Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Wilfried Budach

Aktivität und Volatilität von Cytokinen bei Patienten mit Bauch-Becken- und Kopf-Hals-Tumoren unter Radiochemotherapie und bei Gesunden

Unterschiede in der immunonkologischen Signalgebung

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Simon Dörges

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Edwin Bölke

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hubert Schelzig

Den onkologischen Patienten der Station RA 01

Meiner Familie

Zusammenfassung

Die Studie untersucht bei Tumorentitäten im Bauch-Becken-Bereich und der Kopf-Hals-Region sowie bei Gesunden die drei Cytokine IL-6, TNF-α und IL-10. Sie können als Surrogatmarker einen Gradmesser für pro- und antiinflammatorische Aktivierungen des Immunsystems bei chronischen Krankheitsprozessen darstellen. Der Fokus liegt auf Divergenzen zwischen Patienten und Gesunden sowie innerhalb und zwischen beiden Patientengruppen im Verlauf einer Radiochemotherapie (RCT) unter Einbezug geschlechtsbezogener Unterschiede und lokoregionärer Besonderheiten wie des Darms und dessen Rolle bei chronischer Inflammation.

Insgesamt 99 Probanden nahmen an der Studie teil. Darunter waren 84 onkologisch erkrankte Patienten und 15 gesunde Probanden. Die 84 Patienten untergliederten sich in 40 Patienten mit Bauch-Becken- und 44 Patienten mit Kopf-Hals-Entitäten. Es wurden an insgesamt vier Zeitpunkten vor, während und nach einer simultanen Radiochemotherapie mit zwei Kursen Platinderivaten plus 5-FU jeweils Serum-Proben generiert, bei der gesunden Kohorte nur zu einem Zeitpunkt.

Die Spiegel von IL-6 und IL-10 sind in der Bauch-Becken- und von IL-10 in der Kopf-Hals-Gruppe gegenüber Gesunden signifikant erhöht ($p \leq 0{,}05$), bei TNF-α nicht. Zwischen beiden Entitäten gibt es weder vor, noch unter RCT signifikante Unterschiede, wenngleich Volatilität erkennbar ist. Geschlechtsspezifisch weisen IL-6 bei Frauen und TNF-α bei Männern aller Entitäten und bei Bauch-Becken-Tumoren später unter Therapie teils hoch und höchst signifikant gesteigerte Mittelwerte ($p \leq 0{,}001$; $p \leq 0{,}01$ und $p \leq 0{,}05$) auf. Bei IL-10 zeigen Frauen insgesamt und Frauen mit Bauch-Becken-Tumoren unter RCT Schwankungen über den Verlauf und zuweilen signifikante Differenzen gegenüber Männern ($p \leq 0{,}05$).

Die Untersuchung ergibt bei Patienten mit Bauch-Becken- und Kopf-Hals-Tumoren teilweise eine gesteigerte immunonkologische Aktivierung gegenüber Gesunden. Proentzündliche Cytokine wie IL-6 und TNF-α können, wenn chronisch erhöht, die Tumormikroumgebung positiv in ihren Wachstumstendenzen unterstützen. Der Einfluss der RCT über den Verlauf ist messbar und stellenweise auch von Signifikanz. Geschlechterspezifische Unterschiede zeigen sich bei IL-6 sowie vor allem bei TNF-α und IL-10, wo sich weitere Untersuchungen anbieten würden. Der Darm könnte ein mitbestimmender Faktor der chronischen Inflammation und diese betreffend ein ergänzender Therapieansatz sein.

Abstract

The aim of this study is to analyze the cytokines IL-6, TNF-α and IL-10 in patients with malignancies of the Abdomen-Basin- and the Head-Neck-Area and in healthy volunteers. The three mediators are valid parameters for detecting pro- and anti-inflammatory activities of the immune system in chronic diseases. The study focuses on differences between patients and healthy subjects as well as divergences in and between both patient cohorts during simultaneous radiochemotherapy (RCT). According to that, possible gender-specific disparities and features due to anatomical landmarks like the intestine and its role in chronic inflammation should be investigated.

A total count of 99 probands were part of the study. This includes 84 oncological patients whereof 40 had malignancies in the Abdomen-Basin- and 44 in the Head-Neck-Area. 15 out of 99 were healthy subjects. Blood samples were generated once in the group of healthy volunteers and up to four times before, during and after the patients undergoing simultaneous radiochemotherapy (RCT) with a platinum derivative plus 5-FU.

Levels of IL-6 and IL-10 are in Abdomen-Basin- and IL-10 in Head-Neck-Cancer significantly elevated in comparison to healthy subjects ($p \leq 0.05$), but not TNF-α. There are no significant divergences during RCT between both groups with malignancies however volatility is detectable. Gender-specific differences of patients exist in IL-6 for all woman and TNF-α for all men and men with Abdomen-Basin-Cancer with partly highly significant ($p \leq 0.001$; $p \leq 0.01$; $p \leq 0.05$) elevated levels later in course. IL-10 shows in all women and in women with Abdomen-Basin-Cancer initial and later in course fluctuations with partially significant ($p \leq 0.5$) higher levels in women.

In summary, patients with malignancies in the Abdomen-Basin- and Head-Neck-Area have partly a significantly increased immuno-oncological activity in contrast to healthy people. The proinflammatory IL-6 and TNF-α could influence the tumor microenvironment in a positive way and support tumor growth if they are chronically elevated. Effects of the RCT are measurable during course and show significance in parts. There are gender-related deviations in IL-6 and particularly in TNF-α and IL-10 and further need to investigate is reasonable. The intestine and its impact on inflammation could be a related factor either for therapeutic options.

Abkürzungsverzeichnis

ABS	Absorbtion
AOS	Arabino-Oligosaccharide
APC	Antigen-presenting cell
ATBS	2,2-Azinobis[3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonsäure]-Diammonium-Salz
Bax	Bcl-2-associated X Protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serum-Albumin
Car	Carboplatin
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CD	Cluster of Differentiation
Cis	Cisplatin
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
COX	Cyclooxygenase
CTx	Chemotherapie
DD	Death-Domains
DHA	Docosahexaensäure
DNA/DNS	Deoxyribonucleic acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EPA	Eicosapentaensäure
FADD	Fas-associated protein with death domain
FFS	Freie Fettsäuren
^{18}F-FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
FOS	Fruktooligosaccharide
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue
g	Gravitationsfeldstärke
g	Gramm
Gp 80	Glykoprotein-80
Gy	Gray (Energiedosis)
NW	Nebenwirkungen
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish peroxidase (dt.: Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
IFN-α	Interferon-alpha

IFN-β	Interferon-beta
IκBα	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
Il-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin 10
IL-17	Interleukin-17
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
JAK	Januskinase
KOF	Körperoberfläche
KRK	Kolorektales Karzinom
LOX	Lipoxygenase
LPB	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
m	Männlich
m²	Quadratmeter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD-2	Adapterprotein MD-2
MeV	Megaelektronenvolt
Min.	Minute
ml	Milliliter
MNR	Medizinisch-Neurologisch-Radiologische Klinik
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
NfκB	Nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Next-Generation-Sequencing
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PDGF	Plateled-Derived Growth Factor
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
pg	Pikogramm

RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RCT	Radiochemotherapie
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA/RNS	Ribonucleic acid (dt.: Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive Oxygene Species
RT	Radiotherapie; Raumtemperatur
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
RPM	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SCFA	Short-Chain Fatty Acid
SD	Standarddeviation (Standardabweichung)
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response Syndrom
SOCS	Supressor of cytokine cignaling
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
STD	Standard
TACE	TNF-α-converting-enzyme
TLR4	Toll-like Receptor 4
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
TMB	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha
TNFR	Tumor-necrosis-factor-receptor
TNFSF2	Tumor-necrosis-factor-ligand-superfamily-member 2
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w	Weiblich
WHO	World Health Organization
5-FU	5-Fluorouracil
5-HT	5-Hydroxytryptamin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ..... **I**

Abkürzungsverzeichnis ..... **III**

1 Einleitung **1**

1.1 Epidemiologie maligner Tumorerkrankungen 1

1.2 Bauch-Becken-Tumore 3

1.3 Kopf-Hals-Tumore 4

1.4 Immunogene Wechselwirkungen 5

1.5 Chemotherapie 6

1.5.1 Platinverbindungen 6

1.5.2 5-Fluorouracil (5-FU) 7

1.6 Radiotherapie 8

1.7 Cytokine 10

1.7.1 Interleukin-6 11

1.7.2 Tumornekrosefaktor-alpha 13

1.7.3 Interleukin-10 14

1.8 Störungen der Darmbarriere 16

1.9 Zielsetzung 18

2. Material und Methoden **19**

2.1 Patienten- und Probandenkollektiv 19

2.1.2 Patientenkollektiv 1: Bauch-Becken-Tumore 20

2.1.3 Patientenkollektiv 2: Kopf-Hals-Tumore 20

2.2 Chemotherapie 21

2.3 Radiotherapie 22

2.4 Einverständnis und Ethikvotum 22

2.5 Probengewinnung und -verarbeitung 23

2.5.1 Probengewinnung aus dem peripheren Blut 23

2.5.2 Probenanzahl und -verteilung 24

2.6 Quantifizierung per ELISA 24

2.6.1 Interleukin-6 26

2.6.3 Tumornekrosefaktor-alpha 28

2.6.2 Interleukin-10 29
2.6.4 Fehlerbetrachtung und Troubleshooting 31
2.7 Statistische Auswertung 31
3. Ergebnisse 33
3.1 Gruppenvergleich der Messwerte 33
3.1.1 Interleukin-6 33
3.1.2 Tumornekrosefaktor-alpha 38
3.1.3 Interleukin-10 42
3.2 Ergebnisse im Verlauf 46
3.2.1 Interleukin-6 46
3.2.2 Tumornekrosefaktor-alpha 49
3.2.3 Interleukin-10 52
3.3 Geschlechtsbezogene Unterschiede 55
3.4.1 Interleukin-6 55
3.4.2 Tumornekrosefaktor-alpha 59
3.4.2 Interleukin 10 63
4 Diskussion 67
4.1 Interleukin-6 67
4.2 Tumornekrosefaktor-alpha 72
4.3 Interleukin-10 76
4.4 Darm, Mikrobiom und Inflammation 80
4.5 Schlussfolgerungen 83
5 Ausblick 84
Literaturverzeichnis 86
Abbildungsverzeichnis 93
Tabellenverzeichnis 96

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie maligner Tumorerkrankungen

Krebserkrankungen stellen ein globales Gesundheitsproblem von stetig zunehmender Bedeutung dar. Weltweit nimmt die Inzidenz an bösartigen Tumorerkrankungen seit Jahren zu und gemäß Prognosen der WHO soll die Zahl der neu dokumentierten Erkrankungsfälle im Jahr 2030 bis auf 21,6 Millionen gegenüber 14 Mio. in 2012 ansteigen (Forman, et al., 2014).

Der Anstieg ist zum einen Ausdruck einer steigenden Lebenserwartung, da maligne Erkrankungen vor allem mit fortschreitendem Alter auftreten. Zum anderen sind die Globalisierung und der Zugang größerer Bevölkerungsgruppen aus Schwellen- und Entwicklungsländern zu neuen Ressourcen und damit einhergehend ungünstigen Lebensstilfaktoren weitere Aspekte. Gleichwohl zeigt die Krebssterblichkeit erfreulicherweise seit den 1990er Jahren einen kontinuierlichen Rückgang, was zweifelsfrei den Entwicklungen in der modernen medizinischen Prävention, Diagnostik und Therapie zuzurechnen ist.

In den westlichen Industrienationen und Japan sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache. In der Bundesrepublik Deutschland belegen onkologische Erkrankungen nach den Pathologien des Herz-Kreislaufsystems diesbezüglich ebenfalls den zweiten Rang (Forman, et al., 2014). Bei beiden Geschlechtern ist über die letzten Jahrzehnte ein kontinuierlicher Anstieg der neu diagnostizierten Krebsfälle zu verzeichnen, der allerdings in den letzten zehn Jahren seit 2008 kurzzeitig zum Stillstand gekommen und sogar leicht rückläufig war. So lag bei den weiblichen Patienten im Jahr 2014 die Inzidenz bei 226.960 neu diagnostizierten Gesamtfällen, was altersstandardisiert 344,3 Fälle pro 100.000 Einwohner bedeutet. Bei den Männern liegen die entsprechenden Daten bei 249.160 malignen Neuerkrankungen im Jahr 2014. Dies entspricht altersstandardisiert 420,9 Fällen auf 100.000 Einwohnern. Für das Jahr 2018 sieht die Prognose eine weitere Zunahme der Inzidenz auf 234.300 Fälle bei Frauen und 259.300 Fälle bei Männern (Robert-Koch-Institut, 2017). Da Krebserkrankungen bei beiden Geschlechtern eine lineare Zunahme mit fortschreitendem Lebensalter aufweisen, ist diese Zunahme dabei auch der steigenden Lebenserwartung geschuldet, welche mit jedem Lebensjahr auch einen Risikoanstieg bei der Entartung alternder Zellsysteme hervorbringt.

Die drei häufigsten Malignitäten in Deutschland waren bei Frauen mit Abstand das Mammakarzinom (30,5%) gefolgt von bösartigen Tumoren des Darms (12,3%) und der Lunge (8,5%).

Bei Männern sind es mit Abstand das Prostatakarzinom (23%), dann Tumore der Lunge (13,9%) und des Darms (13,3%) (Robert-Koch-Institut, 2017). Als Ursachen für das Mammakarzinom sind vor allem eine lang andauernde Einwirkung von Östrogenen bei einer frühen Menarche und späten Menopause zu sehen und eine damit korrelierende hohe Geburtenrate. Ferner weitere Einflussfaktoren wie Nikotinabusus vor allem durch Tabakrauch und genetische Dispositionen (Sun, et al., 2017). Bei den bösartigen Lungentumoren ist bei beiden Geschlechtern vor allem Tabakmissbrauch ursächlich. Daneben sind weitere inhalative Noxen und prädisponierende Lungenerkrankungen wie COPD, Asthma oder Asbestose zu nennen (Arasteh, et al., 2013). Neben familiären Prädispositionen stellen nutritive Faktoren auch beim Kolorektalen Karzinom (KRK) und ebenso bei Kopf-Hals-Tumoren einen wichtigen Aspekt der Krebsentstehung dar (Kiadaliri, et al., 2013).

Maligne Erkrankungen gehen häufig mit einer deutlichen Reduktion der Lebenserwartung einher: viele Patienten sterben vor dem Erreichen des 70. Lebensjahrs. Die altersstandardisierten Sterbefälle für alle Krebsentitäten lagen im Jahr 2014 bei Frauen bei 101.614 und 121.331 bei Männern. Erfreulicherweise ist in Deutschland analog der globalen Entwicklung im letzten Jahrzehnt ein deutlicher Rückgang der Krebstodesfälle zu verzeichnen, was die Fortschritte in der onkologischen Therapie wiederspiegelt. So ist gegenüber dem Jahr 2000 ein Rückgang von 17% bei Männern und 11% bei Frauen zu verzeichnen. Bei den Krebssterbefällen dominieren bei den weiblichen Entitäten die Brustdrüse (17,4%), Lunge (15,3%) sowie der Darm (11,7%) und bei den Männern Lunge (24,4%), Darm (11,2%) und Prostata (11,3%) (Robert-Koch-Institut, 2017). Gegenwärtig ist bei der aktuellen und sich abzeichnenden Bevölkerungsentwicklung mit einer urnenförmigen Alterspyramide nicht von einer Trendumkehr bei der Zunahme der Krebsinzidenzen auszugehen (Grobecker, et al., 2016). Im Gegenteil, wird auf Grund der demografischen Aspekte eine weitere Steigerung dieser über die kommenden Jahrzehnte das naheliegende Szenario sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden schwerpunktmäßig maligne Tumorentitäten des Bauch-Beckenraums sowie der Kopf- und Halsregion miteinander verglichen. Dabei inkludieren die Bauch-Becken-Tumore der vorliegenden Arbeit vor allem das Kolorektale, aber auch das Zervixkarzinom der Frau sowie in sehr geringer Gewichtung Entitäten von Magen, Pankreas und Harnblase. Bei den Kopf-Hals-Patienten finden sich entsprechend der Häufigkeitsverteilung insbesondere laryngotracheale Tumore sowie diejenigen der Mundhöhle und des Ösophagus.

Dabei machen die hier untersuchten Entitäten bei den weiblichen Patienten insgesamt 25,5%, bei den Männlichen 28,6% aller malignen Neuerkrankungen aus. Auf die untersuchten Kopf-Hals-Tumore entfallen hier rund 2% aller Krebsfälle bei den Frauen und 6,9% aller Krebsfälle bei den Männern. Bei den Bauch-Becken-Tumoren sind es 23,5% bei den Frauen und 21,7% bei den Männern (Robert-Koch-Institut, 2017).

1.2 Bauch-Becken-Tumore

Der Großteil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten hat eine kolorektale Tumorentität. Darmkrebserkrankungen haben, neben der familiären Genese, ihren Ursprung möglicherweise bedingt durch nutritive Faktoren. Hierzu zählen ein zu hoher Konsum von gepökeltem und verarbeitetem Fleisch mit der Zufuhr an Trimethylamine-N-oxid (TMAO) (Rong, et al., 2015) sowie eine zu geringe Zufuhr protektiv wirkender pflanzlicher Ballaststoffe aus Obst, Gemüse, Hülsenfrüchten und Vollkornprodukten (Aune, et al., 2011). Diese tragen unter anderen durch spezielle Kohlenhydratverbindungen wie Frukto-Oligo-Saccharide (FOS) oder Arabino-Oligosaccharide (AOS) zur Ernährung vieler positiv wirkender Bakterienstämme des intestinalen Mikrobioms bei und sind damit ein zentrales Element für dessen biologische Diversität und die Integrität einer gesunden und widerstandsfähigen Darmmukosa (Daïen, et al., 2017). Durch die zu geringe oder fehlende Zufuhr der für die Mikrobiota zugänglichen Kohlenhydrate resultiert ein Defizit an den für die Enterocyten und das intestinale Immunorgan, *Gut-Associated-Lymphatic-Tissue* (GALT), als Energieträger wichtigen, kurzkettigen freien Fettsäuren (FFS) oder *Short-Chain-Fatty-Acids* (SCFA), was in der Folge zur Dominanz von Gattungen wie *Bacteroidetes* und *Clostridium difficile* mit proinflammatorischen Eigenschaften führen kann (Singh, et al., 2017). Auch ein durch diese Ernährungsfaktoren begünstigter Mangel an natürlichen Folaten kann sich, je nach individuellen genetischen Voraussetzungen, begünstigend auf die Kanzerogenese auswirken (Hubner, et al., 2009).

Des Weiteren sind auch Nikotinkonsum und alkoholische Getränke durch proentzündliche, zytotoxische und mutagene Effekte des Ethanols auf Schleimhautgeweben weitere, auslösende Faktoren. Therapeutisch stellt die neoadjuvante Radiochemotherapie insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien einen der Goldstandards in der Behandlung kolorektaler Tumorentitäten dar (Sauer, et al., 2004).

Hauptursächlich für das Zervixkarzinom sind Virusinfektion mit Humanen Papillomaviren (HPV), vorwiegend mit deren *High-Risk*-Subtypen, wohingegen die *Low-Risk*-Varianten eher kosmetisch störende Genitalwarzen mit nur geringer Entartungstendenz auslösen. Zu den prominentesten Abkömmlingen der *High-Risk*-Fraktion zählen die Typen 16 und 18. Insgesamt sind ca. 17 *High-Risk*-Subtypen bekannt, von denen 14 bei Infektion eine Präkanzerose für das Zervixkarzinom darstellen (Burd, 2003; Naucler, et al., 2009).
Aus diesem Grund kommt der seit einigen Jahren für Mädchen und Jungen zur Verfügung stehenden *Vaccine* gegen HPV eine wichtige Bedeutung für die Prävention dieser Entität zu (D`Souza, et al., 2011).

1.3 Kopf-Hals-Tumore

Maligne Tumore des Kopf-Hals-Bereiches präsentieren sich üblicherweise als Plattenepithelkarzinome. Ursächlich sind primär umwelttoxikologische Faktoren wie inhalative Noxen aus Tabakrauch oder Alkoholika als topisch wirkendes Gift, die sich häufig durch Mischkonsum in der kanzerogenen Wirkung noch potenzieren (La Vecchia, et al., 2008). Ebenso zählen Virusinfektionen mit HPV, insbesondere jene durch sexuelle Kontakte im Rahmen oraler Sexualpraktiken übertragene *High-Risk*-Typen wie 16 und 18, zu den wichtigen potenziellen Präkanzerosen (Spencer, et al., 2016). Wie beim Zervixkarzinom hat die, zunehmend auch bei Jungen von den Gesetzlichen Krankenkassen (GKV) bezahlte, Impfung gegen HPV hier eine zentrale Stellung für die Vorbeugung (D`Souza, et al., 2011).

Der Konsum von alkoholhaltigen Getränken führt bereits in geringer Dosis zu einer Erhöhung des Risikos für Entartungen. Dies gilt insbesondere und mit steigender Inzidenz für hochprozentige Alkoholgetränke wie Schnaps und Branntwein, da die zytotoxischen Effekte des Ethanols dosisabhängig auf das Schleimhautgewebe einwirken (Kiadaliri, et al., 2013). Ferner fehlen diesen Getränken die in weniger hochprozentigen Getränken wie Bier oder Wein vorkommenden sekundären Pflanzenstoffe, die möglicherweise einen Teil der kanzerogenen Effekte des Alkohols vermindern können.

Als stellvertretend für solche Pflanzenstoffe mit einer potenziell antikanzerogenen Wirkung durch die vermuteten, antientzündlichen und erbgutschützenden Eigenschaften seien hier das Xanthohumol im Bier und das Resveratrol im Rotwein genannt (ZHAO, et al., 2016).

Sehr viele der genannten Krebs-Entitäten können heute adjuvant oder neoadjuvant auch in kurativer Intention mit einer simultanen Radiochemotherapie effektiv therapiert und in vielen Fällen sogar geheilt werden, wie u.a. Daten der EORTC (#22931) und RTOG (#9501) Studie belegen (Bernier, et al., 2005). Ferner ist die palliative Behandlung mit Verminderung der Tumorlast und Erhöhung der Lebensqualität eine weitere, wichtige Aufgabe der onkologischen Behandlungskonzepte.

1.4 Immunogene Wechselwirkungen

Sowohl die Grunderkrankung selbst, als auch die therapeutische Anwendung radioaktiver Strahlung oder chemotherapeutischer Medikamente bedeuten eine Extremsituation für den menschlichen Organismus, die mit laborchemisch messbaren Veränderungen einhergehen können. So spielen veränderte Abläufe der Immunaktivierung bei der Entstehung vieler onkologischer Entitäten eine Rolle, ebenso wie auch die therapeutischen Maßnahmen immunologische Prozesse teils gezielt, teils als Kollateraleffekt zu beeinflussen vermögen (Goldszmid, et al., 2014).

Die verschiedenen Immunzelltypen kommunizieren unter anderem über Mediatoren, Cytokine, um ihre Effektivität in der Bekämpfung von Krankheitserregern zu optimieren und auf das notwendige Maß an Aktivierung zu adaptieren (Murphy, et al. 2014; Löffler, et al., 2014). Auch bei zahlreichen nicht onkologischen Krankheitsbildern kommt es zu einer ausgeprägten Aktivierung immunologischer Kaskaden, die zu einer Störung der Homöostase und zu pathologischen Schäden von Zellverbänden im Körper führen können. Neben banalen viralen oder bakteriellen Infektionskrankheiten seien hier stellvertretend die autoimmunologischen Krankheitsbilder Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis genannt (Arastéh, et al., 2013; Böcker, et al., 2004). Beide Erkrankungen zeigen häufig eine typische Aktivitätssteigerung insbesondere von Interleukin-6 (Il-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) vermittelten, proentzündlichen Prozessen (Khaibullin, et al., 2017). Die Kenntnisse über diese Zusammenhänge werden therapeutisch in Form der großen Gruppe der Biologika genutzt.

Als prominente Vertreter seien das Infliximab als Komplexbildner mit TNF-α und das Etanercept als löslicher TNF-α-Rezeptor genannt, die beide die Konzentration von aktivem TNF-α reduzieren und somit proinflammatorische Entzündungsprozesse herunterregulieren können (Yoshizaki, K et.al., 1998).

1.5 Chemotherapie

Der Einsatz zytostatischer Substanzen stellt in der Krebsbehandlung den größten medikamentösen Therapieblock dar und ist neben der Radiotherapie und der operativen Sanierung eine der drei Hauptsäulen bei der Behandlung von onkologischen Erkrankungen (Hiddemann, et al., 2004). Auch bei der Therapie von chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen oder bei Infektionskrankheiten haben Chemotherapeutika einen zentralen Stellenwert (Karow, et al., 2011). Die zu den Chemotherapeutika zählenden Antibiotika sind mit einem Gesamtkonsum von 34,8 Mrd. definierter Tagesdosen (DDD) gar die weltweit am häufigsten eingesetzt Medikamentengruppe (Klein, et al., 2015).
Gemeinhin wird unter dem Begriff der Chemotherapie vor allem die Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen verstanden. Grundlage der Wirkung ist der Eingriff in und nach Möglichkeit die Zerstörung der zellulären Infrastruktur der entarteten Krebszelle. Allen Chemotherapeutika gemein ist deren Eingriff in verschiedene Phasen des mehrstufigen Zyklus (G1 – S – G2 – M – G0 – Phase) einer Zelle (Karow, et al., 2011). Gemäß ihrer Wirkung auf den Zyklus können sie in phasenspezifische und phasenunspezifische Zytostatika untergliedert werden, wobei Letztere während des gesamten Zyklus ihre Wirkung entfalten (Herdegen, et al., 2008). Im Zuge strahlentherapeutischer Therapiekonzepte stellt der Einsatz von Zytostatika zur Nutzung supra-additiver Effekte eine Augmentation der radiobiologischen Wirkung dar (Wannenmacher, et al., 2013).

1.5.1 Platinverbindungen

Eine große Anzahl von Patienten mit soliden Tumoren im Bauch-Becken-Bereich und der Kopf-Hals-Region wird sowohl bei kurativ motivierten als auch palliativen Konzepten mit einer platinbasierten Chemotherapie behandelt (Wannenmacher, et al., 2013). Platinderivate sind phasenunspezifische Therapeutika. Sie zählen zur Gruppe der Alkylanzien und werden bereits seit vielen Jahrzehnten im Rahmen der zytostatischen Therapie onkologischer Krankheiten mit Erfolg eingesetzt (Herdegen, et al., 2008).

Die Erfahrung mit diesen Substanzen ist entsprechend groß. Ihr Einsatz hat sich in Kombination mit einer Radiatio in vielen Studien bei Kopf-Hals- und Bauch-Becken-Tumoren als Vorteil bei der Prognose der Erkrankung herausgestellt (Wannenmacher, et al., 2013). Die Wirkung basiert auf der Vernetzung von DNA-Strängen, *crosslinks,* durch intrazellulär entstehende, hochreaktive Hydroxykomplexe im Cytosol und in den Mitochondrien, was konsekutiv durch Zusammenbruch der Energiehomöostase die Apoptose einzuleiten vermag (Herdegen, et al., 2008). Zumeist wird Cisplatin eingesetzt, beim Kolorektalen Karzinom auch Oxaliplatin oder, vor allem bei unzureichender Nierenfunktion, Carboplatin (Karow, et al., 2011).

Typische Nebenwirkungen von Platinverbindungen sind neben einer Depletion aller Blutzellreihen im Knochenmark sowie teils irreversibler Oto- und Neurotoxizität auch deren hohe Emetogenität. Es kommt zu einer massiven Stimulation enterochromaffiner Zellen im Gastrointestinaltrakt und konsekutiver Freisetzung von biogenen Aminen wie Serotonin (5-Hydroxytryptamin=5-HT). Insbesondere Serotonin als Neurotransmitter wirkt am Rezeptorsubtyp 5-HT3A in der Chemorezeptor-Triggerzone der *Area postrema* am Boden der Rautengrube dorsal des *Ncl. Tractus solitarii* stark emetogen (Schünke, et al., 2006). Aus diesem Grund wird vor Applikation der platinbasierten Chemotherapie eine Prophylaxe mit einem 5-HT3 Antagonisten aus der Setron-Gruppe (z.B. Granisetron) sowie einem Glukokortikosteroid wie Dexamethason vorgenommen (Karow, et al., 2011). Immunologisch vermag Cisplatin – auch in Verbindung mit Endotoxin – die Synthese von TNF-α in renalen Epithelzellen anzuregen, was vermutlich über einen Mechanismus der Stabilisierung von mRNA für TNF-α funktioniert und kausal die nephrotoxischen Effekte erklären kann (Ramesh, et al., 2006; Ramesh, et al., 2007).

1.5.2 5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU zählt zur Gruppe der Pyramidin-Antimetabolite und ist analog zu den Platinverbindungen ein bereits seit Jahrzehnten bewährtes Zytostatikum vor allem bei soliden Tumoren und im Rahmen (neo-)adjuvanter Therapieregime. Bei Kopf-Hals- und Bauch-Becken-Entitäten zeigen sich in Verbindung mit platinhaltigen Zubereitungen und Radiatio Überlebensvorteile für die Patienten (Bernier, et al., 2005; Sauer, et al., 2004).
5-FU zählt zu den fluoridierten Pyrimidinbasen mit Carbonylgruppe und ist eine heterocyclische organische Verbindung.

Auf Grund des am Kohlenstoffatom 5 positionierten Fluors wird die Bezeichnung 5-FU abgeleitet. Es wirkt einerseits blockierend auf die Thymidylat-Synthase und damit hemmend auf die DNA-Synthese. Über einen Basenaustausch bei der DNA und RNA-Synthese wird es ferner als falscher Baustein an Stelle von Cytosin und Thymin sowie Uracil eingebaut. Dies wiederum führt zu Kettenabbrüchen und Störung der Proteinbiosynthese. Zur Verstärkung dieser Effekte wird bei manchen Therapieregimen, so beim Kolorektalen Karzinom, mitunter Folinsäure (THF=Tetrahydrofolat) hinzugegeben (Herdegen, et al., 2008).

