq 25\%$ des Ausgangswertes) der Glandulae parotideae mit Anstieg des gemittelten D_{mean} -Wertes beider Parotiden beobachtet, Tabelle 4.

Tabelle 4: In den Dosisintervallen (Intervallbreite 10 Gy) registrierte Schäden (Verminderung der Speichelfließrate $\leq 25\%$ des Ausgangswertes) an den Glandulae parotideae unter Angabe der gemittelten der D_{mean} -Werte beider Parotiden nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate.

| Dosisintervall (Gy) | Gemittelter D _{mean} - Wert beider Parotiden (Gy) | Anzahl der Patienten mit Schaden (i) zu gesamter Patientenzahl (n) im Dosisintervall (i/n) |
|------------------------|---|--|
| 0-10 | - | - |
| 10-20 | 16,7 | 0/1 |
| 20-30 | 27,5 | 0/2 |
| 30-40 | 33,6 | 3/8 |
| 40-50 | 43,4 | 4/5 |
| 50-60 | 53,9 | 5/7 |
| 60-70 | 61,9 | 3/3 |

Die TD50 in diesem Modell wurde bei circa 37 Gy ermittelt, siehe Abb. 18. Alle Patienten, die eine mittlere D_{mean} -Dosis der Parotiden < 30 Gy erhielten, blieben ohne funktionellen

Schaden, was die klinischen Daten von Eisbruch et al. (2003b), Münter et al. (2004) und Roesink et al. (2001) stützen würde. Im Rahmen der interdisziplinären Zusammenarbeit konnte eine Diplomarbeit an das Institut für Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vergeben werden (Lambeck 2006). Ziel dieser Arbeit war es, ein Computerprogramm zu entwickeln, dass es gestattet, allgemein die Dosis-Wirkungs-Parameter für die gegenwärtig diskutierten NTCP-Modelle, deren statistische Signifikanz und die Güte der Anpassung experimenteller Schädigungsdaten (goodness of fit) an die Modelle, zu bestimmen. Die Abb. 18 gibt die NTCP-Werte, ermittelt mit dem "Mean dose"-Modell, bestimmt mittels Likelihood-Schätzung, in unserem Patientengut mit dem Computerprogramm an.

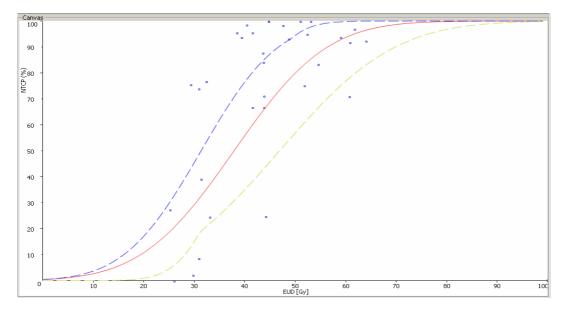


Abb. 18: NTCP-Fit mit Maximum-Likelihood-Schätzung und 95% Konfidenzintervall () anhand von 32 Patienten. TD50 = 37,9 (31,6,...,46,9); m = 0,38 (0,2,...,1,54); n = 0,92 (0,..., <15).

Die Ergebnisse unserer Untersuchung, aufgeführt im Kontext der Literaturdaten, siehe Tabelle 5, modifiziert nach Gregoire (2005). Wir konnten anhand des "Mean dose"-Modells eine höhere TD50 für die Parotis als die anderen Arbeitsgruppen ermitteln. Ein Unterschied, der eventuell mit dem relativ frühen Zeitpunkt der Schadensermittlung mithilfe der Speichelfließwerte schon nach 4 Wochen zusammenhängen kann. Zur Überprüfung dieser Hypothese haben wir weitere Untersuchungen vorgesehen, die bei einem größeren Stichprobenumfang Berechnungen nach 6, 12 und 24 Monate ab Ende der Radiotherapie valide zulassen. Außerdem gehen in das "Mean dose"-Modell nicht alle zu berücksichtigenden Parameter ein, so dass unter Einbeziehung eines a/ß = 3 sowie der parallelen Organstruktur eine Korrektur der TD50 nach unten zu erwarten wäre.

Tabelle 5: Radiotherapietoleranz der Glandula parotis, Tabelle modifiziert nach Gregoire (2005).

| Autor | Radiotherapie- | Methode zur | Berechnungs- | TD50 Parotis/ |
|-------------------|----------------|-----------------|--------------|-------------------|
| | technik | Messung der | modell | Zeit der Messung |
| | | Parotisfunktion | | |
| Eisbruch et al. | 3D-RT und | Ruhe- und | NTCP-Lyman | 26 Gy/ 1 Jahr |
| (1999) | IMRT | Reizspeichel | | |
| , , | | - | | |
| Chao et al. | 3D-RT und | Ruhe- und | Exponential | 32 Gy/ 6 Monate |
| (2001b) | IMRT | Reizspeichel | 1 | |
| (20015) | | | | |
| Saarilahti et al. | IMRT | Ruhe- und | Logistisches | 25,5 Gy/ 6 Monate |
| (2005) | | Reizspeichel | Modell | |
| (2003) | | reizspeiener | Wioden | |
| Bussels et al. | 3D-RT | Szintigraphie | Logistisches | 20 Gy/ 6 Monate |
| (2004) | 3D KI | Szmugrapine | Modell | 20 Gy/ 0 Monate |
| (2004) | | | Wioden | |
| Kuhnt et al. | 3D-RT | Reizspeichel | "Mean dose" | 37 Gy/ 4 Wochen |
| | <i>JD</i> -K1 | reizspeienei | Modell | 37 Gy/ + Woolldii |
| (2005a) | | | iviodell | |
| | | | | |

Anhand von klinisch zu erhebenden Parametern, wie Speichelfließraten oder EGF-Spiegel im Speichel (Daten nicht dargestellt), die über einen längeren Zeitraum bei den Patienten bestimmt werden, könnten zusätzlich noch Aussagen über das Reparaturpotential der Organe getroffen werden. Sechs und 12 Monate nach Radiotherapie waren unsere ermittelten Speichelfließraten zum Ausgangswert immer noch stark vermindert. Bei D_{mean}-Dosen über beide Parotiden > 38 Gy lagen die Speichelfließraten weit darunter. Eine Erholung war erst dann nachweisbar, sobald die D_{mean} -Parotis ≤ 25 Gy auch nur einer Glandula parotis erreicht wurde, auch wenn die andere Drüse D_{mean} -Dosen > 45 Gy erhielt (Kuhnt et al. 2006d). Li et al. (2007) belegten ebenfalls einen klinisch registrierbaren Erholungseffekt über die Zunahme der Speichelfließrate (gemessen mit stimulierter Speichelfließmethode) nach zwei Jahren bei Schonung nur einer Parotisdrüse unter D_{mean}-Dosen < 25 Gy bei 3D-RT oder IMRT, wobei keine Schadenserholungen bei D_{mean}-Parotis > 40 Gy eintraten. Die Ergebnisse der Literatur werden damit immer homogener, so dass nunmehr die Empfehlung abgeleitet werden kann, dass eine D_{mean} -Parotis ≤ 25 Gy nicht überschritten werden darf, um die Drüse noch mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% dauerhaft funktionstüchtig zu halten.

Anhand unserer Daten ist die Glandula parotis ein weitgehend parallel-geschaltetes Organ mit einem relativ hohen Volumeneffekt. Hier ist es durchaus sinnvoll, auch nur kleine Partialvolumina innerhalb des Organs zu schonen und damit eine akzeptable Organfunktion aufrecht zu erhalten. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Methode

der Schadensermittlung mittels stimulierter Speichelmessung durchaus geeignet ist, Dosis-Wirkungs-Beziehungen an den Glandulae der Mundhöhle aufzustellen. Inwieweit eine simultan zur Radiotherapie applizierte Chemotherapie einen weiteren Schaden an den Speicheldrüsen hervorruft, ist nicht ausreichend untersucht. Ein schädlicher additiver Effekt ist nicht auszuschließen und soll in einer Nachfolgestudie in unserer Arbeitsgruppe untersucht werden.

Das NTCP-Programm ist auch eine wichtige Hilfe bei den eingeleiteten Untersuchungen zur Wertigkeit von Radioprotektiva, wie z.B. Amifostin® oder Palifremin®, die die Strahlungsempfindlichkeit des gesunden Normalgewebes verringern helfen sollen, oder zur Überprüfung der verbesserten Speicheldrüsenschonung durch den Einsatz der IMRT an der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Unabhängig von ihrem medizinischen Einsatzgebiet müssen Programme zur Erstellung von Kosten-Nutzen-Analysen von Therapien entwickelt werden. Durch die Einbeziehung von patientenbezogenen Risikofaktoren und den aus den angewandten Therapieverfahren zu erwartenden akuten und chronischen Toxizitäten lassen sich die lebenslangen Gesamtbehandlungskosten vorausberechnen. So können sich letztendlich die zunächst kostenintensiveren modernen Radiotherapiemethoden günstiger im Kosten-Nutzen-Vergleich zu älteren Verfahren erweisen, weil sie einerseits die Heilungsraten erhöhen und andererseits die Nebenwirkungsraten verringern helfen können und somit weniger Kosten für die Rezidiv-/Palliativtherapie oder zur Linderung der meist chronisch verlaufenden, die Patienten aber sehr belastenden Folgeschädigungen anfallen. Diese wirtschaftlichen Aspekte der Therapieentscheidung werden zukünftig eine immer bedeutendere Rolle spielen. Nur klinische Phase-III-Studien mit dem eindeutigen Überlegenheitsnachweis moderner Techniken werden die Kostenträger überzeugen können, die hohen Investitionen und Behandlungskosten auch in der Fläche zu übernehmen, um sie möglichst allen betroffenen Patienten zukommen zu lassen.

4 Tumornekrosevolumen, ein prädiktiver Faktor für das Überleben

Ein wesentlicher Schwerpunkt der klinischen Forschung der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Tumoroxygenierung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Wichtige Daten zur Bedeutung des tumorbiologischen Faktors Tumorhypoxie für die Prognose von Kopf-Hals-Tumoren konnten erhoben werden (Becker et al. 2000, Nordsmark et al. 2005). Eine Vielzahl prognostisch wichtiger Faktoren mit Einfluss auf den Krankheitsverlauf konnte in den letzten Jahren für die Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich aus multivariaten Analysen gewonnen werden. Im Wesentlichen handelt es sich um die bekannten, etablierten Parameter, wie die patientenbezogenen Faktoren Alter oder Geschlecht, therapieassoziierte Faktoren, wie z.B. der Resektionsstatus, und tumorbezogene Faktoren, wie der TNM-Status. Seit geraumer Zeit werden zunehmend auch tumorbiologische Faktoren für die Prognoseabschätzung bedeutsam, siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: Derzeitig belegte etablierte und potentiell relevante Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- Hals- Bereich.

| Prognosefaktoren | Grad der |
|--|---------------------|
| | Etablierung |
| Patientenbezogene Faktoren | |
| - Alter | etabliert |
| - Geschlecht | etabliert |
| Karnofsky-Performance-Status | etabliert |
| - präther. Hb- Wert | etabliert |
| Therapiebezogene Faktoren | |
| - Operation (Resektionsstatus) | etabliert |
| Lymphknotendissektion | etabliert |
| - Radiotherapie (Dosis, Zeit, Fraktionierung) | etabliert |
| - Radiochemotherapie | etabliert |
| Tumorbezogene Faktoren | |
| - Tumorlokalisation | etabliert |
| - Tumorausdehnung (T) | etabliert |
| - Tumorausbreitung (N+M) | etabliert |
| - Grading | etabliert |
| Tumorbiologische Faktoren | |
| - Hypoxie | etabliert |
| - p53-Mutation | potentiell relevant |
| - EGFR-Überexpression | potentiell relevant |
| - Intrazelluläre Signalwege | potentiell relevant |
| - pH | potentiell relevant |
| - Gefäßdichte | potentiell relevant |
| - Nekrosen | potentiell relevant |

Andere Messwerte (Faktoren), zum Zeitpunkt der Erstdiagnose abgenommen, besitzen darüberhinaus auch maßgeblichen Einfluss auf die Therapiemodalität. Sie werden als prädiktive Faktoren, manchmal auch als Surrogatmarker, bezeichnet. Einige Faktoren können sowohl einen prognostischen als auch prädiktiven Wert besitzen. Faktoren, die dem Evidenz-Level I zugehören wollen, müssen ihre biologische Rationale in klinischen, prospektiv- randomisierten Studien eindeutig belegen und müssen mit einfachen und verlässlichen Methoden nachweisbar sein.

Es liegen ausreichende Daten der Literatur über Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich vor, die besagen, dass ein großes Tumorvolumen (Primärtumor + Lymphknotenmetastasen) ein ungünstiger prognostischer Faktor für das krankheitsfreie sowie das Gesamtüberleben ist (Dubben et al. 1998, Gilbert et al. 1987, Mendenhall et al. 2003). Ab einem Tumorvolumen von 35 cm³ kann eine alleinige Radiotherapie dieses Volumen nicht mehr kontrollieren (Johnson et al. 1995). Zudem konnten klinische Untersuchungen belegen, dass intratumorale, milieubedingte Faktoren, wie die Expression von Proliferationsmarkern oder Markern der Vaskularisation, ebenfalls einen möglichen prognostischen wie prädiktiven Wert besitzen (Gasparini et al. 1995). Der Tumorgewebeoxygenierungsstatus (pO₂) ist ein mittlerweile gesicherter, unabhängiger prognostischer Faktor für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. Hypoxische Tumoren besitzen eine höhere Aggressivität im Wachstumsverhalten mit vermehrter Ausschüttung sauerstoffabhängiger Proteine (z.B. Hypoxie-induzierender Faktor-1a (HIF-1a), VEGF oder p53), was mit vermehrter genetischer Instabilität verbunden ist (Vaupel 2004). Retrospektiv gewonnene Ergebnisse aus unserer Universitätsklinik von Bache et al. (2006) belegen, dass eine erhöhte tumorale Hypoxie, die aus einer Kombination von Messungen mit dem endogenen Hypoxiemarker Osteopontin, der pO₂-Histographie, der immunhistochemischen Bestimmung von HIF-1a und der Carboanhydrase IX (CAIX) bestimmt wurde, bei Kopf-Hals-Tumorpatienten mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben korreliert. Andererseits ist eine ausgeprägte Tumorhypoxie auch ein prädiktiver Faktor, der nicht nur etwas über Tumorprogression und Metastasierung aussagt, sondern eine schlechtere lokale Kontrolle nach einer perkutanen Strahlentherapie bedingt (Stadler et al. 1999). Generell werden die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse, ein hypoxisches Mikroenvironment innerhalb eines Tumors entstehen zu lassen, wohl immer noch nicht ausreichend verstanden, wenn man von den gesicherten Mechanismen der beeinträchtigten intratumoralen Sauerstoffverteilung sowie von dem veränderten Sauerstoffverbrauch einmal absieht. Der quantitative Wert des Tumor-pO₂ wird von einer ganzen Anzahl

Tumor- und Patienten-individueller Parameter bestimmt, wie der tumoralen Gefäßdichte, vaskulären Abnormitäten, intratumoralen Druckgradienten, der Mischung von akuter/chronischer Anämie, dem intratumoralen Blutfluss, der Sauerstoffsättigung des Blutes oder des Blutvolumens. Aber der Tumor-pO₂ ist weitgehend unabhängig von der Tumorgröße oder dem Tumorgrading (Rockwell 1997).

Über die letzten Jahre wurden große Anstrengungen unternommen, Methoden zu entwickeln, die den Oxygenierungsstatus eines Tumors zuverlässig messen können. Die gegenwärtig verfügbaren Techniken können in direkt-invasive Methoden (z.B. EppendorfpO2-Histographie), in direkt-non-invasive ([18F] F-MISO- PET) sowie in indirekt-noninvasive Methoden mit Einsatz endogener Marker (z.B. Osteopontin oder Carboanhydrase IX) eingeteilt werden (Padhani et al. 2007, Tatum et al. 2006). Zur Messung des GewebepO₂ wird die direkt-invasive Methode mit dem Eppendorf-pO₂-Histographen als "Goldstandard"-Methode betrachtet, obwohl diese Methode mehrere Nachteile für eine flächendeckende Routineanwendung besitzt. Zunächst spricht die beträchtliche Invasivität des Verfahrens gegen einen Einsatz außerhalb von klinischen Studien. Das manuelle Einstechen der Elektrode ist schmerzhaft und könnte theoretisch durch die mechanische Reizung des Tumors ein möglicher Weg für eine Tumorzellverschleppung sein. Bei einer zu fordernden vollständigen Aufarbeitung des gesamten Tumorvolumens ist die Messung zu zeitintensiv, wobei auch viele Tumor- und Metastasenlokalisationen einer Messung entgehen können, weil sie anatomisch von außen unzugänglich sind. Hauptsächlich wegen dieser Nachteile fand diese Methode an unserer Klinik keinen weiteren Einsatz bei der Untersuchung der Mikromilieus von Kopf-Hals-Tumoren. Generell kann man wohl über alle derzeitig gebräuchlichen Methoden zur Messung der intratumoralen Hypoxie sagen, dass keine der verfügbaren Methoden ideal in Bezug auf klinische Anwendbarkeit, Kostengünstigkeit und Genauigkeit der Vorhersage ist. Weil aber nicht allein das Wissen über die Tumoroxygenierung (Anzahl der Tumorzellen mit Sauerstoffmangel), sondern auch der energetisch-metabolische Zustand der Zellen (hypoxische vitale Zellen mit ausreichender Glukosezufuhr oder hoher anaerober Glykolyse und avitalen Nekrosen) für die Wirksamkeit der Radiotherapie bedeutend ist, wurde versucht, einen anderen Parameter zu finden, der als prognostischer und eventuell prädiktiver Faktor (Surrogatmarker des Therapieansprechens) für die Krankheitsverlaufsvorhersage dienen kann und überall anwendbar, zuverlässig und technisch einfach zu messen ist.

Thomlinson & Gray (1955) waren die ersten, die die Radioresponse von Tumoren mit der Länge der Diffusionsstrecke des Sauerstoffes zwischen Kapillare und der Tumornekrose in Zusammenhang brachten. Sie folgerten daraus, dass sich um die Nekrosezone hypoxische Tumorzellen anordnen, die eine höhere Radioresistenz besitzen, da aufgrund des Sauerstoffmangels sich die Radiolyse des Wassers vermindert und somit die indirekte Strahlenwirkung sinkt. Spätere experimentelle Daten konnten dann unzweifelhaft belegen, dass innerhalb und um hypoxische Tumorareale verstärkt Nekrosen existieren (Ljungkvist et al. 2002). Neueste Untersuchungnen bestätigen, dass intratumorale Nekrosen die Aktivierung von Genen, z.B. eine Überexpression von HIF-1a, LDH5 und GLUT1 (erhöhte intratumorale Azidose mit gesteigertem Glukosemetabolismus zu Laktat) sowie VEGF, das zur gesteigerten Neoangiogenese führt, begünstigen (Koukourakis et al. 2004, 2006).

Das kontrastmittelunterstützte CT stellte sich als sehr gut geeignet für die Detektion von Tumornekrosen heraus (King et al. 2004, Merritt et al. 1997). Insbesondere Kopf-Hals-Tumoren besitzen häufig nekrotische Zonen. Diese können als Hypodensitäten visuell im kontrastmittelverstärkten CT identifiziert werden, siehe auch Abb. 1. In der vorliegenden Untersuchung wurde dieses einfache und leicht reproduzierbare Verfahren benutzt, die Nekrose innerhalb der makroskopisch sichtbaren Tumoren auf der Basis eines routinemäßigen, kontrastmittelunterstützten CT-Untersuchungsprotokolls nachzuweisen und auf ihren prognostischen sowie prädiktiven Wert zu prüfen (Kuhnt et al. 2005b). Retrospektiv wurden 51 Patienten mit histologisch gesicherten, lokal fortgeschrittenen, nicht-fernmetastasierten Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, die zwischen 09/1998 und 09/2002 in der Universitätsklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg radiotherapiert wurden, in eine Studie zur Untersuchung von Tumorvolumen (TV) und tumoralem Nekrosevolumen (NV) eingeschlossen. Alle Patienten hatten zur Stagingdiagnostik und Feststellung der primären Inoperabilität ein Kontrastmittel-CT (150 ml Ultravist 300 Schering, Deutschland) von der Kopf-Hals-Region mit einem Multislice-Spiral-CT-Scanner (Somatom Plus S, Fa. Siemens, Deutschland) erstellt bekommen. Der Durchmesser aller makroskopisch sichtbaren Tumorbereiche wurde anhand der Ellipsoidformel kalkuliert (Volumen [cm 3] = 1/6 x d1 x d2 x d3 mit dem jeweils größten orthogonalen Durchmesser (d) der drei Dimensionen). Das gesamte Tumorvolumen wurde als Summe der Einzelvolumina berechnet (Primärtumor und Halslymphknoten mit einem Durchmesser größer als 1cm). Das Volumen der intratumoralen Nekrose wurde nach dem gleichen Verfahren berechnet und definiert als fokales Gebiet mit niedriger Kontrastierung mit oder ohne umgebenden Kontrastmittelrandsaum, wie durch King et al. (2004) beschrieben. So wurden die zentrale

Nekrose und alle kleinen, isolierten Herde der Nekrosen innerhalb der Primärtumoren oder Lymphknoten gemessen. In unserer Untersuchung konnte bei insgesamt 83% aller Patienten prätherapeutisch eine im CT sichtbare Nekrose nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit Daten, die an Chemotherapiepatienten mit Kopf-und Hals-Karzinomen erhoben wurden, nach denen Plattenepithelkarzinome dieser Lokalisation besonders häufig zur intratumoralen Nekrotisierung neigen (Chua et al. 1997, Munck et al. 1991). Mit steigendem Tumorvolumen stieg auch in unserer Untersuchung das Nekrosevolumen an, was signifikant miteinander korrelierte.

Die Daten von Kuhnt et al. (2005b) wurden mit den früheren Messdaten der intratumoralen pO₂-Bestimmung und den daraus ermittelten hypoxischen Subvolumina (Volumen an pO₂-Werten < 5mmHg), überwiegend an den gleichen Patienten gewonnen, verglichen (Dunst el al. 2003). Die Abb. 19 belegt den gleichgerichteten Zusammenhang zwischen steigendem TV und hypoxischem und nekrotischem Subvolumen. Es war somit möglich, dass intratumorale Nekrosezonen auch Hypoxiezonen oder umgekehrt bedingen konnten. Dies ließ sich kürzlich in einer experimentellen Arbeit an Zervixkarzinomen ebenfalls bestätigen (Sakata et al. 2006).

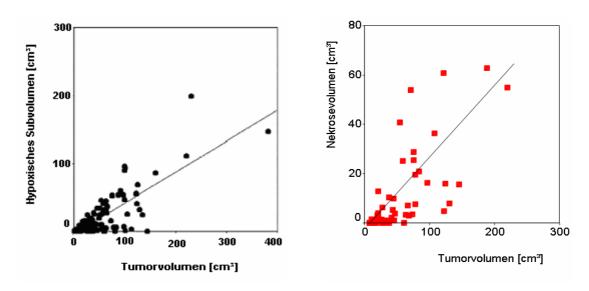


Abb. 19: Korrelation von Tumorvolumen zu intratumoralem hypoxischen Subvolumen (Bild links) und Tumorvolumen zu intratumoralem Nekrosevolumen (Bild rechts). Mit größer werdendem Tumorvolumen steigen sowohl die Tumorhypoxie als auch die Tumornekrosevolumina an.

Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass die Eppendorf-pO₂-Histographie nicht zwischen vitalen hypoxischen und avitalen nekrotischen Zellen unterscheiden kann und es nicht mit der vorliegenden Untersuchung möglich war, den direkten Vergleich der Zonen mit Hypoxie und den Regionen mit der im CT-sichtbaren Nekrose aufgrund der zeitlichen Verschiebung zu erzielen. Nur über den indirekten Analogieschluss kann gefolgert werden,

dass ein gleichgerichteter Zusammenhang zwischen Tumorhypoxie und Tumornekrose existieren muss.

Zwischen dem Auftreten der Nekrose und der T-Kategorie konnte mit p < 0,79 keine signifikante Korrelation gesichert werden. Dies bestätigten die Untersuchungen zum Tumor-pO₂, der zwar ebenfalls mit der Tumorgröße zunimmt, aber schon bei kleinen Tumoren oder in mikroskopischen Invasionszonen vorkommen kann und somit weitgehend als unabhängig von der Tumorgröße gilt (Rockwell 1997). Der tendenziell bestätigte Zusammenhang zwischen Nekrose und höheren N2/3-Kategorien (p < 0,06) belegt die besondere Aggressivität von Kopf-Hals-Tumoren, deren Charakteristikum es ist, frühzeitig in regionäre Lymphknoten zu metastasieren. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse der Daten von Kuhnt et al. (2005b) war das große intratumorale Nekrosevolumen ein wichtiger negativer prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben jener Patienten, die nur mit einer alleinigen Radiotherapie behandelt wurden. Somit könnte der Parameter intratumorale Nekrose ein Kofaktor für die erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung von Kopf-Hals-Tumoren sein. Patienten ohne diesen sich als nachteilig herausgestellten mikromilieubedingten Risikomarker wiesen dagegen ein wesentlich längeres krankheitsfreies Überleben auf, was im Einklang mit Grabenbauer et al. (1998) steht. Das Tumorvolumen als prognostischer Faktor verfehlte nur knapp das Signifikanzniveau, trotzdem war der Trend sichtbar, dass große TV mit der Radiotherapie allein nicht zu kontrollieren sind (mit Kontrolle vs. Rückfall lokal/systemisch 32,3 + 19,8 cm³ vs. 73,7 ± 66,4 cm³; p = 0,18). Wurden jedoch die Patienten unserer Untersuchung einer intensiven kombinierten Radiochemotherapie mit Cisplatin unterzogen, so stellte das intratumorale Nekrosevolumen keinen negativen prognostisch-signifikanten Faktor für das krankheitsfreie Überleben mehr dar, siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Tumor- und Nekrosevolumen sowie das gut kontrastmittelperfundierte Subvolumen bei Patienten mit oder ohne Rezidivnachweis (örtlich bzw. fern).

| | mit Tumorkontrolle | mit Rezidiv | p- Wert |
|--|---|---|------------------------------|
| • RT ohne Cisplatin gesamtes Tumorvolumen nekrotisches Tumorvolumen gut perfundiertes Volumen (TV-NV) | $N = 5$ $32.3 \pm 19.8 \text{ cm}^3$ $0.7 \pm 1.0 \text{ cm}^3$ $31.6 \pm 19.8 \text{ cm}^3$ | $N = 12$ $73.7 \pm 66.4 \text{ cm}^3$ $16.3 \pm 19.0 \text{ cm}^3$ $31.8 \pm 22.2 \text{ cm}^3$ | 0.18 0.003 1.00 |
| • RT mit Cisplatin gesamtes Tumorvolumen nekrotisches Tumorvolumen gut perfundiertes Volumen (TV-NV) | $N = 20$ $65.6 \pm 56.7 \text{ cm}^3$ $11.6 \pm 17.5 \text{ cm}^3$ $54.0 \pm 44.7 \text{ cm}^3$ | $N = 14$ $65.7 \pm 48.3 \text{ cm}^3$ $13.6 \pm 17.6 \text{ cm}^3$ $52.3 \pm 36.6 \text{ cm}^3$ | 1.00 0.80 0.90 |

Daraus ließe sich ableiten, dass in Gebieten mit Tumornekrose ein additiver Wirkungseffekt von Radiotherapie und cisplatinhaltiger Chemotherapie besteht. So scheinen vor allem Patienten mit intratumoralen Hypoxie- oder Nekrosezonen, unabhängig vom T- oder N-Stadium, von dieser intensiven radiochemotherapeutischen Behandlung zu profitieren. Grabenbauer et al. (1998) konnten zwar wie wir den negativen Einfluss des hohen Nekrosevolumens auf das krankheitsfreie Überleben nachweisen, jedoch es gelang ihnen nicht zu zeigen, dass der Einsatz einer simultanen Chemotherapie zur Radiotherapie das Nekrosevolumen signifikant besser kontrollieren kann.

In einer weiteren experimentellen Untersuchung (mehr dazu im Kapitel 7) haben wir die Tumor-pO₂-Werte < 5 mmHg mit Parametern der endogen-mitochondrialen Atmung (OXPHOS), prätherapeutisch gewonnen aus Biopsien der Plattenepithelkarzinome, korreliert (Kuhnt et al. 2002). Dabei konnte die massiv gestörte Komplex-I-Atmung der OXPHOS mit Verminderung der state3_{pyr} und SRPR (Succinat-bezogene Pyruvatatmung) der Tumoren zweifelsfrei belegt werden. Dabei war der Komplex-I-Defekt unabhängig vom Tumor-pO₂, was eine generelle Störung der mitochondrialen OXPHOS belegt, die milieuunabhängig bei diesen Tumoren vorlag.

Die Beziehung zwischen intratumoraler Nekrose und schlechterem Gesamtüberleben konnte auch aus Daten einer großen Multizenterstudie an Ewing-Sarkom-Patienten eindrucksvoll belegt werden (Ahrens et al 1999). Zur weiteren Bestätigung dieses Zusammenhanges wäre bei dem Wissen über die relativ einfache Messung mit den Geräten der heutigen CT-Generation, die äußerst präzise Untersuchungsmöglichkeiten (3D-Rekonstruktion und Volumetrie mittels moderner Software) bieten, die Detektion von Tumornekrosen als prädiktiver Marker in großen klinischen Studien sehr zu empfehlen.

5 Metabolisch-respiratorische Störungen in Tumoren

5.1 Mechanismen der metabolischen Verschiebung

Mitochondrien sind halbautonome Zellorganellen, die eine zentrale Rolle als Auslöser von Proliferation und Apoptose oder Nekrose spielen. Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurden unter anderem durch Otto Warburg die Vorgänge der Zellatmung mehr und mehr erforscht (Warburg 1956a,b). Zunächst wurde nur die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) von ADP zu ATP als Hauptaufgabe der Mitochondrien angesehen. Störungen des Zellstoffwechsels wurden danach über pathologische Verminderungen der zytosolischen Phosphorylierungspotentiale erklärt, die zu Verminderungen der ATP- nutzenden Reaktionen führen. Die mitochondriale Funktion wird durch eine große Anzahl biochemischer Reaktionen gesteuert und bringt die Mitochondrien in Schlüsselposition für das Leben. So ist der funktionelle Zustand der Mitochondrien eng mit zellulärer Arbeitsfähigkeit, Zelltod oder Tumorgenese verknüpft (Augenlicht & Heerdt 2001, Seppet et al. 2007). Außer Zweifel steht der Zusammenhang zwischen Mitochondrienfunktion, Phosphorylierungspotential und Zellarbeit, Abb. 20. Bei gehemmter Mitochondrienfunktion sinkt der ATP-Spiegel der Zelle, also das Phosphorylierungspotential, und die Ca²⁺-Pumpen sind nicht mehr in der Lage, das Ca²⁺ aus dem Zytosol in den Extrazellularraum oder in das endoplasmatische Retikulum zu pumpen. Dadurch steigt das zytosolische Ca²⁺, was eine Dysregulation des Zellstoffwechsels auslöst, denn viele Stoffwechselreaktionen werden über die Ca²⁺-Konzentration gesteuert. Dieser Zustand, nach Gellerich als zelluläre energetische Depression (cellular energetic depression - CED) bezeichnet, ist pathologisch und kann den mitochondrialen Zelltod bewirken (Gellerich et al. 2003). Je nach Betrachtungsweise werden bis zu sechs verschiedene zum Zelltod führende Mechanismen unterschieden, wie Apoptose, Autophagie, zytoplasmatischer Zelltod, Onkose, Ca²⁺-induzierter Zelltod und Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) abhängiger Zelltod (Seppet et al. 2007). Von der großen Komplexität dieser Wege abgesehen, haben sie alle eine Gemeinsamkeit, nämlich die Mitbeteiligung von Mitochondrien, ausgenommen die extrinsische Apoptose und die Autophagie. Deshalb wurde von Gellerich vorgeschlagen, die Zelltodwege, bei denen die Mitochondrien mitwirken, als den "mitochondrialen Zelltod" (mtZT) zu bezeichnen, was also weit über die ursprünglich von Vieira & Kroemer (1999) vorgeschlagene Definition des mtZT hinausgeht, die nur die mitochondrial vermittelte Apoptose umfasste (Seppet et al. 2007). Wie in Abb. 20 dargestellt, wird der mtZT durch Funktionsstörungen der

Mitochondrien, die zum Zustand des energetischen Tiefstandes (cellular energetic depression - CED) führen, ausgelöst (Trumbeckaite et al. 2001, 2003, Vahsen et al. 2004).

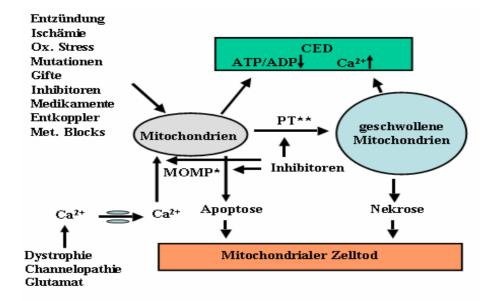


Abb. 20: Mitochondrialer Zelltod. Verschiedene mitochondriale und nicht-mitochondriale Mechanismen verursachen über Funktionsstörungen der Mitochondrien den Zustand des energetischen Tiefstandes (CED), der durch verminderte ATP/ADP-Quotienten und ansteigendem Ca²⁺zytosolisch charakterisiert ist. Den Mitochondrien widerfährt die Permeability Transition (PT) und die Zelle stirbt eines nekrotischen Zelltodes. Wird nur die Außenmembran permeabilisiert, treten Apoptose-induzierende Faktoren (AIF oder Cytochrom c) aus. Beide Wege sowie alle Mitochondrien-involvierte Zelltodmechanismen werden als mitochondrialer Zelltod bezeichnet. Als zentrales pharmakologisches Target bieten sie Angriffspunkte für die Tumortherapie (Beschleunigung des mitochondrialen Zelltodes) oder die Therapie degenerativer Erkrankungen (Verlangsamung des Zelltodes), Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. rer. nat. F.N. Gellerich.

Den initialen Schritt dabei stellt eine Funktionsstörung der Mitochondrien dar, die mitochondriale (z.B. Mutationen des mt-Genoms), aber hauptsächlich nicht-mitochondriale Ursachen (zytotoxische Proteine, Ischämie, Intoxikation, Channelopathie, metabolische Blocks, Medikamente, oxidativer Stress) haben kann. Alle diese Störungen vermindern die Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) und verursachen so den CED, der durch verminderte Phosphorylierungspotentiale und erhöhtes Ca²⁺zytosolisch charakterisiert ist. Bei Dauer dieses Zustandes kann es zur irreversiblen Permeability Transition (PT) und zum nekrotischen Zelltod kommen. Bei Permeabilisierung der mt-Außenmembran (mitochondrial outer membrane permeability - MOMP) tritt dagegen Apoptose ein, die jedoch noch ein längeres Intaktsein des Energiestoffwechsels voraussetzt. Da sowohl die PT als auch die MOMP umschriebene, wenn auch noch nicht vollständig aufgeklärte pathobiochemische Reaktionen darstellen, für die es einerseits Inhibitoren, wie Cyclosporin A (CsA) und Apoptose-inhibierende Proteine, aber auch andererseits

Aktivatoren gibt, handelt es sich hier um zentrale pharmakologische Targets, welche grundsätzlich die Möglichkeit eröffnen, die mitochondrialen Zelltodwege ein- oder abzuschalten (Bredesen et al. 2006, Green & Kroemer 2004).

In der überwiegenden Mehrzahl weisen maligne Tumoren einen stark erhöhten Glukoseumsatz auf, der von einer Hemmung der Zellatmung begleitet wird. Erstmals wurde dieses Phänomen von Herbert G. Crabtree (1929) beschrieben und nach ihm "Crabtree-Effekt" bezeichnet. Anderen Autoren gelang es, dieses Phänomen ebenso in Normalzellen nachzuweisen, was als aerobe Glykolyse bezeichnet wird, denn normalerweise wird die Glykolyse durch eine funktionierende aerobe Atmung unterdrückt (Pasteur-Effekt). Der zugrundeliegende Mechanismus des Crabtee-Effektes ist weiter umstritten. So wurde die Konkurrenz zwischen Glykolyse und Atmung um ADP oder anorganisches Phosphat, Veränderungen des intrazellulären pH, Änderungen der Dichtigkeit der mitochondrialen Membranen, die vermehrte Expression Glykolyseenzyme, spezifische Lageveränderungen von Enzymen (z.B. HK-II-Bindungen) und die Kalziumaufnahme als ursächlich angesehen (Bustamante et al. 1981, Chance & Hess 1959, Evtodienko et al. 1994, Ibsen et al. 1960, Koobs 1972, Mathupala et al. 2001,1997, Packer & Golder 1960, Pedersen et al. 2002, Teplova et al. 1993). Sicherlich könnte bei Tumoren, neben speziellen anderen Mechanismen, die Konkurrenz der Mitochondrien und der Glykolyse um das verfügbare ADP eine bedeutende Rolle spielen, wenn die Tumormitochondrien hinreichend funktionell geschädigt wären. Der metabolische Übergang zum Tumorstoffwechsel wird durch spezifische Onkogene, wie RAS, Src, HER-2/Neu, myc oder dem Tumorsuppressor-Gen p53 kontrolliert (Dang & Semenza 1999, Fantin et al. 2006, Matoba et al. 2006). Die Aktivierung von RAS, Src und HER-2/neu stabilisiert das Hypoxie-induzierende-Faktor- 1α -Protein (HIF- 1α), das die Glykolyseenzyme hoch und den Pyruvatdehydrogenase (PDH)-Komplex herunterreguliert, während myc das Laktatdehydrogenase-A-Isoenzym (LDH-A) hochreguliert (Fantin et al. 2006). Das Wildtyp-p53 kontrolliert die Expression der mitochondrialen COX2-Untereinheit und mutiertes p53 bewirkt dessen Suppression. Im Ergebnis führen solche Veränderungen zu einer verminderten OXPHOS-Aktivität und zum Auftreten der areroben Glykolyse (Donahue et al. 2001). HIF-1α bewirkt u.a. eine verstärkte Gefäßbildung, was der Tumorhypoxie entgegenwirken soll, aber durch Erythropoetinbildung die Migration von Tumorzellen fördern kann (Lester et al. 2005). Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) stimuliert die Sauerstoffradikalen-Bildung (ROS), was die gefäßbildende Wirkung des HIF-1α verstärkt (Haddad & Land 2001). Die mitochondriale ROS-Bildung erhöht möglicherweise die Mutationsrate der mtDNA, führt zu funktionellen Störungen an Komplex I und Komplex III und kann abnormal hohe Membranpotentiale ($\Delta\Psi$) auslösen, was durch Hemmung $\Delta\Psi$ -verbrauchender Reaktionen, wie der F_0F_1 -ATPase, infolge einer vermehrten Expression des Inhibitorprotreins IF₁ oder die Hoch-Regulation des Entkopplerproteins (UCP) verursacht werden kann (Boitier et al. 1995, Capuano et al. 1996, Chen 1988, Petros et al. 2005, Ray & Ray 1997, Tan et al. 2004). Im Ergebnis kommt es durch die erhöhten Membranpotentiale zu einer sich verstärkenden ROS-Bildung (Korshunov et al. 1997).

5.2 Metabolische OXPHOS-Störungen in Plattenepithelkarzinomen

Im Speziellen ist der Energiemetabolismus von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich bislang wenig untersucht worden. Da die Bestimmung hypoxischer Marker und der Mikromilieubedingungen von Kopf-Hals-Tumoren einen Schwerpunkt der klinischen Forschung der Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg darstellt, lag es nahe, auch pathobiochemische Untersuchungen zur Mitochondrienfunktion an diesen Tumoren durchzuführen. Es wurde ein fachübergreifendes Projekt in Zusammenarbeit mit dem Muskellabor der Universitätsklinik für Neurologie, dem Institut für Pathologie und der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gestartet. Zunächst galt es, mitochondriale Eigenschaften experimenteller Tiertumoren zu überprüfen, ehe mit der Untersuchung an Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich begonnen werden konnte.

Zur Untersuchung des zellulären Energiestoffwechsels stehen mehrere Methoden zu Verfügung. Die "state of the art"-Technik ist die hochauflösende Respirometrie (highresolution respirometry) in Verbindung mit der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration (Gellerich et al. 2003, Gnaiger 2003, Kuhnt et al. 2007), bei der man den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit vom frei einstellbaren metabolischen Zustand direkt mit polarographischen Sauerstoffsensoren (Clark-Elektroden) messen kann, siehe Abb. 21. Diese Methode erlaubt, kleine Organismen, Gewebeproben, Zellen oder gar isolierte Mitochondrien funktionell zu untersuchen, wie z.B. Hirn, Herzmuskulatur, quergestreifte Skelettmuskelzellen (Gellerich et al. 1999, Kunz et al. 1993, Mazat et al. 1997, Seppet et al. 2007, Sperl et al. 1997, Veksler et al. 1987). So wurde die "skinned fiber"-Technik zur Detektion von Funktionsdefiziten an Skelettmuskel- und Herzmitochondrien verschiedener Spezies, wie Mensch von Letellier et al. (1992) und Sperl et al. (1997), Ratte von Veksler

et al. (1987), am Kaninchen von Trumbechaite et al. (2003) und am Schwein durch Wicke et al. (2003) etabliert. Der Vorteil dieser Technik besteht insbesondere darin, dass über 90% der im Muskel vorhandenen Mitochondrien erfasst werden, was bei der Untersuchung heterogener Populationen wichtig ist (Larsson & Luft 1999). Wie der Name der Methode "skinned fiber" sagt, werden eigentlich Muskelfasern mit Saponin "gehäutet". Da jedoch Tumoren keine Muskel-ähnliche Struktur besitzen, musste die Übertragbarkeit dieser Technik auf die Untersuchung von Tumoren und Schleimhautproben zuvor geprüft werden.

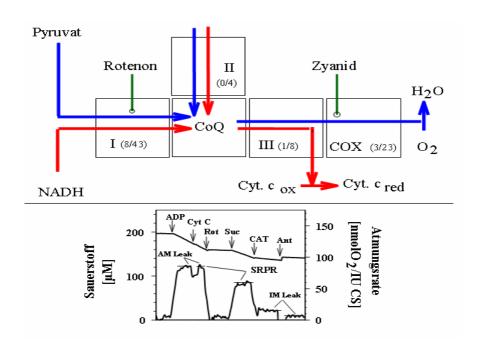


Abb. 21: Multiple Substrat-Inhibitor-Technik mit hochauflösender Respirometrie (blauer Fluss) und Methode der Spektrophotometrie zur Ermittlung der Succinat-bezogenen NADH-Oxidation (SRNO, roter Fluss). Durch Stimulation der Atmungskette über Zugabe von Substrat und ADP erhält man die state-3-Atmung für Pyruvat. Die nach Zusatz von Cytochrom c erreichbare stationäre Atmung ist etwas erhöht, was einen kleinen Defekt in der Außenmembran anzeigt, denn bei intakter Außenmembran beobachtet man keine Änderung. Durch Zugabe von Rotenon wird Komplex I irreversibel gehemmt und die Atmung minimal. Succinat stimuliert die Atmung über Succinatdehydrogenase und man erhält die Komplex-II-abhängige Atmung. Carboxyatractylosid (CAT) hemmt den ADP-Eintritt in die Mitochondrien und man misst die nicht-phosphorylierende Atmung. Schließlich blockiert Antimycin A den Komplex III irreversibel. Inkubation des permeabilisierten Tumorgewebes (10 mg/ Messkammer) in 1,86 ml Medium. Zugaben Substrat: 10 mM Pyruvat, 2 mM Malat; ADP: 2 mM Adenosindiphosphat; Cyt c: 7 µM Cytochrom c; Rot: 5 µM Rotenon; Suc: 10 mM Succinat; CAT: 0,2 mM Carboxyatractylosid; Ant A: 5 µM Antimycin Außenmembran: Innenmembran: A. AM: IM: I.II.III und COX: Atmungskettenkomplexe; (8/43): Anzahl der mtDNA-kodierten Untereinheiten/ Anzahl der Gesamtuntereinheiten von Komplex I.