5-FU ist ein besonders effektiver *Radiosensitizer*, was seinen häufigen Einsatz in strahlentherapeutischen Therapieregimen begründet (Wannenmacher, et al., 2013) und führt vor allem bei sich schnell teilenden Zellen zu Störungen des Zellzyklus. Nebenwirkung sind neben Übelkeit und Erbrechen sowie einer dosisabhängigen Knochenmarktoxizität daher insbesondere Schleimhautdefekte in Form von schweren Mukositiden mit Stomatitis, Ösophagitis und Enteritis mit Diarrhoe als Ausdruck einer Störung der Integrität der Darmschleimhaut und -flora (Karow, et al., 2011). 5-FU vermag außerdem in Kombination mit weiteren Zytostatika einen Interleukin-6-getriggerten Verlust an qualitativer Magermasse in Mäusen auszulösen (Elsea, et al., 2015).

1.6 Radiotherapie

Die Strahlentherapie stellt, insbesondere bei soliden Tumoren, neben den Zytostatika und operativen Eingriffen eine der drei zentralen therapeutischen Säulen in der Onkologie dar. Neben der älteren Technik mit ^{60}CO Kobalt-Ionen kommen in modernen Linearbeschleunigern in der Regel Elektronen oder Photonen mit einer Energie von 4-23 Megaelektronenvolt (MeV) zum Einsatz (Wannenmacher, et al., 2013). Die ionisierende Strahlung führt, ähnlich den Zytostatika und mit ihnen teils synergistisch, innerhalb der maligne und gesunden Zellen zu so starken strukturellen Schäden, dass diese in den programmierten Zelltod übergehen (Böcker, et al., 2004). Der Haupteffekt der Strahlung basiert auf der intrazellulären Freisetzung von ionisierten Wassermolekülen, die als hoch reaktive freie Radikale (ROS-) durch ihre freien Elektronen vor allem DNA-Doppelstrangbrüche in Cytosol und Mitochondrien auslösen und die Zelle damit u.a. mittels Effektor-Caspasen in die Apoptose treiben.

Die Effekte der RT wirken synergistisch mit denen der Chemotherapie: strahlenbiologisch induzierte DNA-Schäden werden durch den kombinierten Einsatz von Zytostatika nicht effektiv repariert, da die Reparaturenzyme nicht effektiv arbeiten können (Wannenmacher, et al., 2013).

Zur Optimierung der Effekte im Rahmen der asynchron ablaufenden Zellzyklen der jeweiligen Krebszellen sowie zur Schonung der umliegenden gesunden Geweben wird die Bestrahlung bei vielen Regimen in viele kleine Einzeldosen zwischen 1,8-2,5Gy pro Tag bis zu einer kumulativen Gesamtdosis fraktioniert, die sogenannte Normofraktionierung. Diese hat sich als Optimum zwischen Therapieeffizienz einerseits und Schonung der umliegenden Geweben andererseits gezeigt. So liegt die tolerable kumulierte Gesamtdosis für das Duodenum bei ca. 40-50Gy, für das gesamte Rectum bei 50-60Gy, bei Eingrenzung auf 25% des Volumens auch bis zu 75Gy. Weitere Varianten der Fraktionierung sind Hypo- oder Hyperfraktionierung, die bei speziellen Fragestellungen zur Anwendung kommen (Mast, et al., 2009; Hübner, 2013)

Die ionisierende Strahlung wirkt, unabhängig der Quelle, dosis- und volumenabhängig erbgutschädigend, stört die normale Funktionalität von Zellverbänden (Wannenmacher, et al., 2013) und zeigt darüber hinaus Veränderungen der immunologischen Signalkaskaden mit veränderten Cytokinmustern (Lorimore, et al., 2003).

Typische Nebenwirkungen der Radiotherapie entfalten sich in Geweben mit hoher Teilungsrate wie Schleimhäuten. Daher sind insbesondere lokal-inflammatorische Prozesse im Mund-Rachenraum wie Mukositis, Stomatitis und als Langzeitfolge Xerostomie oder in der Bauch-Beckenregion Enteritiden mit Störungen der normalen Darmmukosa und nachfolgend Diarrhoen und Stoffwechselstörungen durch verminderte Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen unerwünschte Nebeneffekte der radiobiologischen Strahlung (Mast, et al., 2009). Umfassende supportive und komplementär-onkologische Maßnahmen wie spezielle Mundspüllösungen, gezielte Mikronährstoffgaben alternierend zur Strahlenchemotherapie und suffiziente Analgesie haben eine Linderung zum Ziel (Hübner, 2012).

1.7 Cytokine

Als Cytokine (auch Zytokine, dem Altgriechischen entstammend aus Zyto=Höhle und Kinos=Bewegung) wird eine Gruppe von funktionellen Peptiden mit Mediatoreigenschaften auf die Proliferation und die Differenzierung von unterschiedlichen Zelltypen bezeichnet. In der gegenwärtigen Literatur werden Cytokine in die vier Subgruppen der Wachstumsfaktoren, der Interleukine (IL), der Interferone (IFN) und der Chemokine (CK) untergliedert (Löffler, et al., 2014).

Cytokine können als pleiotrop wirkende Mediatoren in verschiedenen Gewebeaggregaten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Signalkaskaden steuern und stellen somit gute Bezugsgrößen für die Einschätzung der immunologischen Lage und deren Aktivierungszustand dar (Thomas, et al., 2005; Murphy, et al., 2014). So dient beispielweise das proinflammatorische Interleukin-6 als ein profunder Surrogatmarker für ein *SIRS* oder eine Sepsis, und vermag ebenso wie TNF-α eine erhöhte Entzündungsaktivität im Körper anzuzeigen (Thomas, et al., 2005). Das Interleukin-10 zählt, trotz der Bezeichnung als Interleukin, auf Grund seiner molekularen Struktur zu den Typ-3-Interferonen. Es ist den antiinflammatorischen, immunmodulierenden Cytokinen zuzurechnen und wirkt eher bremsend auf die Aktivität von Immunzellen und kann überschießenden, entzündlichen Prozessen entgegensteuern (Löffler, et al., 2014).

Diese drei Cytokine stehen beispielhaft für eine große Zahl an Mediatoren. Bekannt sind gegenwärtig etwa 50 verschiedene Cytokine, Tendenz steigend (Strienz, 2016). Interferone stellen dabei vorwiegend Botenstoffe zur Abwehr von viralen Pathogenen dar, die spezifische antivirale Signalwege in den Immunzellen auslösen. Bekannte Vertreter der Interferone sind das vorwiegend von T-Helferzellen der Gruppe1 (T_H-1-Zellen) produzierte Interferon-gamma (IFN-y), welches Makrophagen-stimulierende Effekte zeigt. Ebenso zählen auch das Interferon-α (IFN-α), das vorwiegend Natürliche Killerzellen (NK) aktiviert sowie Interferon-β (IFN-β) dazu. Dieses wird primär von virusinfiltrierten Fibroblasten ausgeschüttet und aktiviert ebenfalls vor allem Natürliche Killerzellen.

Interferone werden auch zur Therapie von (auto-)immunologischen Krankheiten wie den Virushepatitiden oder der Multiplen Sklerose eingesetzt, haben allerdings starke Nebenwirkungen, die sich klinisch analog zu den Symptomen einer starken Virusgrippe präsentieren können (Arastéh, et al., 2013).

Die nachstehende Tabelle 1 zeigt als Beispiel drei bekannte Cytokine, die für proinflammatorische als auch immunmodulatorische Prozesse stehen.

Tabelle 1 Übersicht und Zuordnung pro- und antiinflammatorischer Cytokine

Cytokin	**Interleukin-6**	**Tumornekrosefaktor-α**	**Interleukin-10**
Klasse	Interleukin	Interleukin	Typ 3 Interferon
Effekte	Proinflammatorisch Akutphase, Pyrogen	Proinflammatorisch Akutphase, Pyrogen	Antiinflammatorisch Regulatorisch

1.7.1 Interleukin-6

Interleukin-6 ist die Bezeichnung für den Hauptvertreter eine Subgruppe sehr ähnlicher Cytokine mit den gleichen Mechanismen der Signaltransduktion. Zusätzlich werden unter anderem IL-11, IL-27, Leukämie-Inhibierender-Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM) und Neuropoetin (NP) dazugerechnet (Löffler, et al., 2014). Die Codierung von Interleukin-6 erfolgt in humanen Zellen auf Chromosom 7 und dem zugehörigen Genlocus 21. Nach vorausgehender Triggerung wird von einem Präcursor-Protein das 184 Aminosäuren umfassende, aktive IL-6 abgespalten (Murphy, et al., 2014).

Das aktive IL-6 kann entweder über membranständige Rezeptoren auf Hepatozyten und Leukozyten oder über den löslichen Rezeptor sIL-6R als Komplex die Spaltung des membranständigen Glykoproteins gp130 in Zielzellen auslösen. Der Prozess über den löslichen Rezeptor wird als *trans-signalling* bezeichnet. Sowohl der membranständige IL-6 Rezeptor als auch die gp130 Untereinheit liegen als Dimere vor. Sobald der Rezeptor aktiviert wurde, kann über die Janus-Kinasen 1 und 2 (Jak 1, 2) der Jak/STAT Signalweg gestartet und nach Dimerisierung zweier phosphorylierter STAT-1/STAT-2 Moleküle im Zellkern die Transkription auf den Zielgenen initiiert werden.

Alternativ kann die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) mittels Jak-Ras-Raf1-MAPK Signalweg ausgelöst werden, über welche ebenfalls im Nucleus vor allem Gene für *Plateled-derived-Growth-Factor* (PDGF) transkribiert werden, der wiederrum eine Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum bewirken kann (Löffler, et al., 2014).

Weitere *Target*-Gene, die durch IL-6 aktiviert werden, codieren unter anderem für die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die über Arachidonsäure als Substrat Eicosanoide bildet sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche aus Arginin Stickstoffmonoxid (NO) generiert. Hierdurch werden die pro-entzündlichen Auswirkungen bis hin zum SIRS und eskaliert als Schock mit multiplem Organversagen erklärt (Löffler, et al., 2014; Murphy, et al., 2014). Das IL-6 fungiert hierbei an der Schnittstelle zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem, nachdem zunächst der Anstieg von Neutrophilen Granulozyten zu einer konkordanten Erhöhung des sIL-6R geführt hat, mediiert es in der Folge die Rekrutierung von CD3+ Lymphozyten.

Des Weiteren erhöht sich durch steigende IL-6- Konzentrationen die Differenzierung von Monozyten zu funktionsfähigen Makrophagen (Alberts, et al., 2017). In der neueren Literatur wird das IL-6 zudem mit einer beschleunigten Differenzierung von T-Helferzellen zu T_H-17 Zellen in Zusammenhang gebracht. T_H-17 Zellen sind pro-entzündlich und unter anderem bei bestimmten Formen der Multiplen Sklerose als die Demyelinisierung mitbestimmende Faktoren bekannt und gelten generell als stark entzündungsfördernd (Bettelli, et al., 2006).

IL-6 vermag außerdem in Hepatozyten die Proteinbiosynthese des C-reaktiven Proteins (CRP) als Akutphaseprotein auszulösen. Ferner kommt es zu Störungen des Eisenstoffwechsels, aus denen eine Anämie resultieren kann: durch Blockade des Eisentransporters Ferroportin-1 wird die Verfügbarkeit von freien Eisen-Ionen deutlich erschwert (Voulgari, et al., 1999). Überdies steigt bei einer systemischen Inflammation auch der Gehalt von IL-6 in der cerebrospinalen Flüssigkeit (Liquor). Das wiederrum kann auf neurochemischer Ebene durch Alteration des Monoaminstoffwechsels zu einer depressiven Stimmungslage führen, die bei Tumorpatienten ohnehin häufiger im Rahmen der Krankheitsbewältigung anzutreffen ist und diese dann weiter zu aggravieren vermag (Engler, et al., 2017).

Auf der anderen Seite darf nicht außer Acht gelassen werden, dass der IL-6- Signalweg nicht ausschließlich pro-, sondern im Rahmen muskulärer Aktivitäten auch für die Gesunderhaltung durch antiinflammatorische Prozesse eine Rolle zu spielen vermag (Scheller, et al., 2011).

So werden in Folge intensiver Muskelanstrengung durch Training kurzzeitig von der arbeitenden Skelettmuskulatur unter anderem größere Mengen IL-6 ausgeschüttet, das jedoch möglicherweise von seinen Effekten her grundsätzlich anders zu beurteilen ist als dasjenige IL-6 im Rahmen entzündlicher Prozesse (Pedersen, et al., 2001). Hier kommt es im Rahmen des Trainings zu kurzzeitigen Spitzenwerten im Serum, die Basalspiegel jedoch sind in den Ruhephasen außerhalb der Aktivität niedriger als bei Untrainierten (Fischer, 2006).

1.7.2 Tumornekrosefaktor-alpha

TNF-α zählt als proinflammatorisches Cytokin zur Subgruppe der Interleukine und besteht im Endprotein aus 157 Aminosäuren (Eck, et al., 1989). Als weitere Bezeichnungen für TNF-α ist in der Wissenschaft *tumor-necrosis-factor-ligand-superfamily-member 2 (TNFSF2)* gebräuchlich. Hier wird der Charakter als Teil einer verschiedene Moleküle umfassenden Cytokin-Familie deutlich (Murphy, et al., 2014; Löffler, et al., 2014).

Der tradierte Name Kachektin beschreibt präzise die klinischen Auswirkungen erhöhter Serumspiegel von TNF-α als Ausdruck von anhaltenden Entzündungsaktivitäten unterschiedlicher Genese. TNF-α bewirkt unter anderem als Pyrogen neben IL-1 und IL-6 in den hypothalamischen Kerngebieten der *Regio praeoptica* eine Sollwertverstellung der Körperkerntemperatur, was Fieberzustände auslösen kann (Murphy, et al., 2014).

TNF-α wird durch Kontakt mit Antigenpräsentierenden Zellen (APC) nach Endotoxineinwirkung von Monocyten und aktivierten Makrophagen sowie Neutrophilen Granulozyten sezerniert. So wird durch die Darmschleimhaut migriertes Lipopolysaccharid (LPS) an LPS-Bindungsprotein (LPS-BP) gebunden und aktiviert auf einer APC den membranständigen dimeren *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR-4), der in Kombination mit CD14 und Adapterprotein MD-2 über NF-κB auf genetischer Ebene die Synthese von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF-α und IL-6 zur Bekämpfung von als schädlich erkannten Mikroorganismen auslöst.

Die Wirkung von TNF-α erfolgt auf zellulärer Ebene vermittelt durch zwei membranständige Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Während TNFR2 membranfixiertes TNF-α binden und genmodulierende Effekte mittels NF-κB auslösen kann, ist TNFR1 ein Rezeptor mit Todesdomäne, *death-domains* (DD).

Dabei wird zunächst die membrangebundene Form von TNF-α durch das *TNF-α-converting-enzyme* (TACE) in eine lösliche Form umgewandelt (sTNF-α) und kann als solche den TNFR1 aktivieren. Über den DD-Rezeptor können nun einerseits, wie bei TNFR2, über eine Aktivierung von NF-κB ebenfalls *Target*-Gene aktiviert werden, die proinflammatorische Prozesse steuern. Alternativ kann über *Fas-Associating-Death- Domain-Containing-Protein* (FADD) und *Tumor-necrosis-factor-receptor-type-1-associated-death-domain-protein* (TRADD) über die DD des TNFR1 mittels Pro-Caspase 8 (FLICE) die Apoptose eingeleitet werden (Löffler, et al., 2014).

Insbesondere durch die Induktion von katabolen Stoffwechselkaskaden im Skelettmuskel hat TNF-α auch Einfluss auf die Kachexie bei Tumorpatienten (Tisdale et.al., 2008).
Es hat im *Nucleus arcuatus* eine anorektische Wirkung und vermindert damit eine hyper- oder zumindest isokalorische Nahrungszufuhr, was den Proteinkatabolismus weiter fördert (Ramos, et al., 2004). In Folge dessen kommt es zu einem *Circulus vitiosus* und die betroffenen Patienten verlieren kontinuierlich an Muskelmasse und Fettgewebe, da deren Metabolite und die Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol die Inappetenz und damit insuffiziente Kalorienaufnahme weiter begünstigen (Hübner, 2013).

1.7.3 Interleukin-10

Das zur Gruppe der Typ-3 Interferone zählende Interleukin-10 ist ein zentraler Marker für antientzündliche und immunmodulatorische Vorgänge und hat als solches teils gegenläufige Funktionen zu IL-6 und TNF-α. IL-10 umfasst 160 Aminosäuren und wird codiert auf Genlocus q31-32 des Chromosoms 1 (Yoon, et al., 2006). Nahezu alle bekannten immunologischen Zellpopulationen wie dendritische Zellen, NK, Makrophagen, Granulozyten und fast alle Subtypen der T-Zellen können IL-10 exprimieren (Roncarolo, et al., 2006).

Von besonderer Bedeutung sind insbesondere die Regelkreisläufe zwischen Makrophagen, T_H2-Zellen und $CD4^+$-$CD25^+$ Regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), letztere identifizierbar anhand des Transkriptionsfaktors *forkhead-box-protein-3* (FOXP3) (Fontenot, et al., 2003).

IL-10 ist notwendig, um jene durch proinflammatorische Cytokine wie IL-6 und TNF-α mit initiierte Entzündungsreaktion in einem moderaten Rahmen zu halten und ein Überschießen der Inflammation zu verhindern. So werden von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen neben den proentzündlichen Mediatoren zumeist auch Gene für antiinflammatorische Cytokine wie IL-10 im Zellkern transkribiert.

In der Folge kommt es durch IL-10-Einfluss zu einer Differenzierung von T-Vorläuferzellen zu T_{reg} und T_H2, die ihrerseits vor allem IL-10 synthetisieren. IL-10 löst nach Bindung an den IL-10 Rezeptor (IL-10R) zum einen die Hetero-Dimerisierung der Proteine p105/p50 aus, wodurch NF-κB an der korrekten Bindung am jeweiligen Promotor des Genlocus für pro-entzündliche Enzyme behindert wird (Driessler, et al., 2004; Löffler, et al., 2014) und ferner wird über den *suppressor-of-cytokine-signalling-3* (SOCS-3) NF-κB inhibiert (Hovsepian, et al., 2013).

IL-10 wirkt innerhalb der Zellen per Negativ Feedback hemmend auf die durch LPS, IL-6 und TNF-α über NF-κB induzierten Enzyme wie COX-2 und iNOS und hemmt somit die Synthese von Prostaglandinen, NO und anderen ROS^- wie Peroxynitrit. Folglich werden die Prostaglandin- und NO-vermittelte Hyperperfusion, die gesteigerte Membran-Permeabilität und Kerntemperaturerhöhung sowie der durch die freien Elektronen der ROS^- ausgelöste Schaden der betroffenen Gewebeagglomerate eingegrenzt. Bei Knock-Out-Mäusen mit fehlender Exprimierung von IL-10 oder IL-10R kommt es zu anhaltenden Fieberzuständen ohne Abfall der Kerntemperatur (Leon, et al., 1998).

Allerdings kann IL-10 situativ und dosisabhängig auch indirekt proinflammatorische Effekte haben und die T_H1-vermittelten Entzündungskaskaden anregen. Therapeutisch eingesetzt, kann IL-10 in hohen Dosen – iatrogen – in Kombination mit LPS eine stärkere T_H1 Reaktion auslösen, als LPS alleine und damit potenziell gegenteilig zu dem erwarteten Effekt die Immunantwort eher verstärken statt abschwächen (Lauw, et al., 2000).

1.8 Störungen der Darmbarriere

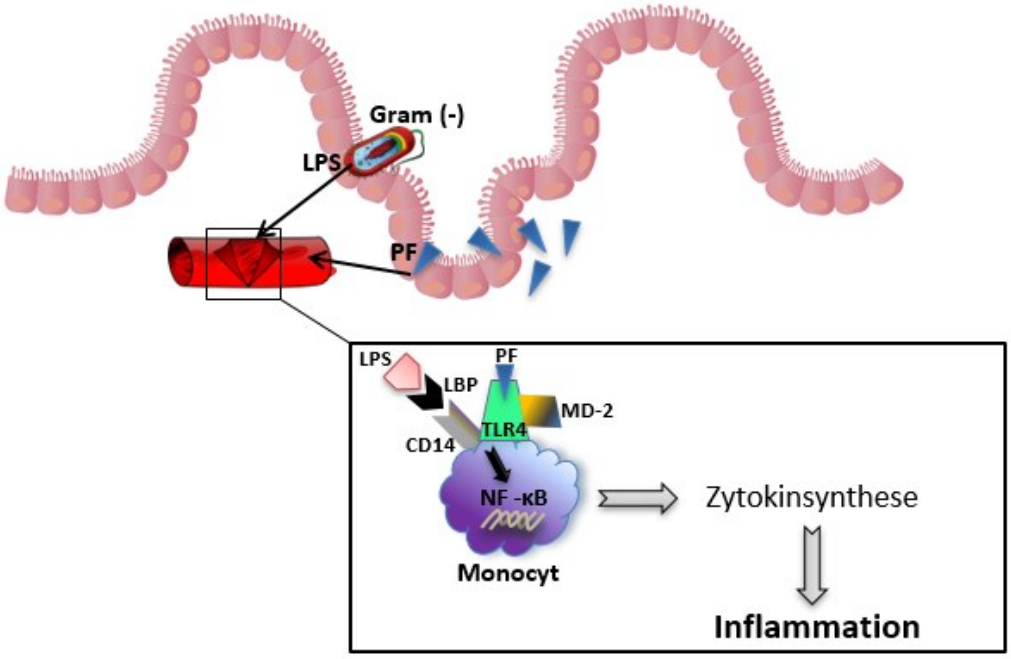
Die jeweiligen Tumorlokalisationen sowie entsprechend jene der Chemotherapie und der radiogenen Strahlung ausgesetzten Körperregionen lassen möglicherweise detektierbare Unterschiede in den Aktivitätsmustern von Serum-Cytokine zu. So liegt bei Patienten mit Tumoren in der Bauch-Becken-Region der Darm als immunologisch bedeutsames Organ im Bereich der radiobiologischen Wirkung (Schünke, et al., 2005). Bei Kopf-Hals-Tumoren finden sich oral ebenfalls lymphatische Agglomerate als erste Kontaktzone mit Mikroorganismen und Umweltnoxen (Schünke, et al., 2006).

Eine Affektion der intestinalen Schleimhautstrukturen und des ansässigen, enteralen Immunsystems durch zytostatische und radiogene Einwirkungen und in der Folge Veränderungen der mikrobiellen Flora und deren Diversität sowie erhöhte Durchlässigkeit für potenzielle Pathogene wirft die Frage nach einer veränderten, möglicherweise gesteigerten Aktivität des Immunsystems im Laufe der Behandlung auf (Hübner, 2013).

Allerdings bieten auch Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich durch die dort lokalisierten Immunorgane und als erste Barriere den Umstand für eine veränderte Aktivierung der inflammatorischen oder auch immunmodulatorischen Cytokine.

Andererseits vermag eine chronisch gesteigerte Entzündungsaktivität als *silent-inflammation* mitursächlich für die verschiedenen Formen der Malignitäten zu sein bzw. könnten erhöhte Cytokine für die Tumormikroumgebung nützliche Faktoren darstellen (Grivennikov, et al., 2010). Erhöhte Serum-Cytokinspiegel als Ausdruck einer gesteigerten Immunaktivierung scheinen zumindest beim KRK vorzuliegen, wie bisherige Studien vermuten lassen (Obeed, et al., 2014; Mager, et al., 2016).

Abbildung 1 zeigt das modellierte Schema einer durch verschiedene Trigger generierten, ungünstig veränderten Kolonisationsflora mit gestörter Integrität der Enterozyten und nachfolgend lokaler wie systemischer Entzündungskaskade durch verschiedene Mediatoren wie IL-6 und TNF-α. Lipopolysaccharide von der Oberfläche Gram (-) Stäbchenbakterien wie E. coli und Proteinfragmente von Nahrungsmitteln migrieren über die durchlässige Darmschleimhaut in das Blutserum. Konsekutiv erfolgt die Bindung an Monocyten, deren weitere Differenzierung und die Bildung von NF-κB als genregulatorischer Faktor sowie in der Folge die Produktion von Cytokinen und der Beginn einer inflammatorischen Kaskade.



© Simon Dörges

Abb. 1: **Darm-Mukosa mit veränderter Kolonisationsflora und gestörter Darmbarriere sowie immunologischer Aktivierung.** CD14 = Cluster-of-Differentiation 14;
Gram (-) = Gram (-)-Stäbchenbakterium; LBP = LPS-Bindungsprotein; LPS = Lipopolysaccharid; MD-2 = Adapterprotein MD-2; NF-κB = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; PF = Proteinfragment; TLR4 = Toll-like-receptor-4

1.9 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 99 Probanden untersucht, ob die drei stellvertretend für pro- und antiinflammatorische Prozesse stehenden Cytokine Interleukin-6, Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukin-10 bei Patienten mit verschiedenen Malignitäten und im Vergleich zu Gesunden in unterschiedlicher Menge im Blutserum zirkulieren. Dadurch soll erhoben werden, ob bei 84 Patienten mit unterschiedlich lokalisierten, soliden Malignitäten im Bauch-Becken und Kopf-Hals-Bereich bereits vor der Intervention durch eine Strahlen- und Chemotherapie erhöhte Serum-Cytokinspiegel als Ausdruck einer gesteigerten Immunaktivierung im Vergleich zu 15 als gesund geltenden Probanden vorliegen.

Des Weiteren wird der Frage nachgegangen, ob es durch die radiogenen und chemotherapeutischen Einflüsse zu einer messbaren Volatilität dieser Mediatoren innerhalb und zwischen den beiden Entitäts-Gruppen der Bauch-Becken- und Kopf-Hals-Tumoren kommt. Dabei wurden bei den beiden Patientengruppen neben dem Ausgangswert auch zu weiteren Zeitpunkten über mehrere Wochen unter simultaner Radiochemotherapie sowie am Ende der Therapie Proben generiert. Ferner wird auch eine nach Geschlechtern gegliederte Betrachtung der gemessenen Cytokine vorgenommen und diese mit Bezug auf mögliche immunonkologische Unterschiede zwischen Männern und Frauen diskutiert.

In der Folge könnte der Erkenntnisgewinn aus der vorliegenden Arbeit dem Einsatz spezifischer, protektiv wirkender Medikamente z.B. im Bereich der Darmtherapeutika zur Reduktion von inflammatorischen Prozessen lokal und systemisch dienen. So könnten möglicherweise im Vorfeld angewandte, immunmodulierende Substanzen oder die mikrobielle Flora unterstützende Präparate und Verhaltensweisen den Schweregrad einer Inflammation günstig beeinflussen. Auch eine grundsätzliche Herabregulierung der proinflammatorischen Kaskaden als potenziell onkogene Faktoren, respektive Rebalancierung der immunologischen Aktivität und damit präventivmedizinisch und komplementär-onkologische Strategien sollen nutzbringend diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten- und Probandenkollektiv

Allumfassend nahmen an der klinisch-prospektiven Studie 99 Personen teil. Darunter waren 84 Patientinnen und Patienten der onkologischen Station RA01 / MNR-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf mit verschiedenen Tumorentitäten unter simultaner Radio- und Chemotherapie. Ergänzt wurde das Kollektiv um 15 zufällig nach Alter und Geschlecht gepoolte, gesunde und zum Zeitpunkt der Probengewinnung nicht an einer onkologischen, entzündlich-rheumatologischen oder sonstigen autoimmunen Erkrankung leidenden Probandinnen und Probanden.

Von den 84 Patientinnen und Patienten waren 40 auf die Gruppe derjenigen mit Malignitäten im Bauch- und Beckengebiet sowie 44 auf entsprechende Entitäten in der Kopf- und Halsregion verteilt. Die Generierung der Proben erfolgte fortlaufend nach passendem Screening im Zeitraum von Frühjahr 2011 bis Sommer 2013 über eine Dauer von knapp zweieinhalb Jahren. Die Gesamtzahl der 99 Probanden lässt sich geschlechtsbezogen auf 58 männliche (58,5%) und 41 weibliche (41,4%) Teilnehmer aufschlüsseln. Von den 84 Patienten verteilten sich diese wiederrum auf 49 männliche (58,3%) und 35 weibliche (41,6%) Personen. Bei den 15 gesunden Probanden entfiel die Verteilung auf 9 des männlichen (60%) und 6 des weiblichen (40%) Geschlechts. Die Altersspanne reichte im gesamten Patientenkollektiv von 28 bis 79 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 60 Jahren. Bei den gesunden Probanden lag der Altersbereich von 23 bis 58 Jahren bei einem mittleren Alter von 34 Jahren. Hinsichtlich der statistischen Aussagekraft wurde von einer angemessenen Anzahl bezüglich des gesamten Kollektivs ausgegangen. Tabelle 2 gibt einen Überblick.

Tabelle 2 Übersicht über das Probandenkollektiv

	Anzahl N	Prozentuale Verteilung [%]
Patientenkollektiv	84	84,48%
- **Bauch-Becken-Tumore**	40	40,4%
- **Kopf-Hals-Tumore**	44	44,4%
Gesunde Kontrolle	15	15,15%
Gesamtkollektiv	99	100 %

2.1.2 Patientenkollektiv 1: Bauch-Becken-Tumore

Zum ersten Patientenkollektiv (Tabelle 3) zählen 40 Patienten mit soliden Tumoren im Bereich der Bauch-Becken-Region, hauptsächlich mit Kolorektalem Karzinom und Zervixkarzinom. Die meisten Patienten erhielten ein Konzept mit zwei Zyklen platinbasierter, intravenöser Chemotherapie mit Cis-, Oxali- oder Carboplatin und 5-Fluorouracil (5-FU) parallel zur konventionell fraktionierten Radiotherapie mit Einzelfraktionen von 5 x 1,8-2,0 bis zu einer kumulativer Gesamtdosis von 45-50.4 Gy. Die Chemotherapie wurde zumeist in zwei Zyklen an vier bis fünf Tagen zu Beginn und am Ende der Radiotherapie appliziert. In der Zeitspanne zwischen den Chemotherapie-Zyklen wurde die Bestrahlung fortgeführt.