Nach positiv abgeschlossenen Machbarkeitsprüfungen am Modelltumor der Ratte, dem R1H-Rhabdomyosarkom, und an Tumorzelllinien wurde die "skinned fiber"-Technik auf humane Gewebeproben übertragen und in "skinned tissue"-Technik dafür umbenannt

(Kuhnt et al. 2007). Gleiches gelang für die hochauflösende Respirometrie (highresolution respirometry) in Verbindung mit der multiplen Substrat-Inhibitor-Titration (Kuhnt et al. 2007, Kuhnt et al. 2004). Da für die Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich bereits klinische Daten zum Mikromilieu vorlagen, bot es sich zwangsläufig an, die experimentellen Daten ebenso bei diesen Patienten zu erheben. Veränderungen respiratorischer Funktionen von Tumormitochondrien können jedoch nur sicher detektiert werden, wenn man deren Ausgangsgewebe zur Gegenüberstellung mit den gleichen Methoden prüfen kann. Von malignen Tumoren aus dem Kopf-Hals-Bereich wissen wir, dass sie aus prämalignen Vorstufen der Schleimhaut im Sinne einer malignen Progression hervorgehen (Califano et al. 1996). Deshalb sollte untersucht werden, ob sich bereits die Mitochondrienfunktion der prämalignen dysplastischen Schleimhäute eines Tumorpatienten von der maligner Tumoren und den Schleimhäuten Gesunder unterscheidet (Qu 2004).

Intraoperativ wurden von fünf männlichen Patienten (mittleres Alter: 60 Jahre, Spanne 52-69 Jahre) mit einem histopathologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches Gewebeproben aus dem Tumor, aus der unmittelbar in Tumornähe befindlichen dysplastischen Schleimhaut, der dem Tumor gegenüberliegenden Schleimhaut sowie aus dem normalen Mundepithel gewonnen, Abb. 22. Ein kleiner Teil der Proben wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort bis zur mtDNA-Analyse und den enzymatischen Untersuchungen aufbewahrt. Die Kontroll-Proben aus normaler Mundschleimhaut wurden von fünf Personen (drei Männer und zwei Frauen, mittleres Alter 30 Jahre) anlässlich einer Tonsillektomie wegen einer akuten Pharyngotonsillitis entnommen. Für diese Patienten bestanden zumindest klinisch keine Hinweise auf eine mitochondriale Erkrankung. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt und alle Patienten erteilten schriftlich ihre Zustimmung zur Untersuchung.

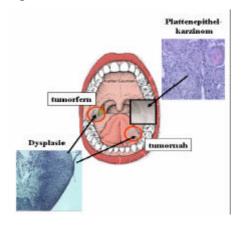


Abb. 22: Entnahmeorte der Proben eines Tumorpatienten.

Es gelang für humane Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich, wie schon für das R1H- Rhabdomyosarkom der Ratte, die Gewebe mechanisch mit Kanülen zu zerkleinern und die Zellwände mit Saponin zu permeabilisieren, ohne dabei die Mitochondrien zu schädigen (Kuhnt et al. 2007, Qu 2004). Die Tabelle 8 zeigt die wichtigsten respirometrischen Parameter der Plattenepithelkarzinome im Vergleich zur Mukosa von Tumorpatienten und Kontroll-Mukosa Gesunder.

Tabelle 8: Respiratorische Eigenschaften in Plattenepithelkarzinomen, Mukosa von Tumorpatienten und Kontroll-Mukosa von Patienten ohne Karzinomnachweis. Die Atmungsraten wurden gemessen mittels "skinned tissue"- Technik unter state-3-und -4- Bedingungen mit Antimycin A mit 10 mM Pyruvat/ 2mM Malat oder 10 mM Succinat/ Rotenon. Die Messwerte werden angegeben in [†][nmol O₂/min/mg Gewebe] oder in [?][pmol O₂/min/U/ CS], Die Aktivität wurde angegeben in U/g Gewebe im Mittelwert ± Standardabweichung. Wert [#] mit p<0,05 signifikant different verglichen zum Plattenepithelkarzinom oder Mukosa vom Tumorpatienten zur Kontroll- Mukosa.

| | Plattenepithel- karzinom (n = 5) | Mukosa von Tumorpatienten (n = 5) | Kontroll- Mukosa (n = 5) |
|---|--|---|--------------------------------|
| +State 3 _{Pyr} | 0.43 ± 0.17 | 0.19 ± 0.1 | 0.40 ± 0.25 |
| [?] State 3 _{Pyr} /CS | 90.0 ± 35.4# | 74.7 ± 48.9 | 140.7 ± 47.9 |
| +State 3 _{Suc} | 0.43 ± 0.24 | 0.28 ± 0.12 | 0.31 ± 0.21 |
| [?] State 3 _{Suc} /CS | 86.7 ± 25.5 | 91.5 ± 25.0 | 111.7 ± 52.1 |
| ⁺CAT | 0.23 ± 0.09 | 0.13 ± 0.04 | 0.15 ± 0.06 |
| ⁺ Leak | $0.071 \pm 0.03 \#$ | 0.012 ± 0.01 | 0.004 ± 0.003 |
| SRPR [%] | 80.0 ± 13 # | 83 ± 11 # | 135 ± 18 |
| RCI _{pyr} | 1.49 ± 0.45 # | 1.30 ± 0.37 # | 2.46 ± 0.46 |
| RCI _{suc} | 1.66 ± 0.66 | 1.93 ± 0.80 | 1.61 ± 0.19 |
| CS(U/mg) | 4.93 ± 1.83# | 2.9 ± 1.65 | 3.19 ± 1.33 |

Im Plattenepithelkarzinom wurde eine signifikant höhere Citratsynthase (CS)- Aktivität gegenüber der Kontroll-Mukosa gemessen. Die SRPR, bezogen auf die CS, war dagegen signifikant in den Plattenepithelkarzinomen sowie im Mukosagewebe der Tumorpatienten gegenüber der Kontroll-Mukosa reduziert. Der RCI_{Pyr} der Kontroll-Mukosa war signifikant gegenüber den Plattenepithelkarzinomen und der Tumorpatienten-Mukosa erhöht. Der RCI_{Suc} der Kontroll-Mukosa war nur wenig im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom mit

103% und der Tumorpatienten-Mukosa mit 119% verändert. Die state-4-Atmung, die Protonen-Leaks der Innenmembran anzeigt, war signifikant different in den Plattenepithelkarzinomen versus Kontroll-Mukosa erhöht. Im Gegensatz dazu war die Leak-Atmung der Kontroll-Mukosa sehr niedrig und nur diskret in der Tumorpatienten-Mukosa erhöht, aber die Leak-Atmung der Plattenepithelkarzinome signifikant gegenüber der Kontroll-Mukosa gesteigert, was als ein Hinweis für die Undichtigkeit der Innenmembran in Tumormitochondrien gelten könnte. Der Cytochrom-c-Test wurde verwendet, um die Dichtigkeit der mitochondrialen Außenmembran auch unter Saponinbehandlung nachzuweisen. Die Außenmembranen der Plattenepithelkarzinome zeigten sich weitgehend unempfindlich gegenüber der Saponisierung. Eine leichte Erhöhung und somit der Nachweis eines vermehrten Austrittes von Cytochrom c ließ sich schon in der Mukosa von Tumorpatienten nachweisen, siehe Tabelle 9.

Tabelle 9: Cytochrom-c-Test zur Prüfung der Dichtigkeit der Mitochondrienaußenmembran. Die Atmungsraten wurden gemessen vor state 3_{Pyr} und nach state 3_{Pyr,Cyt,c} durch Zugabe von 19 μM Cytochrom c. Die Messwerte werden angegeben in nmolO₂/min/mg Feuchtgewicht als Mittelwert ± Standardabweichung. State 3_{Pyr,Cyt,c} wurde bezogen auf die state 3_{Pyr} zur Berechnung des Cytochrom-c-Effekts.

| | State 3 _{Pyr} | State 3 _{Pyr,Cyt.c} | Cyt.c-Effekt [%] |
|----------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------|
| Plattenepithelkarzinom (n = 5) | $0,43 \pm 0.17$ | $0,42 \pm 0.18$ | 98,5 ± 10 |
| Tumorpatienten-Mukosa (n = 5) | $0,20 \pm 0,10$ | $0,27 \pm 0,12$ | 145 ± 32 |
| Kontroll-Mukosa (n = 5) | 0.32 ± 0.05 | $0,56 \pm 0,30$ | 166 ± 66 |

Die höchste Undichtigkeit der Außenmembran wiesen die Kontroll-Schleimhäute auf. Allerdings war bei diesen auch die Standardabweichung relativ hoch. Die Abb. 17 gibt einen Überblick über Mitochondrienmenge und die relativen Enzym-Aktivitäten von Plattenepithelkarzinomen, Tumorpatienten-Mukosa und der Kontroll-Mukosa. Die CS-Aktivität stieg von Kontroll-Mukosa in Richtung Tumorpatienten-Mukosa und Tumorgewebe an. Die relativen Aktivitäten der Komplex I+III, Komplex II+III, SDH und COX waren im Wesentlichen in den beiden Geweben Plattenepithelkarzinom und Kontroll- Mukosa gleich. Die PGI-Aktivität zeigte gegenüber der Kontroll-Mukosa eine signifikante Steigerung in den Plattenepithelkarzinomen (+72%) sowie in der Tumorpatienten- Mukosa (+307%). Die höchste LDH-Aktivität wurde in den

Plattenepithelkarzinomen (+304%) sowie in der Tumorpatienten-Mukosa (+163%) zur Kontroll-Mukosa gefunden, siehe Abb. 23.

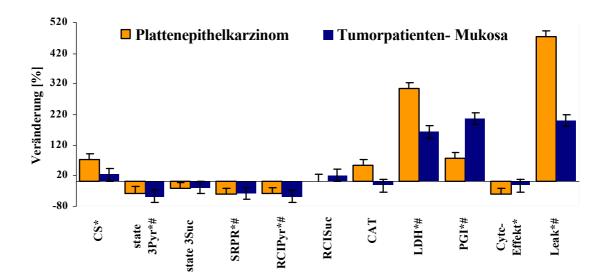


Abb. 23: Veränderung [%] der respirometrischen und glykolytischen Parameter von Plattenepithelkarzinom und tumorbenachbarter Schleimhaut gegenüber Normalmukosa von Kontrollpatienten (Referenzwert in 0-Ebene). Die CS war im Plattenepithelkarzinom und in der tumorbenachbarten Schleimhaut gegenüber der Kontroll- Mukosa von Nichttumorpatienten erhöht, was für einen höheren Gehalt an Mitochondrien dieser beiden Gewebe gegenüber der Kontroll-Mukosa spricht und möglicherweise einen Kompensationseffekt bei gestörter Komplex-I-Atmung darstellt. Die state 3_{Pvr}, die SRPR und der RCI_{Pvr} waren im Plattenepithelkarzinom und in der tumorbenachbarten Schleimhaut signifikant erniedrigt. Der RCI_{Suc} stieg in beiden Geweben leicht an. Lediglich die CAT war in den Tumoren zur Kontroll-Mukosa erhöht und in der tumorbenachbarten Schleimhaut erniedrigt. Die Glykolyseenzyme LDH und PGI waren gegenüber der Kontroll-Mukosa signifikant erhöht. Der negative Cytochrom-c-Test und die erhöhte Leakatmung (über 400%) sprechen für eine vermehrte Dichtigkeit der Mitochondrienaußenmembran sowie für eine Undichtigkeit der Mitochondrieninnenmembran in den Tumoren als ein mögliches Zeichen einer vermehrten Apoptoseresistenz. Untersucht wurden Tumoren von n = 5 Patienten mit n = 10 Einzelansätzen und n = 15 Enzymmessungen. Werte mit *# waren im Plattenepithelkarzinom und in der Tumorpatienten-Mukosa und Werte mit* nur im Plattenepithelkarzinom mit p < 0.05 signifikant verschieden zur Kontroll-Mukosa.

Wir haben zusätzlich die Komplex-I-abhängigen Mitochondrieneigenschaften vom Gewebe-pO₂ von Plattenepithelkarzinomen geprüft (Kuhnt et al. 2002). Dabei konnte kein Zusammenhang der Komplex-I-abhängigen Atmung zur Gewebehypoxie gefunden werden, was für eine mikromilieuunabhängige Schädigung der Mitochondrien spricht, siehe dazu auch Kapitel 6.

Durch die genannten Voruntersuchungen am Experimentaltumor der Ratte konnte belegt werden, dass die Vitalität der Mitochondrienfunktion nicht durch die Vorbehandlungen

beeinträchtigt wurde (Kuhnt et al. 2007). Zwei Kriterien können für die Unversehrtheit der Mitochondrien herangezogen werden: Der respiratorische Kontroll-Index (RCI) für Pyruvat, dem Hauptsubstrat der Mitochondrien, beschreibt in Verbindung mit der Leakatmung die Intaktheit der mitochondrialen Innenmembran und der Cytochrom-c-Test beurteilt die Dichtigkeit der mitochondrialen Außenmembran. Letzterer Test wurde z.B. ursprünglich für den Nachweis einer frühen ischämischen Schädigung von Mitochondrien im Herzgewebe eingesetzt (Gellerich et al. 2000, Kay et al. 1997). Gellerich et al. (2000) verwendeten ihn jedoch auch, um zu zeigen, dass eine ischämische Schädigung der mitochondrischen Außenmembran mit einer unspezifischen Freigabe von Cytochrom c einhergeht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass es während der Permeabilisation der untersuchten Tumoren nicht zu einer Freisetzung von Cytochrom c kommt, was somit eine präparationsbedingte Schädigung der Mitochondrien ausschließt. Kontroll-Patienten wurden Leaks in der Dagegen bei der Normalmukosa von mitochondrialen Außenmembran nachgewiesen. Demnach scheint die mitochondriale Außenmembran im Schleimhautgewebe empfindlicher gegen eine Permeabilisierung zu sein als Tumor, Muskel oder Herz. Eine ähnliche Sensibilität wurde auch im Skelettmuskel von Schweinen konstatiert (Wicke et al. 2003). Wir haben zum Schutz der mt-Außenmembran den mechanischen Druck der Kanülen auf die Schleimhäute stark vermindert und konnten so den Cytochrom-c-Ausstrom verhindern. In der Normalmukosa fanden wir gegenüber den Tumoren und der Mukosa von Tumorpatienten deutlich erhöhte RCI-Werte, was bedeutet, dass die mitochondrialen Hauptfunktionen während des Vorganges des Enthäutens nicht verändert wurden. Die hohen RCI_{DVI}-Werte waren eine Folge der stark verminderten Leakatmung in der Normalmukosa. Auch in der Mukosa der Tumorpatienten war die Leakatmung vermindert. Jedoch war in dieser die aktive Atmung nicht so hoch wie in der Normalmukosa, was wahrscheinlich schon die Folge einer beginnenden Komplex-I-Schädigung war und verminderte RCI erzeugte.

Die Intaktheit der äußeren Membran ist von großer Bedeutung für die Kompartimentierung von Stoffwechselprodukten innerhalb des Intermembranraumes und Voraussetzung für den ADP-Transport in die Mitochondrien. Wie in Abb. 19 dargestellt, geht die Zelle deswegen bei Leaks in der äußeren Mitochondrienmembran in energetische Depression über (Gellerich et al. 2002b, Seppet et al 2007). Der Zustand der mitochondrialen Außenmembran ist aber auch für die mitochondrial ausgelöste Apoptose bedeutsam, denn durch austretendes Cytochrom c wird die Caspasenkaskade stimuliert und die Zelle geht in Apoptose über. Zusätzlich haben die Leaks in der Außenmembran einen direkten Einfluss

auf die OXPHOS-Kapazitäten, denn durch den Cytochrom-c-Austritt nehmen die maximalen Atmungsraten ab.

Ähnlich, wie bei den "skinned fibers" der Muskeln, bleibt bei der biologischen Bewertung der Atmungsraten die Unsicherheit der in den permeabilisierten Tumorproben vorhandenen Mitochondrienmenge (Gellerich et al. 2002a, Seppet et al 2007). Folglich werden Parameter benötigt, die unabhängig von der Mitochondrienzahl aussagekräftig sind. Der Quotient aus Komplex-I-abhängiger Atmung (state 3_{Pyr}) und Komplex-II-abhängiger (state 3_{Suc}) Atmung (SRPR in %) ist ein von der Mitochondrienmenge unabhängiger Parameter, der auch den Vergleich in ein und derselben Probe erlaubt. Er beträgt normalerweise circa 120% in den "skinned fibers" der menschlichen Skelettmuskeln, des menschlichen Herzens, des Mäusegehirns oder des Mäusehippocampus (Gellerich et al. 2002a, Laterveer et al. 1996). In den Zelllinien eines Leiomyosarkoms (Ergebnisse nicht gezeigt), im menschlichen Plattenepithelkarzinom aus dem Kopf-Hals-Bereich, in der dysplastischen, das heißt präkanzerös veränderten Schleimhaut von Tumorpatienten, sowie im Rattenrhabdomyosarkom konnten sehr massive Funktionsdefizite mit Absinken dieser SRPR detektiert werden. Die Defizite waren hauptsächlich durch die verminderte Komplex-I-abhängige Atmung in allen Tumorgeweben, was sich auch in verminderten SRPR (< 100%) zeigte, ausgelöst. Damit stehen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Resultaten von Simonnet et al. (2003) und Lichtor & Dohrmann (1986). Beide Arbeiten nutzten dafür aber enzymatische bzw. chromatographische Techniken. In unserer Arbeit konnte für die Normalmukosa der Mundhöhle eine SRPR von circa 135% nachgewiesen werden, was den Werten für Skelettmuskel ähnlich wäre. Dennoch ist der SRPR-Wert von der metabolischen Ausstattung des Gewebes abhängig und beträgt z.B. bei Leber und Niere der Ratte nur 28% und 53%. In beiden Geweben liegt also die Komplex-Iabhängige Atmung viel niedriger als die Komplex-II-abhängige Atmung. Die Ursache ist sicherlich eine verminderte Komplex-I-Ausstattung als Zeichen einer Anpassung der Mitochondrienfunktion an spezielle metabolische Erfordernisse in diesen Organen. Deshalb ist es wichtig, dass bei respirometrischen Untersuchungen in Tumoren für den direkten Vergleich die respirometrischen Parameter der entsprechenden Ausgangsgewebe oder die der prämalignen Vorstufen mit gemessen werden. Bei einigen mitochondrialbedingten Erkrankungen und während des Alterns gelang es zu zeigen, dass die SRPR sich verringert (Chen et al. 2004, Khuchua et al. 1994, Gellerich et al. 2003). Im menschlichen Skelettmuskel bei Patienten mit chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie (CPEO) verringerte sich die SRPR mit der abnehmenden Aktivität des Komplexes I in Korrelation

mit zunehmenden Deletionen der mtDNA (Gellerich et al. 2002a). Im Herzen und im Skelettmuskel bei alternden Fisher- Ratten konnte ebenso die Reduzierung der SRPR mit abnehmender Tätigkeit von Komplex I gezeigt werden (Chen et al. 2004).

dargestellt, nahm in den Plattenepithelkarzinomen und der Wie in Abb. 23 die Mitochondrienmenge, tumorbenachbarten Schleimhaut gemessen der an Citratsynthaseaktivität (CS), gegenüber der Normalmukosa von Kontrollpatienten um 80 bzw. 30% zu. Parallel trat eine noch stärkere Zunahme der Glykolyseaktivität auf. Im Gegensatz dazu fanden wir in einigen vorläufigen Messungen keine veränderten Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I+III, II+III, IV, und der SDH (Daten nicht gezeigt), was aber wahrscheinlich infolge Materialmangels auf der geringen Zahl der Messungen beruhte. Da aber bei den oben erwähnten respirometrischen Messungen der fünf Patienten in den Tumoren relative Verminderungen an Komplex-I-Aktivität gefunden wurden, können wir annehmen, dass dies auch bei unseren Tumorproben in den photospektrometrischen Messungen der Fall ist. Zudem wurden im Muskellabor bei sehr verschiedenen Erkrankungen signifikante Korrelationen zwischen der SRPR und der relativen Komplex-I-Aktivität gefunden (Seppet et al. 2007)

Hochinteressant ist die erhöhte Stabilität der Plattenepithelkarzinommitochondrien gegenüber der Cytochrom-c-Freisetzung, die als ein neuer Mechanismus der Anti-Apoptose-Strategie angesehen werden könnte. Da die Mitochondrien der Tumoren und der normalen Schleimhaut während der Permeabilisierung der Zellmembranen einem ähnlichen mechanischen Stress ausgesetzt werden, ist die signifikant verminderte Stimulation durch Zusatz von Cytochrom c ein deutliches Zeichen für eine größere Stabilität der Außenmembran der Tumormitochondrien, was einer innerhalb der intakten Tumorzelle verminderten Freisetzung von Cytochrom c und einer demnach auch verminderten Apoptoseneigung entsprechen könnte.

5.3 Metabolische OXPHOS-Störungen und mtDNA-Mutationen

Schon seit geraumer Zeit werden Veränderungen der mitochondrialen Gene als Teil der Tumorgenese angesehen (Hobermann 1975). Tumorgenese und Alterung (Seneszenz) verbinden viele Gemeinsamkeiten. Chinnery et al. (2002) sowie Elson et al. (2001) haben die Hypothese der "relaxed replication" für die Akkumulation der mtDNA-Mutationen postuliert. Bekanntlich akkumuliert die mtDNA mehr Schäden genotoxischer Agenzien als die nDNA. In Tumorzellen liegen hunderte homoplasmatischer Veränderungen der mitochondrialen Gene vor. Die Fusion zweier Tumorzelllinien, bei denen sich ein

mitochondriales Genom einer Zelllinie schneller replizieren kann als das der anderen, führt zum Übergewicht des ersteren und möglicherweise zum Wachstumsvorteil, also zu einem Selektionsvorteil (Polyak et al. 1998, Richard et al. 2000). Diesen funktionell-relevanten Selektionsvorteil einzelner Tumorzellen in verschiedenen Tumor- Environments (z.B. Hypoxie) konnten Dunbar et al. (1995) herstellen. Dagegen haben Untersuchungen von Coller et al. (2001) anhand eines mathematischen Modells zeigen können, dass die anwesenden homoplasmatischen mitochondrialen Mutationen der mtDNA das Resultat lediglich zufälliger Aussonderungen mutierter Genome vieler Zellgenerationen in der Tumorentwicklung darstellen. Sie beschreiben, dass Akkumulationen von mehreren tausend Mutationen der mtDNA existieren, die Mehrzahl von ihnen jedoch funktionell und physiologisch stumm bleibt und nur eine Minderheit für die Tumorgenese an Bedeutung gewinnt.

Jedes Mitochondrium enthält mehrere Kopien seines Genoms. Obgleich die Zahl der Mitochondrien pro Zelle mit der Zellart schwankt, enthält eine einzelne Zellart gewöhnlich eine ziemlich konstante Kopienzahl der mtDNA. Während der Befruchtung werden die Mitochondrien durch das Zytoplasma der Oozyten übertragen. So ist das mitochondriale Genom vom Kerngenom dadurch unterschieden, dass es einem streng mütterlichen Erbmuster folgt. Innerhalb einer Zelle ist die mtDNA-Reproduktion halbautonom und nicht mit der S-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Dennoch scheinen die beiden genetischen Systeme der nDNA und mtDNA eng miteinander verbunden zu sein, wobei vieles bisher noch unklar ist. Obgleich das Mitochondrium das notwendige Instrumentarium enthält, sein Genom für die insgesamt 13 mitochondrial kodierten Proteine zu replizieren, werden die anderen über 900 Proteine durch die nDNA kodiert und in die Mitochondrien importiert. Durch verschiedene spezifische Eigenheiten ist die mtDNA sehr anfällig gegen mutagene Einflüsse. Vor allem oxidativer Stress durch ROS löst eine Zunahme der Mutationen in der mtDNA aller alternder Zellen aus, so dass es wahrscheinlich ist, dass dieser Prozess auch im Kontext der Krebsentstehung und anderer Krankheiten relevant ist. Dies belegen Experimente, die durch die Zufuhr oxidativer Agenzien die Karzinogenese einleiteten und durch Antioxidantien wieder hemmen konnten (Beckman et al. 1994). Da jede Zelle viele Mitochondrien mit mehrfachen Kopien der mtDNA enthält, ist es möglich, dass der Wildtyp und die durch Mutation entstehenden Variationen der mtDNA koexistieren können. Dies wird als Zustand der Heteroplasmie bezeichnet. Schoeler et al. (2005) wiesen den Einfluss mutierter mtDNA auf die OXPHOS in Zellen mit verschiedenen Heteroplasmiegraden nach. Während der Zellteilung werden die Mitochondrien nach dem Zufallsprinzip auf die Tochterzellen verteilt. Über die Zeit

kann so der Anteil der durch Mutation entstehenden Variationen der mtDNA innerhalb der Zelle schwanken. Der Wildtypanteil kann auch vollständig verschwinden und der Zustand der Homoplasmie der Mutante ist erreicht. So kann der ausgelöste Proteinfunktionsverlust durch eine Mutation abhängig von dem Anteil der durch Mutation entstehenden Variation der mtDNA schwanken. Dieser Effekt trägt zu den verschiedenen Phänotypen bei.

Multiple somatische mtDNA-Mutationen ließen sich in verschiedenen Tumortypen, z.B. dem hepatozellulären Karzinom, dem Uteruszervixkarzinom oder dem Mammakarzinom nachweisen (Pejovic et al. 2004, Rosson & Keshgegian 2004, Tamori et al 2004, Zhu et al. 2004). Als Auslöser dieser mtDNA- Mutationen wurden UV-Strahlung bei lichtinduzierten Hauttumoren, chemische Verbindungen bei Harnblasenkarzinomen oder Viren in hepatozellulären Karzinomen angesehen (Boitier et al 1995, Chen et al. 2004, Tamori et al. 2004, Yang et al. 2004). In der Literatur wird zudem diskutiert, dass homoplasmatische mitochondriale Mutationen nicht nur in den malignen Tumoren, sondern auch in Zellen der sie umgebenden Flüssigkeiten vorkommen. Zhu et al. (2005) bewiesen dies bei Adenokarzinomzellen von Brustkrebspatientinnen und den Flüssigkeitsaspiraten der laktierenden Mamma. Kirches et al. (2002) gelang Gleiches für Hirntumoren und Liquor zu zeigen. Letztere fanden auch Hinweise, dass diesen Mutationen eventuell auch eine prognostische Bedeutung zukommt. So verschwanden sie nach einem Zeitraum von 6 Monaten aus den Zellen des Liquors, sofern sich die Patienten in kompletter Remission befanden. Im Rezidivfall oder bei Tumorpersistenz blieben diese Mutationen bestehen.

Nachweislich sind pathologische mtDNA-Mutationen wichtig im Prozess des Alterns von postmitotischen Zellen (Michikawa et al. 1999). Etwa 1 - 5 % des Sauerstoffes werden während der Elektronenübergänge in der OXPHOS zu freien Radikalen umgewandelt, wie z.B. Wasserstoffperoxide am Komplex I und III und lassen die Atmungskette zum Entstehungsort der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden. Das Fehlen oder das nicht effizient genug arbeitende Fehlererkennungs- und Reparaturvermögen (Polymerase Gamma durch ständige Neusynthese mit hoher Fehlerquote belastet), die Nähe zum Entstehungsort der freien Radikale und der fehlende Histonenschutz bedingen eine 10 - 20-fach höhere Mutationsanfälligkeit der mtDNA im Vergleich zur nDNA (Ozawa 1999, Sawyer & Van Houten 1999). Da sich Mitochondrien weitgehend unabhängig vom Zellzyklus vermehren und die mtDNA eine Halbwertszeit von nur wenigen Tagen oder Wochen besitzt, wird sie öfter repliziert als die nDNA, was letztendlich zu einer höheren Fehlerrate im mtDNA-Genom führen muss. Somatische mtDNA-Mutationen können somit zumeist als adaptive oder Anpassungsveränderungen an neue Umgebungen gedeutet

werden (Brandon et al. 2006). Mit voranschreitendem Alter oder vermehrter Einwirkung von exogenen Noxen werden somatische mtDNA-Mutationen in allen postmitotischen Zellen akkumuliert, es steigt die ROS-Fraktion, es kommt zur zunehmenden Verminderung der Antioxidationssysteme und dies alles führt in der Summe zur verminderten ATP-Synthese-Leistung. Der Alterungsprozess ist eng an die Entstehung auch von bösartigen Tumoren geknüpft (Singh 2004). Die mtDNA-Mutationen könnten der Funktion nach onkogenen Charakter (Tumorinitiator und -Promotor) tragen, der über eine pathologisch hohe ROS-Erzeugung durch die Atmungskettenkomplexe verstärkt wird.

Im Gegensatz dazu gelang es Taylor et al. (2003), schon in Stammzellen normaler Dünndarmkrypten in hohem Maß mtDNA-Mutationen zu belegen. Sie fanden zudem, dass Mutationen in strukturell wichtigen tRNA-Genen vorhanden waren, die den nachfolgenden biochemischen Defekt (COX-Defizienz) erklären konnten. Mit der Alterung der Stammzellen nahmen die Veränderungen zu, ein Phänomen was bisher nur an postmitotischen Zellen belegt werden konnte. Das Vorhandensein der mtDNA-Mutationen schon in Stammzellen der Krypten könnte ein Hinweis sein, so die Autoren, dass die Mutationen schon vor der Entwicklung eines Darmkrebses existent sind. Ein Zusammenhang zwischen spezifischen mtDNA-Keimbahnmutationen und Karzinogenese ist demnach möglich. Doch könnten die mtDNA-Veränderungen auch eine Adaptation an wechselnde Lebensräume der Individuen (Klimabedingungen) darstellen, die in sich die Prädisposition für bestimmte Krebsarten tragen (Brandon et al. 2006).

Califano et al. (1996) beschrieben erstmalig die maligne Progression der nDNA über prämaligne Läsionen auch für Karzinome im Kopf-Hals-Bereich. Amplifizierte chromosomale Regionen können dominante Onkogene darstellen, während deletierte Regionen vor allem Tumorsuppressor-Gene enthalten können. Die Genexpressions-Mikroarry-Technologien haben es möglich gemacht, dass eine sehr schnelle Identifizierung tausender nukleärer Gene und deren Produkte detektiert werden können, die für die Tumorprogression notwendig sind. Dabei ließ sich zeigen, dass viele Mutationen mit Einfluss auf die Transkription sehr frühe Ereignisse im Verlauf der Malignisierung von Kopf-Hals-Tumoren darstellen. Invasive Tumoren und prämaligne Schleimhäute wiesen mehr als 300 mutierte nukleäre Gene (up- oder down-reguliert) im Vergleich zur normalen Mukosa auf, wobei nur 23 unterschiedliche Genmutationen registriert wurden, wenn das prämaligne Gewebe mit malignen Tumoren verglichen wurde (Ha et al. 2003). Diese Mutationen betrafen insbesondere Gene mit Veränderungen der Zytokeratin-Expression, Veränderungen der Zelladhäsionsmoleküle, des MAP-Kinaseweges sowie Zytokin-

änderungen einschließlich der VEGF-Überexpression. Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich korreliert die Häufigkeit der Mutation des Tumorsuppressorgenes p53 mit den Alkohol- und Rauchgewohnheiten (Altieri et al. 2004, Cancado et al. 2001). Daneben wurden für die Kopf-Hals-Tumoren Viren als ätiologisch bedeutsam gefunden, z.B. das Epstein-Barr-Virus (EBV) für die Entwicklung des Nasopharynxkarzinoms und humane Papillomaviren (HPV) in 11% für Mundhöhlenkarzinome (Dahlgren et al. 2004, Dietz et al. 2004). Viren sowie übermäßiges Rauchen und Alkohol wirken durch erhöhten endogen-oxidativen Stress auf nDNA und mtDNA. Es gelang der Beweis, dass auf oxidativen Stress die Mitochondrien und die mtDNA zahlenmäßig zunehmen und dies eine Erwiderung im Sinne einer Anpassung darstellt, da die mitochondrialen Funktionen von Normalmukosa über Dysplasie bis hin zum Karzinom im Kopf-Hals-Bereich absinken (Kim et al. 2004, Lee et al. 2000). Der Gehalt an mtDNA erlaubt den direkten Rückschluss auf die Anzahl an Mitochondrien in der Zelle (Simonet et al. 2002). Durch eine spezifische Beschreibung der Veränderungen der mtDNA im Sinne von Biomarkern könnten eventuell einige, unterschiedliche klinische Fragestellungen in der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, wie z.B. über das Voranschreiten prämaligner Läsionen, das Vorhandensein oder Fehlen von Karzinomrezidiven, die Vorhersage des klinischen Outcomes oder die Identifizierung der mtDNA, als ein spezifisches Target auch für die Therapie formuliert werden.

Der funktionelle Zusammenhang zwischen nDNA-und mtDNA-Integrität in der Kanzerogenese der prämalignen Schleimhäute zu Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist ungenügend beleuchtet. Mutationen dieser beiden Genome können Ursache spezieller Defekte der Atmungskette sein. Dies ist bei einer Vielzahl primärer mitochondrialer Enzephalomyopathien zweifelsfrei schon belegt worden (DiMauro & Schon). In der Literatur gibt es Hinweise, dass auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches somatische mtDNA-Mutationen auftreten (Ha et al. 2002). Da allein acht Proteinuntereinheiten des Komplexes I mtDNA-kodiert sind, könnten diese Mutationen als eine mögliche Ursache für die Komplex-I-Defizienz angesehen werden. Aus diesem Grund sollte versucht werden, in den Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich mtDNA-Mutationen zu finden, die eventuell Ursache für die hohe, zuvor zweifelsfrei belegte Komplex-I-Defizienz wären.

Um die Funktionsbedeutung auch spezifischer mtDNA-Mutationen und ihre Rolle in der Krebsentwicklung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu untersuchen, bedurfte es einer vollständigeren Analyse der gesamten mtDNA, da es bisher nicht

gelungen war, spezifische Mutationen diesen Tumoren zuzuordnen. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb alle 16 569 Basenpaarungen der mtDNA der Plattenepithelkarzinome in allen fünf Tumorproben (siehe Abb. 22 in Abschnitt 5.2) systematisch durch Sequenzierung, analog Taylor et al. (2001), untersucht. Die Analyse erfolgte mittels Sequenzierungskit BigDyeTerminator Version 3.1 im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Es wurde die gesamte Basenfolge der mtDNA analysiert und mit der "Standardsequenz der revidierten Cambridge Referenzfolge (rCRS)" der MITOMAP Datenbank verglichen (Mitomap- Datenbank, Andrews et al. 1999). Alle detektierten Nukleotid-Substitutionen der Tumoren wurden durch die Sequenzierung der identischen Bruchstücke aus dem dysplastischen Epithel desselben Patienten überprüft. Lag auch in der dysplastischen Schleimhaut derselbe SNP vor, wurden dann die mtDNA-Proben des normalen, nichtneoplastischen Epithels des Mundes im selben Fragment dieses Patienten sequenziert. Die identifizierten Mutationen/Polymorphismen (SNP) wurden mit der MITOMAP-Datenbank und mit zwei weiteren Datenbanken, der MtDB-Human Mitochondrial Genome Database und der Human Mitochondrial Genome Polymorphism Database, abgeglichen. Der Nachweis von mtDNA-Deletionen konnte nicht erfolgen. Bei den fünf Tumorpatienten wurde systematisch nach folgendem Algorithmus vorgegangen, Abb. 24.

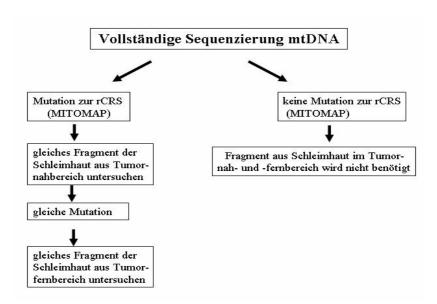


Abb. 24: Sequenzierungsalgorithmus des vollständigen mtDNA-Genoms der fünf Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich. Wurde im Vergleich zur rCR-Sequenz der MITOMAP-Datenbank eine Nukleotidsubstitution (SNP) registriert, wurde zunächst das entsprechende Fragment aus der tumornahen Mundschleimhaut, dann das aus der tumorferneren Schleimhaut sequenziert.

So konnten zunächst in den fünf Tumor-mtDNAs insgesamt 118 SNPs gegenüber der rCRS der MITOMAP-Datei registriert werden. In fast ausschließlicher Mehrheit waren alle Veränderungen der Tumoren homoplasmatischen Charakters, was zunächst für eine schnelle Selektion von mutierter mtDNA sprechen könnte. Der Basenaustausch C4336T (tRNA Gln-Gen) lag bei einem Patienten mit einem Heteroplasmiegrad von 50% vor. Die Abb. 25 zeigt den Fall eines Nukleotid-Austausches G15613A im Plattenepithelkarzinom im Vergleich zur rCRS.

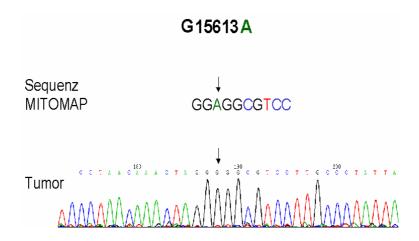


Abb. 25: Ausschnitt aus der Basensequenz der mtDNA eines Patienten mit Plattenepithelkarzinom. Substitution der Base A durch Base G an der Nukleotid-Position 15 613 der mtDNA. Es liegt keine pathologene Mutation vor, sondern ein bereits bekannter Polymorphismus aus der Datenbank MtDB-Human Mitochondrial Genome Database.

Die zur rCRS abweichenden Nukleotidpositionen aller fünf Plattenepithelkarzinome fasst die Tabelle 10 zusammen. Anhand der Literatur scheint es zwei Eigenschaften von mtDNA-Veränderungen im Krebs ungeachtet der Tumorart zu geben. Erstens sind die häufigsten Punktmutationen mit Substitutionen der Basen A zu G und C zu T (Penta et al. 2001). Die hier untersuchten Tumoren wiesen zu 23% (20/85) SNPs von A zu G, zu 16% (14/85) von C zu T und ebenfalls 22% (18/85) Austausche von G zu A sowie 26% (22/85) Austausche von T zu C auf. Somit machten die in der Literatur häufig beschriebenen SNPs in den untersuchten Plattenepithelkarzinomen 39% aus. Zweitens war auch in unserer Untersuchung, analog zu den Daten der Literatur, die D-loop-Region der häufigste Ort der Veränderungen (Ha et al. 2002). Dies ließ sich auch in den untersuchten Plattenepithelkarzinomen mit 51/85 (60%) bestätigen. Jedoch konnten alle detektierten SNPs in zwei weiteren mtDNA-Datenbanken (MtDB-Human Mitochondrial Genome Database, Human Mitochondrial Genome Polymorphism Database) als häufig vorkommende, stille Polymorphismen aufgespürt werden. Keiner dieser Polymorphismen

ließ sich als Frame shift-, Nonsense- oder als Missense-Mutationen nachweisen. Somit konnten wir nicht eine pathologische Mutation einer Tumor-mtDNA belegen.

Tabelle 10: Single-Nukleotid-Polymorphismen der mtDNA der fünf Plattenepithel-karzinomproben im Vergleich zur rCRS. Die grau unterlegten Polymorphismen betreffen Regionen kodierend für den Komplex I. Anhand der mtDNA-Basenfolge können die Patienten nach Herrnstadt et al. (2002) bestimmten Haplogruppen (Personen in Lebensräumen) in Europa zugeordnet werden. Alle Patienten besitzen typische Polymorphismen der Position 11 719 und 14 766 der Haplogruppe H mit den weiterführenden Single-Nukleotid-Polymorphismen G4769A, G1438A, 750A, G8860A und G15326A für die Haploguppe H2 (Polymorphismen gelb unterlegt). MITOMAP Database *Http://www.mitomap.org, MtDB-Human Mitochondrial Genome Database**Http://www.genpat.uu.se/mtDB/mainframe.htm, Human Mitochondrial Genome Polymorphism Database ***Http://www.giib.or.jp/mtsnp/index_e.shtm.

| | Patient 1 | Patient 2 | Patient 3 | Patient 4 | Patient 5 |
|------------|--------------|------------------|--------------|--------------|---------------|
| | Kehlkopf- | Mundhöhlen- | Kehlkopf- | Tonsillen- | Tonsillen- |
| | karzinom | karzinom | karzinom | karzinom | karzinom |
| D1-loop | C15914A ** | C16519T ** | A15928G** | C16093T ** | C16519T ** |
| | C16224T ** | | C16126T ** | T16192C ** | |
| | T16266C ** | | T16236C ** | G16235A ** | |
| | C16311T ** | | T16294C ** | T16270C ** | |
| | C16519T ** | | T16296C ** | C16304T ** | |
| | | | C16304T ** | | |
| | | | C16519T ** | | |
| D2- loop | G73A * | G263A * | G73A * | G73A * | C152T * |
| | C146T * | 309 7C-9C *(75%) | G263A * | T150C * | G263A * |
| | C152T * | 309 7C-8C *(25%) | 309 7C-8C * | G263A * | 309 7C-9C * |
| | G263A * | 315 5C-6C | 315 5C-6C * | 315 5C-6C * | |
| | T315C * | T317C ** | T317C ** | | |
| | T324C ** | C477T ** | | | |
| 12S | A709G * | G750A* | G709A* | G750A* | G750A* |
| | G750A * | G1438A* | G750A* | G1438A* | G1438A* |
| | G1438A * | | A930G** | | |
| | | | G1438A* | | |
| 16S | G1811A** | A3010G * | A1888G ** | G2706A* | A3010G* |
| | G2706A* | | G2706A* | C3197T* | |
| ND1 | G3480A* | | | | |
| ND2 | C4561T ** | G4769A* | G4769A* | G4769A* | G4769A* |
| | G4769A* | | | A5460G* | |
| CO1 | T7028C* | | T7028C* | A6179G* | |
| | | | | T7028C* | |
| CO2 | | | | 7768 A-G * | |
| ATPase8 | | | | | |
| ATPase6 | G8860A* | G8860A* | A8637G* | G8860A* | G8860A* |
| | A9055G** | | G8860A* | | |
| G04 | GO COOFF ! ! | | G9180A** | 10455 | |
| CO3 | C9698T ** | | A9966G ** | A9477G** | |
| | C9716T** | | | | |
| ND3 | | | | | |
| ND4L | G10550A** | | G11012 + *** | 010070 + *** | C11064T total |
| ND4 | A11719G * | | G11812A** | G10978A** | C11864T ** |
| ND5 | A12372G * | | | | A12372G * |
| ND6 | T14167C ** | | G14233A** | C14182T ** | |
| | A14560G * | | | | |
| CytB | T14766C * | G15326A* | A14905G * | T14766C* | G15326A* |
| | C14798T * | | G15326A * | G15326A * | G15613A ** |
| | G15326A * | | G15607A ** | | |
| | A15803G * | | | | |
| Nicht | C4336T **50% | | C10463T ** | A5824 * | |
| kodierende | G8291A* | | | G12308A * | |
| Region | G12308A* | | | | |

Anhand der mtDNA-Basenfolge können alle Menschen u.a. nach Herrnstadt et al. (2002) bestimmten Haplogruppen (Menschen in Lebensräumen) weltweit zugeordnet werden. Alle untersuchten Patienten besaßen typische Polymorphismen der Position 11719 und 14766 der Haplogruppe H mit den weiterführenden Single-Nukleotid-Polymorphismen G4769A, G1438A, 750A, G8860A und G15326A für die Haplogruppe H2, so dass hier keine typischen Tumormutationen, sondern Normvarianten ohne pathologisches Korrelat vorlagen. Somit waren auch die restlichen 33/118 (28%) der detektierten Single-Nukleotid-Polymorphismen ebenfalls nicht mehr bedeutend für eventuelle pathologische Funktionen.