Tabelle 3 Tumorentitäten der Patientengruppe 1 - Bauch-Becken

Lokalisierung	Anzahl N	Prozentuale Verteilung [%]
Kolorektal	27	65%
Zervix	7	17,5%
Magen	3	7,5%
Pankreas	2	5%
Harnblase	2	5%
Gesamt	40	100 %

2.1.3 Patientenkollektiv 2: Kopf- Hals-Tumore

Das zweite Patientenkollektiv umfasst 44 Patienten mit Tumoren der Kopf- und Halsregion und spiegelt mit einer Verteilung von 79,5% männlicher Teilnehmer auch nahezu die Verteilung dieser Tumore in der Gesamtbevölkerung wider (Tabelle 4). In dieser Gruppe wurden als multimodales Konzept mehrere Zyklen einer Chemotherapie auf Platinbasis und 5-FU parallel zur fraktionierten Radiotherapie intravenös zumeist an vier bis fünf Tagen parallel zur Radiotherapie appliziert. Die Strahlentherapie wurde hier ebenfalls in konventionell fraktionierten Einheiten mit 5 x 1,8-2,0 Gy bis kumulativ 50-70 Gy fortlaufend auch in der Zytostatika-freien Zeit durchgeführt.

Tabelle 4 Tumorentitäten der Patientengruppe 2 - Kopf-Hals

Lokalisierung	Anzahl N	Prozentuale Verteilung [%]
Naso-/Hypo-/Oropharynx	14	31,81%
Mundhöhle	14	31,81%
Ösophagus	11	25%
Larynx	4	9%
CUP - zervikaler LK	1	2,3%
Gesamt	44	100 %

2.2 Chemotherapie

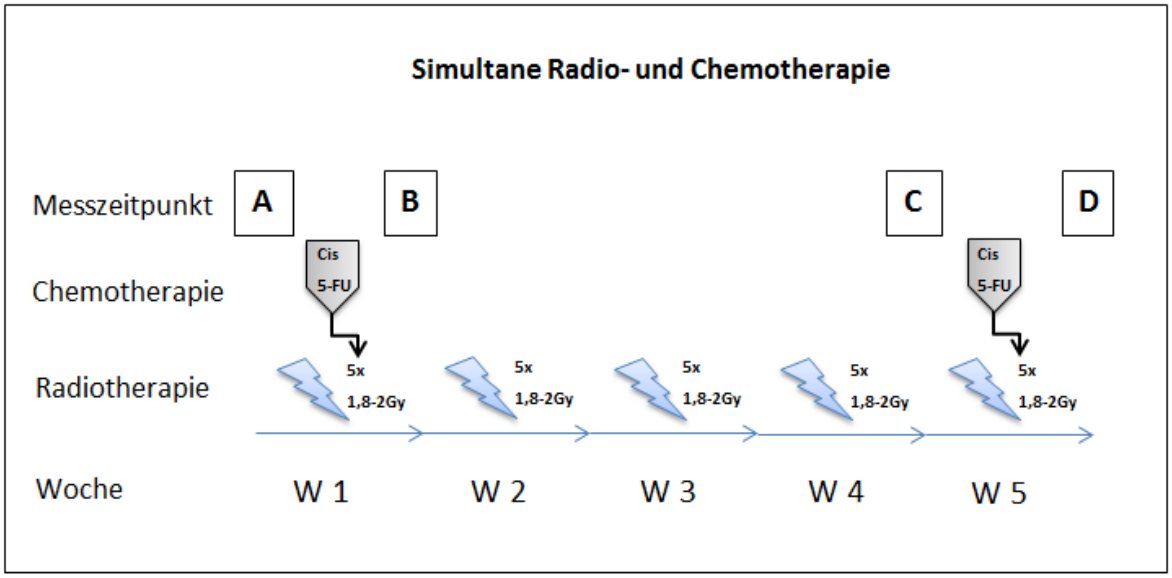
Im Rahmen der Prämedikation vor der zytostatischen Behandlung erhielten die Patienten üblicherweise eine ausreichende Prähydrierung mit 500-1000ml einer isotonen 0,9% NaCl-Lösung. Ferner wurden das H1-Antihistaminikum Clemastin als Kurzinfusion sowie zur antiemetischen Prophylaxe 2mg des 5-HT3-Antagonisten Granisetron, 8mg des Glucocorticoids Dexamethason und 40mg des Protonenpumpeninhibitors Pantoprazol jeweils per os verabreicht.

Im Anschluss bekamen die Patienten beider Gruppen für den supra-additiven Effekt auf die Bestrahlung eine intravenöse Therapie mit einer Körperoberflächen-adaptierten Dosis zumeist eines Platinsalzes an vier bis fünf Tagen der beiden Therapie-Zyklen. Cisplatin wurde mit einer Dosis von 20mg/m² KOF als Kurzinfusion gelöst in 250ml 0,9% Kochsalzlösung parallel mit 500ml des Osmodiuretikums Mannitol über 30 min. Laufzeit appliziert. Bei einer GFR von unter 60 ml/min. als Ausdruck einer eingeschränkten Nierenfunktion wurde Carboplatin mit 60mg/m² KOF eingesetzt.

Überdies wurde die zytostatische Behandlung beider Patientengruppen um die intravenöse Therapie mit 5-FU in Körperoberflächen-adaptierter Dosis von 600mg/m² KOF gelöst in 1000ml einer 0,9% NaCl-Lösung als Dauerinfusion innerhalb von 24-Stunden über fünf Tage á zwei Zyklen ergänzt.

2.3 Radiotherapie

Nach Anwendung einer Computertomografie zur exakten Definition der Bestrahlungsareale und entsprechender 3D-gestützter digitaler Berechnung der Bestrahlungspläne wurden diese für die jeweiligen Patienten fertiggestellt. Die Patienten der vorliegenden Arbeit erhielten typischerweise, wie beim Kolorektalen und Zervixkarzinom und den Kopf-Hals-Tumoren, eine konventionell fraktionierte Radiotherapie mit 1,8 bis 2.0Gy pro Tag bis zu einer kumulativen Gesamtdosis von 45-50.4Gy. Bei den Kopf-Hals-Tumoren wurden zumeist 1,8-2,0 Gy pro Einzelfraktion bis 50-70Gy Gesamtdosis je nach Konzept eingesetzt, teils in der IMRT-Technik und maskengestützt. Abbildung 2 zeigt eine Modelldarstellung des Studiendesigns der simultanen Radiochemotherapie und der Zeitpunkte der Probengewinnung.



© Simon Dörges

Abb. 2: Modell des Studiendesigns und der Messzeitpunkte vor, während und nach simultaner Radiochemotherapie. A-D=Messzeitpunkt; Cis=Cisplatin; 5-FU=5-Fluorouracil; Gy=Gray; W=Woche

2.4 Einverständnis und Ethikvotum

Alle Patientinnen und Patienten sowie die gesunden Probanden willigten schriftlich in die Durchführung der Probenentnahme und Nutzung der Ergebnisse für die medizinische Forschung ein. Das positive Ethikvotum der Heinrich-Heine-Universität für die Studie stammt vom 13. April 2011 und trägt die Studiennummer 2797 (Prof. Kröncke).

2.5 Probengewinnung und -verarbeitung

2.5.1 Probengewinnung aus dem peripheren Blut

Die Generierung der Proben erfolgte ausnahmelos unter sterilen Bedingungen über eine neue Butterflykanüle und nicht über etwaige bereits liegende Venenverweilkanülen in ein steriles BD Vacutainer® Serumröhrchen mit Geltrennkissen und 9ml Fassungsvolumen. Dieser Aspekt ist aus dem Grund von Relevanz, da liegende Venenverweilkanülen zu Ansammlungen von Immunzellen im Bereich des Stichkanals führen können und daher, bei fehlendem Verwerfen der ersten Blutproben, artifizielle Werte generieren können. Bei den Patientinnen und Patienten erfolgten insgesamt je bis zu vier Probenentnahmen vor, während und nach der simultanen Radio- und Chemotherapie im Rahmen der standardmäßigen Laborroutinen. Die erste Probe (A) wurde nativ im Rahmen der Routinelaborabnahme vor Beginn der strahlen- oder chemotherapeutischen Intervention gewonnen. Die zweite Probe (B) wurde am Ende des 1. Kurses der Chemotherapie abgenommen. Die dritte Probe (C) wurde bei Beginn eines zweiten Kurses der simultanen Chemotherapie erhoben und die vierte Probe (D) nach Abschluss des zweiten Chemotherapie-Blocks. Alsbald nach Entnahme der Probe wurde das Serumröhrchen unmittelbar nach Einsetzen des Gerinnungsprozesses unter labortechnischen Standardbedingungen bei 18-25°C Raumtemperatur über 15 Minuten bei mindestens 1.500g-2000g zentrifugiert. Die korrekte Einstellung der Parameter für die Zentrifugierung ist für ein optimales Abseren zur weiteren Analytik obligat. Hierzu wird die entsprechende Drehzahl der Zentrifuge mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Drehzahl [upm]} = \sqrt{\frac{g}{11{,}18 \cdot r[\text{cm}]}} \cdot 1000$$

Die hieraus abzuleitende Drehzahl zur optimalen Abserung liegt bei einem Radius von 10cm bei ca. 3700 U/min. Nach dem erfolgreichen Prozess des Zentrifugierens erfolgte umgehend die Kryokonservierung der Proben bei unter –20°C bis zum Zeitpunkt der weiteren Analytik per ELISA.

2.5.2 Probenanzahl und -verteilung

Insgesamt wurden im Rahmen der Studie 723 Messwerte aller drei Cytokine erhoben.
Die Verteilung der Stichprobenumfänge N über die jeweiligen Messzeitpunkte A-D ist auf Grund der dem onkologischen Patientenkollektiv inhärenten Häufigkeit von Therapieabbrüchen, -änderungen, Todesfällen oder anderen Ursachen nicht gleich.

So ergibt sich zunächst folgende Verteilung der Stichprobenumfänge über die drei Gruppen und den Verlauf der Messzeitpunkte wie in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Vorläufiger Stichprobenumfang je Messzeitpunkt

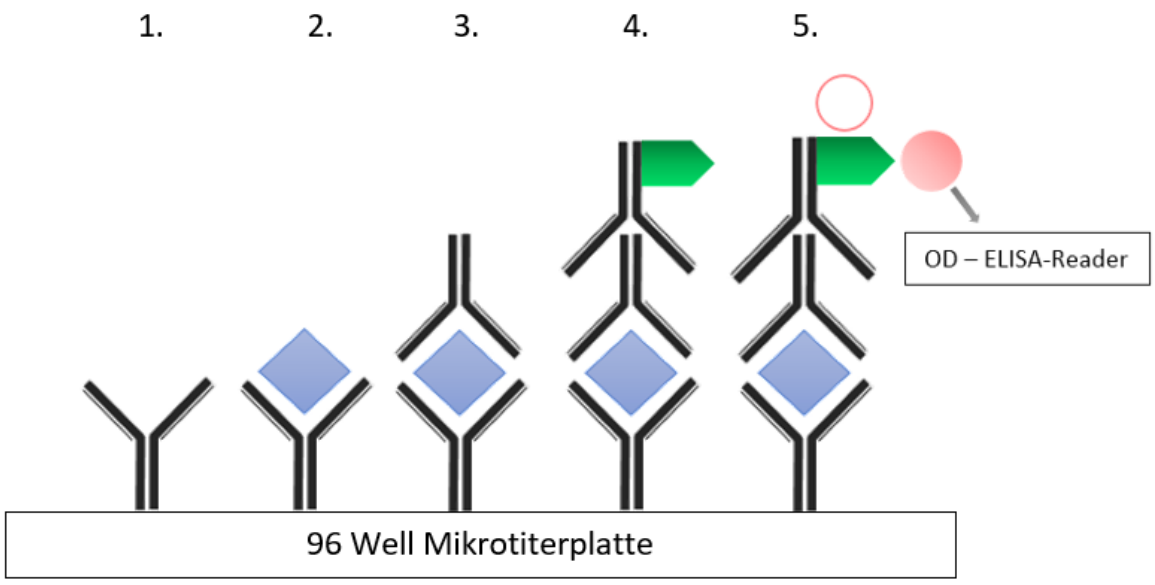
	A	B	C	D
Bauch-Becken	36	27	25	21
Kopf-Hals	37	33	25	22
Kontrolle	15	-	-	-

2.6 Quantifizierung per ELISA

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist ein biotechnologisches Verfahren auf Basis einer Antikörper-Antigen-Interaktion zur Bestimmung verschiedener Moleküle in Lösungen. Die in dieser Arbeit eingesetzten ELISA wurden allesamt im sogenannten Sandwich-Verfahren durchgeführt. Dabei wird zunächst der Boden einer mit 96 Kuhlen versehenen Mikrotiterplatte (*96-well-plate*) mit einem ersten Antikörper, dessen Paratop gegen ein Epitop des Analyten der Lösung binden kann, beimpft und über Nacht bei Raumtemperatur (RT, 20-25°C) stehen gelassen. Nach Zugabe der Proben-Seren mittels Pipette binden die Analyten an den ersten Antikörper.

Im nächsten Schritt wird nun abermals ein weiterer Antikörper mit anderem Paratop hinzugegeben, welcher ein weiteres Epitop des Analyten binden kann. Dieser zweite Antikörper ist kovalent an das Vitamin Biotin gebunden. Nun werden Meerrettich-Peroxidase, *Horseradish Peroxidase,* (HRP) und Avidin als Avidin-HRP Konjugat hinzugegeben und können den zweiten Antikörper auf Grund dessen Biotinylierung binden.

Durch die enzymatische Wirkung der Peroxidase entstehen entweder als Reaktionsprodukt 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin (TMB) oder 2,2-Azinobis[3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonsäure]-Diammonium Salz (ABTS), wodurch ein Farbwechsel der Proben (Chemilumineszenz) ausgelöst wird. Mittels eines speziellen Photometers, dem *ELISA-Reader*, kann nun die optische Dichte (OD) bzw. Absorption (ABS) der Proben bei verschiedenen Wellenlängen (typischerweise 405nm und 650nm) abgelesen und gegen eine Standardkurve ausgewertet werden. Die Quantifizierung der Parameter IL-6, IL-10 und TNF-α erfolgte in dieser Arbeit mittels verschiedener *ELISA-Kits* der Fa. Peprotech® (Princeton Business Park, Rocky Hill, NJ 08553 USA). Auf Grund der Unterschiede in der Prozessierung der jeweiligen Analyten erfolgt deren Beschreibung teils separat für die einzelnen Vorgänge. Die nachfolgende Abbildung 3 zeigt die stufenweise Durchführung eines ELISA-Tests im angewandten Sandwich-Verfahren.



© Simon Dörges

Abb. 3: Darstellung eines ELISA-Tests im Sandwich-Verfahren. 1. Zeigt eine 96-well Mikrotiterplatte mit gebundenem „*Capture*-Antikörper“. 2. Erfolgt die Zugabe der Probe des Analyten und dessen Bindung an den Antikörper. 3. Wird der „*Detection*-Antikörper“ hinzugefügt. 4. Wird der „*Enzym-linked* Antikörper“ ergänzt. 5. Abschließend wird ein Substrat hinzugefügt, welches durch das Enzym umgesetzt wird zu einem Produkt, dessen Farbumschlag per Optischer Dichte (OD/ABS) in einem ELISA-Reader detektierbar ist.

2.6.1 Interleukin-6

Zur Anwendung kam das *Human Il-6 Mini ABTS ELISA Development Kit 900-M16* der Fa. Peprotech® mit einer Detektionsbreite von 32-4000 pg/ml.

Die Bestandteile zur Analytik umfassten wie folgt:

- Mikrotiterplatte 96-well
- Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung ph 7,20 steril (PBS) - zur Verdünnung
- Polysorbat-20 als Waschlösungskonzentrat – 0,05% in PBS
- Bovines-Serum-Albumin (BSA) als Block – 1% gepuffert in PBS
- Anti-Humane IL-10 Antikörper aus der Ziege
- Biotinyliertes Anti-Humanes IL-10 aus der Ziege
- Rekombinantes Humanes IL-10
- ABTS Flüssigkeits-Substrat
- Avidin-HRP Konjugat

Hierbei wurde zunächst wie oben beschrieben eine Mikrotitrierplatte 96-well mit 1µg/ml in PBS gelösten polyklonalen Antikörpern gegen humanes Interleukin-6 benetzt und über Nacht geschlossen bei Raumtemperatur belassen. In der Folge wurde die Flüssigkeit von der Platte abpipettiert und diese mit 300µl Waschpuffer pro well insgesamt viermal gewaschen. Nun folgten die Zugabe von 300µl 1% BSA in PBS als Blockpuffer je well mit einer Inkubationszeit von einer Stunde bei RT und danach abermals ein vierfacher Waschgang der Platte.

Danach wurden 100µl Probenlösung pro well zugegeben und weitere zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach erneuter vierfacher Waschung erfolgte die Zugabe von 100 µl des biotinylierten Antikörpers mit einer Konzentration von 0,5µg/ml (500ng/ml) pro well und abermalige Inkubation für zwei Stunden bei RT.

Nach erneut vierfachem Waschgang wurde das Avidin-HRP-Konjugat im Verhältnis 1:2000 in der Verdünnungslösung mit 100µl pro well hinzugefügt und bei RT 30 min. inkubiert. Wieder erfolgte ein vierfacher Waschgang und schlussendlich die Zugabe von 100µl ABTS-Substrat pro well mit Inkubation bis zum Eintritt des Farbumschlags in Blau bei RT. Nun wurde noch eine Stopplösung hinzugefügt, die mit einem Farbumschlag von Blau zu Gelb das Ende der ablaufenden Chemilumineszenz markiert.

Mittels des Spektralphotometers *(ELISA-Reader)* wurde die Chemilumineszenz über die optische Dichte O.D. in 5min. Intervallen über 30 Minuten kontrolliert und bei 405nm Wellenlänge abgelesen, mit einer Korrekturablesung bei 650nm. Unter Einbezug der Softwarelösungen Excel von Microsoft® und Prism von GraphPad® wurden die entsprechenden Standardkurven kalibriert, um eine Transformation der mit dem Spektralphotometer gemessenen optischen Dichte in die jeweiligen Konzentrationen zu errechnen. Entsprechender Auszug einer Messung des Standards für IL-6 und nachfolgend logarithmische Erstellung der Standardkurve.

Tabelle 8 Standardkonzentrationen und OD einer Messung für IL-6

STD	STD	STD	conz	ABS
0,672	0,634		1,5	0,65300
0,443	0,537		0,75	0,49000
0,292	0,451	0,467	0,375	0,37950
0,217	0,34	0,332	0,1875	0,29633
0,221	0,323	0,296	0,09375	0,28000
0,202	0,295	0,298	0,046875	0,26500
0,219	0,316	0,313	0,0234375	0,28267
0,205	0,291	0,261	0,000001	0,25233

Tabelle 6: Standardkonzentrationen und OD einer Messung für IL-6.
STD=Standardlösung; conz=Konzentration; ABS(OD)=Absorption

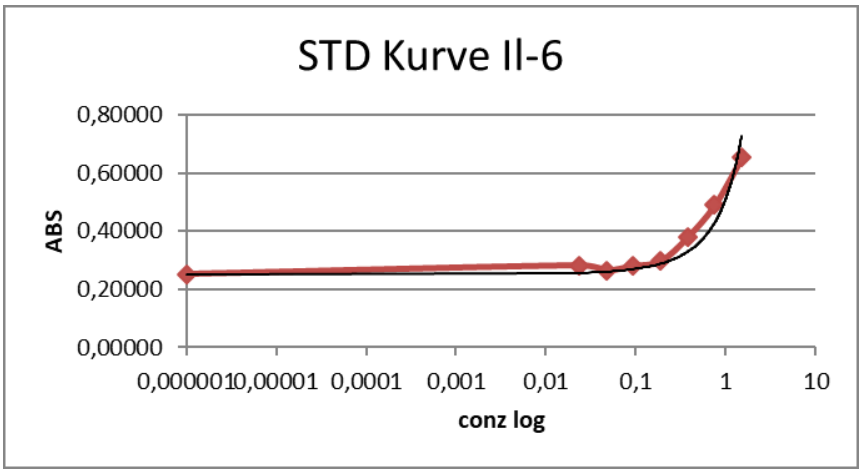


Abb. 4: Aus Standardkonzentration und OD/ABS logarithmisch errechnete Standardkurve einer Messung für IL-6. Dargestellt ist die Absorption aufgetragen gegenüber der Konzentration des Standards.

2.6.3 Tumornekrosefaktor-alpha

Zum Einsatz kam hier das *Human TNF-α Mini-ELISA Development Kit 900-M25* der Fa. Peprotech® mit einer Detektionsbreite von 16-2000 pg/ml.

Bestandteile des Analytik-Setups waren wie folgt:

- Mikrotiterplatte 96-well
- Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung ph 7,20 steril (PBS) - zur Verdünnung
- Polysorbat-20 als Waschlösungskonzentrat – 0,05% in PBS
- Bovines-Serum-Albumin (BSA) als Block – 1% gepuffert in PBS
- Anti-Humane IL-10 Antikörper aus dem Kaninchen
- Biotinyliertes Anti-Humanes Il-10 aus dem Kaninchen
- Rekombinantes Humanes IL-10
- ABTS Flüssigkeits-Substrat
- Avidin-HRP Konjugat

Abermals wurden die unter IL-6 beschriebenen Einzelschritte inklusive der angepassten Inkubationszeiten bei RT sequenziell durchgeführt. Der Farbumschlag der 96 wells zu Blau nach Zugabe der ATBS Lösung wurde photometrisch bei einer optischen Dichte von 405nm Wellenlänge sowie einer Korrektur bei 650nm nach Zugabe der Stopplösung detektiert. Analog erfolgte abermals die Kalibrierung des Standards. Tabelle 7 zeigt am Beispiel eines Kits die Konzentrationen der Standardlösung bei entsprechenden Absorptionswerten.

Tabelle 7 Standardkonzentration und OD einer Messung für TNF-α

STD	STD	STD	conz	ABS
1,236	1,156		3 ng/ml	1,236
0,811	0,84		1,5	0,8255
0,495	0,49	0,516	0,75 ng/ml	0,4925
0,282	0,289	0,296	0,375 ng/ml	0,2855
0,192	0,184	0,19	0,1875	0,18866667
0,114	0,122	0,129	0,09375	0,118
0,089	0,088	0,103	0,046875	0,0885
0,07	0,069	0,07	0 ng/ml	0,06966667

Tabelle 7: Standardkonzentrationen und OD einer Messung für TNF-α.
STD=Standardlösung; conz=Konzentration; ABS(OD)=Absorption.

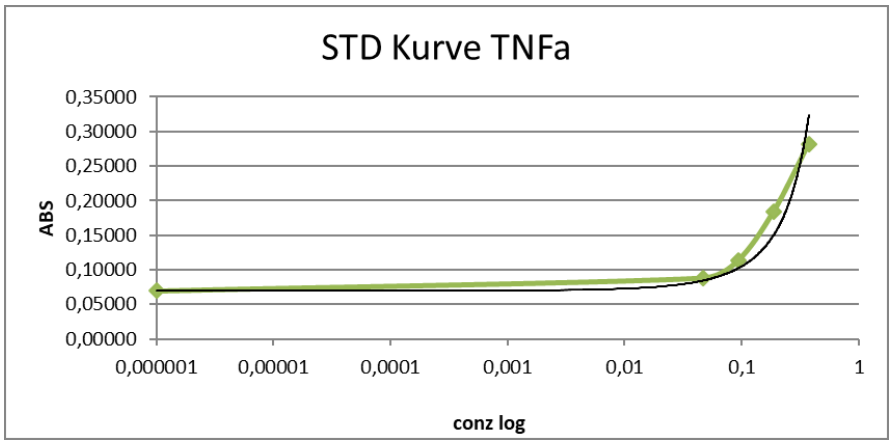


Abb. 5: Aus Standardkonzentration und OD/ABS erstellte Standardkurve einer Messung für TNF-α. Dargestellt ist die Absorption aufgetragen gegenüber der Konzentration des Standards.

2.6.2 Interleukin-10

Die IL-10 Analytik erfolgte mittels *Human IL-10 Mini ABTS ELISA Development Kit 900-M21* Fa. Peprotech® mit einer Detektionsbreite von 64-4000 pg/ml.

Die Bestandteile zur Analytik umfassten wie folgt:

- Mikrotiterplatte 96-well
- Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung ph 7,20 steril (PBS) - zur Verdünnung
- Polysorbat-20 als Waschlösungskonzentrat – 0,05% in PBS
- Bovines-Serum-Albumin (BSA) als Block – 1% gepuffert in PBS
- Anti-Humane IL-10 Antikörper aus dem Kaninchen
- Biotinyliertes Anti-Humanes IL-10 aus dem Kaninchen
- Rekombinantes Humanes IL-10
- ABTS Flüssigkeits-Substrat
- Avidin-HRP Konjugat

Darüberhinausgehend entsprach die Durchführung im Wesentlichen analog jener Schritte beim IL-6, weshalb auf eine gesonderte Beschreibung an dieser Stelle verzichtet wird.

Die Ablesung der Chemilumineszenz nach Farbumschlag mittels Spektralphotometer zur Ermittlung der optischen Dichte erfolgte abermalig in fünf Minuten Schritten über 30 min. bei 405nm Wellenlänge und zur Korrekturablesung bei 650nm. Nachfolgend die entsprechende Beispieltabelle (Tabelle 8) einer Messung des Kalibrators (Standard) und Erstellung der Standardkurve.

Tabelle 8: Standardkonzentration und OD einer Messung für IL-10

STD	STD	STD	conz	OD/ABS
0,535	0,569		2,5	0,552
0,188	0,339		1,25	0,2635
0,132	0,272	0,302	0,625	0,202
0,105	0,164	0,176	0,3125	0,1345
0,085	0,129	0,177	0,15625	0,107
0,084	0,1	0,106	0,078125	0,092
0,076	0,087	0,097	0,0390625	0,0815
0,071	0,078	0,079	0,000001	0,076

Tabelle 8: Standardkonzentrationen und OD einer Messung für IL-10.
STD=Standardlösung; conz=Konzentration; ABS(OD)=Absorption

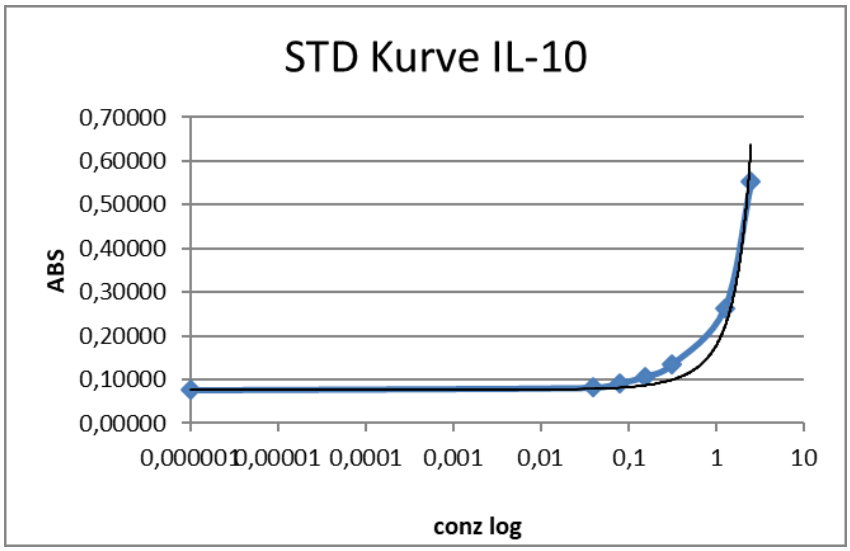


Abb. 6: Aus Standardkonzentration und OD/ABS erstellte Standardkurve einer Messung für IL-10. Dargestellt ist die Absorption aufgetragen gegenüber der Konzentration des Standards

2.6.4 Fehlerbetrachtung und Troubleshooting

Bei je einer ELISA-Platte einer Proben-Tranche von IL-10 und TNF-α kam es bei allen Proben zu unplausiblen Messwerten im hohen drei- bis vierstelligen Messbereich. Es war nicht mehr nachvollziehbar, wodurch diese Verzerrung generiert wurde, da bei beiden weiteren Proben-Fuhren und ELISA-Platten sowie bei allen drei Tranchen von IL-6 alle Werte stets in einem nachvollziehbaren Korridor lagen. Das Troubleshooting erbrachte keine exakte Klarheit, sodass vermutlich von einem Verdünnungsfehler bei einem der Zwischenschritte ausgegangen werden muss, wodurch sich der Faktor der Werte verändert hat. Bedauerlicherweise waren die Proben verworfen bzw. war nicht mehr ausreichendes Material für einen weiteren Durchlauf mit einer neuen Platte vorhanden, sodass die entsprechende Tranche für den Gesamt-Pool exkludiert werden musste. Der Stichprobenumfang ändert sich somit für IL-10 und TNF-α wie nachfolgend in Tabelle 9 dargestellt. Für IL-6 bleibt der ursprüngliche Stichprobenumfang geltend.