In der Literatur wurden gehäuft Deletionen in Tumoren beschrieben und bestimmten Tumorentitäten zugeordnet (Penta et al. 2001). Doch unsererseits wurden dazu keine Untersuchungen ausgeführt und eine Klärung bleibt somit für unsere Plattenepithelkarzinome unbeantwortet. In der Literatur wird zudem unisono von einer übermäßig hohen Mutationsrate der mtDNA im Vergleich zur nDNA im Prozess des Alterns oder der Krebserkrankung ausgegangen. Im Durchschnitt konnten wir bei den fünf Plattenepithelkarzinomen 17 mtDNA-Polymorphismen pro Patient (0,1% der gesamten mtDNA) nachweisen. Möglicherweise war unsere Untersuchungsmethode nicht sensitiv genug, Mutationen mit geringem Heteroplasmiegrad aufzuspüren. Dass es sich bei den Veränderungen eindeutig um Polymorphismen und nicht um pathogene Mutationen handelt, konnte das identische Auftreten in den Tumor-nahen als auch Tumor-fernen Schleimhäuten belegen. Alle Patienten gehören dem mit 50% in Europa häufigen Haplotyp H an. Bestimmte Haplotypen können für die Sukzeptabilität einer Erkrankung eine Rolle spielen (Chinnery et al. 2002). Ob der wiederum seltenere Haplotyp H2 eine besondere Empfindlichkeit gegenüber mutagenen Noxen darstellt und somit bei ihm gehäuft Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches vorkommen, kann aufgrund unserer Untersuchung an nur 5 Patienten nicht beantwortet werden. Um die pathogene Rolle von mtDNA-Polymorphismen eindeutig belegen zu können, müssten zukünftig weiterreichendere Untersuchungen folgen.

In welchem Ausmaß nun die mtDNA-Veränderungen auch zu den multiplen Funktionsänderungen der OXPHOS in Tumoren beitragen, gelang bisher noch nicht endgültig zu klären. Abu-Amero et al. (2005) konnten die Häufung somatischer mtDNA-Mutationen mit einem funktionellen Komplex-I-Defekt in humanen Schilddrüsen-karzinomzelllinien korrelieren. Dem stehen die Resultate von Bourges et al. (2004) entgegen, die bei ND4- und ND5-Defekten sowie auch in rho°-Zellen keine wesentlichen Komplex-I-Funktionsstörungen im Vergleich zu Normalzellen fanden. Es konnte lediglich

eine reduzierte Komplex-Membranverankerung in Abwesenheit der hydrophoben Komplex-I-Anteile belegt werden. Scheubel et al. (2002) fanden für den geschädigten Herzmuskel (Normalzellen) und Meierhofer et al. (2006) für Nierenzellkarzinome heraus, dass die Down-Regulation der Atmungskettenkomplexfunktion für Komplex I nicht mit spezifischen mtDNA-Mutationen korrelierte. In der vorliegenden Untersuchung ließen sich für Komplex-I-kodierende mtDNA-Abschnitte bei einem Patienten insgesamt sechs Polymorphismen, bei drei Patienten drei Polymorphismen und bei einem Patienten eine Veränderung belegen. So kann jedenfalls für die untersuchten Plattenepithelkarzinome nicht von einem mtDNA-mutationsbedingten Funktionsausfall für Komplex I rückgeschlossen werden. Dies spricht dafür, dass die meisten somatischen mtDNA-Mutationen in kodierenden Regionen in Tumorgeweben überwiegend stille oder apathologische Polymorphismen darstellen und nukleäre DNA-Mutationen für die Defekte im Komplex I entscheidender sind (Shoubridge 2001). So bestehen Verbindungen in Familien mit autosomal dominat vererbtem Paragangliom zwischen einem Komplex-II-Funktionsdefizit und einer Mutation der nDNA im Abschnitt SDHC, der für Komplex II (der Komplex II wird ausschließlich nDNA-kodiert) kodiert (Baysal et al. 2000). Nonsense- und Missense-Mutationen wurden des Weiteren in der Untereinheit SDHD, 11q23, bei Patienten mit familiären, aber auch sporadischen Phäochromozytomen gefunden (Gimm et al. 2000).

Möglicherweise von besonderem Interesse für die Tumortherapie ist der Einfluss von mtDNA-Mutationen auf die Wirkung von Zytostatika. So besitzen Zellen mit Mutationen der COX- und der ND-Untereinheit nachweislich eine Resistenz mit Apoptosearrest auf die Zytostatika Cisplatin und 5-FU (Ohta 2006). Bei Austausch der mutierten Mitochondrien (Mutanten mit homoplasmatischer Mutation für COX-Untereinheit I in Cybridzellen) gegen Normalmitochondrien (Mitochondrien mit Wild-Typ-mtDNA) konnten die Medikamente wieder die Apoptose einleiten. Somit stellen solche mtDNA-Mutationen negative prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eine Induktions-Chemotherapie bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich dar. Eine PCR mit Sequenzierung (Gen-Chip-Analyse) könnte vor einer geplanten intensiven oder neoadjuvanten Chemotherapie mit Cisplatin/5-FU resistente Patienten selektieren und die primäre simultane Radiochemotherapie bei diesen Patienten von vornherein z.B. mit Paclitaxel, dass am Zytoskelett der Zelle wirkt, indizieren.

6 Zusammenfassung

Jedwede radiotherapeutische Behandlung im funktionell und ästhetisch sehr sensiblen Kopf-Hals-Gebiet führt durch ein ausgedehntes Tumorwachstum, aber auch durch eine radikal-operative Therapie zu körperlich-funktionellen Einschränkungen und kosmetischen Defekten, die psychisch und physisch die Patienten erheblich beeinflussen können. Deshalb sollte vor jeder Therapieentscheidung Radikalität und Funktionalität sorgfältig gegeneinander abgewogen werden und sich das Vorgehen nicht allein an der kurativen Zielstellung, sondern sich auch am höchstmöglichen Erhalt an Lebensqualität orientieren. In den letzten Jahren hat sich neben den Fortschritten in den operativen Behandlungstechniken vor allem auf dem Gebiet der Strahlentherapie inklusive der immensen Erweiterung der Möglichkeiten der systemischen Chemo- oder Targeted-Therapien die Chance auf Heilung auch für Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren vergrößert.

Die vorliegende Arbeit sollte anhand von Originalpublikationen den aktuellen Stand der Forschung mit Darstellung der eigenen Ergebnisse zur multimodalen Therapie von lokal fortgeschrittenen, inoperablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich darlegen. Das Forschungsspektrum betraf klinische Studien zur Wertigkeit der simultanen Radiochemo-/Targeted-Therapie, Untersuchungen zum prognostischen und prädiktiven Wert der Tumormikromilieumarker Hypoxie und Nekrose sowie die Möglichkeiten der Verbesserung der Strahlentherapie zur Senkung radiogener Therapiefolgen an den Speicheldrüsen. Neben diesen klinischen Studien sollten auch erste, z.T. noch nicht veröffentlichte, eigene Ergebnisse der experimentellen Forschung zum metabolischrespiratorischen Status von Plattenepithelkarzinomen und deren spezifische Unterschiede zu ihren Normalgeweben dargestellt werden.

Neuere Studien geben Hinweise, dass bei lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich der Einsatz von unkonventionellen Fraktionierungsregimen mit der simultanen Gabe von Chemotherapiesubstanzen der neueren Generation, z.B. der Taxane, der Überlebensvorteil gegenüber einer alleinigen Radiatio 20 bis 30% betragen kann. Eigene Forschungsergebnisse einer klinischen Phase-I/II-Studie konnten belegen, dass eine intensivierte Radiochemotherapie die Tumorkontroll- und Gesamtüberlebensraten weiter erhöhen kann. Eine Phase-III-Studie zur Sicherung dieser Ergebnisse wird im Jahr 2007 in Deutschland initiiert. Leider ist zu

befürchten, dass der Einsatz noch wirksamerer Zytostatika in Kombination mit einer Radiotherapie die Regenerationsfähigkeit der Schleimhäute im Mund- und Rachenbereich übersteigt. Bereits jetzt werden vermehrt schmerzhafte, langanhaltende Mukositiden beobachtet, die die orale Nahrungsaufnahme der Patienten so stark behindern, dass die PEG-Sondenernährung sogar über längere Zeit zwingend fortgesetzt werden muss. Auch führt die Anwendung solcher intensiven simultanen Radiochemotherapieregime oft zu einer vital bedrohlichen Knochenmarktoxizität. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, die Kombinationsbehandlung zu modifizieren und neue Substanzen zu implementieren, die zielgerichtet ihre Zytotoxizität nur auf die Tumoren fokussieren und die Normalgewebe weitgehend schonen.

Der zusätzliche Einsatz von chimären, monoklonalen Antikörpern (wie Cetuximab) aus der Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), hauptsächlich gerichtet gegen den erbB1-Rezeptor, in Kombination mit Radiochemotherapie stellt eine neue, vielversprechende Therapieoption dar. Im Jahre 2005 konnte die Studienleitung der einzigen europäischen, multizentrischen Phase-I/II-Studie zu diesem Thema übernommen werden. In dieser Studie wird die wöchentliche Cisplatindosis geprüft, die zu einer simultanen Cetuximab-Gabe und einer HART appliziert werden kann. Die ersten Ergebnisse der Phase-I-Studie belegen zumindest die gute Verträglichkeit der Behandlung. Responseraten liegen bisher noch nicht vor. Die Nebenwirkungen der Behandlung besitzen ein weitaus geringeres toxisches Potential als intensive Radiochemotherapien. Weitere klärende Studien über die Rationale und mögliche, bisher aber noch unbekannte Langzeitnebenwirkungen dieser Substanzklasse müssen in Zukunft erfolgen.

Zudem erlauben die modernen Möglichkeiten der Strahlentherapie, wie die 3D-Konformationbestrahlung oder die IMRT, eine verbesserte Dosisverteilung mit höherer Dosiskonformität im Tumor zu erreichen sowie im Gegenzug auch das gesunde Normalgewebe im Strahlengang besser zu schützen. Sie sollten insbesondere eingesetzt werden, um die für die Patienten sehr quälende, lebenslang anhaltende Therapiefolge der Xerostomie wirksam zu vermindern. Die theoretische Annahme, dass durch die Vermeidung der radiogenen Xerostomie auch die Folgekomplikationen an den Zähnen und Kieferknochen gesenkt werden können, muss in Phase-III-Studien überprüft werden. Gegenüber den Kostenträgern kann die initial zwar kostenintensivere Therapie der 3D-Konformationstherapie oder der IMRT eindeutig dadurch argumentativ gerechtfertigt werden, dass unter anderem durch die Verhinderung von z.T. gravierenden Langzeitfolgen spätere Zusatzkosten gespart werden könnten.

Eine hoher Anteil von Hypoxie- und Nekrosezonen in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches konnten als unabhängige, prognostisch ungünstige Mikromilieufaktoren für das krankheitsfreie Überleben identifiziert werden, denn die intratumorale Nekrose kann möglicherweise als ein Kofaktor für die erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung von Kopf-Hals-Tumoren gelten. Erst die simultane Chemotherapie zur Radiatio half das krankheitsfreie Überleben signifikant bei den Patienten zu verbessern, die mit diesen negativen Mikromilieufaktoren belastet waren. So sollte insbesondere bei diesen Patienten die wirkungsvollere Kombinationbehandlung empfohlen werden. Die Detektion der intratumoralen Nekrose gelingt heutzutage ohne vermehrten Aufwand mit der Durchführung der kontrastmittelunterstützten Computertomographie, die ohnehin eine obligate Standarduntersuchung vor jeder Therapieentscheidung bei histologisch bewiesenen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist. Mit dieser Methode kann der prognostische und zugleich prädiktive Wert der Tumornekrose auch für das Gesamtüberleben der Patienten relativ leicht in zukünftigen klinischen Studien überprüft werden, um Risikokollektive prätherapeutisch sicher zu detektieren, weil nur diese Patienten maximal von einer intensiveren, simultan-kombinierten Radiochemotherapie profitieren werden.

Seit Otto Warburg ist das Wissen über die Atmung von Tumorzellen immens erweitert worden. Vielfältige Untersuchungen der mitochondrialen Medizin haben ebenso zu einem großen Detailwissen beigetragen. Im Verlauf der Tumorgenese ersetzt die Glykolyse häufig die aerobe Atmung (Warburg-Effekt). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass Mitochondrien von humanen Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich charakteristische, deutlich-verminderte Komplex-I-abhängige Atmungsraten aufweisen, die wiederum mit einer reduzierten Apoptoseneigung einhergehen. Diese Anti-Apoptoseneigung in Tumoren konnte aus der besonderen Dichtheit der mitochondrialen Außenmembran gegenüber ausströmendem Cytochrom c in Verbindung mit der Erhöhung der Leckatmung der mitochondrialen Innenmembran (Entkopplung) abgeleitet werden. Dies könnte eine Erklärung für den Ersatz der aeroben Atmung durch Glykolyse in malignen Tumoren bieten. Diese Umstellung könnte dann als Schutzmechanismus der Tumorzelle vor der mitochondrial-getriggerter Apoptose gelten, da die Glykolyse nicht in die Apoptosekaskaden eingreifen kann.

Der Prozess der malignen Progression von Karzinomen aus prämalignen Vorstufen konnte zuvor auch für die Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen werden. Durch den besonderen chronischen Einfluss exogener Noxen, wie dem übermäßigen Gebrauch von Tabak und Alkohol, zeichnen sich die Kopf-Hals-Tumoren durch eine "Feldkanzerisierung" der Mund-und Pharynxschleimhaut aus, was bedeutet, dass diese prämalignisierten Gebiete häufig Ausgangspunkte für Zweitkarzinome oder für Rezidive sind. In der vorliegenden Arbeit gelang es, bereits in prämalignen Läsionen gleichgerichtete OXPHOS-Defekte zu belegen, was für einen unumkehrbaren Prozess einer Malignisierung dieser Zellen spricht.

Schon seit geraumer Zeit werden Veränderungen der mitochondrialen Gene als Teil der Tumorgenese angesehen. Tumorgenese und Alterung (Seneszenz) verbinden viele Gemeinsamkeiten. Vor allem oxidativer Stress durch reaktive oxygene spezies (ROS) löst eine Zunahme der Mutationen der mtDNA aller alternder, postmitotischer Zellen aus, so dass es wahrscheinlich ist, dass dieser Prozess auch im Kontext der Krebsentstehung und anderer Krankheiten relevant ist. Multiple somatische mtDNA-Mutationen ließen sich in verschiedenen Tumortypen, z.B. dem hepatozellulären Karzinom, dem Uteruszervixkarzinom oder dem Mammakarzinom nachweisen. Als Auslöser dieser mtDNA- Mutationen wurden vor allem exogene Noxen, wie z.B. UV-Strahlung bei lichtinduzierten Hauttumoren, chemische Verbindungen bei Harnblasenkarzinomen oder Viren in hepatozellulären Karzinomen angesehen. Viren sowie übermäßiges Rauchen und Alkohol wirken durch erhöhten endogen-oxidativen Stress auf nDNA und mtDNA. In der vorliegenden Arbeit gelang der Beweis, dass auf oxidativen Stress die Mitochondrien und die mtDNA zahlenmäßig zunehmen und dies eine Erwiderung im Sinne einer Anpassung darstellt, da die mitochondrialen Funktionen von Normalmukosa über Dysplasie bis hin zum Karzinom im Kopf-Hals-Bereich absinken. Zudem können Mutationen dieser beiden Genome (n- und mtDNA) Ursache spezieller Defekte der OXPHOS sein. Da allein acht Proteinuntereinheiten des Komplexes I mtDNA-kodiert sind, konnten diese Mutationen als eine mögliche Ursache für die zuvor nachgewiesene Komplex-I-Defizienz angesehen werden. Um die Funktionsbedeutung spezifischer mtDNA-Mutationen und ihre Rolle in Krebsentwicklung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich untersuchen, wurde eine vollständigere Analyse der gesamten mtDNA vorgenommen. Alle detektierten Nukleotid-Substitutionen der Tumoren wurden durch die Sequenzierung der identischen Bruchstücke aus dem dysplastischen Epithel desselben Patienten überprüft. Lag auch in der dysplastischen Schleimhaut derselbe Polymorphismus vor, wurden dann die mtDNA-Proben des normalen, nicht-neoplastischen Epithels des Mundes im selben Fragment dieses Patienten sequenziert. In der Arbeit konnten keine pathogenetischen Mutationen in den Geweben gefunden werden. Alle detektierten Veränderungen entsprachen häufigen Polymorphismen ohne jegliche direkte Relevanz zu den detektierten

Funktionsstörungen. Es gelang jedoch Polymorphismen zu identifizieren, die dem Haplotyp H2 der Menschen in Europa entsprechen. Bekannt ist eine Sukzeptabilität einiger Haplotypen für eine Krankheitsentstehung. Ob der H2-Subtyp besonders empfindlich gegenüber exogenen Noxen mit daraus verstärkt resultierender Krebsentstehung ist, konnte anhand unseres geringen Stichprobenumfanges nicht geklärt werden. Weitere Untersuchungen der mitochondrialen Membranen, der OXPHOS, der nukleären und mitochondrialen DNA von Tumoren müssen die noch immer zahlreichen ungeklärten zwischen den spezifischen Defizienzen, Zusammenhänge den veränderten Stoffwechselwegen und der besonderen Resistenz gegen Apoptosesignalen zu ihren Ausgangszellen klären.

7 Literatur

- Abitbol A, Abdel-Wahab M, Harvey M, Lewin A, Troner M, Hamilton-Nelson K, Wu J, Markoe A: Phase II study of tolerance and efficacy of hyperfractionated radiation therapy and 5-fluorouracil, cisplatin, and paclitaxel (taxol) and amifostine (ethyol) in head and neck squamous cell carcinomas: A-3 protocol. Am J Clin Oncol 28 (2005) 449-455
- Abu-Amero KK, Alzahrani AS, Zou M, Shi Y: High frequency of somatic mitochondrial DNA mutations in human thyroid carcinomas and complex I respiratory defect in thyroid cancer cell lines. Oncogene 24 (2005) 1455-1460
- 3. Ahrens S, Hoffmann C, Jabar S, Braun-Munzinger G, Paulussen M, Dunst J, Rube C, Winkelmann W, Heinecke A, Gobel U, Winkler K, Harms D, Treuner J, Jurgens H: Evaluation of prognostic factors in a tumor volume-adapted treatment strategy for localized Ewing sarcoma of bone: the CESS 86 experience. Cooperative Ewing Sarcoma Study. Med Pediatr Oncol 32 (1999) 186-195
- 4. Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L: Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. Clin Cancer Res 5 (1999) 2884-2890
- 5. Altieri A, Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Dal Maso L, Talamini R, Levi F, Negri E, Rodriguez T, La Vecchia C: Wine, beer and spirits and risk of oral and pharyngeal cancer: a case—control study from Italy and Switzerland. Oral Oncol 40 (2004) 904-909
- 6. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet 23 (1999) 147
- Ang K, Berkey BA, Tu, X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L: Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Expression on Survival and Pattern of Relapse in Patients with Advanced Head and Neck Carcinoma. Cancer Res 62 (2002) 7350-7356

- 8. Attin T, Buchalla W, Siewert C, Hellwig E: Fluoride release/uptake of polyacid-modified resin composites (componers) in neutral and acidic buffer solutions. J Oral Rehabil 26 (1999) 388-393
- 9. Augenlicht LH & Heerdt BG: Mitochondria: integrators in tumorigenesis? Nat Genet 28 (2001) 104-105
- 10. Bache M, Reddemann R, Said HM, Holzhausen HJ, Taubert H, Becker A, Kuhnt T, Hansgen G, Dunst J, Vordermark D: Immunohistochemical detection of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-1alpha-related markers, and hemoglobin levels. Int J Radiat Oncol Biol Phys 66 (2006) 1481-1487
- 11. Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Wurl P, Meye A, Bartel F, Schmidt H, Rath FW, Taubert H: Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. Int J Cancer 96 (2001)110–117
- 12. Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Goldkorn T: The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. Biochim Biophys Acta 1314 (1996) 147-156
- 13. Baujat B, Audry H, Bourhis J, Chan AT, Onat H, Chua DT, Kwong DL, Al-Sarraf M, Chi KH, Hareyama M, Leung SF, Thephamongkhol K, Pignon JP; MAC-NPC Collaborative Group: Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 64 (2006) 47-56
- 14. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW 3rd, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B: Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. Science 287 (2000) 848-851
- 15. Becker A, Stadler P, Lavey RS, Hansgen G, Kuhnt T, Lautenschlager C, Feldmann HJ, Molls M, Dunst J: Severe anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 46 (2000) 459-466

- 16. Beckman JK, Bagheri F, Ji C, Blair IA, Marnett LJ: Phospholipid peroxidation in tumor promoter-exposed mouse skin. Carcinogenesis 15 (1994) 2937-2944
- 17. Beer KT, Zehnder D, Lussi A, Greiner RH: Sparing of contralateral major salivary glands has a significant effect on oral health in patients treated with radical radiotherapy of head and neck tumors. Strahlenther Onkol 178 (2002) 722-726
- 18. Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H: Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI, Saarbrücken, 2006
- 19. Bianco C, Tortora G, Bianco R, Caputo R, Veneziani BM, Caputo R, Damiano V, Troiani T, Fontanini G, Raben D, Pepe S, Bianco AR, Ciardiello F: Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). Clin Cancer Res 8 (2002) 3250-3258
- 20. Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, Olson JA Jr, Marks JR, Dressman HK, West M, Nevins JR: Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. Nature 439 (2006) 353-357
- 21. Boitier E, Merad-Boudia M, Guguen-Guillouzo C, Defer N, Ceballos-Picot I, Leroux JP, Marsac C: Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radicals. Cancer Res 55 (1995) 3028-3035
- 22. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 354 (2006) 567-578
- 23. Bourges I, Ramus C, Mousson de Camaret B, Beugnot R, Remacle C, Cardol P, Hofhaus G, Issartel JP: Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with the prohibitin. Biochem J 383 (2004) 491-499

- 24. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, Horiot JC, Le Maitre A, Pajak TF, Poulsen MG, O'Sullivan B, Dobrowsky W, Hliniak A, Skladowski K, Hay JH, Pinto LH, Fallai C, Fu KK, Sylvester R, Pignon JP: Meta-Analysis of Radiotherapy in Carcinomas of Head and neck (MARCH) Collaborative Group. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. Lancet 368 (2006) 843-854
- 25. Boyle P, Macfarlane GJ, Maisonneuve P, Zheng T, Scully C, Tedesco B: Epidemiology of mouth cancer in 1989. J R Soc Med 83 (1990) 724-730
- 26. Brandon M, Baldi P, Wallace DC: Mitochondrial mutations in cancer. Oncogene 25 (2006) 4647-4662
- 27. Bredesen DE, Rammohan VR, Mehlen P: Cell death in the nervous system Nature 443 (2006) 796-802
- Brizel DM & Esclamado R: Concurrent chemoradiotherapy for locally advanced, nonmetastatic, squamous carcinoma of the head and neck: consensus, controversy, and conundrum. J Clin Oncol 10 (2006) 2612-2617
- 29. Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K: A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. BMC Cancer 6 (2006) 6-28
- 30. Budach V, Stuschke M, Budach W, Baumann M, Geismar D, Grabenbauer G, Lammert I, Jahnke K, Stueben G, Herrmann T, Bamberg M, Wust P, Hinkelbein W, Wernecke KD: Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial. J Clin Oncol 20 (2005) 1125-1135
- 31. Bussels B, Maes A, Flamen P, Lambin P, Erven K, Hermans R, Nuyts S, Weltens C, Cecere S, Lesaffre E, Van den Bogaert W: Dose-response relationships within the parotid gland after radiotherapy for head and neck cancer. Radiother Oncol 73 (2004) 297-306

- 32. Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL: Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. J Biol Chem 256 (1981) 8699-8704
- 33. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res 56 (1996) 2488-2492
- 34. Cancado RP, Yurgel LS, Filho MS: Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral Oncol 37 (2001) 446–454
- Capuano F, Varone D, D'Eri N, Russo E, Tommasi S, Montemurro S, Prete F, Papa,
 S: Oxidative phosphorylation and F(O)F(1) ATP synthase activity of human hepatocellular carcinoma. Biochem Mol Biol Int 38 (1996) 1013-1022
- 36. Chance B & Hess B: Metabolic control mechanisms. IV. The effect of glucose upon the steady state of respiratory enzymes in the ascites cell. J Biol Chem 234 (1959) 2421-2427
- 37. Chao KS, Bosch WR, Mutic S, Lewis JS, Dehdashti F, Mintun MA, Dempsey JF, Perez CA, Purdy JA, Welch MJ: A novel approach to overcome hypoxic tumor resistance: Cu-ATSM-guided intensity-modulated radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 49 (2001a) 1171-1182
- 38. Chao KS, Deasy JO, Markman J, Haynie J, Perez CA, Purdy JA, Low DA: A prospective study of salivary function sparing in patients with head-and-neck cancers receiving intensity-modulated or three-dimensional radiation therapy: initial results. Int J Radiat Oncol Biol Phys 49 (2001b) 907-916
- Chen LB: Mitochondrial membrane potential in living cells. Annu Rev Cell Biol 4 (1988) 155-181
- 40. Chen GF, Chan FL, Hong BF, Chan LW, Chan PS: Mitochondrial DNA mutations in chemical carcinogen-induced rat bladder and human bladder cancer. Oncol Rep 12 (2004) 463-472

- 41. Chen Y, Tostlebe M, Müller SP, Zierz S, Holtz J, Gellerich FN: Age dependent changes of mitochondrial properties in heart and m. soleus of FISHER rats. Biochim Biophys Acta 1657 (2004) 34
- 42. Chinnery PF, Samuels DC, Elson J, Turnbull DM: Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? Lancet 360 (2002) 1323-1325
- 43. Chua DT, Sham JS, Kwong DL, Choy DT, Leong L, Chan FL: Evaluation of cervical nodal necrosis in nasopharyngeal carcinoma by computed tomography: incidence and prognostic significance. Head Neck 19 (1997) 266-275
- 44. Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG: High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. Nat Genet 28 (2001) 147-150
- 45. Crabtree HG: Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. Biochem J 23 (1929) 536-545
- 46. Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Hoqmo A, Bjornestal L, Lindholm J, Lundberg B, Dalianis T, Munck-Wikland E: Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. Int J Cancer 112 (2004) 1015-1019
- 47. Damiano V, Melisi D, Bianco C, Raben D, Caputo R, Fontanini G, Bianco R, Ryan A, Bianco AR, De Placido S, Ciardiello F, Tortora G: Cooperative antitumor effect of multitargeted kinase inhibitor ZD6474 and ionizing radiation in glioblastoma. Clin Cancer Res11 (2005) 5639-5644
- 48. Dang, C V & Semenza G L: Oncogenic alterations of metabolism. Trends Biochem 24 (1999) 68-72
- 49. Danial NN & Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. Cell 116 (2004) 205-219
- 50. Danielsen AJ & Maihle NJ: The EFG/ErbB receptor family and apoptosis. Growth Factors 20 (2002) 1-15

- 51. Dawes C: Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. J Dent Res 66 (1987) 648-653
- 52. Dietz A, Logothetis CA, Helbig M, Flechtenmacher C, Rudat V, Dollner R, Wallner F, Bosch FX: Prognostic impact of EBV-related LMP-1, histologic type, and environmental factors in nasopharyngeal carcinoma in a German population. Onkologie 27 (2004) 345-350
- 53. DiMauro S & Schon EA: Mitochondrial DNA mutations in human disease. Am J Med Genet 106 (2001) 18-26
- 54. Donahue RJ, Razmara M, Hoek JB, Knudsen TB: Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function. FASEB J 15 (2001) 635-644
- 55. Dreyer JO, Sakuma Y, Seifert G: Radiation-induced sialadenitis. Stage classification and immunohistology. Pathologe 10 (1989) 165-170
- 56. Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP: Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy. Radiother Oncol 47 (1998) 167-174
- 57. Dubska L, Andera L, Sheard MA: HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. FEBS Lett 579 (2005) 4149-4158
- 58. Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ: Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 6562-6566
- 59. Dunst J, Stadler P, Becker A, Lautenschlager C, Pelz T, Hansgen G, Molls M, Kuhnt T: Tumor volume and tumor hypoxia in head and neck cancers. The amount of the hypoxic volume is important. Strahlenther Onkol 179 (2003) 521-526
- 60. Dunst J: Zukünftig nur noch simultane Radiochemotherapie in der Onkologie? Onkologe 3 (2000) 232-237
- 61. Eichhorn W, Gehrke G, Bschorer R, Stepke M, Greschniok A, Kaiserling E, Voy ED: Morphologische Veränderungen von kleinen Kopfspeicheldrüsen durch Strahlentherapie. Dtsch Zahnärztl Z 48 (1993) 58-64

- 62. Eisbruch A, Rhodus N, Rosenthal D, Murphy B, Rasch C, Sonis S, Scarantino C, Brizel D: How should we measure and report radiotherapy-induced xerostomia? Semin Radiat Oncol 13 (2003a) 226-234
- 63. Eisbruch A, Ship JA, Dawson LA, Kim HM, Bradford CR, Terrell JE, Chepeha DB, Teknos TN, Hogikyan ND, Anzai Y, Marsh LH, Ten Haken RK, Wolf GT: Salivary gland sparing and improved target irradiation by conformal and intensity modulated irradiation of head and neck cancer. World J Surg 27 (2003b) 832-837
- 64. Eisbruch A, Kim HM, Terrell JE, Marsh LH, Dawson LA, Ship JA: Xerostomia and its predictors following parotid-sparing irradiation of head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 50 (2001) 695-704
- 65. Eisbruch A, Ten Haken RK, Kim HM, Marsh LH, Ship JA: Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 45 (1999) 577-587
- 66. Elson JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF: Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. Am J Hum Genet 68 (2001) 802-806
- 67. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M: Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 21 (1991) 109–122
- 68. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J, Alsner J, Overgaard J: The influence of epidermal growth factor receptor and tumor differentiation on the response to accelerated radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck in the randomized DAHANCA 6 and 7 study. Radiother Oncol 74 (2005) 93-100
- 69. Evtodienko YuV, Teplova VV, Duszynski J, Bogucka K, Wojtczak L: The role of cytoplasmic [Ca2+] in glucose-induced inhibition of respiration and oxidative phosphorylation in Ehrlich ascites tumourcells: a novel mechanism of the Crabtree effect. Cell Calcium 15 (1994) 439-446

- 70. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P: Attenuation of LDH-A expressino uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. Cancer Cell 9 (2006) 426-434
- 71. Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM: C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. Anticancer Res 12 (1992) 613-619
- 72. Fietkau R, Iro H, Grabenbauer GG, Altendorf-Hofmann A, Sauer R: Simultane Radiochemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluorouracil bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren. Strahlenther Onkol 167 (1991) 693-700
- 73. Forastiere AA, Shank D, Neuberg D, Taylor SG 4th, DeConti RC, Adams G: Final report of a phase II evaluation of paclitaxel in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: an Eastern Cooperative Oncology Group trial (PA 390). Cancer 82 (1998) 2270-2274
- 74. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ: Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. J Cell Physiol 182 (2000) 41-49
- 75. Fowler JF: Is there an optimum overall time for head and neck radiotherapy? A review, with new modelling. Clin Oncol (R Coll Radiol) 19 (2007) 8-22
- 76. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N: Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. Oral Oncol 36 (2000) 106-115
- 77. Garden AS, Harris J, Vokes EE, Forastiere AA, Ridge JA, Jones C, Horwitz EM, Glisson BS, Nabell L, Cooper JS, Demas W, Gore E: Preliminary results of Radiation Therapy Oncology Group 97-03: a randomized phase II trial of concurrent radiation and chemotherapy for advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. J Clin Oncol 22 (2004) 2856-2864
- 78. Gasparini G, Bevilacqua P, Bonoldi E, Testolin A, Galassi A, Verderio P, Boracchi P, Guglielmi RB, Pezzella F: 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 (1995) 1375-1383

- Gellerich F.N, Trumbeckaite S. Müller T, Chen Y, Deschauer M, Gizatullina Z, Zierz
 S: Energetic depression caused by mitochondrial dysfunction. Mol Cell Biochem
 265-257 (2003) 391-405
- 80. Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Muller T, Neudecker S, Zierz S: Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. Biochim Biophys Acta 1556 (2002a) 41-52
- 81. Gellerich FN, Laterveer FD, Zierz S, Nicolay K: The quantitation of ADP diffusion gradients across the outer membrane of heart mitochondria in the presence of macromolecules. Biochim Biophys Acta 1554 (2002b) 48-56
- 82. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Seppet E, Rasmussen HN, Neuhoff C, Zierz S: Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and disease. Biochem Soc Trans 28 (2000) 164-169
- 83. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Hertel K, Zierz S, Muller-Werdan U, Werdan K, Redl H, Schlag G: Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. Shock 11 (1999) 336-341
- 84. Gerlach R, Janich M, Kuhnt T, Lambeck S, Langhammer T, Opitz L, Jirsak N, Dunst J: Comparative investigation for determination of the dose- effect parameter according to the "mean-dose" and "logistic" model for the parotid gland. Biomedizinische Technik 50 (2005) 993
- 85. Gernhardt CR, Schulze E, Klapproth J, Schaller HG.. The Influence of Irradiation on de- and remineralization of dentin. J Dent Res 82 (2003) 335
- 86. Gernhardt CR, Kielbassa AM, Hahn P, Schaller HG.: Tensile bond strength of different dentin adhesive systems on irradiated and nonirradiated dentin. J Oral Rehabil 28 (2001) 814-820
- 87. Gibson MK & Forastiere AA: Reassessment of the role of induction chemotherapy for head and neck cancer. Lancet Oncol 7 (2006) 565-574

- 88. Gilbert RW, Birt D, Shulman H, Freeman J, Jenkin D, MacKenzie R, Smith C: Correlation of tumor volume with local control in laryngeal carcinoma treated by radiotherapy. Ann Otol Rhinol Laryngol 96 (1987) 514-518
- 89. Gimm O, Armanios M, Dziema H, Neumann HP, Eng C: Somatic and occult germline mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. Cancer Res 60 (2000) 6822-6825
- 90. Gnaiger E: Oxygen conformance of cellular respiration. A perspective of mitochondrial physiology. Adv Exp Med Biol 543 (2003) 39-55
- 91. Grabenbauer GG, Steininger H, Meyer M, Fietkau R, Brunner T, Heinkelmann P, Hornung J, Iro H, Spitzer W, Kirchner T, Sauer R, Distel L: Nodal CT density and total tumor volume as prognostic factors after radiation therapy of stage III/IV head and neck cancer. Radiother Oncol 47 (1998) 175-183
- 92. Green DR & Kroemer G: The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science 305 (2004) 626-629
- 93. Gregoire V: Tumor control probability (TCP) and normal tissue complication probability (NTCP) in head and neck cancer. Rays 30 (2005) 105-108
- 94. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev 13 (1999) 1899-1911
- 95. Grötz KA, Riesenbeck D, Brahm R, Seegenschmiedt MH, al-Nawas B, Dörr W, Kutzner J, Willich N, Thelen M, WagnerW: Chronische Strahlenfolgen an den Zahnhartgeweben ("Strahlenkaries"). Klassifikation und Behandlungsansätze. Strahlenther Onkol 177 (2001) 96-104
- 96. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, Pevsner J, Westra WH, Califano J: A transcriptional progression model for head and neck cancer. Clin Cancer Res 9 (2003) 3058-3064
- 97. Ha PK, Tong BC, Westra WH, Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Zahurak M, Sidransky D, Califano JA: Mitochondrial C-tract alteration in premalignant lesions of the head and neck: a marker for progression and clonal proliferation. Clin Cancer Res 8 (2002) 2260-2265

- 98. Haddad JJ & Land SC: A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alphadependent regulation of HIF-1alpha. FEBS Lett 505 (2001) 269-274
- 99. Harari PM & Huang S: Radiation combined with EGFR signal inhibitors: head and neck cancer focus. Semin Radiat Oncol 16 (2006) 38-44
- 100. Harari PM: Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer 11 (2004) 689-708
- 101. Harwood TR, Staley J, Yokoo H: Histopathology of irradiated and obstructed submandibular salivary glands. Arch Pathol 96 (1973) 189-196
- 102. Herrmann T, Baumann M, Dörr W: Klinische Strahlenbiologie kurz und bündig. 4. Aufl. Urban & Fischer Verlag München, Jena, 2006
- 103. Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, Ghosh SS, Olefsky JM, Beal MF, Davis RE, Howell N: Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. Am J Hum Genet 70 (2002) 1152-1171
- 104. Hitt R, Lopez-Pousa A, Martinez-Trufero J, Escrig V, Carles J, Rizo A, Isla D, Vega ME, Marti JL, Lobo F, Pastor P, Valenti V, Belon J, Sanchez MA, Chaib C, Pallares C, Anton A, Cervantes A, Paz-Ares L, Cortes-Funes H: Phase III study comparing cisplatin plus fluorouracil to paclitaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer. J Clin Oncol 23 (2005) 8636-8645
- 105. Hoberman HD: Is there a role for mitochondrial genes in carcinogenesis? Cancer Res 35 (1975) 3332-3335
- 106. Holbro T, Civenni G, Hynes NE: The ErbB receptors and their role in cancer progression. Exp Cell Res 284 (2003) 99-110
- 107. Huang SM, Bock JM, Harari PM: Epidermal growth factor receptor with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 59 (1999) 1935-1940
- 108. HumanMitochondrial Genome Polymorphism Database. <u>Http://www.giib.or.jp/mtsnp/index_e.shtm.</u>

- 109. Ibsen KH, Coe EL, McKee RW: Some factors influencing respiration and glycolysis. Cancer Res 20 (1960) 1399-1407
- 110. Johnson CR, Thames HD, Huang DT, Schmidt-Ullrich RK: The influence of quantitative tumor volume measurements on local control in advanced head and neck cancer using concomitant boost accelerated superfractionated irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 32 (1995) 635-641
- 111. Johnston JB, Navaratnam S, Pitz MW, Maniate JM, Wiechec E, Baust H, Gingerich J, Skliris GP, Murphy LC, Los M: Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. Curr Med Chem 13 (2006) 3483-3492
- 112. Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G: A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. Nature 439 (2006) 168-174
- 113. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TPJ, Ward CW, Burgess AW: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Exp Cell Res 284 (2003) 31-53
- 114. Kabore AF, Johnston JB, Gibson SB: Changes in the apoptotic and survival signaling in cancer cells and their potential therapeutic implications. Curr Cancer Drug Targets 4 (2004) 147-163
- 115. Kay L, Rossi A, Saks V: Detection of early ischemic damage by analysis of mitochondrial function in skinned fibers. Mol Cell Biochem 174 (1997) 79-85
- 116. Keller AZ & Terris M: The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx. Am J Public Health Nations Health 55 (1965) 1578-1585
- 117. Kelloff GJ, Krohn KA, Larson SM, Weissleder R, Mankoff DA, Hoffman JM, Link JM, Guyton KZ, Eckelman WC, Scher HI, O'Shaughnessy J, Cheson BD, Sigman CC, Tatum JL, Mills GQ, Sullivan DC, Woodcock J: The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. Clin Cancer Res 11 (2005) 7967-7985

- 118. Khuchua Z, Belikova Y, Kuznetsov AV, Gellerich FN, Schild L, Neumann HW, Kunz WS: Caffeine and Ca2+ stimulate mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human skeletal muscle fibers due to activation of actomyosin ATPase. Biochim Biophys Acta 1188 (1994) 373-379
- 119. Kies MS, Haraf DJ, Rosen F, Stenson K, List M, Brockstein B, Chung T, Mittal BB, Pelzer H, Portugal L, Rademaker A, Weichselbaum R, Vokes EE: Concomitant infusional paclitaxel and fluorouracil, oral hydroxyurea, and hyperfractionated radiation for locally advanced squamous head and neck cancer. J Clin Oncol 19 (2001)1961-1969
- 120. Kim MM, Clinger JD, Masayesva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH Califano JA: Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. Clin Cancer Res 10 (2004) 8512-8515
- 121. King AD, Tse GM, Ahuja AT, Yuen EH, Vlantis AC, To EW, van Hasselt AC: Necrosis in metastatic neck nodes: diagnostic accuracy of CT, MR imaging, and US. Radiology 230 (2004) 720-726
- 122. Kirches E, Krause G, Weis S, Mawrin C, Dietzmann K: Comparison between mitochondrial DNA sequences in low grade astrocytomas and corresponding blood samples. Mol Pathol 55 (2002) 204-206
- 123. Konings AW, Coppes RP, Vissink A: On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 62 (2005) 1187-1194
- 124. Koobs DH: Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. Sience 178 (1972) 127-133
- 125. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA: High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett 416 (1997) 15-18
- 126. Köstler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC: Oral Mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. CA Cancer J Clin 51 (2001) 290-315

- 127. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E: Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. Cancer Sci 97 (2006) 582-588
- 128. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pastorek J, Karapantzos I, Gatter KC, Harris AL: Hypoxia-activated tumor pathways of angiogenesis and pH regulation independent of anemia in head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 59 (2004) 67-71
- 129. Kuhnt T, PelzT, Qu X, Hänsgen G, Dunst J, Gellerich FN: Mitochondrial OXPHOS functions in R1H rhabdomyosarcoma and skeletal muscles of the rat. Neurochem Res 32 (2007) 973-980
- 130. Kuhnt T, Wendt T, Engenhart-Cabillic R, Lammering G, Flentje M, Grabenbauer GG, Fietkau R, Baumann M, Dunst J: Simultane hyperfraktioniert-akzelerierte Radiotherapie (HART) mit Cisplatin (CIS) und dem Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab (CET) für lokal fortgeschrittene, inoperable Kopf-Hals-Tumoren: eine Phase-I-Dosisfindungsstudie zu einem neuen multimodalen Therapieansatz. Strahlenther Onkol 183 (2007b) in press
- 131. Kuhnt T: Phase I/II- Studie zur hyperfraktioniert- akzelerierten Radiotherapie (HART) plus Cetuximab (CET) und Cisplatin (CIS) bei lokal fortgeschrittenen, inoperablen Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereiches. Forum 21 (2006a) 32-33
- 132. Kuhnt T, Becker A, Bloching M, Schubert J, Klautke G, Fietkau R, Dunst J: Aggressive simultaneous radiochemotherapy with cisplatin and paclitaxel in combination with accelerated hyperfractionated radiotherapy in locally advanced head and neck tumors. Results of a phase II trial. Medical Oncol 23 (2006b) 325-334
- 133. Kuhnt T, Janich M, Götz U, Gerlach R, Chiricuta I, Hänsgen G: Etablierung einer 3D Konformationstechnik zur Radiotherapie von Kopf- Hals- Tumoren unter Berücksichtigung der Parotisschonung. Strahlenther Onkol 182 (2006c) 325-330