Tabelle 9 Stichprobenumfang Messzeitpunkt A-D für IL-10 und TNF-α

	A	B	C	D
Bauch-Becken	25	18	18	15
Kopf-Hals	24	26	20	17
Kontrolle	15	-	-	-

2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der ODs der ELISAs erfolgte mit den Programmen Excel von Microsoft® und Prism von GraphPad®. Die weitere statistische und grafische Aufbereitung wurde mit SAS®/STAT by SAS Institute vorgenommen. Auf Grund des Setups der erhobenen Parameter über vier Messzeitpunkte und unterschiedlicher Stichprobenumfänge über die Messzeiträume A-D wurden für die statistische Auswertung verschiedene Modelle eingesetzt. So wurde neben dem Verfahren des t-tests und dem Shapiro-Wilk-Test als Überprüfung auf Normalverteilung der Grundgesamtheit einer Stichprobe bei metrischen Datensätzen auch der Wilcoxon-Rangsummen-Test und der Mediantest angewendet.

Betreffs der statistischen Signifikanz ist der Fehler 1. Art, auch α-Fehler genannt, ein anerkanntes Instrument zur Einschätzung von Irrtumswahrscheinlichkeiten bei Hypothesentests. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird der α-Fehler als p-Wert dezimal angegeben. Dabei gilt hinsichtlich des Signifikanzniveaus α ein p-Wert ≤0,1 als schwach signifikant, p≤0,05 als signifikant, p≤0,01 als sehr signifikant und p≤0,001 als höchst signifikant. In dieser Arbeit wurde das häufig verwendete Niveau von p≤0,05 als Kriterium für statistische Signifikanz festgelegt. Schwach signifikante Ergebnisse mit p≤0,1 wurden zusätzlich gesondert als solche markiert und beschrieben.

Im Rahmen der Aufbereitung der Ergebnisse wurde als Methode der Darstellung die Boxplot/ Box-Whisker-Plot Variante gewählt. Mittels Boxplots lassen sich bei komplexen ordinalskalierten Datensätzen wesentliche Punkte der Verteilung grafisch erfassbar präsentieren und werden insbesondere Gruppenvergleiche präziser abgebildet. Abbildung 7 zeigt anschaulich die Darstellung per Boxplot-Graphen.

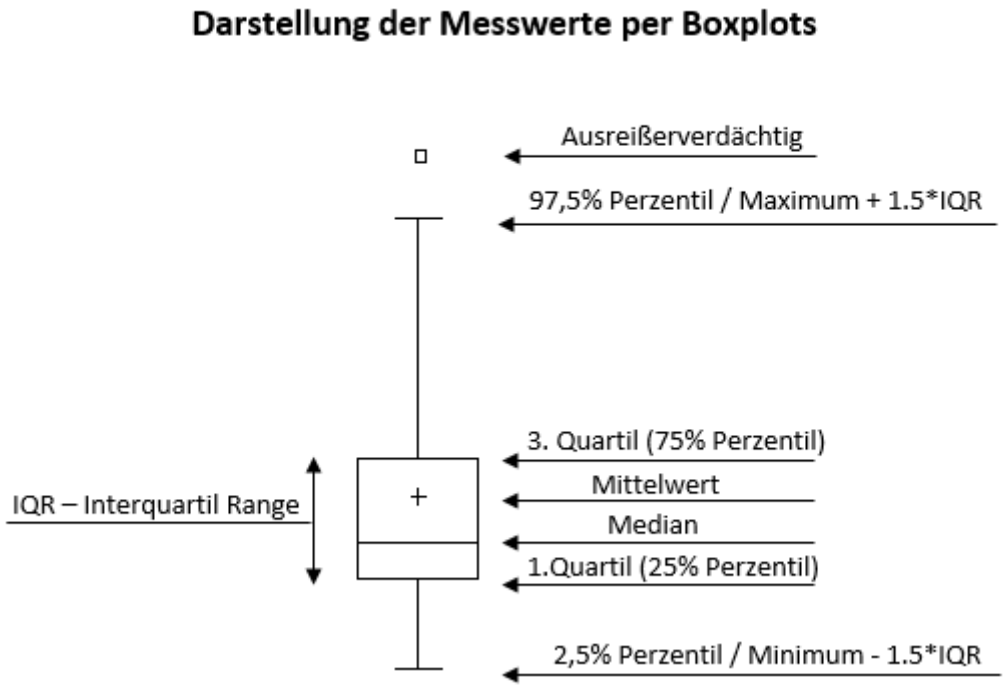


Abb. 7: Legende der Boxplot-Darstellung. IQR = Interquartile Range: 50% der Messwerte liegen innerhalb dieses Sektors zwischen dem 0,25-Quantil und 0,75-Quantil (=25% und 75% Perzentil). Die Festlegung der oberen und unteren Antenne (Whisker) ist nicht einheitlich. Mitunter wird das Maximum als 3-facher Faktor +1,5*IQR beschrieben. Werte außerhalb der Antennengrenzen können als ausreißerverdächtig gelten.

3. Ergebnisse

Die Auswertung der erhobenen Messwerte erfolgt aus unterschiedlichen Betrachtungswinkeln. Zunächst werden die beiden Patientenkohorten aus Bauch-Becken- und Kopf-Hals-Tumoren sowie die Kontrolle im direkten Vergleich am Messzeitpunkt A und in der Folge die zwei Patientenarme zu den jeweiligen Erhebungspunkten B-D betrachtet und hinsichtlich signifikanter Unterschiede gegenübergestellt. Des Weiteren schließt sich ein Überblick über den gesamten Verlauf aller Messzeitpunkte innerhalb der jeweiligen beiden Gruppen an. Abschließend kommt eine nach Geschlecht gegliederte Betrachtung der Messwerte der gesamten Patientenkohorte sowie auch nach beiden Entitätsgruppen differenziert zur Darstellung.

3.1 Gruppenvergleich der Messwerte

Zunächst wird jeweils für die Cytokine IL-6, TNF-α und IL-10 der direkte Vergleich aller drei Gruppen, der beiden Patientenkohorten und den Gesunden, zum Messzeitpunkt A und nachfolgend der beiden Patientengruppen zu den Zeitpunkten B-D gezeigt und hinsichtlich der Verteilung der Messwerte und signifikanter Unterschiede der Mittelwerte beschrieben.

3.1.1 Interleukin-6

Zum ersten Messzeitpunkt A finden sich für IL-6 bei den Bauch-Becken- mit 183,85 pg/ml und bei den Kopf-Hals-Tumoren mit 183,45 pg/ml nahezu identische Mittelwerte, die über denen der Gesunden mit 96,12 pg/ml liegen (Tabelle 10). Ferner sind 50% der Messwerte innerhalb beider Patientengruppen in einem vergleichbaren Korridor mit geringfügig höherem 75% Perzentil der Bauch-Becken-Patienten. Beide Gruppen zeigen nah beieinander liegende Minima bei 29,25 pg/ml und 29,64 pg/ml sowie Maxima von 517,32 pg/ml und 497,87 pg/ml. Die Werte der nicht erkrankten Personen hingegen liegen in einer deutlich engeren Spanne von 29,64 pg/ml bis 286,1 pg/ml vor und die IQR50% ist ebenfalls enger (Abb.8). Gegenüber der Kontrolle sind die MW bei p=0,049 in der Bauch-Becken- und p=0,058 in der Kopf-Hals-Gruppe einmal signifikant höher und einmal nur schwach signifikant höher, als in der Gruppe der gesunden Probanden. Zwischen den beiden Patientengruppen findet sich mit p=0,98 kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 10 Messwerte der gesamten Kohorte für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt A

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=36	183,85*	129,53	29,25	517,32	56,32	259,64
Kopf-Hals N=37	183,45(*)	141,83	29,64	497,87	50,26	235,41
Gesunde N=15	96,12	81,19	29,65	286,16	49,08	105,85

(*)p≤0,1; *p≤0,05

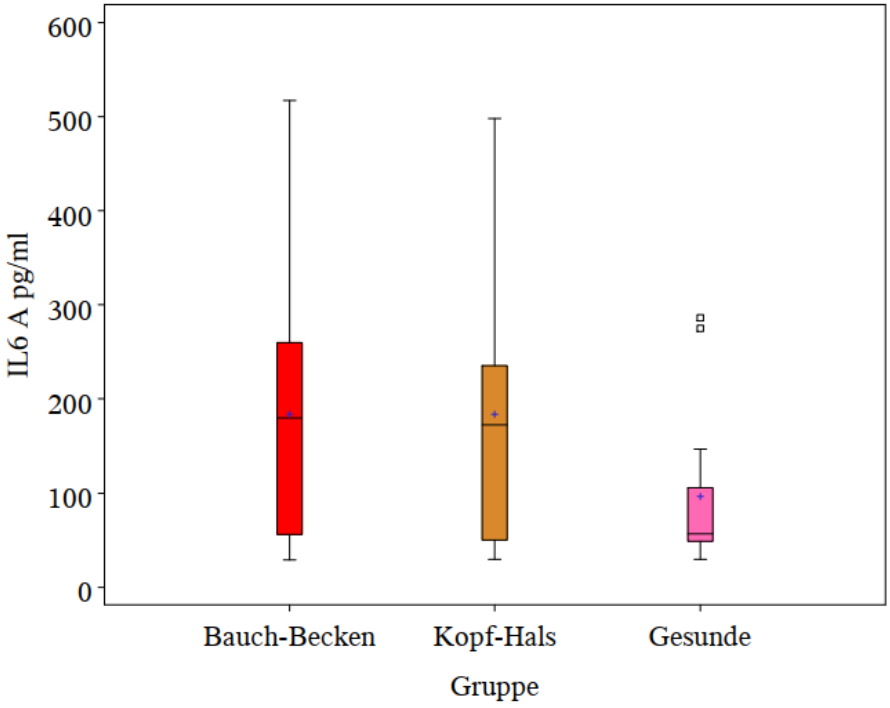


Abb. 8: Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) innerhalb der drei Gruppen zum Messzeitpunkt A per Boxplots. Beide Patienten-Gruppen zeigen zum Messzeitpunkt A höhere Mittelwerte als die Gruppe der Gesunden, die bei der Bauch-Becken-Gruppe auch signifikant sind, und eine wesentlich breitere Streuung der Messwerte. Die Verteilung der Messwerte ist zwischen den beiden Patientengruppen homogen mit nur geringfügigen Unterschieden.

Am zweiten Messzeitpunkt B nach dem ersten Chemotherapie-Zyklus entfällt die Gruppe der Gesunden. In der Bauch-Becken-Gruppe ist der Mittelwert auf 200,04 pg/ml gestiegen, in der Kopf-Hals-Gruppe hingegen auf 166,99 pg/ml gefallen. Die IQR50% ist bei der Gruppe der Kopf-Hals-Patienten enger und zeigt ein tieferes 25% und 75% Perzentil im Vergleich zur Bauch-Becken-Gruppe. Die Minima und Maxima sind weiterhin vergleichbar (siehe Tabelle 11 und Abb. 9). Insgesamt liegen die gemessenen Werte nach dem ersten Messzeitpunkt bei den Bauch-Becken-Patienten geringfügig höher, ohne dass der Unterschied zur Kopf-Hals-Gruppe mit p=0,36 statistische Signifikanz aufweist.

Tabelle 11 Messwerte der Patientenkohorten für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt B

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=27	200,04	131,25	30,84	489,90	63,20	276,59
Kopf-Hals N=33	166,99	144,25	30,84	503,75	56,94	227,67

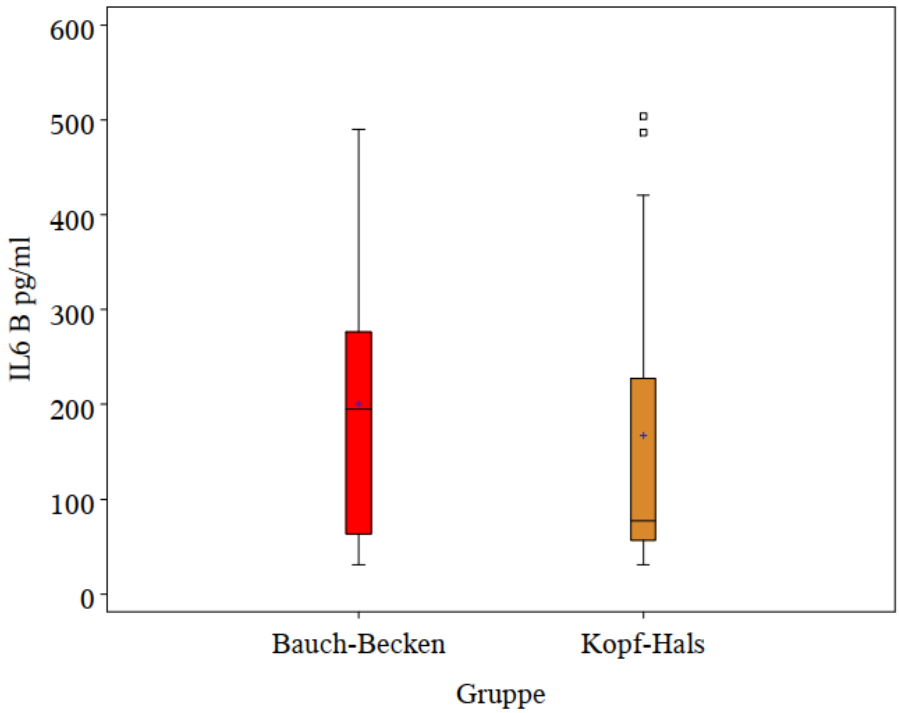


Abb. 9: Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) zwischen beiden Gruppen zum Messzeitpunkt B per Boxplots. Die Verteilung der Messwerte ist hinsichtlich der IQR50% ähnlich wie zum Zeitpunkt A mit insbesondere höherem Mittelwert in der Bauch-Becken-Gruppe.

Zum dritten Messzeitpunkt C zeigt sich die Verteilung bei Il-6 mit einem deutlichen Unterschied der IQR50%. So liegen 50% der Messwerte bei der Bauch-Becken-Gruppe mit einem 75% Perzentil von 345,91 pg/ml in einer deutlich größeren Spanne vor, als bei der Kopf-Hals-Gruppe mit 198,07 pg/ml. Die Mittelwerte sind mit 211,24 pg/ml zu 156,13 pg/ml bei der Bauch-Becken-Gruppe weiter zunehmend höher. Die Maximalwerte sind in beiden Gruppen weiterhin eng beieinander um 500 pg/ml (siehe Tabelle 12 und Abb. 10). Mit einem p=0,3 ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch nicht signifikant.

Tabelle 12 Messwerte der Patientenkohorten für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt C

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=25	211,24	150,830	29,64	506,15	50,66	345,91
Kopf-Hals N=25	156,13	150,833	36,42	491,02	55,37	198,07

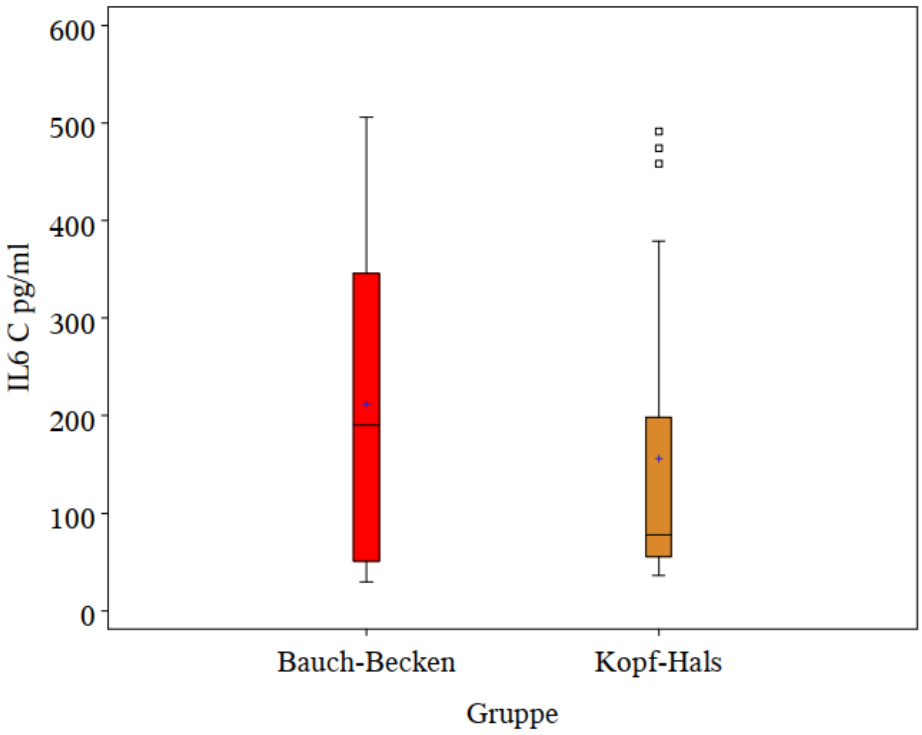


Abb. 10: Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) zwischen beiden Gruppen zum Messzeitpunkt C per Boxplots. Die Unterschiede in der Verteilung der Messwerte hat zwischen den beiden Patientengruppen hinsichtlich der IQR50% zugenommen, 50% der Messwerte in der Bauch-Becken-Gruppe liegen in einem deutlich größeren Werte-Korridor. Es imponiert ein tieferes 75% Perzentil in der Kopf-Hals-Gruppe.

Am letzten Messzeitpunkt D ist die Verteilung der Werte zwischen den beiden Patientengruppen weiterhin ähnlich, die Perzentilen haben sich allenfalls geringfügig angenähert aber bleiben deutlich unterschiedlich (siehe Abb. 11). Die Mittelwerte (Tabelle 13) erreichen in der Bauch-Becken-Kohorte 211,73 pg/ml und in der Kopf-Hals-Gruppe 139,63 pg/ml, ohne dass der Unterschied der MW mit p=0,15 signifikant ist.

Tabelle 13 Messwerte der Patientenkohorten für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt D

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=21	211,73	150,03	38,01	513,53	46,32	319,95
Kopf-Hals N=22	139,63	133,76	29,64	448,60	49,08	207,39

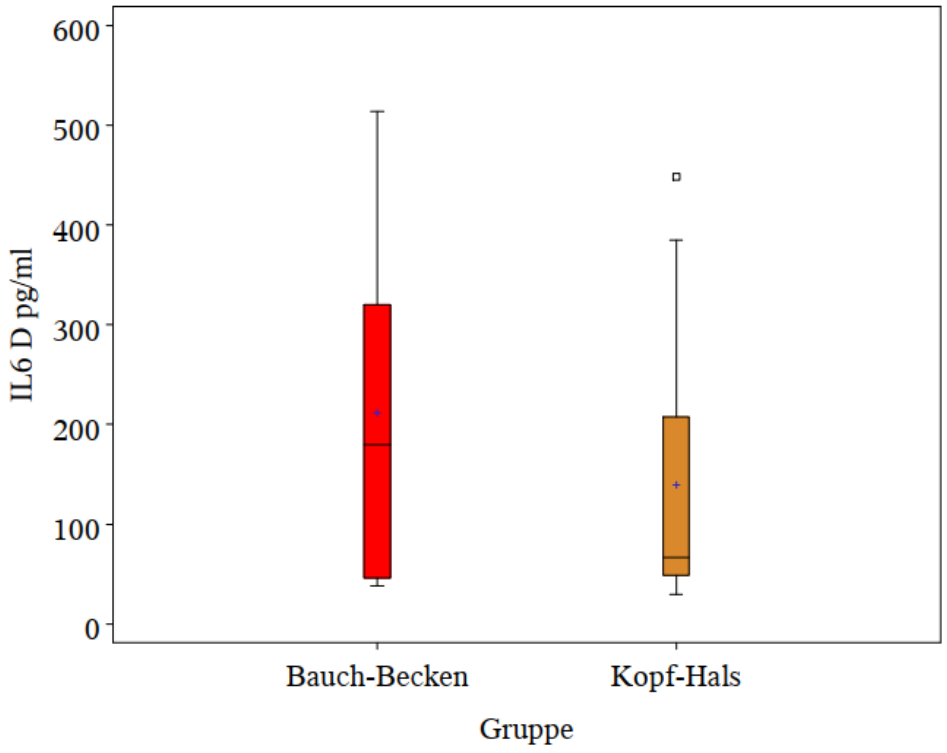


Abb. 11: Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) zwischen beiden Gruppen zum letzten Messzeitpunkt D per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte zwischen den beiden Patientengruppen ist zum Messzeitpunkten D gegenüber der Messung C vor dem letzten Chemotherapie-Kurs fast konstant.

3.1.2 Tumornekrosefaktor-alpha

Bei der Analytik von TNF-α ergibt die erste Messung bei beiden Patientengruppen im Vergleich zu den Gesunden tiefere Mittelwerte. Die Streuung der Messwerte ist in beiden Patientengruppen homogen mit einem gering tieferen 75 % Perzentil in der Bauch-Becken-Gruppe. Auffallend sind die tieferen Minima und die auf vergleichbaren Niveaus ebenfalls deutlich tiefer liegenden 25% Perzentile in beiden Patientengruppen gegenüber der Kontrollgruppe. Die Spanne der IQR50% der gesunden Probanden ist deutlich enger als bei den Patienten, welche aber größere Maxima erreichen (siehe Tabelle 14 und Abb.12). Mit p=0,33 und p=0,83 sind die Differenzen zu den Gesunden ebenso wenig signifikant wie mit p=0,20 zwischen beiden Patientengruppen.

Tabelle 14 Messwerte der gesamten Kohorte für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt A

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=25	97,88	56,65	33,59	176,55	41,64	147,56
Kopf-Hals N=25	114,23	52,24	38,55	172,03	45,32	151,42
Gesunde N=15	139,70	8,30	127,99	154,82	133,00	144,83

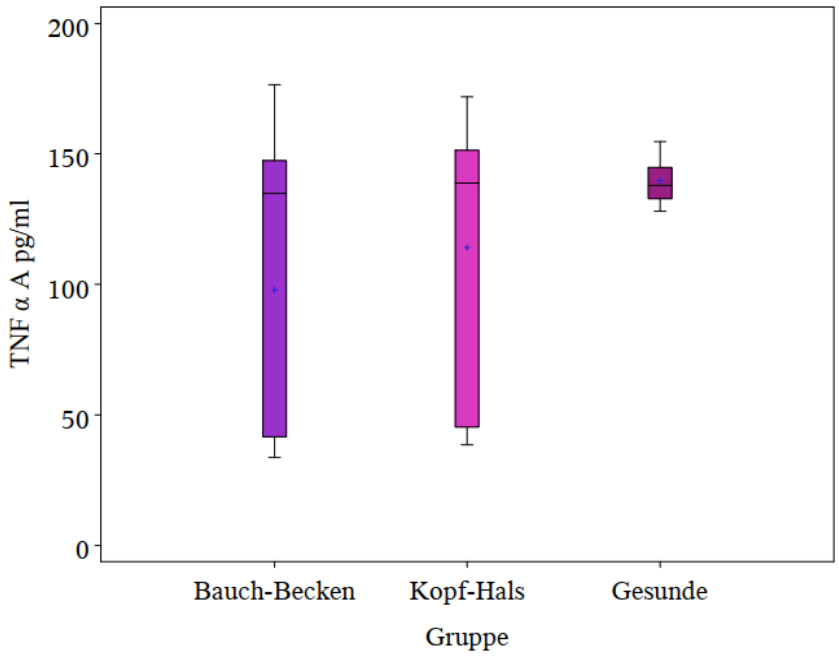


Abb. 12: Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den drei Gruppen zum Messzeitpunkt A per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte präsentiert als IQR50% zwischen den beiden Patientengruppen ist sehr gering, im Vergleich zu den Gesunden aber hoch.

Bei der zweiten Messung nach der ersten Chemotherapie-Applikation präsentiert sich zwischen den beiden Patienten-Kohorten bezüglich der Streuung der Messwerte ein weiterhin sehr homogenes Bild. Es liegt bei beiden Patientengruppen im Vergleich zueinander nur eine geringe Deviation der Perzentilen vor (Tabelle 15, Abb.13). Die Mittelwerte beider Gruppen sind mit einem p=0,19 nicht signifikant im Unterschied.

Tabelle 15 Messwerte der Patientenkohorten für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt B

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=18	94,74	55,26	36,16	168,13	41,03	145,29
Kopf-Hals N=26	118,94	47,41	39,87	177,91	50,04	147,10

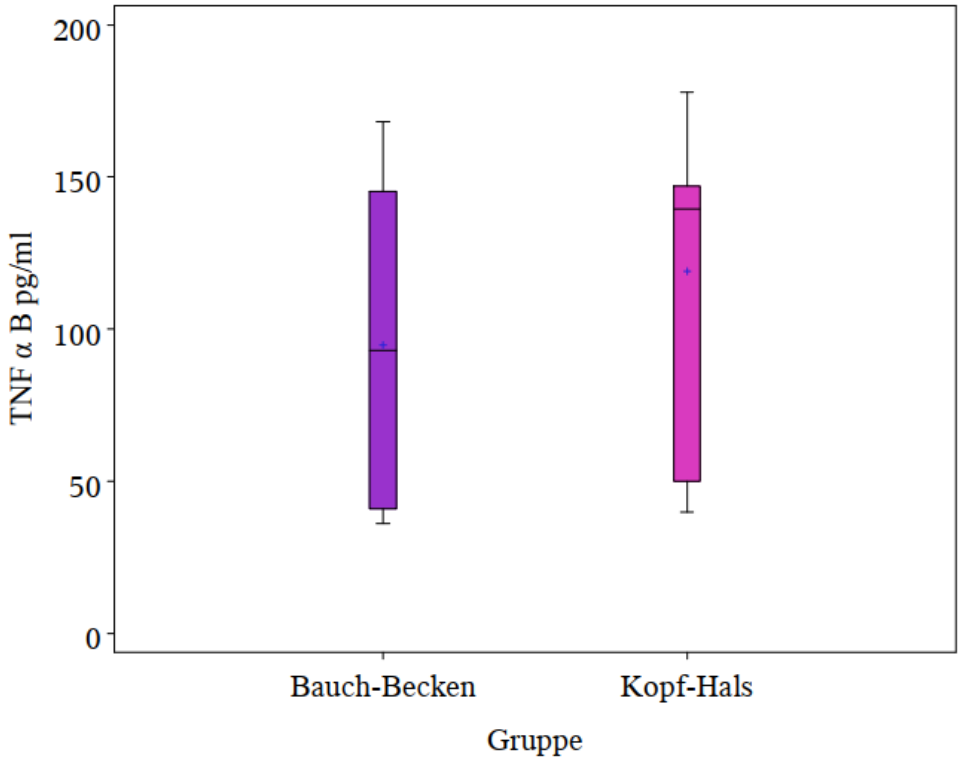


Abb. 13: Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den beiden Gruppen zum Messzeitpunkt B per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte zwischen den beiden Patientengruppen ist weiterhin gering. Das 25% und 75% Perzentil der Kopf-Hals-Gruppe sind minimal höher im Vergleich zur Bauch-Becken-Kohorte.

Am dritten Messzeitpunkt C findet sich zwischen den beiden Kohorten nun ein deutlicher Unterschied in der Verteilung der Messwerte mit einem deutlich höheren 25 % Perzentil in der Kopf-Hals-Gruppe bei 90,13 pg/ml, gegenüber 37,39 pg/ml bei den Bauch-Becken-Entitäten (siehe Tabelle 16 und Abb.14).

Der Unterschied der MW zwischen beiden Gruppen ist mit p=0,02 signifikant.

Tabelle 16 Messwerte der Patientenkohorten für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt C

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=18	81,75*	56,26	26,12	168,34	37,39	147,10
Kopf-Hals N=20	122,72	46,52	42,93	168,96	90,13	151,42

*p<0,05

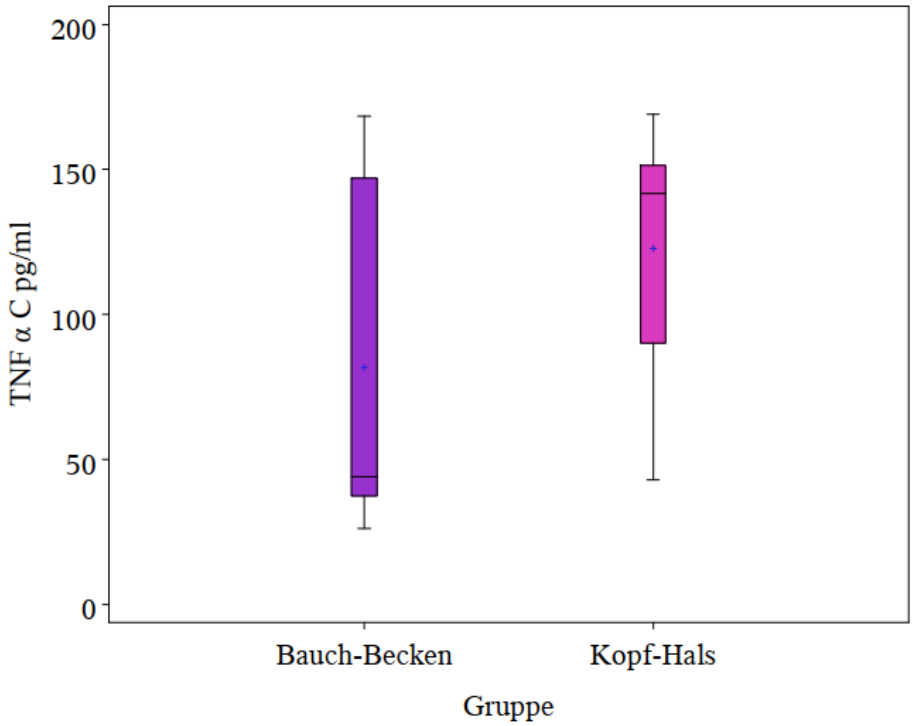


Abb. 14: Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den beiden Gruppen zum Messzeitpunkt C per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte zwischen den beiden Patientengruppen ist markant. Die Maxima liegen gleichauf. Der MW bei den Bauch-Becken-Entitäten ist bei p=0,02 signifikant tiefer als bei den Kopf-Hals-Tumoren.

Zum letzten Messzeitpunkt D nach der zweiten Chemotherapie liegt die Spanne der Messwerte in beiden Gruppen noch weiter auseinander. Die Maxima liegen weiterhin vergleichbar hoch. Das 25% Perzentil ist in der Kopf-Hals-Gruppe auf 132,09 pg/ml angestiegen, das 75% Perzentil liegt in beiden Gruppen vergleichbar um 150 pg/ml. Die Divergenz der Mittelwerte ist bei einer dem Trend folgender Spreizung zwischen beiden Gruppen diesmal bei p=0,056 nur schwach signifikant.