- 134. Kuhnt T, Hey J, Jirsak N, Lambeck S, Sehlleier S, Gernhardt C, Schaller HG, Gerlach R, Hänsgen G: Einseitige Speicheldrüsenschonung ist ein wirksamer Schutz vor Xerostomie bei Patienten mit beidseitiger Radiotherapie im Kopf- Hals- Bereich. Strahlenther Onkol 182 (2006d) 39
- 135. Kuhnt T, Jirsak N, Müller AC, Pelz T, Gernhardt C, Schaller HG, Janich M, Gerlach R, Dunst J: Quantitative und qualitative Speicheldrüsenfunktionsuntersuchungen in Abhängigkeit von Dosis und Volumen einer Radiotherapie zur Verringerung der Xerostomie bei Kopf- Hals- Tumoren. Strahlenther Onkol 181 (2005a) 520-528
- 136. Kuhnt T, Mueller AC, Pelz T, Hänsgen G, Bloching M, Koesling S, Schubert J, Dunst J: Impact of tumor control and presence of visible necrosis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy or radiochemotherapy. J Cancer Res Clin Oncol 131 (2005b) 758-764
- 137. Kuhnt T, Pelz T, Xying Q, Spohn V, Hänsgen G, Bloching M, Becker A, Zywietz F, Dunst J, Zierz S, Gellerich FN: Complex I-caused dysfunction in mitochondria of human tumors and rat rhabdomyosarcoma. Biochim Biophys Acta 1657 (2004) 54
- 138. Kuhnt T, Becker A, Pigorsch S, Pelz T, Bloching M, Passmann M, Lotterer E, Hänsgen G, Dunst J: Aggressive simultaneous radiochemotherapy with cisplatin and paclitaxel in combination with accelerated-hyperfractionated Radiotherapy in locally advanced Head and Neck Tumors –Results of a phase I-II trial. Strahlenther Onkol 179 (2003a) 673-681
- 139. Kuhnt T, Kegel T, Bloching M, Dunst J: Radio(chemo)therapie lokal fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome im Kopf- Hals- Bereich. Onkologe 9 (2003b) 771-782
- 140. Kuhnt T, Pelz T, Becker A, Gellerich FN, Hänsgen G, Zierz S, Dunst J: Mitochondriale Atmungsaktivitäten der Atmungskettenkomplexe I und II in menschlichen Plattenepithelkarzinomen und deren Abhängigkeit vom pO₂. In: Baumann M & Petersen C (Hrsg): Experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie, Bd. 11, Dresden, 2002, S.64-68

- 141. Kunz WS, Kuznetsov AV, Schulze W, Eichhorn K, Schild L, Striggow F, Bohnensack R, Neuhof S, Grasshoff H, Neumann HW: Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. Biochim Biophys Acta 1144 (1993) 46-53
- 142. Kutcher GJ, Burman C, Brewster L, Goitein M, Mohan R: Histogram reduction method for calculating complication probabilities for three-dimensional treatment planning evaluations. Int J Radiat Oncol Biol Phys 21 (1991) 137-146
- 143. Kvols LK: Radiation Sensitizers: A Selective Review of Molecules Targeting DNA and non-DNA Targets. J Nucl Med 46 (2005) 187-190
- 144. Lambeck S: Anwendung von Dosis- Wirkungs- Modellen zur Minimierung von Nebenwirkungen bei der Radiotherapie am Beispiel der Parotis. Halle, Univ, Diplomarb, 2006
- 145. Larsson NG & Luft R: Revolution in mitochondrial medicine. FEBS Lett 455 (1999) 199-202
- 146. Laterveer FD, Nicolay K, Gellerich FN: ADP delivery from adenylate kinase in the mitochondrial intermembrane space to oxidative phosphorylation increases in the presence of macromolecules. FEBS Lett 386 (1996) 255-259
- 147. Lavertu P, Adelstein DJ, Saxton JP, Secic M, Eliachar I, Strome M, Larto MA, Wood BG: Aggressive concurrent chemoradiotherapy for squamous cell head and neck cancer: an 8-year single-institution experience. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 125 (1999)142-148
- 148. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH: Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. Biochem J 348 (2000) 425-432
- 149. Lester RD, Jo M, Campana WM, Gonias SL: Erythropoietin promotes MCF-7 breast cancer cell migration by an ERK/mitogen activated protein kinase-dependent pathway and is primarily responsible for the increase in migration observed in hypoxia. J Biol Chem 280 (2005) 39273-39277

- 150. Letellier T, Malgat M, Coquet M, Moretto B, Parrot-Roulaud F, Mazat JP: Mitochondrial myopathy studies on permeabilized muscle fibers. Pediatr Res 32 (1992) 17-22
- 151. Li Y, Taylor JM, Ten Haken RK, Eisbruch A: The impact of dose on parotid salivary recovery in head and neck cancer patients treated with radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 67 (2007) 660-669
- 152. Lichtor T & Dohrmann GJ: Respiratory patterns in human brain tumors.

 Neurosurgery 19 (1986) 896-899
- 153. Ljungkvist AS, Bussink J, Rijken PF, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Denekamp J: Vascular architecture, hypoxia, and proliferation in first-generation xenografts of human head-and-neck squamous cell carcinomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 54 (2002) 215-228
- 154. Lyman JT & Wolbarst AB: Optimization of radiation therapy, IV: A dose-volume histogram reduction algorithm. Int J Radiat Oncol Biol Phys 17 (1989) 433-436
- 155. Machtay M, Aviles V, Kligerman MM, Treat J, Weinstein GS, Weber RS, Mirza N, Chalian AA, Rosenthal DI: A phase I trial of 96-hour paclitaxel infusion plus accelerated radiotherapy of unrespectable head and neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 44 (1999) 311-315
- 156. Maier H, De Vries N, Snow GB: Occupational factors in the aetiology of head and neck cancer. Clin Otolaryngol Allied Sci 16 (1991) 406-412
- 157. Maier H, Tisch M, Kyrberg H, Conradt C, Weidauer H: Occupational hazardous substance exposure and nutrition. Risk factors for mouth, pharyngeal and laryngeal carcinomas? HNO 50 (2002) 743-752
- 158. Marks JE: Mucosal protectants and their application for head and neck cancer chemoirradiation. Curr Opin Oncol 9 (1997) 267-273
- 159. Marmor MD, Kochupurakkal BS, Yarden Y: Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. Int J Radiat Oncol 58 (2004) 903-913

- 160. Marshall JR, Graham S, Haughey BP, Shedd D, O'Shea R, Brasure J, Wilkinson GS, West D: Smoking, alcohol dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. Eur J Cancer Oral Oncol 28 (1992) 9-15
- 161. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL: Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions J Biol Chem 276 (2001) 43407-43412
- 162. Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL: Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter containsfunctionally active response elements for the tumor suppressor p53. J Biol Chem 272 (1997) 22776-22780
- 163. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM: p53 regulates mitochondrial respiration. Science 312 (2006) 1650-1653
- 164. Mazat JP, Letellier T, Bedes F, Malgat M, Korzeniewski B, Jouaville LS, Morkuniene R: Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies. Mol Cell Biochem 174 (1997) 143-148
- 165. Meierhofer D, Mayr JA, Fink K, Schmeller N, Kofler B, Sperl W: Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism. Br J Cancer 94 (2006) 268-274
- 166. Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Hinerman RW, Mancuso AA: Parameters that predict local control after definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. Head Neck 25 (2003) 535-542
- 167. Mendenhall WM, Amdur RJ, Siemann DW, Parsons JT: Altered fractionation in definitive irradiation of squamous cell carcinoma of the head and neck. Curr Opin Oncol 12 (2000) 207-214
- 168. Merlano M, Benasso M, Corvo R, Rosso R, Vitale V, Blengio F, Numico G, Margarino G, Bonelli L, Santi L: Five-year update of a randomized trial of alternating radiotherapy and chemotherapy compared with radiotherapy alone in treatment of unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. J Natl Cancer Inst 88 (1996) 583-589

- 169. Merritt RM, Williams MF, James TH, Porubsky ES: Detection of cervical metastasis. A meta-analysis comparing computed tomography with physical examination. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 123 (1997) 149-152
- 170. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G: Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. Science 286 (1999) 774–779
- 171. MITOMAP Database Http://www.mitomap.org
- 172. Moore C: Cigarette smoking and cancer of the mouth, pharynx and larynx. A continuing study. JAMA 218 (1971) 553-558
- 173. Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, Scorrano L, Panoutsakopoulou V, Mannella CA, Korsmeyer SJ: A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c. Embo J 20 (2001) 661-671
- 174. Munck JN, Cvitkovic E, Piekarski JD, Benhamou E, Recondo G, Bachouchi M, Tellez-Bernal E, Luboinski B, Eschwege F, Wibault P: Computed tomographic density of metastatic lymph nodes as a treatment-related prognostic factor in advanced head and neck cancer. J Natl Cancer Inst 83 (1991) 569-575
- 175. Münter MW, Hoffner S, Hof H, Herfarth KK, Haberkorn U, Rudat V, Huber P, Debus J, Karger CP: Changes in salivary gland function after radiotherapy of head-and-neck tumors measured by quantitative pertechnetate scintigraphy: Comparison of intensity-modulated radiotherapy and conventional radiation therapy with and without Amifostine. Int J Radiat Oncol Biol Phys 67 (2007) 651-659
- 176. Münter MW, Karger CP, Hoffner SG, Hof H, Thilmann C, Rudat V, Nill S, Wannenmacher M, Debus J: Evaluation of salivary gland function after treatment of head-and-neck tumors with intensity-modulated radiotherapy by quantitative pertechnetate scintigraphy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 58 (2004) 175-184
- 177. MtDB-Human Mitochondrial Genome Database Http://www.genpat.uu.se/mtDB/mainframe.htm
- 178. Nagler RM: The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. Oral Dis 8 (2002) 141-146

- 179. Niemierko A: Reporting and analyzing dose distributions: a concept of equivalent uniform dose. Med Phys 24 (1997) 103-110
- 180. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J: Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. Radiother Oncol 77 (2005) 18-24
- 181. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, Caponigro F, Salomon DS: The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. Curr Drug Targets 6 (2005) 243-257
- 182. Ohta S: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. Oncogene 7 (2006) 4768-4776
- 183. Ono M & Kuwano M: Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. Clin Cancer Res 12 (2006) 7242-7251
- 184. Ozawa T: Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. J Bioenerg Biomembr 31 (1999) 377-390
- 185. Packer L & Golder RH: Correlation of structural and metabolic changes accompanying the addition of carbohydrates to Ehrlich ascites tumor cells. J Biol Chem 235 (1960) 1234-1240
- 186. Padhani AR, Krohn KA, Lewis JS, Alber M: Imaging oxygenation of human tumours. Eur Radiol 17 (2007) 861-872
- 187. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH: Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. Biochim Biophys Acta 1555 (2002) 14-20

- 188. Pejovic T, Ladner D, Intengan M, Zheng K, Fairchild T, Dillon D, Easley S, Dillon D, Marchetti D, Schwartz P, Lele S, Costa J, Odunsi K: Somatic D-loop mitochondrial DNA mutations are frequent in uterine serous carcinoma. Eur J Cancer 40 (2004) 2519-2524
- 189. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC: Mitochondrial DNA in human malignancy. Mutat Res 488 (2001) 119-133
- 190. Petersen C, Zips D, Krause M, Schone K, Eicheler W, Hoinkis C, Thames HD, Baumann M: Repopulation of FaDu human squamous cell carcinoma during fractionated radiotherapy correlates with reoxygenation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 51 (2001) 483-493
- 191. Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC: mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA 102 (2005) 719-724
- 192. Pfister DG, Su YB, Kraus DH, Wolden SL, Lis E, Aliff TB, Zahalsky AJ, Lake S, Needle MN, Shaha AR, Shah JP, Zelefsky MJ: Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm. J Clin Oncol 24 (2006) 1072-1078
- 193. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L: 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 (2000) 949-955
- 194. Plevova P: Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy- induced oral mucositis: a review. Oral Oncol 35 (1999) 453-470
- 195. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B: Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. Nat Genet 20 (1998) 291-293
- 196. Qu X: Mitochondrial function of otorhinolaryngological tumors. Hochschule Anhalt (FH), Bernburg, Dessau, Köthen, 2004

- 197. Quynh-Thu L & Giaccia AJ: Therapeutic Exploitation of the Physiological and Molecular Genetic Alterations in Head and Neck Cancer. Clinical Cancer Research 9 (2003) 4287-4295
- 198. Ray S & Ray M: Does excessive adenosine 5'-triphosphate formation in cells lead to malignancy? A hypothesis on cancer. Medical Hypotheses 48 (1997) 473-476
- 199. Richard SM, Bailliet G, Paez GL, Bianchi MS, Peltomaki P, Bianchi NO: Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. Cancer Res 60 (2000) 4231-4237
- 200. Rockwell S: Oxygen delivery: implications for the biology and therapy of solid tumors. Oncol Res 9 (1997) 383–390
- 201. Roesink JM, Moerland MA, Battermann JJ, Hordijk GJ, Terhaard CH: Quantitative dose-volume response analysis of changes in parotid gland function after radiotherapy in the head-and-neck region. Int J Radiat Oncol Biol Phys 51 (2001) 938-946
- 202. Rosson D & Keshgegian AA: Frequent mutations in the mitochondrial control region DNA in breast tissue. Cancer Lett 215 (2004) 89-94
- 203. Saarilahti K, Kouri M, Collan J, Hamalainen T, Atula T, Joensuu H, Tenhunen M: Intensity modulated radiotherapy for head and neck cancer: evidence for preserved salivary gland function. Radiother Oncol 74 (2005) 251-258
- 204. Sagowski C, Wenzel S, Tesche S, Jenicke L, Jaehne M: Investigation of radiosialadenitis during fractioned irradiation: sialoscintigraphical and histomorphological findings in rats. Eur Arch Otorhinolaryngol 260 (2003) 513-517
- 205. Sakata K, Someya M, Nagakura H, Nakata K, Oouchi A, Hareyama M, Satoh M: A clinical study of hypoxia using endogenous hypoxic markers and polarographic oxygen electrodes. Strahlenther Onkol 182 (2006) 511-517
- 206. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM: Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 93 (2002) 586-592

- 207. Sawyer DE & Van Houten B: Repair of DNA damage in mitochondria. Mutation Res 434 (1999) 161-176
- 208. Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE, Holtz J: Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. J Am Coll Cardiol 40 (2002) 2174-2181
- 209. Schmidt-Ullrich R. K., Contessa J. N., Dent P., Mikkelsen R. B., Valerie K., Reardon D. B., Bouwers G., Lin P. S: Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. Radiat Oncol Investig 7 (1999) 321-330
- 210. Schoeler S, Szibor R, Gellerich FN, Wartmann T, Mawrin C, Dietzmann K, Kirches E: Mitochondrial DNA deletions sensitize cells to apoptosis at low heteroplasmy levels. Biochem Biophys Res Commun 332 (2005) 43-49
- 211. Semrau R, Mueller RP, Stuetzer H, Staar S, Schroeder U, Guntinas-Lichius O, Kocher M, Eich HT, Dietz A, Flentje M, Rudat V, Volling P, Schroeder M, Eckel HE: Efficacy of intensified hyperfractionated and accelerated radiotherapy and concurrent chemotherapy with carboplatin and 5-fluorouracil: updated results of a randomized multicentric trial in advanced head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 64 (2006) 1308-1316
- 212. Seppet E, Gizatullina E, Trumbeckaite S, Zierz S, Striggow F, Gellerich FN: Mitochondrial medicine: the central role of energetic depression in cell pathophysiology. In: Saks VA (Hrsg): Molecular System Bioenergetics: Energy for life. Wiley-VCH, Weinheim, 2007 in press
- 213. Sheridan MT, O'Dwyer T, Seymour CB, Mothersill CE: Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. Radiat Oncol Investig 5 (1997) 180-186
- 214. Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, Alcalde RE, Matsumura T: Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. Cancer Lett 95 (1995) 79-83
- 215. Shoubridge EA: Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. Hum Mol Genet 10 (2001) 2277-2284

- 216. Simonnet H, Demont J, Pfeiffer K, Guenaneche L, Bouvier R, Brandt U, Schagger H, Godinot C: Mitochondrial complex I is deficient in renal oncocytomas. Carcinogenesis 24 (2003) 1461-1466
- 217. Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, Gallou C, Beroud C, Demont J, Bouvier R, Schagger H, Godinot C: Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. Carcinogenesis 23 (2002) 759-768
- 218. Singh KK: Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer.

 Ann N Y Acad Sci 1019 (2004) 260-264
- 219. Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH: Human papilloma virus and risk of oral cancer. Laryngoskope 108 (1998) 1098-1103
- 220. Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett MK, Stacker SA, McArthur GA, Cullinane C: EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor. Int J Radiat Oncol Biol Phys 55 (2003) 713-723
- 221. Sperl W, Skladal D, Gnaiger E, Wyss M, Mayr U, Hager J, Gellerich FN: High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. Mol Cell Biochem 174 (1997) 71-78
- 222. Staar S, Rudat V, Stuetzer H, Dietz A, Volling P, Schroeder M, Flentje M, Eckel HE, Mueller RP: Intensified hyperfractionated accelerated radiotherapy limits the additional benefit of simultaneous chemotherapy--results of multicentric randomized German trial in advanced head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 50 (2001) 1161-1171
- 223. Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Hansgen G, Dunst J, Wurschmidt F, Molls M: Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 44 (1999) 749-754
- 224. Summerhayes IC, Lampidis TJ, Bernal SD, Nadakavukaren JJ, Nadakavukaren KK, Shepherd EL, Chen LB: Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci 79 (1982) 5292-5296

- 225. Sweeney C, Carraway KL: Negative regulation of ErbB family receptor tyrosine kinases. Br J Cancer 90 (2004) 289-293
- 226. Swinson DE, O'Byrne KJ: Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 7 (2006) 250-256
- 227. Tamori A, Nishiguchi S, Nishikawa M, Kubo S, Koh N, Hirohashi K, Shiomi S, Inoue M: Correlation between clinical characteristics and mitochondrial D-loop DNA mutations in hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 39 (2004) 1063-1068
- 228. Tan MG, Ooi LL, Aw SE, Hui KM: Cloning and identification of hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein, a novel liver-specific uncoupling protein. J Biol Chem 279 (2004) 45235-45244
- 229. Tarnawski R, Widel M, Skladowski K: Tumor cell repopulation during conventional and accelerated radiotherapy in the in vitro megacolony culture. Int J Radiat Oncol Biol Phys 55 (2003) 1074-1081
- 230. Tarnawski R, Fowler J, Skladowski K, Swierniak A, Suwinski R, Maciejewski B, Wygoda A: How fast is repopulation of tumor cells during the treatment gap? Int J Radiat Oncol Biol Phys 54 (2002) 229-236
- 231. Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KS, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D: Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. Int J Radiat Biol Phys 82 (2006) 699-757
- 232. Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A, Chinnery PF, Samuels DC, Taylor GA, Plusa SM, Needham SJ, Greaves LC, Kirkwood TB, Turnbull DM: Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. J Clin Invest 112 (2003) 1351-1360
- 233. Taylor RW, Taylor GA, Durham SE, Turnbull DM: The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. Nucleic Acids Res 29 (2001) 74-79

- 234. Teplova VV, Bogucka K, Czyz A, Evtodienko YV, Duszynski J, Wojtczak L: Effect of glucose and deoxyglucose on cytoplasmic [Ca2+] in Ehrlich ascites tumor cells. Biochem Biophys Res Commun 196 (1993) 1148-1154
- 235. Teraishi F, Kagawa S, Watanabe T, Tango Y, Kawashima T, Umeoka T, Nisizaki M, Tanaka N, Fujiwara T: ZD1839 (Gefitinib, 'Iressa'), an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, enhances the anti-cancer effects of TRAIL in human esophageal squamous cell carcinoma. FEBS Lett 579 (2005) 4069-4075
- 236. Thilmann C, Oelfke U, Huber P, Debus J. Intensitätsmodulierte Strahlenbehandlungneue Perspektiven für die Tumortherapie. Deutsch Ärztebl 48 (2006) 2843-2848
- 237. Thomlinson RH & Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br J Cancer 9 (1955) 539-549
- 238. Tisch M, Enderle G, Zoller J, Maier H: Mundhöhlenkrebs bei Maschinenarbeitern. Laryngo Rhino Otol 75 (1996) 759-763
- 239. Trumbeckaite S, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN: Calpain Inhibitor (BSF 409425)
 Diminishes Ischemia-Reperfusion- Induced Damage of Rabbit Heart Mitochondria.
 Biochem Pharmacol 65 (2003) 911-916
- 240. Trumbeckaite S, Opalka JR, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN: Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. Eur J Biochem 268 (2001) 1422-1429
- 241. Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, Kroemer G: AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. EMBO J 23 (2004) 4679-4689
- 242. Vaupel P: The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. Oncologist 9 (2004) 10-17
- 243. Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA: Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. Biochim Biophys Acta 892 (1987) 191-196

- 244. Vieira KL & Kroemer G: Pathophysiology of mitochondrial cell death control. Cell Mol Life Sci 56 (1999) 971-976
- 245. Vokes EE, Stenson K, Rosen FR, Kies MS, Rademaker AW, Witt ME, Brockstein BE, List MA, Fung BB, Portugal L, Mittal BB, Pelzer H, Weichselbaum RR, Haraf DJ: Weekly carboplatin and paclitaxel followed by concomitant paclitaxel, fluorouracil, and hydroxyurea chemoradiotherapy: curative and organ-preserving therapy for advanced head and neck cancer. J Clin Oncol 21 (2003) 320-326
- 246. Vokes EE, Haraf DJ, Stenson K, Stupp R, Malone D, Levin J, Weichselbaum RR: The role of paclitaxel in treatment of head and neck cancer. Semin Oncol 22 (1995) 8-12
- 247. Waldfahrer F, Maldea L, Altendorf- Hofmann A, Iro H: Evaluierung der neuen TNM- Stadieneinteilung für Kopf- Hals- Tumoren anhand von 3247 Patienten. HNO 47 (1999) 957-962
- 248. Wallace DC: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annu Rev Genet 39 (2005) 359-407
- 249. Warburg O: On the origin of cancer cells. Science 123 (1956a) 309-314
- 250. Warburg O: On respiratory impairment in cancer cells. Science 124 (1956b) 269-270
- 251. Warren CM & Landgraf R: Signalling through ErbB receptors: multiple layers of diverity and control. Cell Signalling 18 (2006) 923-933
- 252. Weissleder R: Molecular Imaging: Exploring the Next Frontier. Radiology 212 (1999) 609-614
- 253. Wendt TG, Abbasi-Senger N, Salz H, Pinquart I, Koscielny S, Przetak SM, Wiezorek T: 3D-conformal-intensity modulated radiotherapy with compensators for head and neck cancer: clinical results of normal tissue sparing. Radiat Oncol 21 (2006) 1-18
- 254. Wicke M, Gellerich FN, Greb N, von Lengerken G, Zierz S: Oxygraphische Untersuchungen der Mitochondrienfunktion. Verwendung permeabilisierter Fasern von Muskelbiopsien des Schweines. Fleischwirtschaft 2 (2003) 78-81

- 255. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH: TNM-Atlas, Illustrierter Leitfaden zur TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 5. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005
- 256. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, Clayman GL, Katz RL, Hung MC: Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 3 (1997) 3-9
- 257. Yang JH, Lee HC, Chung JG, Wei YH: Mitochondrial DNA mutations in light-associated skin tumors. Anticancer Res 24 (2004) 1753-1758
- 258. Zhu W, Qin W, Bradley P, Wessel A, Puckett CL, Sauter ER: Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid. Carcinogenesis 26 (2005) 145-152

8 Liste der Originalarbeiten zur kumulativen Habilitationsschrift

- 1. **Kuhnt T**, Pelz T, Qu X, Hänsgen G, Dunst J, Gellerich FN: Mitochondrial OXPHOS functions in R1H-rhabdomyosarcoma and skeletal muscles of the rat. Neurochem Res 32 (2007) 973-980
- 2. **Kuhnt T**: Phase-I/II- Studie zur hyperfraktioniert- akzelerierten Radiotherapie (HART) plus Cetuximab (CET) und Cisplatin (CIS) bei lokal fortgeschrittenen, inoperablen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Forum 21 (2006a) 32-33
- 3. **Kuhnt T**, Becker A, Bloching M, Schubert J, Klautke G, Fietkau R, Dunst J: Aggressive simultaneous radiochemotherapy with cisplatin and paclitaxel in combination with accelerated hyperfractionated radiotherapy in locally advanced head and neck tumors. Results of a phase II trial. Medical Oncol 23 (2006b) 325-334
- 4. **Kuhnt T,** Janich M, Götz U, Gerlach R, Chiricuta I, Hänsgen G: Etablierung einer 3D- Konformationstechnik zur Radiotherapie von Kopf-Hals-Tumoren unter Berücksichtigung der Parotisschonung. Strahlenther Onkol 182 (2006c) 325-330
- 5. Kuhnt T, Jirsak N, Müller AC, Pelz T, Gernhardt Ch, Schaller HG, Janich M, Gerlach R, Dunst J: Quantitative und qualitative Speicheldrüsenfunktions-untersuchungen in Abhängigkeit von Dosis und Volumen einer Radiotherapie zur Verringerung der Xerostomie bei Kopf-Hals-Tumoren. Strahlenther Onkol 181 (2005a) 20-28
- 6. **Kuhnt T**, Müller AC, Pelz T, Hänsgen G, Bloching M, Kösling S, Schubert J, Dunst J: Impact of tumor control and presence of visible necrosis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy or radiochemotherapy. J Cancer Res Clin Oncol 131 (2005b) 758-764

- 7. **Kuhnt T**, Becker A, Pigorsch S, Pelz T, Bloching M, Passmann M, Lotterer E, Hänsgen G, Dunst J: Aggressive simultaneous radiochemotherapy with cisplatin and paclitaxel in combination with accelerated hyperfractionated radiotherapy in locally advanced head and neck tumors. Results of a phase I-II trial. Strahlenther Onkol 179 (2003a) 673-681
- 8. **Kuhnt T**, Kegel T, Bloching M, Dunst J: Radio(chemo)therapie lokal fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome im Kopf- Hals- Bereich. Onkologe 9 (2003b) 771-782
- 9. Dunst J, Stadler P, Becker A, Lautenschlager C, Pelz T, Hänsgen G, Molls M, **Kuhnt T**: Tumor volume and tumor hypoxia in head and neck cancers. The amount of the hypoxic volume is important. Strahlenther Onkol 179 (2003) 521-526
- 10. **Kuhnt T**, Pelz T, Becker A, Gellerich FN, Hänsgen G, Zierz S, Dunst J: Mitochondriale Atmungsaktivitäten der Atmungskettenkomplexe I und II in menschlichen Plattenepithelkarzinomen und deren Abhängigkeit vom pO₂. In: Baumann M & Petersen C (Hrsg): Experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie, Bd. 11, Dresden, 2002, S.64-68

9 Thesen

- 1. Krebserkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches umfassen ätiologisch und histologisch sehr verschiedene bösartige Neubildungen der Lippe, Mundhöhle, Nasen- und Nasennebenhöhlen, des gesamten Pharynx und Larynx einschließlich der Tumoren der Speicheldrüsen. Das Mundhöhlen- und Rachenkarzinom ist in Deutschland mit einer altersstandardisierten Inzidenz von circa 17 / 100 000 Einwohner die siebthäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern, hingegen stehen diese Tumoren bei den Frauen mit der Inzidenz von circa 4 / 100 000 Einwohner im Jahre 2002 an fünfzehnter Stelle. Exogene Noxen, wie das Rauchen und hoher Alkoholkonsum, gelten als Hauptrisikofaktoren. Über 90% aller Karzinome im Kopf-Hals-Bereich sind histologisch Plattenepithelkarzinome.
- Die Strahlentherapie ist neben der Operation die wichtigste Therapieoption in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren und eine der effektivsten Methoden, Tumorzellen zu vernichten. Das therapeutische Vorgehen richtet sich nach der TNM-Klassifikation der UICC und den daraus abgeleiteten Stadien. Circa 60% der Tumoren in den Lokalisationen Mundhöhle, Oropharynx, Larynx und Hypopharynx werden in den UICC-Stadien III und IV A,B registriert. Die krankheitsfreien Überlebensraten nach 5 Jahren, vor allem ab UICC-Stadium IV A, liegen unter 32% und sind leider damit mehr als unbefriedigend.
- 3. Scheidet aus tumorbiologischen oder funktionellen Gründen eine kurative chirurgische Therapie bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren der UICC-Stadien III und IV A,B aus, gilt die definitive, simultane Radiochemotherapie als Behandlung der Wahl. Nur die simultane Gabe einer Chemotherapie zur fortgeschrittenen, nicht-resektablen Bestrahlung von lokal Plattenepithelist, karzinomen verglichen zu allen anderen Möglichkeiten Chemotherapieapplikation (neoadjuvant, adjuvant, sequenziell), mit einer deutlich besseren lokalen Kontrolle und einer signifikanten Erhöhung des Gesamtüberlebens verbunden. Trotz dieser Fortschritte in den letzten Jahren gelang es bisher für lokal fortgeschrittene, inoperable Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich weder für die Radio- noch für die simultane Radiochemotherapie einen allgemeingültigen Standard zu definieren.

- 4. Anhand neuer metaanalytischer Daten kann die simultane Gabe des Medikamentes Cisplatin, ein Medikament der 1. Zytostatikageneration, zu einer hyperfraktioniertakzelerierten Radiotherapie (HART) als gesicherte Therapieempfehlung für lokal fortgeschrittene, primär-inoperable Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches ausgesprochen werden.
- 5. Mit Verbesserung der lokoregionären Kontrolle durch effektive, simultane Radiochemotherapieregime, die ein längeres lokoregionäres, rezidivfreies Überleben ermöglichen, nimmt aber die Häufigkeit der Fernmetastasierung zu. Dieser systemischen Mikrometastasierung frühzeitig begegnen zu können, wurden neue Medikamentenkombinationen, z.B. Taxan-basierte Schemata mit hoher Dosierung als neoadjuvante Chemotherapie eingesetzt. Phase-III-Studien müssten folgen, um die Wertigkeit einer Taxan-basierten Induktion im Hinblick auf ein verbessertes Überleben durch Senkung der Fernmetastasen raten eindeutig belegen zu können.
- 6. Eine andere Option, die Therapiewirkung am Tumor zu verstärken, ist die Intensivierung der Radiatio durch radiosensibilisierende Substanzen. Für Patienten der inoperablen UICC-Stadien III und IV A,B konnte innerhalb einer eigenen Phase-I/II- Studie die dosisdichte Gabe von Cisplatin + Paclitaxel in simultaner Kombination mit einer hyperfraktioniert-akzelerierten Radiotherapie (HART) eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate auf 50% erbringen. Die Absenkung der Fernmetastasierungsrate auf 10%, die damit deutlich unter der bislang bestätigten Zahl von 25 30% liegt, trägt dazu bei. Die darüber aufgetretenen außerordentlich hohen Akuttoxizitäten an Mundschleimhaut und Knochenmark erlauben es aus heutiger Sicht nicht, diesen Weg der Therapieoptimierung weiter zu verfolgen.
- 7. Ein neuer, interessanter Ansatz für die Therapie maligner Tumoren bringt die Blockade der EGFR-Signalübertragungswege. Der Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Tumorzelloberfläche, im Besonderen die der erbB1-4-Gruppe auch bei Kopf-Hals-Tumoren, wird eine prognostische Wertigkeit zugeschrieben. Aus präklinischen Untersuchungen ist bekannt, dass die gesteigerte EGFR-Expression eine der bedeutendsten Indikatoren für eine Radioresistenz maligner transformierter Zellen in vitro als auch in vivo ist. Durch die Blockade von erbB- Rezeptoren kann in Tumorzellen eine derartige Radioresistenz überwunden werden. Eine Reihe von Hemmern aus zwei bisher bekannten

Kategorien, zum einen monoklonale erbB-Rezeptor-Antikörper (mAK) und zum anderen mehr oder weniger rezeptorspezifische, kleinmolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), haben ihre Wirksamkeit bereits in der klinischen Behandlung einiger menschlicher Karzinome gezeigt.

- 8. Die meiste klinische Erfahrung im molekularen Targeting besteht bisher mit dem rekombinanten, chimären, monoklonalen Antikörper C225 (Cetuximab, Erbitux®). Die Verträglichkeit dieses Antikörpers ist außerordentlich gut. Ein Synergismus der Wirkungen kann durch die Kombination von Strahlentherapie, Chemotherapie und eines EGFR-Blockers angenommen werden. Die ersten eigenen Ergebnisse der multizentrischen Phase-I/II-Studie einer hyperfraktioniert- akzelerierten Radiotherapie kombiniert mit niedrig-dosiertem Cisplatin und Cetuximab konnte bisher die gute Verträglichkeit der Behandlung bestätigen. Die Ergebnisse des Tumoransprechens werden Mitte 2007 erwartet.
- 9. Radiogene Spätfolgen der Normalgewebe bleiben ein großes Problem der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich und tragen in erheblichem Maße zu einer immer noch schlechten Akzeptanz der Therapie bei, obwohl die Risiken einer Bestrahlungsbehandlung vergleichsweise modernen gering und schwere Komplikationen selten geworden sind. Dennoch gibt es langfristige, den Patienten meist sehr belastende Nebenwirkungen, wie die quälende Mundtrockenheit (Xerostomie), die als Resultat der Hyposalivation infolge des radiogenen Speicheldrüsenfunktionsausfalles entsteht. So konzentrieren sich Hauptbemühungen speziell auf die Speicheldrüsenschonung der Glandulae parotideae, die, im Gegensatz zu den anderen großen Kopfspeicheldrüsen, zumeist nicht Teil des Zielvolumens sind und somit potentiell geschützt werden könnten.
- 10. Eine neue 3D-Radiotherapietechnik wurde entwickelt, die eine komplexe Stehfeldmit einer Pendelbestrahlung kombiniert und somit in der Lage ist, eine inhomogene Dosisverteilung in der ipsilateralen Parotis zu erzeugen und eine konsequente Schonung der kontralateralen Drüse zuzulassen. Diese Technik kann deutschlandweit, flächendeckend in der Routinebehandlung von Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt werden.
- 11. Das einzige objektive Verfahren zum Nachweis einer Xerostomie ist die sialometrische Bestimmung der Speichelfließrate. Zur Prüfung der Wertigkeit der

neu entwickelten 3D-konformalen Radiotherapie (3D-RT) mit Sicht auf die tatsächlich zu erhaltenden Speichelfließraten wurde sie der alten konventionellen Radiotherapietechnik (2D-RT) gegenübergestellt. Tendenziell lag die Speichelfließrate aller Patienten mit 3D-Konformationstechnik (3D-RT) über dem gesamten Beobachtungszeitraum höher als bei Patienten, die mit älterer, konventioneller Technik (2D-RT) therapiert wurden.

- 12. Mithilfe kontinuierlich über den Bestrahlungsverlauf quantitativ bestimmbarer Variablen (biologische Schadensparameter) kann aus deren Veränderung mit steigender Strahlendosis in einem Organ die Wahrscheinlichkeit der zukünftigen Schädigung vorausberechnet werden (Normalgewebekomplikationswahrscheinlichkeit NTCP). Für das Risikoorgan Parotis werden gegenwärtig in der Literatur inhomogene Werte für die Toleranzdosis mit 50% Schadenswahrscheinlichkeit (TD50) angegeben. Eine einfache und reproduzierbare Messmethode ist die Bestimmung der Salivation mittels Reizspeichelmessung. Die in unserem Patientengut mit dem "Mean dose"-Modell bestimmte TD50 wurde bei circa 37 Gy ermittelt. Mittlere D_{mean}-Dosen der Parotiden < 30 Gy verhindern einen funktionellen Schaden nach WHO-Klassifikation. Ein weitgehend irreparabler Schaden für die Parotis konnte für Werte > 40 Gy belegt werden.
- 13. Maligne Tumoren in vivo zeichnen sich durch ein als chaotisch bezeichnetes Gefäßnetz mit einer starken Inhomogenität der Durchblutung, der Sauerstoff- und Glukoseversorgung sowie des Säure-Basenhaushaltes aus. Für das Ansprechen der Tumoren auf eine Radiotherapie sind neben Histologie und Tumorvolumen auch sauerstoffabhängige Faktoren bedeutsam.
- 14. Der Tumorgewebeoxygenierungsstatus (pO₂) ist ein mittlerweile gesicherter, unabhängiger prognostischer Faktor für Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. Hypoxische Tumoren besitzen eine höhere Aggressivität im Wachstumsverhalten mit vermehrter Ausschüttung sauerstoffabhängiger Proteine (z.B. Hypoxieinduzierenden Faktor-1a, VEGF oder p53), was mit vermehrter genetischer Instabilität verbunden ist. Zudem ist eine hohe tumorale Hypoxie auch ein wichtiger prädiktiver Faktor, der nicht nur etwas über Tumorprogression und Metastasierung aussagt, sondern auch eine schlechtere lokale Kontrolle nach einer alleinigen perkutanen Strahlentherapie bedingt.

- 15. Über die letzten Jahre wurden große Anstrengungen unternommen, Methoden zu entwickeln, die den Oxygenierungsstatus eines Tumors zuverlässig bestimmen können. Zur Messung des Gewebe-pO₂ wird die direkt-invasive Methode mit dem Eppendorf-pO₂-Histographen immer noch als "Goldstandard"-Methode betrachtet, obwohl diese Methode mit mehreren Nachteilen behaftet ist.
- 16. Insbesondere Kopf-Hals-Tumoren besitzen nekrotische Zonen, die als Hypodensitäten im kontrastmittelverstärkten CT identifiziert werden können. Experimentelle Daten konnten belegen, dass innerhalb und um hypoxische Tumorareale auch Nekrosen existieren. Die Nekrose ist vergesellschaftet mit einem sauren pH-Wert, einem hohen Laktatanteil aus der aeroben Glykolyse und zeigt das Vorhandensein defekter Tumormitochondrien an. In unserer Untersuchung war eine signifikante Verbindung zwischen der im CT sichtbar vorhandenen, spontanen Tumornekrose und höheren N-Stadien belegbar. Zudem korrelierte ein ansteigendes Tumorvolumen mit höheren hypoxischen Sub-und Nekrosevolumina.
- 17. Die intratumorale Nekrose ließ sich ebenso wie die hohe tumorale Hypoxie als ein ungünstiger prognostischer Faktor bei Patienten, die nur mit einer alleinigen Radiotherapie behandelt wurden, nachweisen. Sobald die Patienten einer intensiven radiochemotherapeutischen Kombinationsbehandlung unterzogen wurden, schied das intratumorale Nekrosevolumen als signifikanter Faktor für das krankheitsfreie Überleben aus. Somit erweist sich die intratumorale Nekrose zusätzlich als ein prädiktiver Faktor, der mit einer Kombinationsbehandlung positiv beeinflusst werden kann.
- 18. Seit langem ist die zentrale Rolle der Mitochondrien als Auslöser von Proliferation und Apoptose im Zellstoffwechsel bekannt. Die Kennzeichnung von Unterschieden hinsichtlich der mitochondrischen Eigenschaften in Tumoren und prämalignen Vorstufen zu Normalzellen und dem funktionellen Zusammenhang zwischen nDNA- und mtDNA-Integrität könnte ein weiterer Schritt im Verständnis des Tumormetabolismus bedeuten.
- 20. Die multiple Substrat-Inhibitor-Titration erbringt im Tumorgewebe zuverlässige Ergebnisse bezüglich der OXPHOS-Funktion. Im humanen Plattenepithelkarzinom aus dem Kopf-Hals-Bereich, in der dysplastischen Schleimhaut von Tumorpatienten sowie laut eigener Voruntersuchungen auch im R1H-

Rattenrhabdomyosarkom spezifische konnten Funktionsänderungen im Atmungskettenkomplex I mit einer Absenkung der SRPR unter 100% analysiert werden. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der Komplex-I-abhängigen Gewebehypoxie gefunden werden, Atmung zur was für eine mikromilieuunabhängige Schädigung der OXPHOS sprechen könnte. Zudem konnte eine Zunahme der glykolytischen Kapazität für die Plattenepithelkarzinome und in der Tumorpatienten-Mukosa konstatiert, nicht aber in der Mukosa von tumorfreien Patienten gemessen werden.

- 21. Eine Anti-Apoptoseneigung in Plattenepithelkarzinomen konnte aus der besonderen Dichtheit der mitochondrialen Außenmembran gegenüber ausströmendem Cytochrom c in Verbindung mit der Erhöhung der Leckatmung der mitochondrialen Innenmembran (Entkopplung) abgeleitet werden. Dies könnte eine Erklärung für den Ersatz der aeroben Atmung durch Glykolyse in malignen Tumoren bieten. Diese Umstellung könnte dann als Schutzmechanismus der Tumorzelle vor der mitochondrial-getriggerten Apoptose gelten, da die Glykolyse nicht in die Apoptosekaskaden eingreifen kann.
- 22. Die detektierten mtDNA-Veränderungen ließen sich alle als nicht-pathogene Polymorphismen ohne jegliche direkte Relevanz auf die Komplex-I-Defizienz identifizieren. Es gelang jedoch Polymorphismen zu identifizieren, die dem Haplotyp H2 der Menschen in Europa entsprechen. Bekannt ist eine Sukzeptabilität einiger Haplotypen für eine Krankheitsentstehung. Ob der H2-Subtyp besonders empfindlich gegenüber exogenen Noxen mit daraus verstärkt resultierender Krebsentstehung ist, kann anhand unseres geringen Stichprobenumfanges nicht geklärt werden.

10 Lebenslauf

Name: Dr. med. Thomas Kuhnt

Geb.: 08.07.1967 in Bad Frankenhausen

Eltern Dieter Kuhnt

Irmgard Kuhnt, geb. Engelke

Familienstand: ledig

Adresse: Kleine Ulrichstrasse 24

06108 Halle / Saale

Telefon: 0345- 1224852

e-mail: <u>thomas.kuhnt@medizin.uni-halle.de</u>

Schulischer und beruflicher Werdegang

| 1974- 1984 | Besuch der Polytechnischen Oberschule "Juri Gagarin" Bad Frankenhausen |
|------------|--|
| 1984- 1986 | Besuch der Erweiterten Oberschule "J. W. von Goethe" Rossleben |
| 1986- 1989 | Wehrdienst |
| 1989- 1995 | Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 1996- 2001 | Facharztausbildung an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg |
| 1998 | Erlangung des Grades Dr. med. |
| 2001 | Facharzt für Strahlentherapie |
| 2002 | Oberarzt an der Universitätsklinik für Strahlentherapie der Martin- Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| 2005 | Leiter der Abteilung Strahlentherapie im LZG der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg |

Dr. med. Thomas Kuhnt

Halle (Salle), den 26.05.2007

11 Erklärungen

| Habilitationsversuch unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universein Habilitationsverfahren im Gange ist. | |
|---|-------|
| Hiermit erkläre ich an Eides statt und wahrheitsgemäß, dass ich ganz allein und nur di der Arbeit gekennzeichneten Arbeitsmittel und Quellen verwendet habe. | ie in |
| | |
| | |
| Dr. med. Thomas Kuhnt | |
| Halle(Saale), den 26.05.2007 | |

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Dunst, ehemaliger Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für dessen Förderung meiner wissenschaftlichen und klinischen Arbeit und Ausbildung. Er hat den größten Anteil an der Umsetzung der Habilitationsschrift sowie an der Erstellung der dazu erforderlichen wissenschaftlichen Manuskripte. Zugleich verdanke ich ihm die Möglichkeit, meine wissenschaftlichen Ergebnisse in Form von Vorträgen und Postern auf einer Vielzahl von Kongressen vortragen zu können. Er hat mich in meiner medizinischen und menschlichen Entwicklung wesentlich geprägt. Herzlichen Dank dafür!

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Muskellabor der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erhoben. Hier gilt mein Dank vor allem Herrn PD Dr. rer. nat. Gellerich und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für ihre tatkräftige Unterstützung. Herzlich danken möchte ich den Ärztinnen Frau Tanja Pelz und Frau Xiaoying Qu für die Erhebung und die Auswertung der Daten. Zudem möchte ich Herrn PD Dr. med. Deschauer für die molekulargenetische Expertise Dank sagen.

Herrn Prof. Dr. med. habil. Hauptmann, Direktor des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, möchte ich für die hilfreiche Aufarbeitung und Bereitstellung der pathologischen Präparate und den konstruktiven wissenschaftlichen Dialog zu meiner Arbeit herzlich danken.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. med. dent. habil. Schaller, Direktor der Klinik für Parodontologie und Zahnerhaltungsheilkunde der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die immerwährende konstruktive Zusammenarbeit sowie Herrn Dr. med. dent. Gernhard für die Planung der gemeinsamen Projekte und Anträge. Den beiden Doktoranden, Frau Nicole Jirsack und Herrn Jeremias Hey, danke ich für ihre fleißige Arbeit.

Nicht genug danken kann ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und da besonders der Komm. Direktorin Frau PD Dr. med. Hänsgen und den beiden Medizinphysikern Herrn Dr. rer. nat. Gerlach und Herrn Dr. rer. nat. Janich.