Tabelle 17 Messwerte der Patientenkohorten für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt D

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=15	85,06(*)	55,86	35,20	166,90	40,95	149,83
Kopf-Hals N=17	123,02	45,94	41,20	166,07	132,09	151,19

(*) p≤0,1

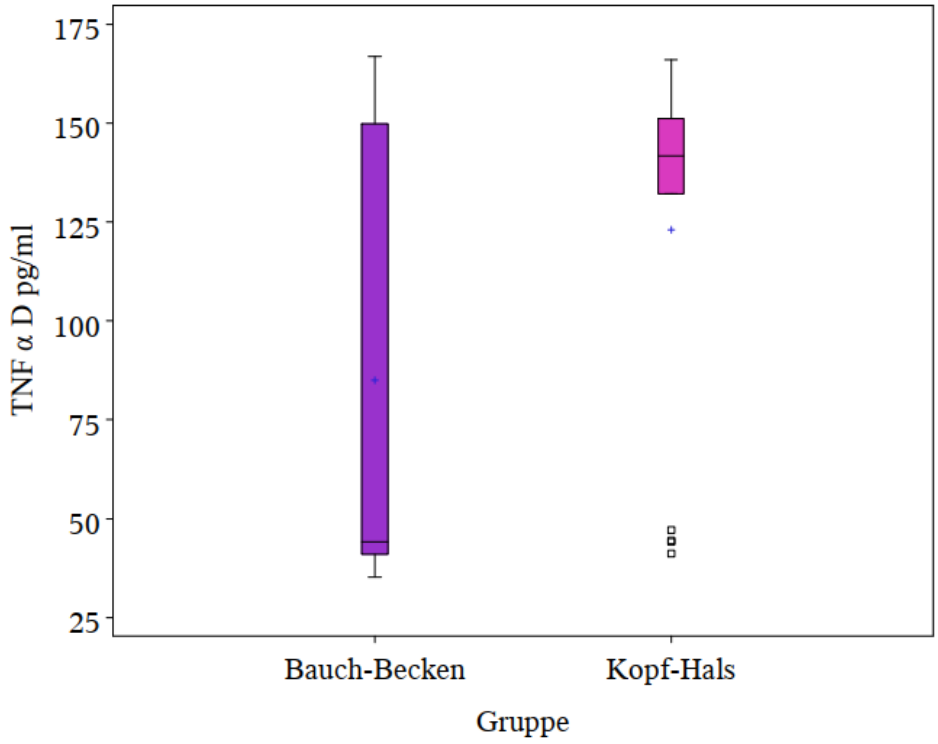


Abb. 15: Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den beiden Gruppen zum Messzeitpunkt D per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte hat noch weiter zugenommen. Die Maxima liegen in beiden Kohorten weiter auf einem ähnlichen Level um 166 pg/ml.

3.1.3 Interleukin-10

Bei IL-10 weisen die Patientengruppen fast identische MW auf, die deutlich über denen der Gesunden liegen. Wie Tabelle 18 zeigt, liegen in beiden Patientenkohorten die Minima sowie die 25% Perzentilen nah beieinander und auf ähnlichem Niveau wie bei den Gesunden. Die Maxima und 75% Perzentilen grenzen sich gegenüber den Gesunden deutlich nach oben hin ab und zeigen in der Kopf-Hals-Gruppe die höchsten Werte. Abb. 16 stellt die Unterschiede der Verteilung grafisch dar. Die MW beider Patientengruppen sind mit jeweils $p<0,01$ sehr signifikant gegenüber den Gesunden erhöht. Zwischen beiden Patientengruppen ist mit $p=0,77$ keine Signifikanz betreffs der Mittelwerte feststellbar

Tabelle 18 Messwerte der gesamten Kohorte für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt A

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=25	180,05**	42,95	134,70	261,19	142,67	209,03
Kopf-Hals N=25	179,23**	51,31	135,97	270,44	141,41	234,14
Gesunde N=15	140,17	5,78	130,06	149,53	136,60	144,76

**p≤0,01

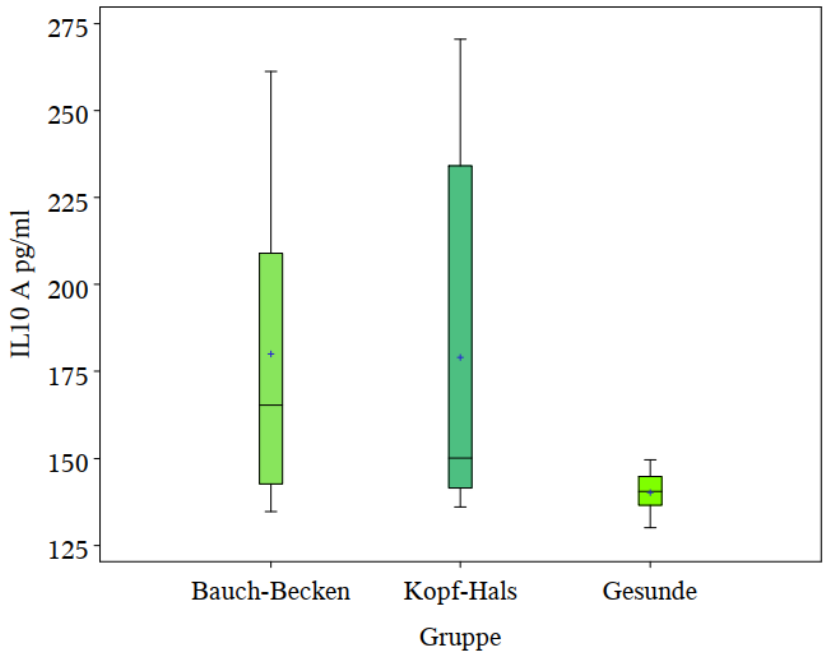


Abb. 16: Darstellung der Messwerte von IL-10 (pg/ml) bei den drei Gruppen zum Messzeitpunkt A per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte zwischen den beiden Patientengruppen ist erkennbar, im Vergleich zu den Gesunden sehr deutlich.

Zum Messzeitpunkt B liegen nach der ersten kombinierten Radiochemotherapie die Werte für IL-10 zwischen beiden Gruppen in einem gespiegelten Werteintervall gegenüber der Ausgangsmessung. Das 75% Perzentil in der Bauch-Becken-Gruppe hat auf 234,96 pg/ml zugenommen, wohingegen es in der Kopf-Hals-Gruppe auf 220,56 pg/ml gesunken ist. Die Maxima liegen mit 256,51 pg/ml zu 264,44 pg/ml in beiden Gruppen höher, der Mittelwert ist in der Bauch-Becken-Kohorte fast konstant, in der Kopf-Hals-Gruppe auf 170,23 pg/ml gesunken. Die Divergenz der Mittelwerte zwischen beiden Gruppen ist mit p=0,56 jedoch außerhalb der statistischen Signifikanz.

Tabelle 19 Messwerte der Patientenkohorten für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt B

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=18	179,38	45,48	133,02	256,51	139,74	234,96
Kopf-Hals N=26	170,23	48,22	133,65	264,44	139,95	220,56

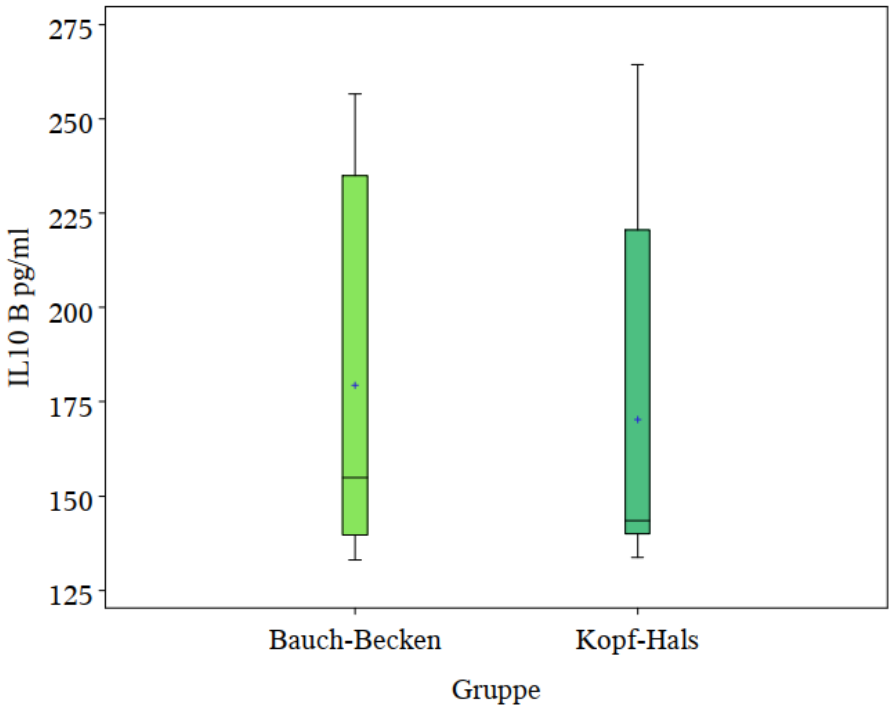


Abb. 17: Darstellung der gemessenen Werte von IL-10 (pg/ml) bei den zwei Patientengruppen zum Messzeitpunkt B per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte zwischen den beiden Patientengruppen ist erkennbar und fast invers zur Ausgangsmessung A.

Der Messzeitpunkt C vor dem zweiten Chemotherapie-Kurs ergibt dem Trend folgend eine weiter zunehmend unterschiedliche Verteilung der Messwerte mit tieferem 75% Perzentil bei der Kopf-Hals-Gruppe. Hier zeigen sich die Maxima hingegen geringfügig erhöht und liegen bei nun 273,13 pg/ml und damit höher als in der Bauch-Becken Gruppe mit 261,19 pg/ml (siehe Tabelle 20 und Abb. 18).

Die Mittelwerte sind in der Bauch-Becken-Gruppe mit 191,86 pg/ml gegenüber 173,08 pg/ml in der Kopf-Hals-Gruppe mit p=0,08 nur schwach statistisch signifikant erhöht.

Tabelle 20 Messwerte der Patientenkohorten für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt C

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=18	191,86(*)	46,20	137,65	261,19	147,45	238,01
Kopf-Hals N=20	173,08	52,50	133,23	273,13	140,79	192,18

(*) p≤0,1

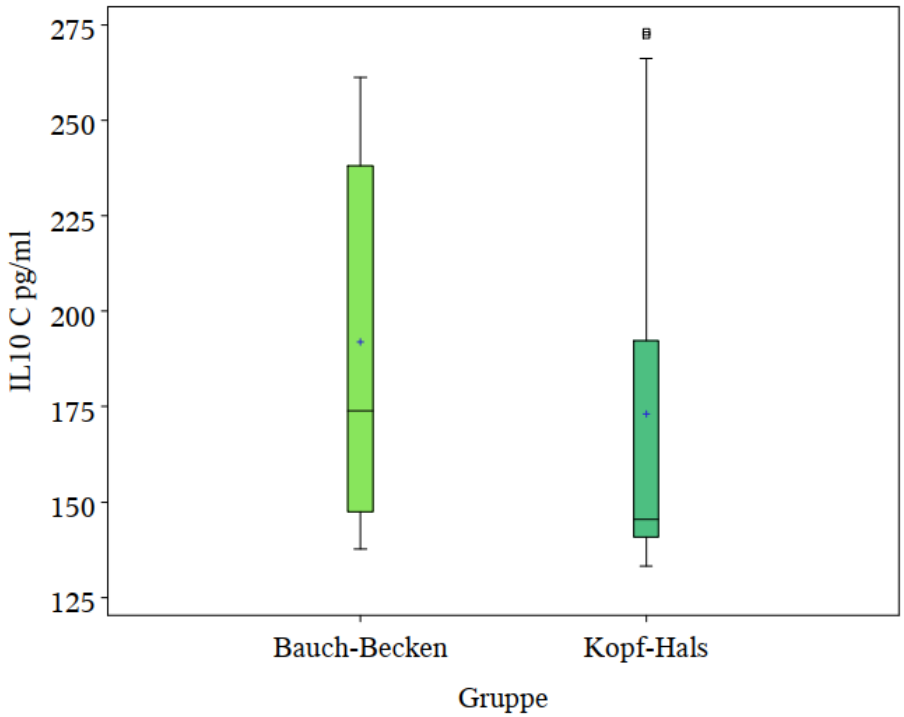


Abb. 18: Darstellung der gemessenen Werte von IL-10 (pg/ml) bei den zwei Patientengruppen zum Messzeitpunkt C per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte zwischen den beiden Patientengruppen ist hier weiterhin erkennbar. Die IQR50% bei der Bauch-Becken-Gruppe liegt bei einer merklich größeren Spanne der Messwerte deutlich höher.

Zum letzten Messpunkt D nach dem zweiten Chemotherapie-Kurs parallel zur Radiatio liegen die MW der Bauch-Becken-Entitäten bei 193,96 pg/ml und bei den Kopf-Hals-Patienten bei 170,91 pg/ml. Die Verteilung der Messwerte hat sich gegenüber den beiden vorherigen Messungen B und C weiter verändert. Bei fast gleich hohen Maxima in beiden Gruppen um 275 pg/ml ist jedoch die IQR50% der Kopf-Hals-Gruppe mit einem 75% Perzentil bei nur noch 156,75 pg/ml gegenüber 241,81 pg/ml in der Bauch-Becken-Kohorte klar gesunken und enger gefasst (siehe Tabelle 21 und Abb.19). Die Differenz der MW zwischen beiden Gruppen ist mit p=0,15 nicht signifikant

Tabelle 21 Messwerte der Patientenkohorten für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt D

Gruppe	Mittelwert	Standard-abweichung	Min.	Max.	25% Perzentil	75% Perzentil
Bauch-Becken N=15	193,69	49,41	136,39	275,91	144,13	241,81
Kopf-Hals N=17	170,91	51,71	134,07	274,98	140,16	156,75

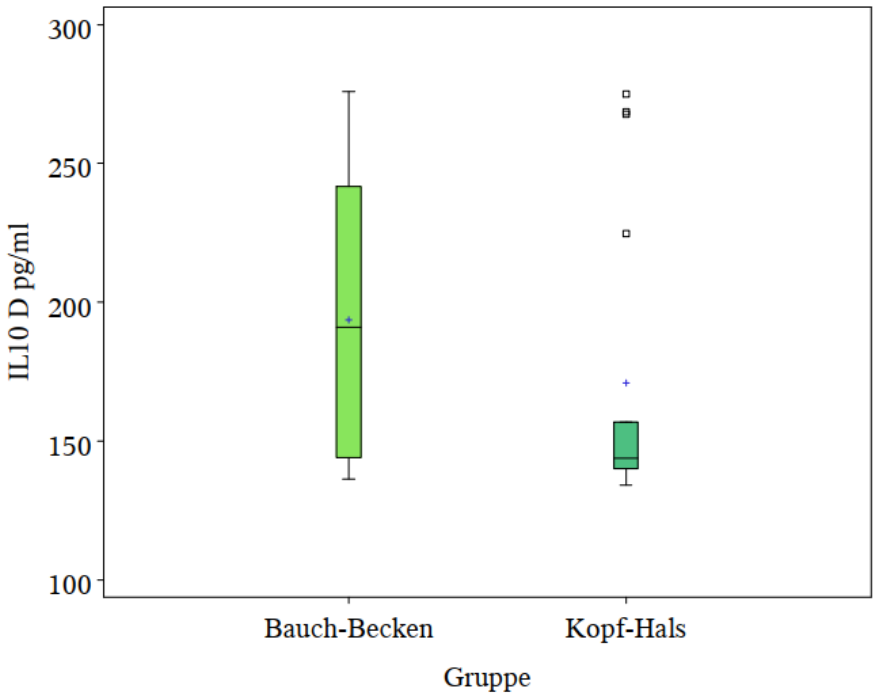


Abb. 19: Darstellung der gemessenen Werte von IL-10 (pg/ml) bei den zwei Patientengruppen zum Messzeitpunkt D per Boxplots. Der Unterschied in der Streuung der Messwerte zwischen den beiden Patientengruppen ist zunehmend und erreicht hier seine größte Ausdehnung. Die IQR50% bei der Bauch-Becken-Gruppe zeigt eine breitere Verteilung der Messwerte bei vergleichbaren Maximalwerten.

3.2 Ergebnisse im Verlauf

Im nun folgenden Abschnitt wird der zeitliche Verlauf über die simultane Radiochemotherapie mit dem Fokus innerhalb der beiden Tumorentitäten je Cytokin dargestellt und die unter Kapitel 3.1 beschriebenen Unterschiede zwischen beiden Gruppen kommen teilweise noch ergänzend zur Sprache.

3.2.1 Interleukin-6

Die nachstehende Tabelle 20 gibt einen Überblick über die Mittelwerte beider Gruppen samt Standardabweichungen im zeitlichen Verlauf der Radiochemotherapie über die Messzeitpunkte A bis D. Während in der Bauch-Becken-Kohorte die MW zu den beiden letzten Messzeitpunkten C und D auf 211,24 pg/ml bzw. 211,72 pg/ml steigen, ist der Verlauf bei den Kopf-Hals-Patienten gegenläufig mit den tiefsten Mittelwerten zum Zeitpunkt D bei 139,63 pg/ml. Wie bereits unter 3.1.1 nachzulesen, sind die MW der Bauch-Becken-Kohorte gegenüber den Gesunden mit $p<0,05$ signifikant erhöht, bei den Kopf-Hals-Patienten ist die Signifikanz mit $p=0,058$ schwach und zwischen beiden Gruppen fand sich bei fast identischen Werten keine signifikante Differenz.

Tabelle 20 Messwerte im Verlauf für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

Gruppe	A	B	C	D
Bauch-Becken N=36;27;25;21	183,85±129,53*	200,04±131,25	211,24±150,83	211,73±150,03
Kopf-Hals N=37;33;25;22	183,45±141.83(*)	166,99±144.25	156,13±150.83	139,63±133.76
Kontrolle N=15	96,12±81.19	-	-	-

Die Mittelwerte sind angegeben als Mittelwerte ± SD; (*) $p\leq0,1$; *$p\leq0,05$

Die für IL-6 gemessenen Werte bei den Patienten mit Tumoren im Bauch-Becken-Bereich zeigen sich über die gesamte Radiochemotherapie von zunehmender Schwankungsbreite. Die größte Distributionsbreite zeigt sich zum Messzeitpunkt C mit dem höchsten 75% Perzentil, das zum Ende bei D wieder tiefer liegt (Abb. 20). Die höchsten Mittelwerte erreicht die Kohorte zum Zeitpunkt C und D mit je 15% Zunahme (Abb.21). Signifikant ist die Zunahmen der MW über den Verlauf ausgehend von der Ausgangsmessung A zu den Messzeitpunkten B bis D mit p=0,62, p=0,48 und p=0,46 jedoch nicht.

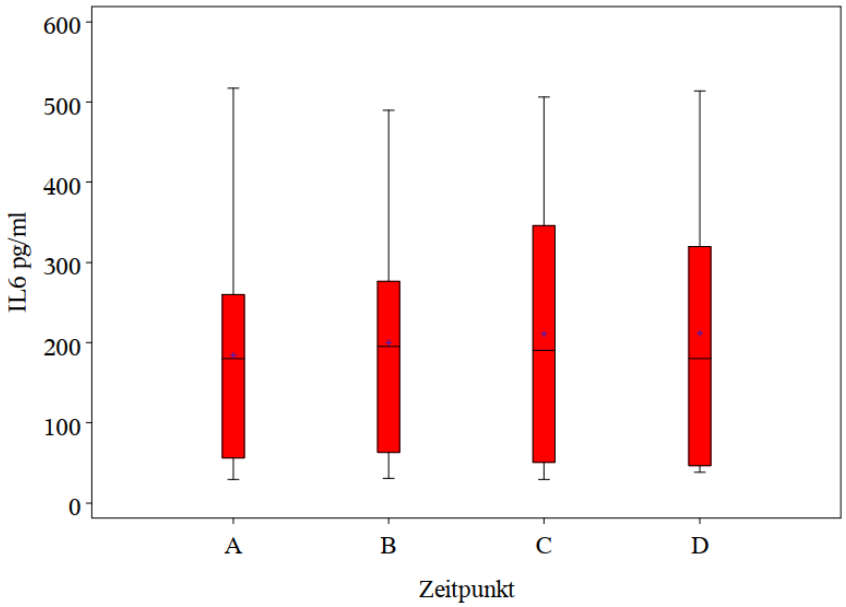


Abb. 20: Boxplots der Messwerte der Bauch-Becken-Patienten über den Verlauf zwischen Messzeitpunkt A bis D bei Interleukin-6 (pg/ml). Die Distribution der Messwerte verändert sich mit breiterer IQR50% zu den letzten beiden Messzeitpunkten mit dem höchsten 75% Perzentil zum Zeitpunkt C.

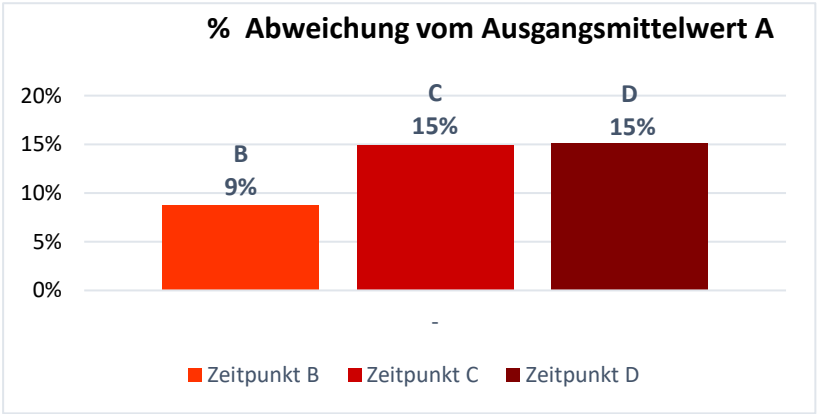


Abb. 21: Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangswert A bei Interleukin-6 (pg/ml) in der Bauch-Becken-Kohorte. Der größte Anstieg liegt mit je 15% zu den Zeitpunkten C und D am Ende vor.

Bei den Patienten der Kopf-Hals-Kohorte fallen die Mittelwerte von den Ausgangswerten bei A zum Messzeitpunkt D hin konstant ab. Abbildung 23 zeigt die prozentualen Abweichungen. Auffällig im direkten Vergleich ist die in der Kopf-Hals-Gruppe geringere Spanne der IQR50% mit vergleichbarem 25%, aber tieferen 75% Perzentilen über alle Messpunkte mit den tiefsten Werten vor (C) und nach (D) der zweiten simultanen Chemotherapie (siehe Abb. 22). Die MW sind gegenüber der Ausgangsmessung A im Verlauf bei p=0,63, p=0,33 sowie p=0,17 nicht statistisch signifikant verändert.

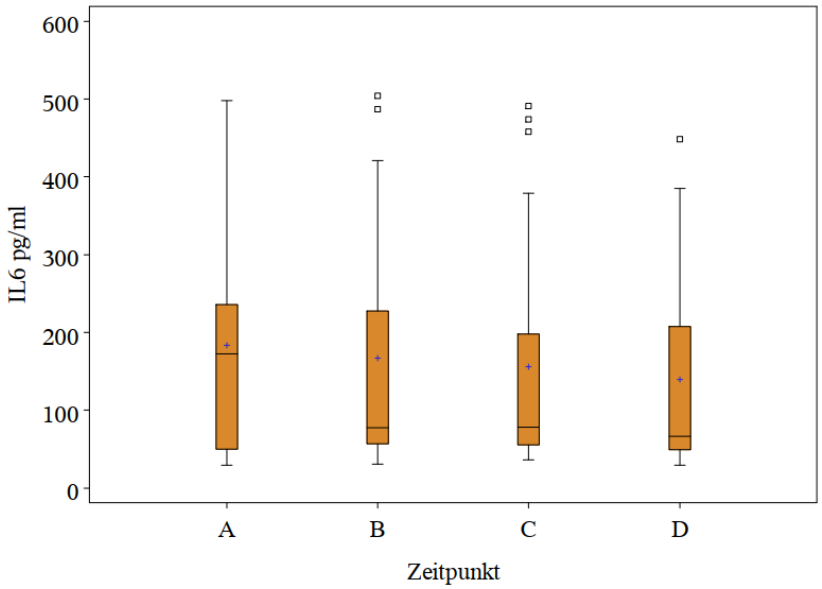


Abb. 22: Boxplots der Messwerte der Kopf-Hals-Patienten über den Verlauf zwischen Messzeitpunkt A und D bei Interleukin-6 (pg/ml). Die IQR50% zeigt in der Kopf-Hals-Kohorte eine engere Spreizung als in der Bauch-Becken-Gruppe mit durchweg tieferem 75% Perzentil. Dieses liegt vor und nach dem ersten Chemotherapie-Kurs höher als vor und nach dem zweiten Kurs.

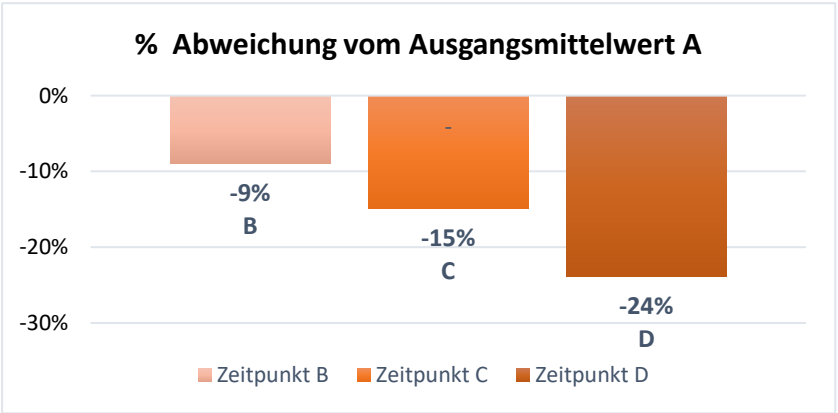


Abb. 23: Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangsmittelwert A bei Interleukin-6 (pg/ml) in der Kopf-Hals-Gruppe. Die deutlichste Reduktion findet sich am Ende mit -24%.

3.2.2 Tumornekrosefaktor-alpha

Die folgende Tabelle 21 gibt einen Überblick über die Mittelwerte beider Gruppen samt Standardabweichungen im zeitlichen Verlauf der Radiochemotherapie über die Messzeitpunkte A bis D. In der Bauch-Becken-Kohorte nehmen die Messwerte ab und zeigen den tiefsten Wert am Zeitpunkt C mit 81,75 pg/ml gefolgt vom Zeitpunkt D mit 85,06 pg/ml. Bei den Kopf-Hals-Patienten finden sich steigende Mittelwerte mit 122,72 pg/ml bei C und 123,02 pg/ml am Ende bei D. Wie bereits unter Kapitel 3.1.2 dargestellt, sind die Unterschiede initial zwischen beiden Patientenkohorten und den Gesunden mit p=0,33 und p=0,83 sowie innerhalb beider Patientenarme mit p=0,28 nicht signifikant.

Tabelle 21 Messwerte im Verlauf für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

Gruppe	A	B	C	D
Bauch-Becken N=25;18;18;15	97,88±56,65	94,74±55,36	81,75±56,26	85,06±55,86
Kopf-Hals N=25;22;20;17	114,23±52,24	118,94±47,41	122,72±46,52	123,02±45,94
Kontrolle N=15	139,70±8,30	-	-	-

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SD

Die für TNF-α gemessenen Werte bei den Patienten mit Tumoren im Bauch-Becken-Bereich sind über die gesamte Radiochemotherapie von großer Konstanz. Die größte Distributionsbreite zeigt sich zum Messzeitpunkt C mit dem tiefsten 25% und zum Zeitpunkt D mit dem höchsten 75% Perzentil (Abb. 24). Die tiefsten Mittelwerte erreicht die Kohorte ebenfalls zum Zeitpunkt C mit 81,75 pg/ml gefolgt von D mit 85,06 pg/ml. Abbildung 25 zeigt die prozentualen Abweichungen vom Ausgangsmittelwert A. Signifikant ist die Abnahme der MW über den Verlauf ausgehend von der Ausgangsmessung A zu den Messzeitpunkten B bis D mit p=0,82, p=0,34 und p=0,58 nicht.

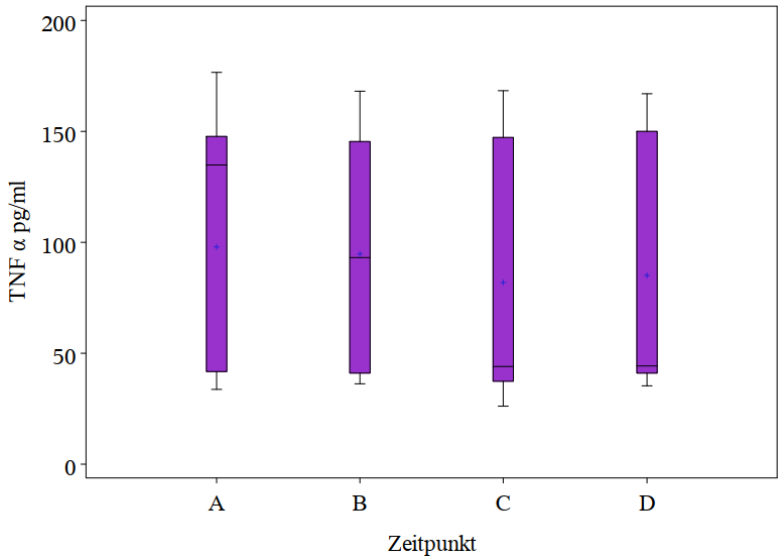


Abb. 24: Darstellung der Bauch-Becken Kohorte über den gesamten Verlauf der Radiochemotherapie zwischen Messzeitpunkt A bis D bei TNFα (pg/ml). Insgesamt zeigt sich Spanne der Werte über die gesamte Therapie sehr stabil. Die IQR50% verbreitert sich allenfalls gering mit abnehmendem 25% Perzentil am Zeitpunkt C und wenig steigendem 75% Perzentil zum Ende bei D.

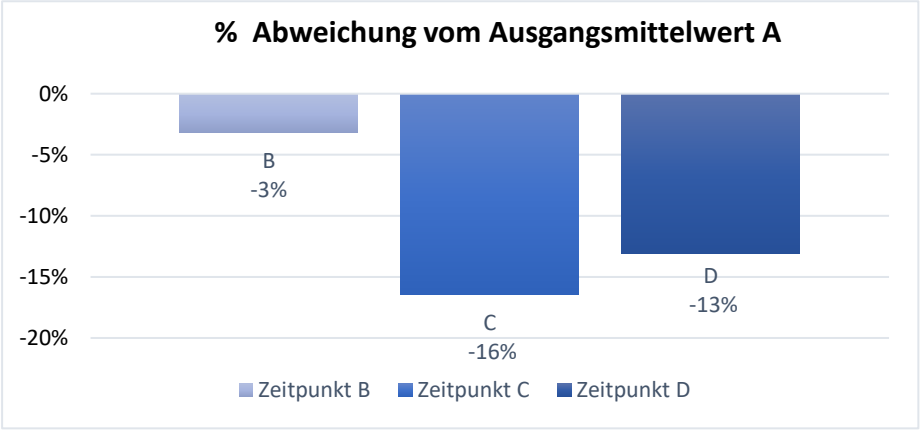


Abb. 25: Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangsmittelwert A bei TNF-α (pg/ml) in der Bauch-Becken-Kohorte. Eine Abnahme vor allem vor Beginn des 2. Chemotherapie-Kurses bei C ist erkennbar und bleibt nach diesem vergleichbar tief (D).

Der Verlauf von TNF-α bei den Kopf-Hals Patienten zeigt sich über die simultane Radiochemotherapie invers zu den Bauch-Becken-Tumoren mit kontinuierlich ansteigenden Mittelwerten. Die IQR50% verkleinert sich ab dem Messzeitpunkt C mit steigendem 25% Perzentil und erreicht am Ende ihre geringste Spannbreite. Die Maxima und Minima hingegen bleiben auf vergleichbaren Niveaus.

Abbildung 26 zeigt die Veränderungen über den Verlauf grafisch auf. In Abbildung 27 sind die prozentualen Veränderungen gegenüber dem Initialwert dargestellt. Die Abweichungen der Mittelwerte vom Ausgangswert A sind zu den Zeitpunkten B, C und D mit jeweils p=1,0, p=0,6 und p=0,74 nicht signifikant.

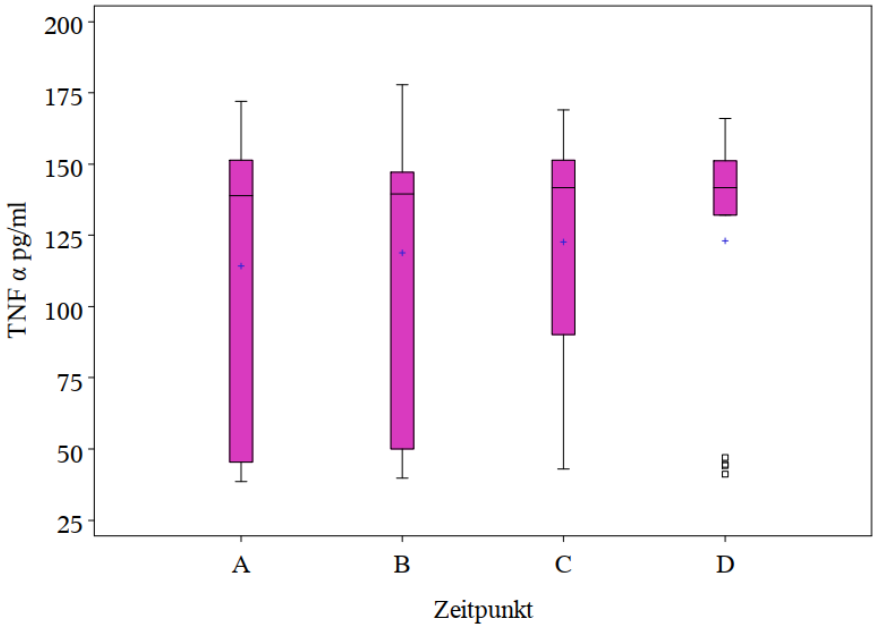


Abb. 26: Kopf-Hals-Kohorte im Vergleich über den gesamten Verlauf der Radiochemotherapie zwischen Messzeitpunkt A und D bei TNF-α (pg/ml). Die IQR50% ist nach dem ersten Chemotherapie-Kurs konstant, vor Beginn des zweiten Kurses wird sie markant enger mit höherem 25% Perzentil, das sich am Ende nochmal deutlich erhöht und die IQR verkleinert.

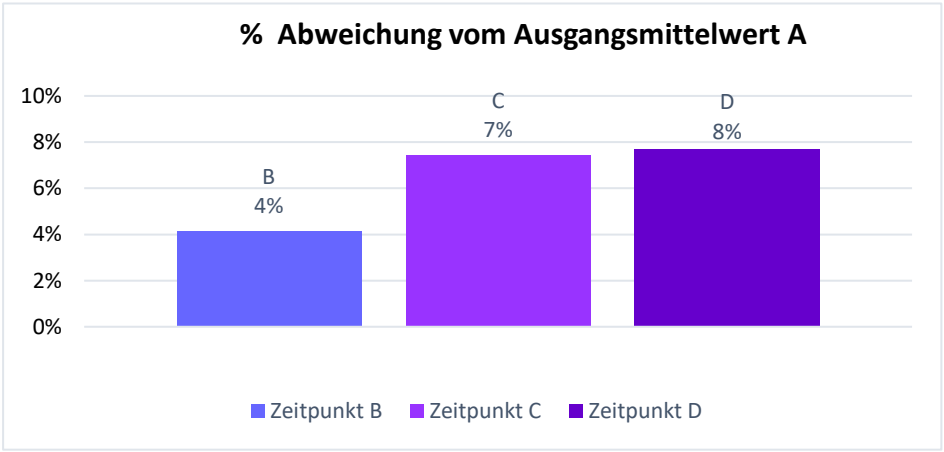


Abb. 27: Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangsmittelwert A bei TNF-α (pg/ml) in der Kopf-Hals-Kohorte. Eine kontinuierliche Zunahme um 4% bis 8% bis zum Zeitpunkt D ist vorhanden.

3.2.3 Interleukin-10

In Bauch-Becken-Kohorte ist der MW von IL-10 konstant nach dem ersten Chemotherapie-Kurs bei B und nimmt zu den Zeitpunkten C und D zu. Bei den Kopf-Hals-Patienten finden sich sehr gering fallende Mittelwerte. Die nachstehende Tabelle 22 gibt einen Überblick über die Parameter beider Gruppen im zeitlichen Verlauf der Radiochemotherapie über die Messzeitpunkte A bis D. Wie bereits unter Kapitel 3.1.3 dargestellt, sind die MW in beiden Patienten-Kohorten mit je $p<0,01$ sehr signifikant höher als bei den Gesunden. Zwischen beiden Patientengruppen mit gibt es mit $p=0,77$ keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 22 Messwerte im Verlauf für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

Gruppe	A	B	C	D
Bauch-Becken N=25;18;18;15	180,05*±42,95	179,38±45,48	191,86±46,20	193,69±49,41
Kopf-Hals N=25:26;20;17	179,02*±51,31	170,23±48,22	173,08±52,50	170,91±51,71
Kontrolle N=15	140,17±5,78	-	-	-

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SD; *p≤0,01

In der Bauch-Becken-Gruppe kommt es analog zu einem Anstieg der Mittelwerte zu einer Verbreiterung der IQR50% durch ein zu allen weiteren Zeitpunkten steigendes 75% Perzentil (Abb. 28). Auch die Maximalwerte finden sich am Ende nach dem zweiten Chemotherapie-Kurs. Die geringen Zunahmen der Mittelwerte vom Ausgangsmittelwerte A (Abb. 29) sind, wie auch bei IL-6 und TNF-α, zu den Zeitpunkten B, C und D mit $p=0,78$, $p=0,33$ und $p=43$ ohne statistische Signifikanz.

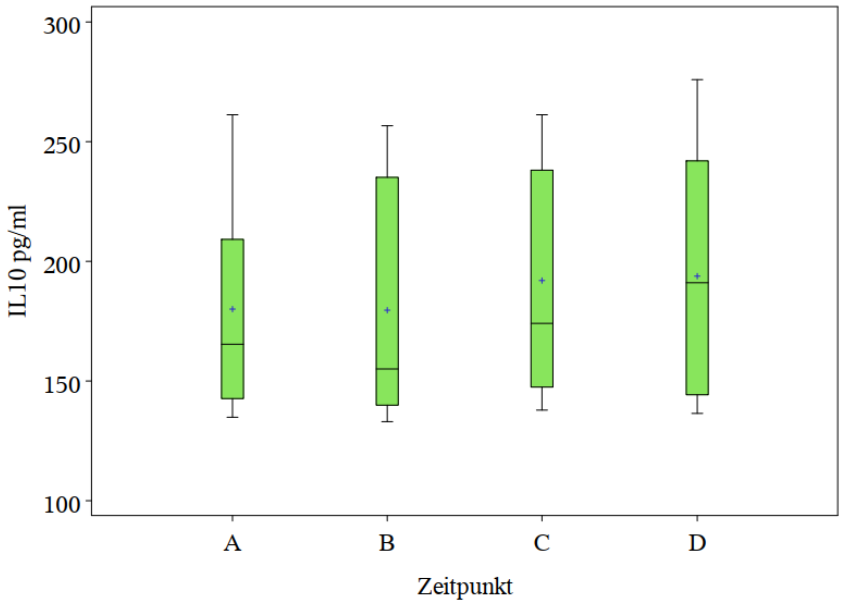


Abb. 28: Boxplots von IL-10 (pg/ml) bei **der Bauch-Becken-Kohorte über den gesamten Verlauf.** Die IQR50% unterliegt deutlichen Schwankungen und erreicht ihre größte Spannbreite mit dem höchsten 75% und 95%Perzentil am letzten Messzeitpunkt D.

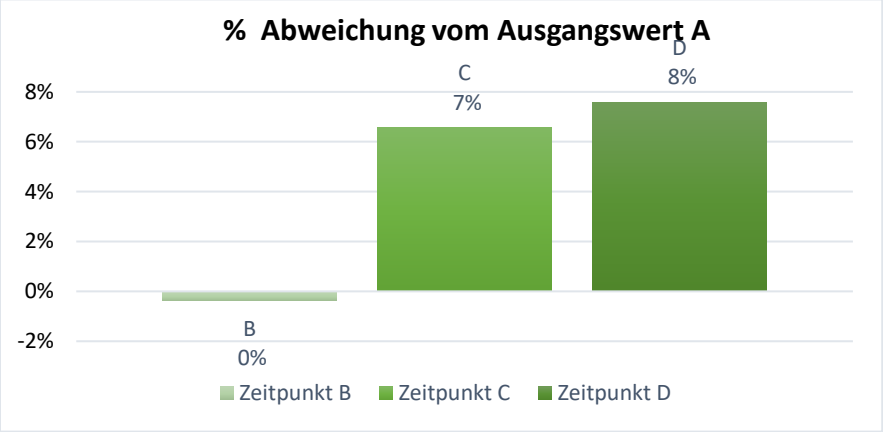


Abb. 29: Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangsmittelwert A bei IL-10 (pg/ml) in der Bauch-Becken-Kohorte. Einer Zunahme um 7% und 8% lässt sich in der zweiten Hälfte des Therapiesettings feststellen.

Der Verlauf bei den Kopf-Hals-Patienten zeigt sich über die simultane Radiochemotherapie im Vergleich zu der Bauch-Becken-Kohorte konträr. Die IQR50% weist bei den Kopf-Hals-Patienten initial die größte und am Ende die schmalste Spannbreite auf. Dabei nimmt der Wertekorridor zu jedem Zeitpunkt durch ein Absinken des 75% Perzentils klar ab, wohingegen das 25% Perzentil konstant bleibt.

Die Mittelwerte pendeln um 170 pg/ml. Zum Zeitpunkt D liegt der MW knapp oberhalb der IQR. Abbildung 30 veranschaulicht grafisch die zugehörigen Boxplots im Verlauf und Abbildung 31 zeigt die prozentualen Abweichungen der MW vom Ausganswert an. Der Unterschied der MW im Verlauf der simultanen Radiochemotherapie ist mit p=0,28, p=0,65 und p=0,6 zu den Zeitpunkten B-D nicht statistisch signifikant.

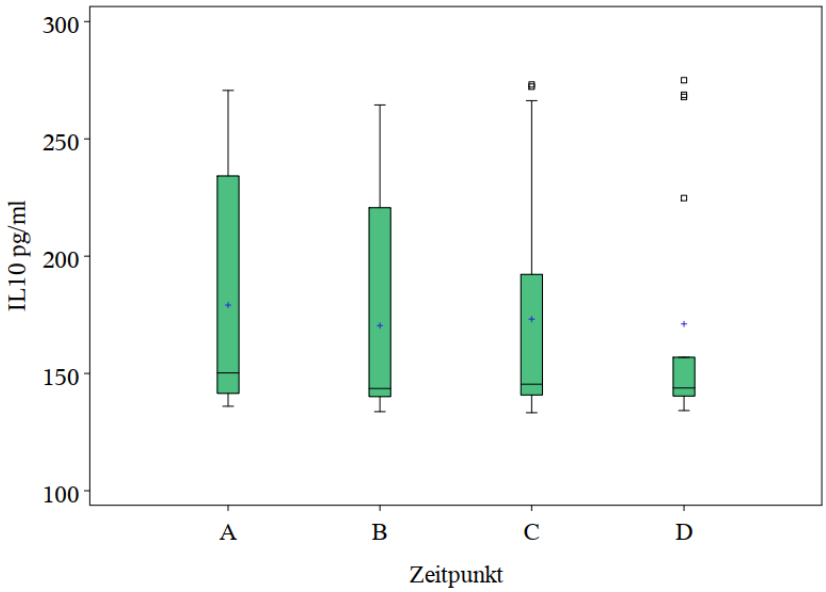


Abb. 30: Kopf-Hals-Kohorte im Vergleich über den gesamten Verlauf der Radiochemotherapie zwischen Messzeitpunkt A und D bei IL-10 (pg/ml). Die IQR50% nimmt hier im Verlauf merklich zu jedem Zeitpunkt weiter ab und erreicht am Ende mit dem tiefsten 75% Perzentil Ihre kleinste Spanne. Der MW liegt hier oberhalb des tiefen 75% Perzentils, wodurch einige Maximalwerte als ausreißerverdächtig markiert werden.

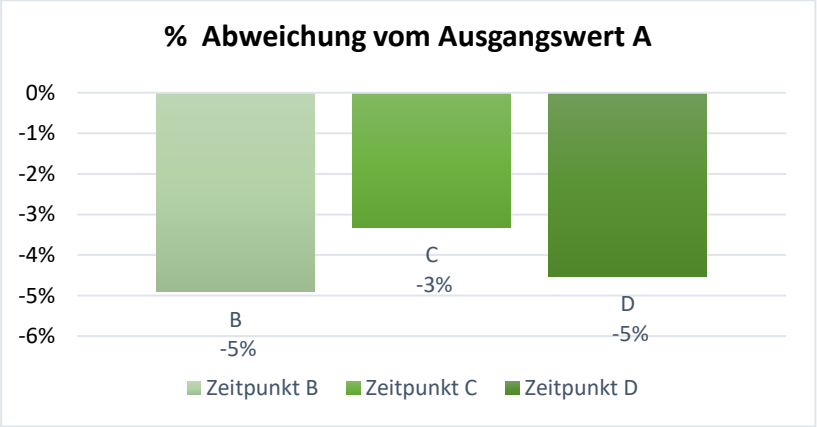


Abb. 31: Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangsmittelwert A bei IL-10 (pg/ml) in der Kopf-Hals-Kohorte. Die Abweichungen sind relativ gering und bewegen sich zwischen 3% und 5%.

3.3 Geschlechtsbezogene Unterschiede

Abschließend erfolgt eine nach Geschlechtern gegliederte Beschreibung der Messwerte sowohl für die Gesamtheit aller Tumorpatienten als auch wieder separiert für die beiden Kohorten. Auf Grund des epidemiologisch bedingten, zu den männlichen Patienten verschobenen Geschlechtergefälles bei den Kopf-Hals-Tumoren, haben hier die Stichprobenumfänge bisweilen ein deutliches Gefälle.

3.4.1 Interleukin-6

Bei der geschlechtlichen Gliederung der gesamten Kohorte zeigen die Frauen höhere Mittelwerte als die Männer. Während diese bei den Männern sinken, steigen sie bei den Frauen mit den höchsten MW zum Zeitpunkt C, wie Tabelle 23 veranschaulicht. Es fallen ab dem Messpunkt B bei den Frauen ein höheres 25% Perzentil und eine engere Spanne der IQR50% auf. Die Maximalwerte liegen bei beiden Geschlechtern ähnlich hoch um 500 pg/ml. Abbildung 32 illustriert die Unterschiede in der Verteilung der Messwerte.

Es findet sich im gesamten Patientenkollektiv mit p=0,2 zum Zeitpunkt A vor der Radiochemotherapie noch kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Dies ändert sich jedoch nach dem ersten Chemotherapie-Kurs. Zum Zeitpunkt B liegen bei den weiblichen Patienten mit p=0,03 signifikant höhere Mittelwerte vor, als bei den Männern. Dieser Trend bleibt und setzt sich über den Verlauf mit hoher Signifikanz bei p≤0,01 zum Zeitpunkt C und p=0,018 am Ende der Radiochemotherapie zum Zeitpunkt D fort.

Tabelle 23 Messwerte gesamte Tumorkohorte nach Geschlecht für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

	A	B	C	D
Männer gesamt N=44;37;35;27	155,31±134,31	152,77±142,63	139,89±139,0	140,40±138,1
Frauen gesamt N=29;23;20;16	189,04±125,68	228,66*±119,83	249,38**±149,65	232,95*±141,36

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SD; *p≤0,05; **p≤0,01

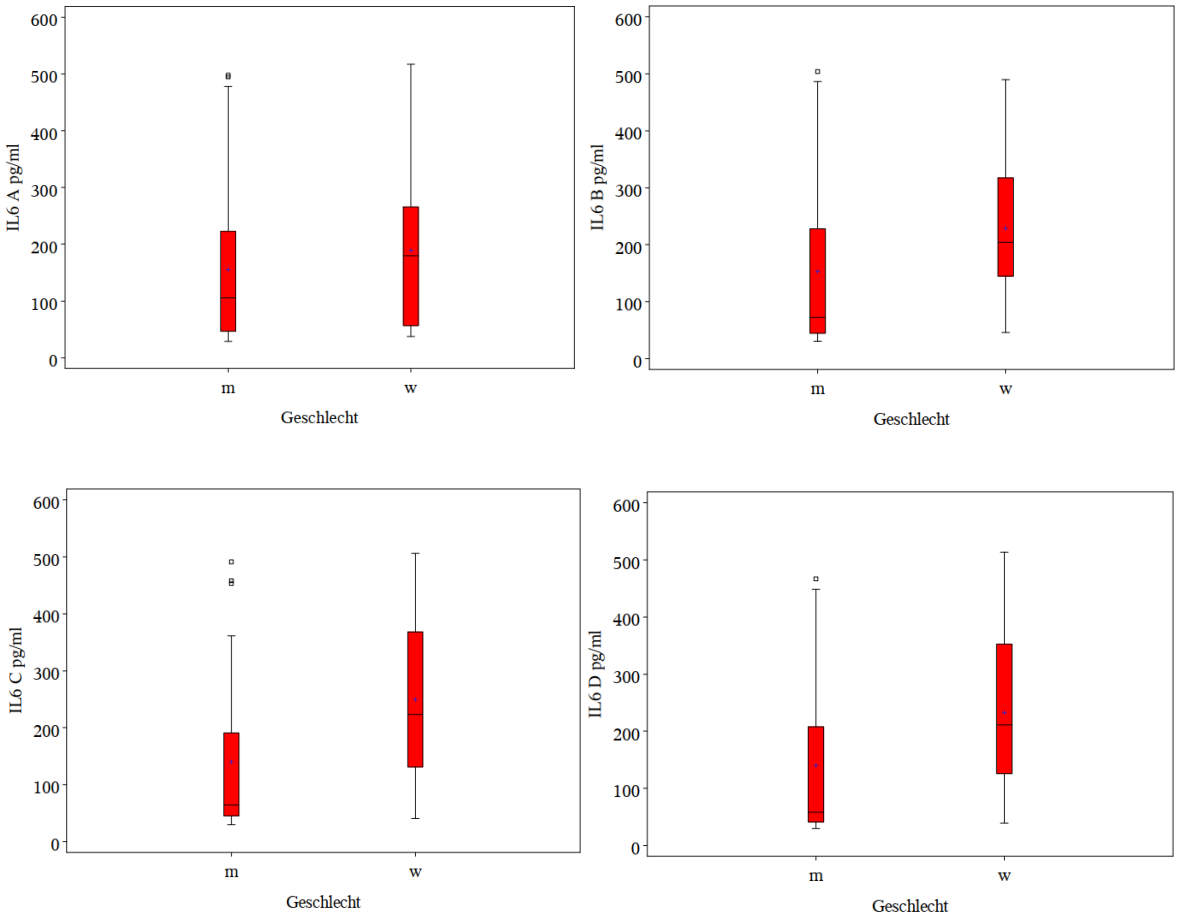


Abb. 32: Gesamte Patientenkohorte im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A und D bei IL-6 (pg/ml). Dargestellt sind Zeitpunkt A und B (oben) sowie C und D (unten) als Box-Whisker-Plots pro Geschlecht und Messzeitpunkt. Die Unterschiede der Mittelwerte sind signifikant ab dem Zeitpunkt B bis zum Ende. Die Verteilung der Messwerte unterscheidet sich innerhalb des 25% und 75% Perzentils zunehmend. m=männlich; w=weiblich

Bei den Bauch-Becken-Entitäten imponiert weiterhin der Unterschied bei der IQR50%, die sich hier zum Zeitpunkt D bei den männlichen Patienten mit einem Anstieg des 25% und deutlichem Abfall des 75% Perzentils zeigt. Bei den Frauen hingegen steigt das 75% zum Messzeitpunkt D an (siehe Abb. 33) Bei den Bauch-Becken-Patienten sind die Unterschiede der Mittelwerte (Tabelle 24) zwischen Männern und Frauen an den Messzeitpunkten A, B, C und D mit je p=0,09, p=0,07, p=0,052 und p=0.10 stets nur schwach signifikant.

Tabelle 24 Messwerte Bauch-Becken-Kohorte (BB) nach Geschlecht für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer BB N=14;11;10;9	142,14±119,73	148,59±131,74	141,41±144,70	150,41±154,33
Frauen BB N=22;16;15;12	210,40(*)±131,1	235,41(*)±122,5	257,80(*)±140,5	257,72(*)±134,9

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SD; (*)p≤0,1

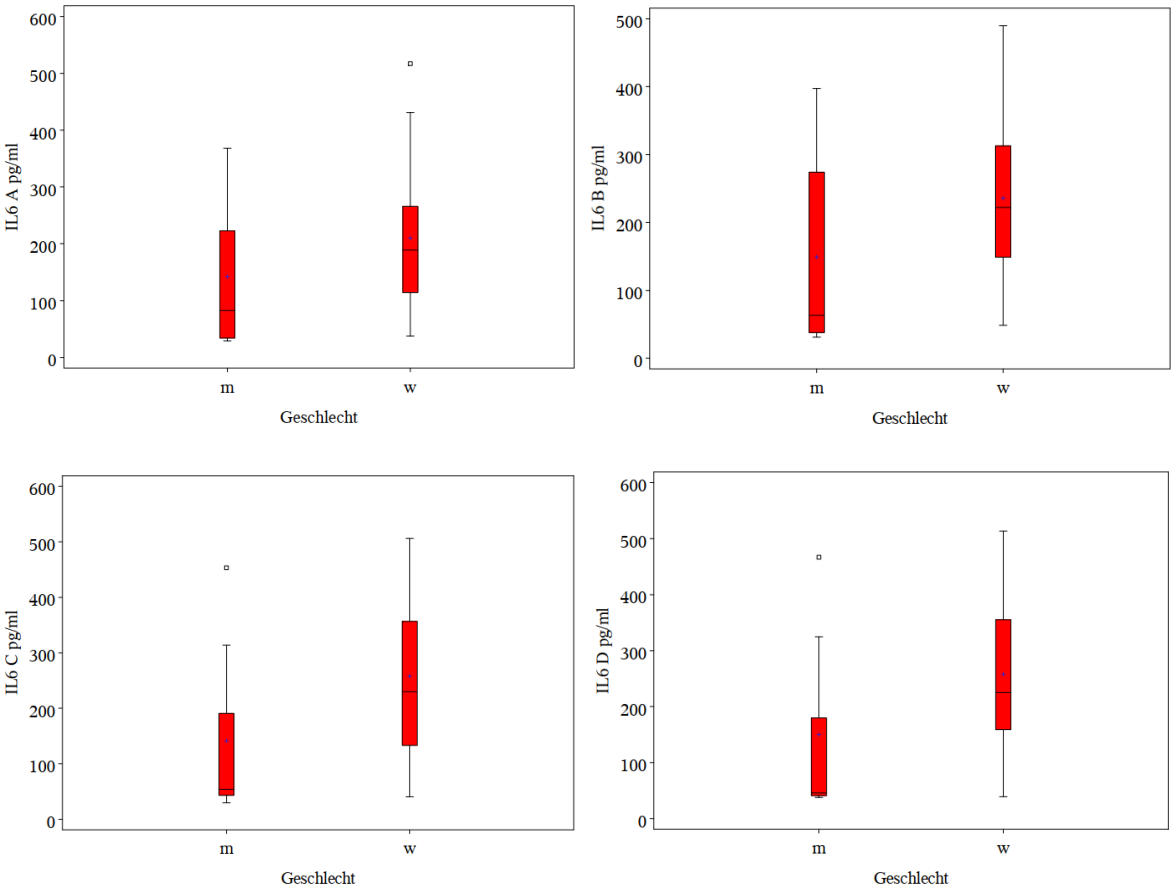


Abb. 33: Bauch-Becken-Patienten im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A-D bei IL-6 (pg/ml). Dargestellt sind Zeitpunkt A und B (oben) sowie C und D (unten) als Box-Whisker-Plots pro Geschlecht und Messzeitpunkt. Die Streuung der Messwerte unterscheidet sich innerhalb des 25% und 75% Perzentils und diese sind bei den Frauen konstant höher. Bei den Männern liegen die Werte der IQR50% am Ende in einem engeren Korridor. m=männlich; w=weiblich

Bei den Kopf-Hals-Patienten ist der Unterschied bei der Verteilung der Werte ähnlich wie in der Bauch-Becken-Gruppe. Der Stichprobenumfang ist zum Ende hin dünn zu Gunsten der männlichen Patienten verschoben. Männer zeigen diesmal zu allen Zeitpunkten die Maxima mit den höchsten Werten bei knapp 500 pg/ml am Ende. Das 75% Perzentil liegt bei den Frauen stets höher.

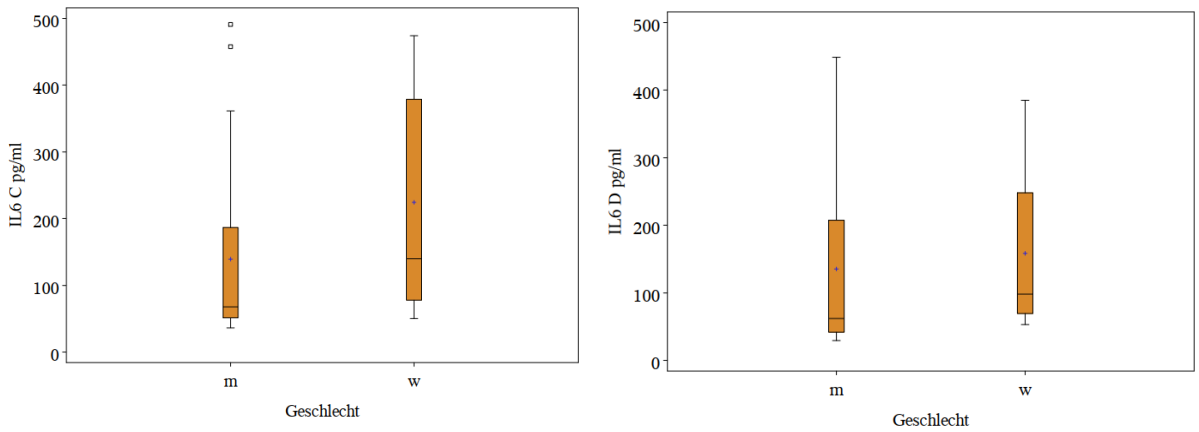
Bei den Kopf-Hals-Patienten liegen mit p=0,47, p=0,19, p=0,26 und p=0,42 zu keinem der Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen vor. (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25 Messwerte Kopf-Hals-Kohorte (KH) nach Geschlecht für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer KH N=30;26;20;18	178,88±149,75	154.55±149.47	139.13±139.94	135.40±133.74
Frauen KH N=7;7;5;4	203.03±108.44	213.23±121.32	224.10±190,40	158,64±152,62

Die Werte sind angegeben in als Mittelwerte ± SD

Die nachstehende Abbildung 34 illustriert die unterschiedliche Verteilung der Messwerte zwischen beiden Geschlechtern über den Verlauf der Radiochemotherapie grafisch.



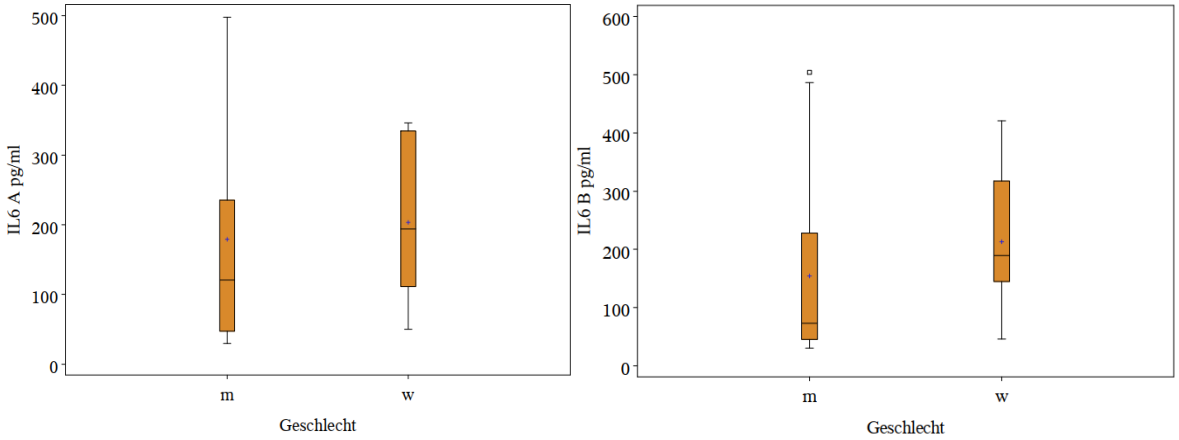


Abb. 34: Kopf-Hals-Kohorte im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-6 (pg/ml). Dargestellt sind Zeitpunkt A und B (S.58 unten) sowie C und D (S. 59 oben) als Box-Whisker-Plots pro Geschlecht und Messzeitpunkt. Die Verteilung der Messwerte unterscheidet sich weiterhin mit höherem 25% und 75% Perzentil und mit breiterer IQR50% bei den Frauen, welche stärker schwankt und beide Male nach den Chemotherapie-Kursen bzw. am Ende schmäler ist. m=männlich; w=weiblich

3.4.2 Tumornekrosefaktor-alpha

Bei der gesamten Kohorte zeigen sich bei TNF-α betreffs der Verteilung der Messwerte deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern über die einzelnen Messzeitpunkte. Die IQR50% ist bei den Männern bis auf Zeitpunkt B sehr eng gefasst, bei den Frauen bis auf Zeitpunkt C sehr breit. Die Maxima sind initial vergleichbar hoch und sinken nur bei den Frauen im Verlauf ab. Das 75% Perzentil ist bei A und B vergleichbar, sinkt bei C bei den Frauen stark ab und liegt am Ende wieder knapp unter dem der Männer (siehe Abb.35).

Bei den Mittelwerten zeigt TNF-α zwischen beiden Geschlechtern in der gesamten Kohorte bei den ersten beiden Messungen noch keine signifikanten Differenzen mit $p=0,16$ und $p=0,13$. Zum Zeitpunkt C ist der MW (siehe Tabelle 26) bei den Männern mit $p\leq0,001$ höchst und am Ende bei D mit $p\leq0,01$ hoch signifikant gegenüber den Frauen erhöht.

Tabelle 26 Messwerte gesamte Tumorkohorte nach Geschlecht für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer gesamt N=31;30;24;21	122,40±45,04	119,31±47,86	127,27***±46,18	124,76**±47,78
Frauen gesamt N=18;14;14;11	99,50±55,23	87,03±54,16	62,24±43,30	67,93±44,67

Die Werte sind angegeben in als Mittelwerte ± SD; **p≤0,01; ***p≤0,001

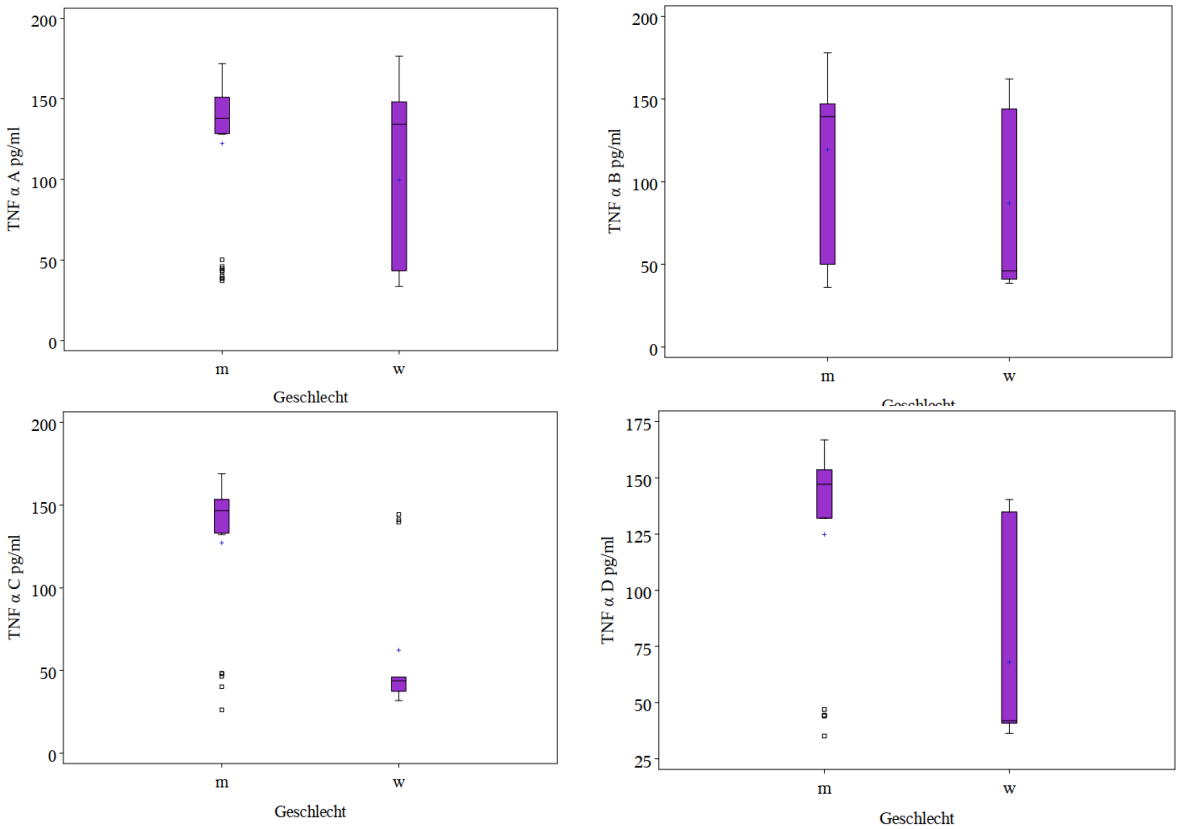


Abb. 35: Gesamte Patientenkohorte im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei TNF-α (pg/ml). Dargestellt sind Box-Whisker-Plots pro Geschlecht und Messzeitpunkt. Die Verteilung der Messwerte unterscheidet sich innerhalb des 25% und 75% Perzentils stark und schwankt deutlich mit breiterer IQR bei den Frauen bis auf den Zeitpunkt C. m=männlich; w=weiblich

In der Bauch-Becken-Gruppe fällt eine homogene und gleichbleibende Verteilung der Messwerte vor und nach dem ersten Chemotherapie-Kurs auf. Ab dem Zeitpunkt C ist die IQR bei den Frauen sehr schmal, bei den Männern liegt nur hier das 25% Perzentil höher als zu den anderen Zeitpunkten (Abb. 36).

Die höheren Mittelwerte der Männer in der Bauch-Becken-Gruppe (Tabelle 27) sind zu Beginn am Messzeitpunkt A mit p=0,36 und nach der ersten Chemotherapie mit p=0,28 noch nicht signifikant. Im weiteren Verlauf der Therapie zeigt sich zu den Zeitpunkten C mit p=0,03 und D mit p=0,04 jedoch ein signifikant höherer Mittelwert bei den Männern.

Tabelle 27 Messwerte Bauch-Becken-Kohorte (BB) nach Geschlecht für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer BB N=11;9;8;7	117,89±49,83	112,09±53,92	121,67*±55,33	120,98*±56,43
Frauen BB N=14;9;10;8	82,16±58,38	77,38±54,09	49,82±32,38	53,63±33,06

Die Werte sind angegeben in als Mittelwerte ± SD; *p≤0,05

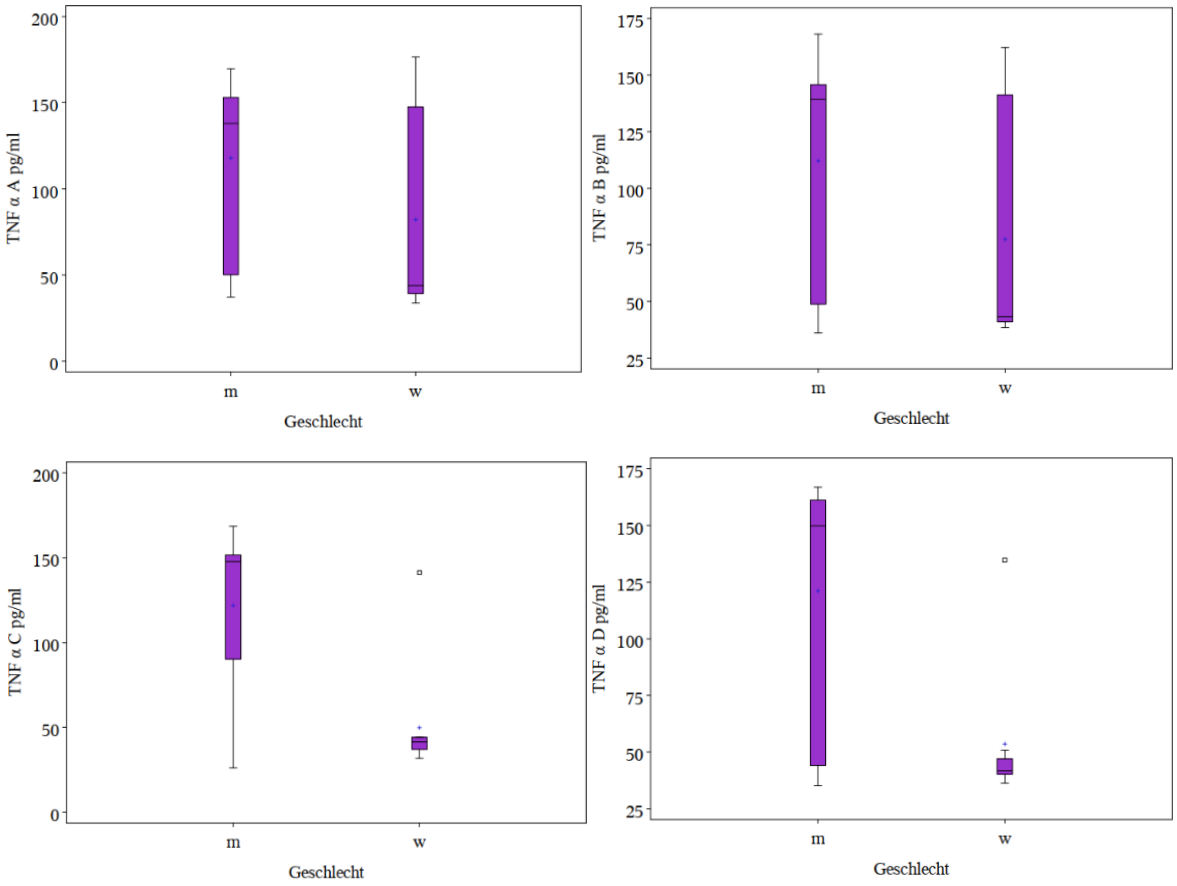


Abb. 36: Bauch-Becken-Patienten im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei TNF-α (pg/ml). Bei den Frauen ist der Wertekorridor der IQR50% zu den Zeitpunkten C und D wesentlich enger als bei den Männern. m=männlich; w=weiblich

Bei den Kopf-Hals-Entitäten ist die Verteilung zwischen den Geschlechtern ähnlich inhomogen. Nach initial vergleichbarer Spreizung der Werte zeigt sich ab dem Zeitpunkt B bei den Männern durch ein höheres 25% Perzentil insgesamt eine engere Verteilung der Messwerte innerhalb der IQR50% und auch die Maxima liegen höher, wohingegen die Minima bei den Geschlechtern vergleichbar bleiben (Abb.37). Die Unterschiede der leicht ansteigenden Mittelwerte (siehe Tabelle 28) in beiden Gruppen sind bei dem mit p=0,67, p=0,87, p=0,11 sowie p=0,16 im Gegensatz zu den Messzeitpunkt C und D in der Bauch-Becken-Gruppe statistisch zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Tabelle 28 Messwerte Kopf-Hals-Kohorte (KH) nach Geschlecht für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer KH N=20;21;16;14	118,05±51,87	122,40±46,10	130,07±42,61	126,66±45,06
Frauen KH N=4;5;4;3	95,17±57,45	104,40±55,64	93,29±56,40	106,04±56,18

Die Werte sind angegeben in als Mittelwerte ± SD

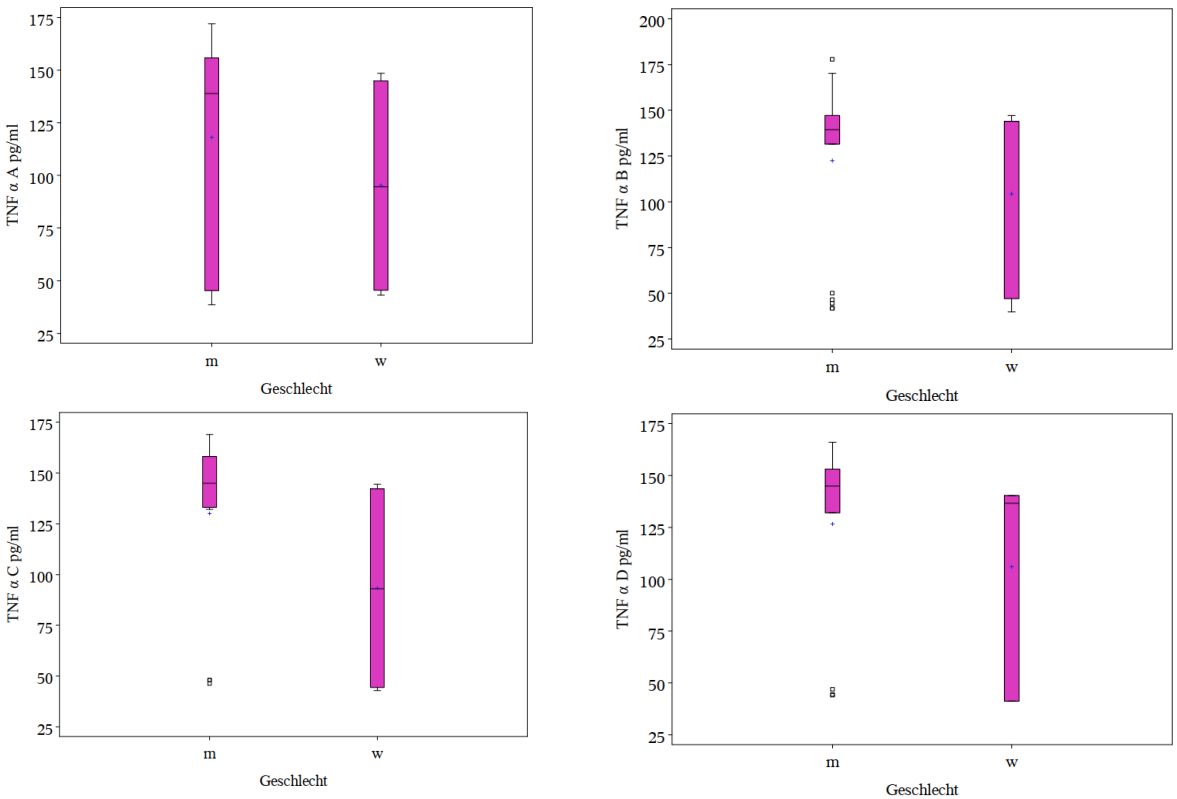


Abb. 37: Kopf-Hals-Gruppe im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei TNF-α (pg/ml). Die dargestellten Boxplots sind am Messzeitpunkt A zwischen beiden Geschlechtern kaum zu unterscheiden. Im Verlauf der Therapie ist die IQR50% bei den Männern sehr eng gefasst, bei den Frauen ändert sich nur wenig an der Verteilung der Messwerte. m=männlich; w=weiblich

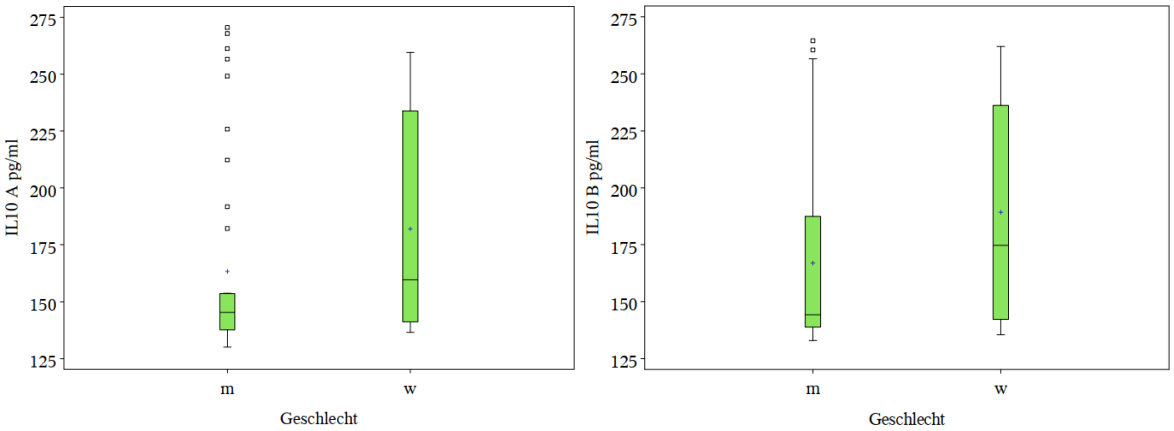
3.4.2 Interleukin 10

Die Verteilung der Messwerte ist konträr zwischen Männern und Frauen über die gesamte Therapie. Die IQR50% ist bei den männlichen Patienten wesentlich enger als bei den Frauen, die eine größere Verteilung von 50% der Messwerte über alle Messzeitpunkte zeigen. Die Maximalwerte liegen bei den Männern im Bereich von 270 pg/ml etwas höher als bei den Frauen um 260 pg/ml. An dieser Verteilung ändert sich bis zum Messzeitpunkt D hin kaum etwas, das untere 25% Perzentil und die Minima bleiben vergleichbar (siehe Abb. 38). Die höheren MW der Frauen gegenüber den Männern, mit ansteigendem Muster und den höchsten Werten bei D und C (siehe Tabelle 29), zeigen sich zum Zeitpunkt A mit p=0,052 schwach signifikant, bei B mit p=0,14 nicht signifikant, bei C mit p=0,03 signifikant und am Ende bei D mit p=0,19 nicht signifikant.

Tabelle 29 Messwerte gesamte Tumorkohorte nach Geschlecht für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer gesamt N=31;30;24;21	163,30±42,48	166,87±44,64	167,11±47,03	171,21±51,41
Frauen gesamt N=18;14;14;11	182,02(*)±45,42	189,20±49,34	207,45*±45,35	201,41±46,56

Die Werte sind angegeben in als Mittelwerte ± SD; (*)p≤0,1; *p≤0,05



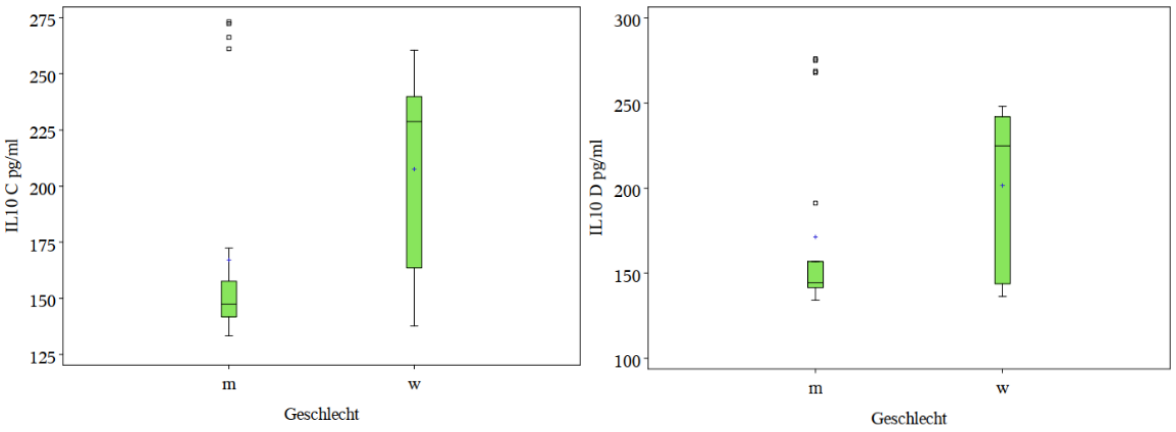


Abb. 38: Gesamte Patientenkohorte im Vergleich der Geschlechter zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-10 (pg/ml). Dargestellt sind Boxplots pro Geschlecht und Messzeitpunkt (A und B S. 63 unten; C und D S 64 oben). Die Verteilung der Messwerte unterscheidet sich innerhalb des 25% und 75% Perzentils. m=männlich; w=weiblich

Bei den Bauch-Becken-Tumoren fällt eine ähnliche Verteilung der Messwerte auf. Die IQR50% ist auch hier beim weiblichen Geschlecht breiter mit insgesamt höherem 25% und 75% Perzentil und ändert sich unter der Radiochemotherapie kaum. Bei den Männern sinkt das 75% Perzentil am Zeitpunkt C etwas ab. Die Maxima liegen bei den Männern zwischen 256 pg/ml bis 275 pg/ml und bei den Frauen mit 247 pg/ml bis 255 pg/ml etwas tiefer (siehe Abb. 39)

Der Unterschied der höheren Mittelwerte der Frauen gegenüber den Männern (siehe Tab. 30) ist zum Messzeitpunkt A mit p=0,03 signifikant, zum Zeitpunkt B mit p=0,28 nicht signifikant, zum Zeitpunkt C mit p=0,056 nur schwach signifikant und am Ende zum Zeitpunkt D mit p=0,14 erneut nicht signifikant.

Tabelle 30 Messwerte Bauch-Becken-Kohorte (BB) nach Geschlecht für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer BB N=11;9;8;7	161,36±38,11	166,50±42,26	165,29±39,87	171,19±49,43
Frauen BB N=14;9;10;8	194,74*±41,95	192,27±47,29	213,12(*)±40,81	213,38±42,89

Die Werte sind angegeben in als Mittelwerte ± SD; (*)p≤0,1; *p≤0,05

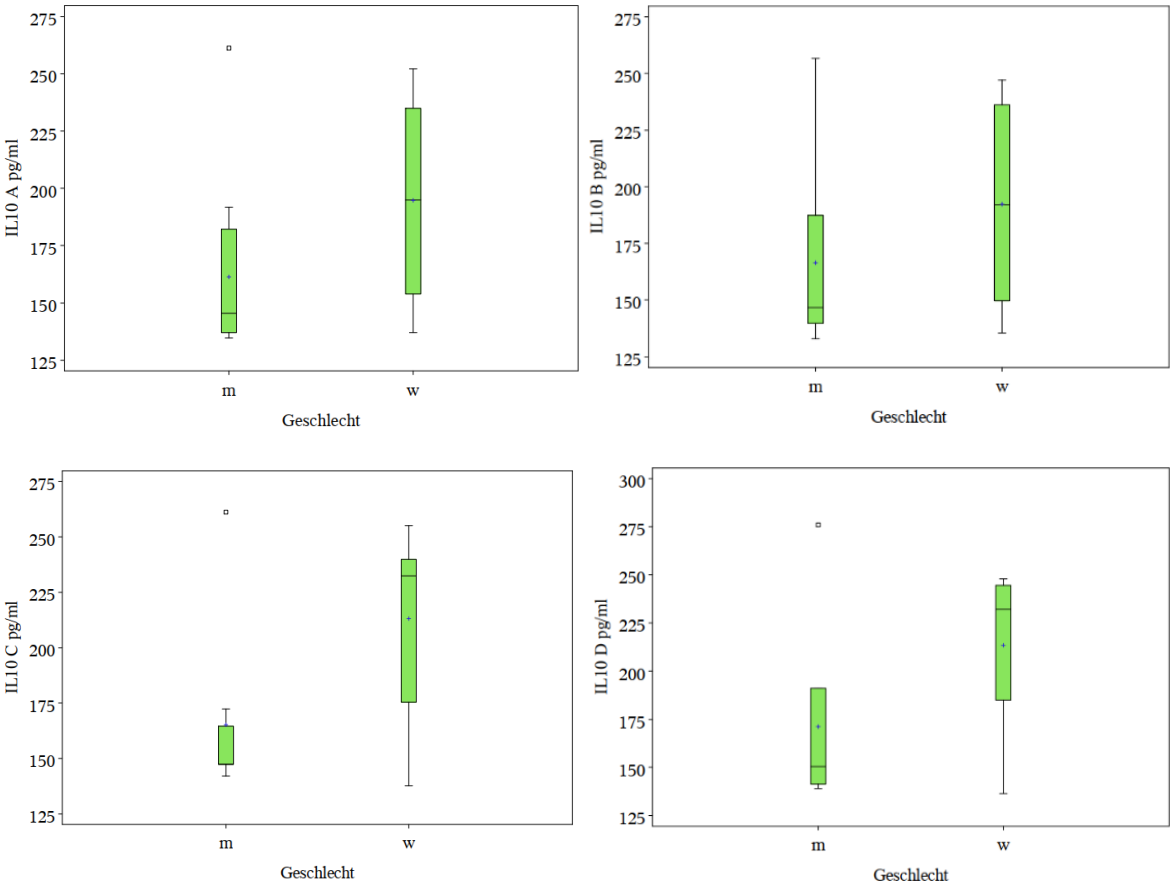


Abb. 39: Bauch-Becken-Patienten im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-10 (pg/ml). Die Streuung der Messwerte unterscheidet sich zwischen beiden Geschlechtern deutlich. Bei den Frauen ist der Wertekorridor der IQR50% wesentlich breiter. Bei beiden Geschlechtern ändert sich die Verteilung der Messwerte unter der Radiochemotherapie wenig. Bei Männern ist das 75% Perzentil am Zeitpunkt C am tiefsten. m=männlich; w=weiblich

Bei den Kopf-Hals-Entitäten ist die Verteilung der Messwette zwischen den Geschlechtern bei der Ausgangsmessung nah beieinander. Nach der ersten Chemotherapie sinkt das 75% Perzentil bei den Männern von 219,04 pg/ml auf 157,16 pg/ml und bleibt bis zum Ende auf diesem Niveau. Bei den Frauen ändert es sich nur geringfügig. Die Maximalwerte bleiben bei den Männern und den Frauen auf vergleichbaren Niveaus bei 260-270 pg/ml (Abb. 40). Die Mittelwerte nehmen vor allem bei den Frauen am Ende ab und sind zu allen Zeitpunkten höher als bei den Männern, wo die Schwankung gering ist (Tabelle 31). Bei dem beschriebenen Geschlechterverhältnis sind die Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Geschlechtern mit p=0,84, p=0,51, p=0,5 und p=1,0 im Gegensatz zur Bauch-Becken-Gruppe zu keinem Messzeitpunkt signifikant.

Tabelle 31 Messwerte Kopf-Hals-Kohorte (KH) nach Geschlecht für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

	A	B	C	D
Männer KH N=20;21;16;14	175,61±49,69	167,03±46,64	168,02±51,45	171,21±54,20
Frauen KH N=4;5;4;3	196,06±63,86	183,68±58,12	193,28±59,50	169,47±47,91

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± SD

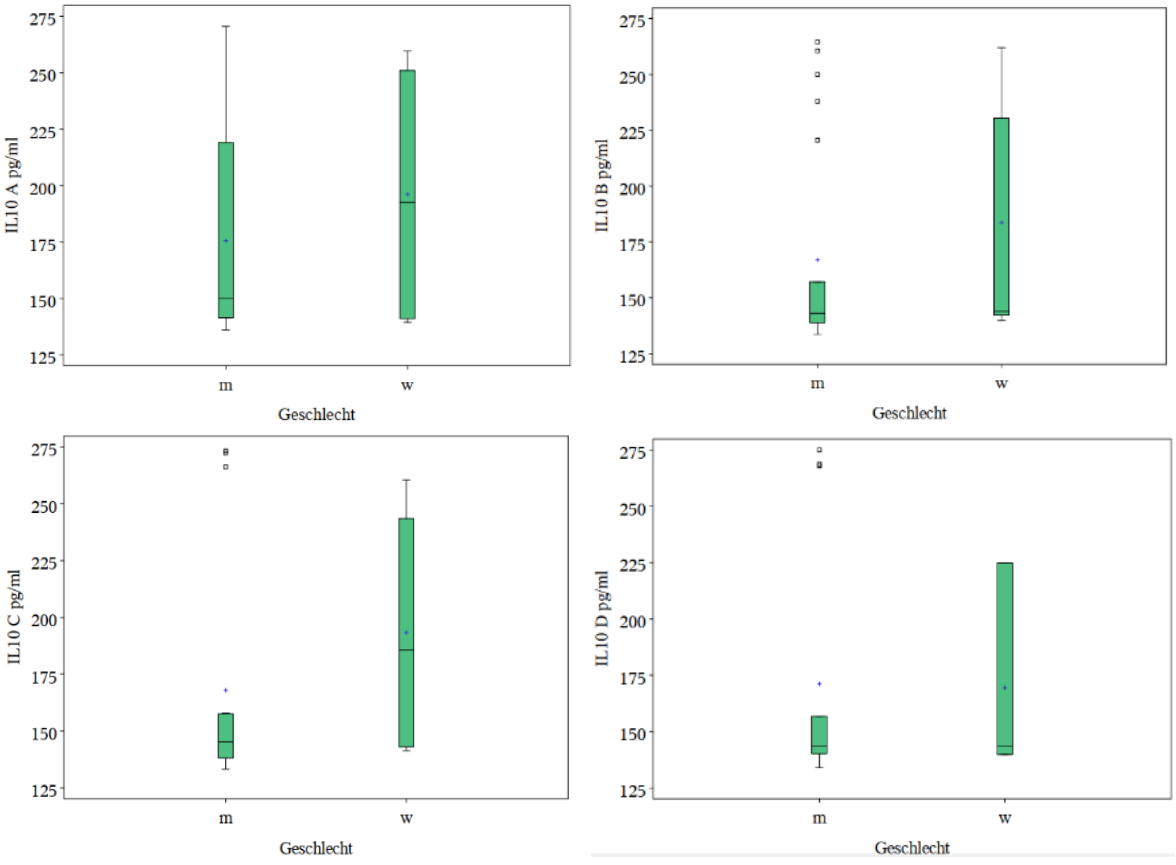


Abb. 40: Kopf-Hals-Kohorte mit männlichen und weiblichen Patienten zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-10 (pg/ml). Die dargestellten Boxplots sind hier am Messzeitpunkt A zwischen beiden Geschlechtern nur gering im Unterschied. Ab dem ersten Chemotherapie-Zyklus ist die IQR50% bei den Männern deutlich enger, wodurch die Maximalwerte als außreißerverdächtig deklariert werden. Bei den Frauen bleibt die Verteilung über den Verlauf nahezu konstant. m=männlich; w=weiblich

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen der pro- und antiinflammatorischen Cytokine IL-6, TNF-α und IL-10 zu vier Zeitpunkten vor, während und nach simultaner Radiochemotherapie bei Patienten mit Bauch-Becken- und Kopf-Hals-Tumoren sowie einmalig bei einer gesunden Gruppe gemessen. Damit sollen Unterschiede vor Beginn und unter der simultanen Therapie aus Bestrahlung und Zytostatika zwischen den beiden Patientengruppen sowie Gesunden untersucht werden. Bei den verwendeten ELISA-Kits handelt es sich um experimentelle und keine diagnostischen Kits, sodass in der klinischen Routine verwendete Grenzbereiche, die sich in der Literatur finden lassen, nur eingeschränkt übertragen werden können. Ferner ist zu bemerken, dass sich die Detektionsbreiten und Referenzbereiche je Labor und eingesetzter Analyseverfahren heterogen ausgestalten, wodurch direkte Vergleiche von Messwerten im Bereich der Cytokin-Analytik verkompliziert werden. Aus den hier erhobenen Resultaten werden mögliche Rückschlüsse auf die immunogene Aktivierung im Rahmen der onkologischen Grunderkrankungen gezogen. Die vorliegenden Ergebnisse werden jeweils pro Cytokin mit Bezug auf den aktuellen Stand der Literatur diskutiert und die Effekte der Radio- und Chemotherapie eingeordnet. Anschließend werden weitere Aspekte der erhobenen Befunde in Zusammenschau mit der Rolle des Mikrobioms im Darm sowie dessen Integrität eruiert. Ferner wird abschließend die Aktivität von Serum-Cytokinen als Ausdruck für chronische Krankheitsprozesse wie Tumorentitäten thematisiert und wird auf mögliche Chancen der frühzeitigen Diagnostik und Prävention geblickt.

4.1 Interleukin-6

Die Mittelwerte des Surrogatmarkers IL-6 liegen bei den Bauch-Becken-Entitäten bei 183,85 pg/ml und bei den Kopf- Hals-Tumoren bei 183,45 pg/ml gegenüber 91,16 pg/ml bei nicht onkologisch Erkrankten. Beide Patientengruppen zeigen vor radiochemotherapeutischer Intervention gegenüber den gesunden Probanden signifikant bzw. schwach signifikant erhöhte Basalspiegel im Serum. Bezüglich der Referenzbereiche gilt, dass verschiedene Kits zu experimentellen und diagnostischen Verfahren unterschiedliche Referenzbereiche angeben. Allgemein gelten Werte in der klinischen Diagnostik zwischen 30-100 pg/ml als grenzwertig bis leicht erhöht (Thomas, et al., 2005).

SIRS und Sepsis gehen in der Regel mit Werten ab 500 bis >1000 pg/ml einher (Harbarth, et al., 2001). Bei den Gesunden dieser Arbeit liegt der Mittelwert mit bereits 96,1 pg/ml eher hoch, bei beiden Patientengruppen finden sich im Mittel erhöhte Werte und die Maxima reichen bis knapp an die Grenzen für ein beginnendes SIRS. Diese Ergebnisse decken sich mit Erhebungen von Knüpfer & Preiss sowie Shuichi et al.. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass bei Patienten mit verschiedenen abdominellen Tumorentitäten wie dem Kolorektalen Karzinom und dem Pankreaskarzinom IL-6 erhöht ist (Knüpfer, et al., 2010; Shuichi, et al., 1998). Ferner ist auch bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen, dass IL-6 gegenüber Gesunden gesteigert ist (Riedel, et al., 2005).

In weiteren Studien haben Duffy et al. bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und De Vita et al. bei gastrointestinalen Tumoren erhöhtes IL-6 beschrieben, welches auch mit der Rezidiv- und Überlebensrate assoziiert ist. Im Fall der gastrointestinalen Tumoren jedoch scheint IL-6 als alleiniger Prognosemarker ungeeignet zu sein (Duffy, et al., 2008; De Vita, et al., 2001).

In dieser Arbeit liegen die Mittelwerte bei der Bauch-Becken-Kohorte ohne signifikanten Unterschied fast gleichauf mit den Kopf-Hals-Patienten. Dies stützt die Überlegung, dass die vorgeschaltete Lage der immunologischen Organe in der Kopf-Hals-Region und der dortige erste Kontakt mit Erregern und Noxen aus der Umgebung auch eine Aktivierung der proinflammatorischen Achse mit sich bringen kann, ohne dass jedoch der Unterschied zu Patienten mit Tumoren in der Bauch-Becken-Region signifikant ausfallen muss. Zumal neuere Untersuchungen wie von Hayes et. al. davon ausgehen, dass auch das orale Mikrobiom bzw. die dortige Flora als ein Faktor der bei der Entstehung von Tumoren im Aerodigestivtrakt mit zu berücksichtigen sind (Hayes, et al., 2018).

Über den Verlauf der Radiochemotherapie zeigen die Messwerte einige Schwankungen und ist der Einfluss durch die Strahlenchemotherapie auch messbar. So zeigen die Mittelwerte in der Bauch-Becken-Gruppe zu den letzten Messzeitpunkten eine Zunahme, wohingegen bei Kopf-Hals-Entitäten die Werte kontinuierlich sinken und am Ende um 24% tiefer liegen. Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.

Im Gegensatz zu experimentellen Daten von Reers et al., die Kulturen von Kopf-Hals-Tumorzellen unter den Einfluss einer Radiochemotherapie bis 18Gy, 5-FU und Cisplatin gesetzt haben, lassen sich in der vorliegenden Humanstudie keine signifikanten Mittelwertdivergenzen innerhalb der jeweiligen Patientengruppe über den Therapieverlauf feststellen (Reers, et al., 2013).

Es zeigen sich überdies keine statistisch signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich zwischen den Patienten mit Bauch-Becken- und Kopf-Hals-Tumoren zu den jeweiligen Messzeitpunkten A bis D, wohl aber nimmt die Verteilungsbreite der Messwerte in der Kopf-Hals-Gruppe zum Ende hin ab. Bei den Bauch-Becken-Patienten hingegen ist die Streuung zum Ende zunehmend, was für einen Einfluss der immunologisch flächenmäßig größeren Darmabschnitte gegenüber den begrenzteren Arealen der Kopf-Hals-Region sprechen könnte. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, als dass sie tatsächlich ein durch die radiochemotherapeutische Intervention in den unterschiedlichen Regionen abweichendes Reaktionsmuster zeigen. Kritisch zu bemerken ist, dass der abnehmende Stichprobenumfang bei den späteren Messzeitpunkten möglicherweise die tatsächlichen Schwankungen etwas vermindert.

Die Datenlage ist zu dieser Thematik leider nicht sehr ergiebig. Untersucht wurde bisher, dass die gesteigerte IL-6 Signalkaskade, welche bei Tumorpatienten unabhängig der therapeutischen Interventionen messbar ist, potenziell die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen vermag (Duan, et al., 2015). Auch weisen experimentelle Daten darauf hin, dass eine Blockade der IL-6-Signalgebung mit konsekutiver Verminderung der STAT3-Aktivierung die zytostatischen Effekte von Carboplatin verstärken kann (Wang, et al., 2016).

Warum liegt IL-6 bei den Tumorentitäten unabhängig der Lokalität durchweg erhöht vor? Diesbezüglich geben molekulare Mechanismen der Tumorzell-Mikroumgebung mögliche Aufschlüsse, ebenso wie Teilaspekte der Pathomechanismen von zellulärer Entartung berücksichtig werden müssen. Tumorzellen und ihre Mikroumgebung aus Endothel- und Immunzellen zeigen eine herabgesetzte Synthese von Antitumor- und Zellkontrolleffektoren und eine verminderte Apoptosebereitschaft.

Durch Anpassungsstrategien der Mitochondrien an höhere Konzentrationen von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit Hilfe des durch IL-6 vermehrt gebildeten Hypoxie-induzierten Faktors (HIF) kann der sonst durch die ROS ausgelöste Defekt mitochondrialer Membranen, der zu Störungen der Ionen-Homöostase und dem Zusammenbrechen des Zellstoffwechsels mit nachfolgender Apoptose führt, von Tumorzellen abgewendet werden (Ralph, et al., 2010). Ferner ergibt sich eine gesteigerte Angiogenese der Tumorumgebung, die durch IL-6 ebenfalls gefördert wird (Gopinathan, et al., 2015). IL-6 generiert über die pg130-JAK/STAT-Signalkaskade und insbesondere anhaltender STAT3 Aktivierung eine gesteigerte Produktion von VEGF-mRNA und damit vermehrte Bildung von VEGF in Fibroblasten, wodurch es zu einer Akzelerierung der Gefäßneubildung im Tumorgewebe kommt (Yu, et al., 2009; Waldner, et al., 2012). Hierdurch ermöglichen sich Tumorzellen selbst eine optimierte Bereitstellung der für das Wachstum benötigten Ressourcen, insbesondere an Glukose und weiteren Nährstoffen. Die gesteigerte Stoffwechselaktivität von vielen Tumorzellen mit erhöhtem Glukose-Umsatz lässt sich diagnostisch mittels des radioaktiven *Tracers* 2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (^{18}F-FDG) in der Positronen-Emissions-Tomografie (PET) nutzen (Croteau, et al., 2016).

Hier bieten sich weitere therapeutische Ansätze, bei denen unter anderem beim Kolorektalen und dem Ovarialzell-Karzinom versucht wird, mit IL-6-Rezeptor-Antikörpern wie Sunitinib die Angiogenese zur verhindern und die Verbindungen zwischen Tumor und versorgender Mikroumgebung zu unterbrechen (Nagasaki, et al., 2014; Hsu, et al., 2011).

Auch Lebensstilfaktoren haben einen erheblichen Einfluss bei der Entstehung und Prognose der untersuchten Malignitäten und auf die Cytokin-Konzentrationen. So sind die Assoziationen zwischen Tabak- und Alkoholkonsum und Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes wiederholt gut belegt (Maso, et al., 2016). Noch dünn ist dagegen die Datenlage betreffs konkreter Einflüsse dieser Noxen auf die IL-6 Konzentrationen. Sunyer et al. sowie Koo & Han konnten aufzeigen, dass durch Tabakkonsum IL-6 codierende Gene in ihrer Aktivität verändert und auch Serumwerte beeinflusst werden (Sunyer, et al., 2009; Koo, et al., 2016). Solide belegt ist der Einfluss von physischer Aktivität auf die IL-6 Konzentrationen. Durch vermehrte Muskelanstrengung wird temporär vermehrt IL-6 von Myocyten freigesetzt, was u.a. metabolische Effekte mit gesteigerter Glykogenolyse und Lipoyse auslösen kann (Reihmane, et al., 2014).

Außerdem werden durch die Muskelaktivität weitere Adaptationsmechanismen eingeleitet. Die beim Tumor und dessen Mikroumgebung unerwünschten Effekte über die JAK/STAT3-Kaskade und Aktivierung von VEGF-Produktion in Fibroblasten führt in gesundem Muskelgewebe zur Anpassung mit verbesserter Mikrokapillarisierung und Steigerung von Kraft und Ausdauer. IL-6 vermag hier insbesondere die für regenerative Aufgaben in der myocytären Umgebung wichtigen Satellitenzellen zu stimulieren (Muñoz-Cánoves, et al., 2013). Wie durch Fischer gezeigt wurde, führen die bei Gesunden kurzzeitig gesteigerten IL-6 Werte nach Training im Mittel zu tieferen Basalspiegeln und erklären somit außerhalb der pathologischen Tumorkonstellation die vermeintlich gegenläufigen Effekte von IL-6 mit den positiven Auswirkungen von regelmäßigem Training (Fischer, 2006). Kontrovers dazu ist die Rolle von IL-6 im Rahmen der Tumorkachexie zu sehen. So sind bei chronisch erhöhten IL-6 Leveln, wie sie auch in dieser Arbeit bei sämtlichen Tumorentitäten festgestellt wurden, negative Aspekte wie vermehrte Proteindegradation, erhöhter oxidativer Stress und Depletion der Glykogenspeicher kritisch zu betrachten (Baltgalvis, et al., 2010).

Bei der geschlechtsgegliederten Auswertung vor der Radiochemotherapie zeigen sich in der Gesamtheit der Patienten zwischen männlichen und weiblichen Probanden insgesamt ab dem Zeitpunkt nach der ersten Chemotherapie signifikant höhere Mittelwerte bei den Frauen. In den Untergruppen der Bauch-Becken- und Kopf-Hals-Tumore ließen sich hingegen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Bei einer bereits erwähnten Analyse von 32 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren fanden sich zwar erhöhte IL-6 Werte in Serum und Speichel, Unterschiede zwischen den Geschlechtern wurden jedoch ebenfalls keine festgestellt (John, et al., 2004). Kritisch zu bemerken ist, dass die Geschlechterverteilung bei den Kopf-Hals-Patienten im Gegensatz zu den Bauch-Becken-Tumoren nicht ausgewogen ist und valide Aussagen etwas erschwert.
Daten aus Analysen von Patienten mit schweren Traumata zeigen eher bei Männern höhere Quoten für multiples Organversagen und nosokomiale Infektionen bei gesteigerten IL-6 Messwerten (Sperry, et al., 2008). Versuche mit genetisch modifizierten ApcMin/+ Mäusen, die eine erhöhte Prädisposition für gastrointestinale Tumore haben, führen beim männlichen Geschlecht zu verstärkten IL-6r und SOCS3-Konzentrationen im Muskelgewebe (Hetzler, et al., 2015). Zusammenhänge zwischen Inflammation und der Rolle des Intestinums werden unter Kapitel 4.4 „Darm, Mikrobiom und Inflammation“ diskutiert.

4.2 Tumornekrosefaktor-alpha

Mit TNF-α wurden bei dem zweiten, tendenziell entzündungsfördernden Cytokin in beiden Patientenkohorten gegenüber den Gesunden als auch im Vergleich untereinander keine signifikanten Differenzen vor Anbeginn der Radiochemotherapie gemessen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in beiden Patientengruppen vergleichbar erhöhte TNF-α Spiegel. Dabei liegen die Mittelwerte in der Bauch-Becken-Kohorte mit 97,88 pg/ml und bei den Kopf-Hals-Patienten mit 114,23 pg/ml unter den Gesunden mit 139,70 pg/ml. Die Werte liegen allerdings bei den Gesunden in einer sehr engen Spanne nur zwischen 127,99 bis 154,82 pg/ml, bei den Patienten ist der Wertebereich zwischen 33,59 bzw. 38,55pg/ml bis 176,55 pg/ml bzw. 172,02 pg/ml erheblich breiter. Wodurch diese höheren Mittelwerte bei den Gesunden zustande kommen, ist nicht zweifelsfrei zu klären.

Generell stellt auch TNF-α analog zu IL-6 einen der zentralen Mediatoren in der Bekämpfung von als pathologisch beurteilten Komponenten dar. Unter anderem wird es von aktivierten Makrophagen nach deren Stimulation durch LPS-LBP oder T_H-1 Zellen aus Speicher-Granula entleert und begünstigt die Endothelzellaktivierung, erhöht damit dessen Durchlässigkeit und führt zur Diapedese weiterer Immunzellen (Murphy, et al., 2014).
Ähnlich dem IL-6, mit dem es teils synergistisch wirkt, steuert auch TNF-α der Mikroumgebung der Tumorzellen die beschriebenen und bei konstantem Vorliegen für dessen Wachstum zuträglichen Effekte bei, die bei Gesunden jedoch zu einer Begrenzung der unkontrollierten Zellteilung beitragen: während die Kaskade über TNFR1 – TRADD – FADD zur Aktivierung der pro-apoptotischen Effektor-Caspase 3 führt, bedeuten die mehrgliedrigen Signalwege über TNFR2 – TRAF und Januskinase – AP1, p38MKK oder IκBα und Hemmung von NF-κB eine Aufrechterhaltung der Inflammation und Prolongierung des zellulären Überlebens (Ham, et al., 2016).

Im Verlauf der Radiochemotherapie kommt es in beiden Kohorten zu Schwankungen der TNF-α Messwerte. Die gemittelten Werte sind bei den Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren höher, vor der zweiten Chemotherapie-Applikation auch signifikant höher, als in der Bauch-Becken-Gruppe und steigen an, wohingegen sie bei dieser fallen. Die Abweichung innerhalb der Gruppen ist über den Verlauf nicht von statistischer Signifikanz gegenüber den Ausgangswerten. Bei den Kopf-Hals-Patienten steigt das 25% Perzentil ab dem zweiten Chemotherapie-Kurs an.

Hier zeigen sich also durchaus Einflüsse durch die radiochemotherapeutische Behandlung, ohne aber, dass eindeutig die immunologisch großflächigere Darmregion gegenüber des kleineren Kopf-Hals-Areals als ursächlicher Faktor ausgemacht werden kann.

Das unter Strahlenbelastung von Geweben TNF-α Werte ansteigen können, haben auch Versuche zur Regulierung strahleninduzierter Lungenschäden mit dem Saponin der Süßholzwurzel - Glycyrrhizinsäure (Lakritz) - sowie Pentoxifyllin gezeigt, welche beide diese Effekte abmildern konnten (Rübe, et al., 2002; Refahi, et al., 2015).
Reers et al., die Kopf-Halstumorzelllinien unter den Einfluss von 5-FU, Cisplatin und Bestrahlung bis 18Gy gesetzt hatten, stellen in Bezug auf TNF-α ebenfalls kontroverse Ergebnisse mit teils steigenden, teils fallenden Werten fest (Reers, et al., 2013).

In der hiesigen Arbeit liegen in beiden Gruppen die höchsten Werte am Ende der simultanen Therapie mit Cisplatin, 5-FU und Radiatio bei der Kopf-Hals-Kohorte und bleibt in der Bauch-Becken-Gruppe die die Verteilungsbreite der Messwerte bis zum Ende am größten mit den abnehmenden Mittelwerten. Hierbei ist zu bemerken, dass durch den Einfluss der Zytostatika eine passagere Knochenmarksschädigung erzeugt und die Fähigkeit zu immunologischen Reaktionen zumindest vorübergehend reduziert werden kann (Karow, et al., 2011). Allerdings ist die hier eingesetzte Chemotherapie von geringerer Intensität als komplexere Polychemotherapien, die beim Mammakarzinom oder bei hämatologischen Systemerkrankungen angewendet werden (Davies, et al., 2012; Rasche, et al., 2014). Es bleiben daher wohl ausreichende Kapazitäten für eine proinflammatorische Immunzellreaktivität vorhanden. Jedoch ohne, dass, von Einzelfällen abgesehen, weitere Ressourcen für signifikant stärkere Ausschläge über das erhöhte Basallevel hinausgehend vorhanden sind.

Bei der nach Geschlecht gegliederten Auswertung liegen in der gesamten Tumorkohorte in der zweiten Hälfte der Radiochemotherapie bei den Männern signifikant höhere Mittelwerte vor als bei den Frauen. In der Bauch-Becken-Gruppe findet sich dieser signifikante Unterschied mit höheren Mittelwerten der Männer vor und nach dem zweiten Chemotherapie-Kurs ebenfalls wieder. In der Kopf-Hals-Gruppe ist dieser Unterschied nicht existent, wobei hier auf die Unausgewogenheit des Geschlechterverhältnisses hingewiesen werden muss.

Dass Frauen mit Bauch-Becken-Tumoren niedrigere TNF-α Werte aufweisen als Männer, könnte eine Bestätigung für Veränderungen der intestinalen Integrität mit gesteigerter proinflammatorischer Signalkaskade getriggert über LPS-LBP oder TLR4-MD2 sein. Untersuchungen von Aomatsu et al. mit humanen Neutrophilen Granulozyten unter LPS-Stimulation weisen ebenfalls bei Männern signifikant höhere TNF-α Level auf, als bei Frauen und zeigen eine stärkere proinflammatorische Kapazität (Aomatsu, et al., 2013).

Bei übergewichtigen Patienten, die ebenfalls im Vergleich zu Gesunden durch das Viszeralfett eine größere proentzündliche Aktivität haben, sind ebenfalls bei Männern höhere TNF-α Werte bekannt (Cartier, et al., 2009). Verwunderlich ist in diesem Kontext nicht, dass Übergewicht, insbesondere durch abdominelles Fettgewebe, einen Risikofaktor für onkologische Erkrankungen darstellt und die Prognose unter anderem vom Kolorektalen und vom Endometriumkarzinom verschlechtert (Rickles, et al., 2013; Klepsland-Mauland, et al., 2017). Fettgewebe ist als hormonell aktives Gewebe gut untersucht. Adipozyten produzieren neben dem anorexigenen Hormonen Leptin und dem Insulinmodulator Adiponektin auch zahlreiche Cytokine, verstärkt TNF-α und VEGF (Bastard, et al., 2006). Vermutlich wandern vermehrt aktivierte Makrophagen in das überschüssige Gewebe ein und verursachen eine intensivierte Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren (Galic, et al., 2010).

Divergent ablaufende Immunkaskaden zwischen Männern und Frauen, die sich auch in unterschiedlichen Prävalenzen von Autoimmunerkrankungen zeigen, werden auch auf die Effekte der verschieden konzentrierten Steroidhormone zurückgeführt. Bei Männern treten mehr Erkrankungen auf, die von einer akuten, zellulär-dominierten Antwort mit $CD8^+$-CTL, $CD4^+$-T_H1 sowie durch Makrophagen vermittelter Mediatorausschüttung gekennzeichnet sind. Hingegen überwiegen bei Frauen $CD4^+$-T_H2-Antikörper gesteuerte Prozesse. Dabei wirken Androgene wie Testosteron auf Zellkernebene stimulierend auf NF-κB und begünstigen die TLR4-MD2 vermittelte Signalantwort. Östrogene hingegen vermindern tendenziell die NF-κB Signalgebung und stimulieren gleichzeitig *T-cell-immunoglobulin-and-mucin-domain-containing-3* (Tim-3). Dieses steigert die regulatorische T-Zell-Aktivität und führt somit über eine verminderte TLR4-MD2 Signalgebung dämpfend auf die Ausschüttung von TNF-α und IF-γ. Dadurch kommt es bei Frauen zu einer Verschiebung hin zu der T_H2-vermittelten Antwort mit vermehrter IL-4 und IL-10 Sezernierung (Fairweather, et al., 2008).

Erklärbar könnten die hier gemessenen, höheren TNF-α Werte bei den männlichen Patienten weiter dadurch sein, dass durch das 17β-Östradiol der Frauen die Hemmung des NF-κB-Signalwegs die inflammatorische Kapazität begrenzt. Allerdings fällt bei Männern etwa ab dem 40. Lebensjahr der Testosteronspiegel (Wu, et al., 2008). Eine Untersuchung von Fleishman et al. an 428 männlichen Patienten mit nicht-Testosteronabhängigen Tumoren bei einem Durchschnittsalter von 62,05 Jahren ergab bei 48% sogar einen laborchemischen Hypogonadismus <3,00 ng/ml. (Fleishman, et al., 2010)

Diese sehr hohe Quote liegt damit deutlich über derjenigen der gesunden Normalbevölkerung, bei der, wie in der Baltimore Longitudinalstudie, etwa 20% der über 60-jährigen Männer hypogonadale Serumwerte <3,00 ng/ml aufweisen (Harman, et al., 2001). Womöglich reichen aber selbst verringerte Androgenspiegel aus, um die entsprechende NF-κB und die TLR4-MD2 Signalgebung zu unterstützen.

In der Zusammenschau sind somit bei Männern die Cytokin-stimulierenden Effekte der Androgene möglicherweise ein Triggerfaktor und bei den Frauen die Cytokin-bremsenden Einflüsse der Östrogene zusätzlich unter dem Einfluss der Radiochemotherapie begünstigende Faktoren, welche die signifikanten Unterschiede im Verlauf erklären können. Hier böten sich weitere Untersuchen an, die der Fragestellung nach veränderten Steroidhormon-Konzentrationen bei unterschiedlichen Tumorentitäten nachgehen.

Zukünftig werden Gender-spezifische Therapien mit Biologika, welche diese intergeschlechtlichen Unterschiede berücksichtigen, auch in der immunonkologischen Therapie wohl einen zunehmenden Platz in den Behandlungsregimen einnehmen (Mirandola, et al., 2015).

4.3 Interleukin-10

Der regulatorische Arm des Immunsystems wurde in der vorliegenden Arbeit durch die IL-10-Aktivität im Serum ermittelt. Dabei zeigen sich, kohärent zu dem proentzündlichen IL-6, hoch signifikante Divergenzen zwischen den beiden Patientenkohorten und den gesunden Probanden mit 180,05 pg/ml und 179,23 pg/ml gegenüber 140,1 pg/ml, wobei auffällt, dass die beiden Patientengruppen nahezu gleichauf liegen. Diese Werte decken sich mit Ergebnissen von Wang et.al., die bei Patienten mit Multiplem Myelom ähnlich hohe Mittelwerte von 167,19 pg/ml aufzeigen (Wang, et al., 2016). Auch O´Hara et.al. konnten bei Patienten mit fortgeschrittenem KRK erhöhte IL-10 Werte im Serum feststellen. Allerdings wurde hier nicht der Verlauf unter der Therapie ermittelt (O'Hara, et al., 1998).

Es ergeben sich in der aktuellen Arbeit einige Unterschiede in der Verteilung der IL-10 Messwerte über den Verlauf der Radiochemotherapie der beiden Patientengruppen. Bei den Tumorentitäten im Bauch-Becken-Bereich liegen 50% der Messwerte über den ganzen Verlauf in einem bereiteren Korridor, als bei den Kopf-Hals-Tumoren und bei diesen nimmt die Streuung der Werte zum Ende hin ab. Die Mittelwerte sind in der Bauch-Becken-Gruppe zu allen Messzeitpunkten höher als in der Kopf-Hals-Kohorte, jedoch liegt nur vor dem zweiten Chemotherapie-Kurs eine schwache Signifikanz vor. Die Werte divergieren sowohl zwischen als auch innerhalb der jeweiligen Patientenkohorte unter der Radiochemotherapie.

Hier könnten die Einflüsse der regionären Bestrahlung abdominal und pelvin ursächlich sein, der Zusammenhang ist aber allenfalls nur schwach erkennbar. In einer Untersuchung von Arpin et. al wurden bei Patienten mit NSCLC unter thorakaler Radiotherapie im Mittel ebenfalls keine signifikanten Veränderungen von IL-10, TNF-α und IL-6 festgestellt (Arpin, et al., 2005). Heidecke et. al. stellten bei Patienten mit Ösophaguskarzinom unter Radiochemotherapie zwar eine Affektion der Proliferationsaktivität von T-Lymphocyten fest, fanden jedoch ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der IL-2, IL-4 und IL-10 Spiegel (Heidecke, et al., 2002).

Ebenso wie bei den erhöhten Spiegeln von IL-6 vor Beginn der Therapie ist auch die modulatorische Aktivität des Immunsystems bei den onkologischen Patienten gegenüber Gesunden vor der Radiochemotherapie gesteigert. Das ist insofern erklärbar, als dass ein Organismus, ohne spezifischen Gendefekt, im Bestreben nach Homöostase auch die IL-10 Produktion sämtlicher Immunzellpopulationen steigert, wenn die Grundaktivität hochreguliert ist.

Da zudem IL-10 für die Proliferation des Tumors und dessen Umgebung auch nutzbringende Effekte haben könnte, sind die erhöhten Werte womöglich Ausdruck der multiplen Aufgaben von IL-10 in der immunonkologischen Situation (Mosser, et al., 2008) (Landskron, et al., 2014). Die Rolle von IL-10 im Rahmen der onkologischen Prozesse ist ambivalent. So kann IL-10 einerseits die Aktivität regulatorischer T-Zellen steigern und über anhaltende Aktivierung von STAT-1, -3 und -5 und SOCS-3 die Bindung von NF-κB an dessen Promoter blockieren und die Synthese der proentzündlichen Mediatoren bremsen. Hierdurch wird die proentzündliche Signalgebung mit ihren proliferativen Eigenschaften auf die Tumorzellen eingeschränkt (Dennis, et al., 2013). Versuche an IL-10-defizienten Mäusen zeigen eine deutliche Progredienz von mikrobiell-induziertem KRK mit Metastasierung und verstärkter Inflammation bei Ausfall der IL-10 Produktion in $CD4^+$-$CD25^+$ regulatorischen T-Zellen (Erdman, et al., 2003).

IL-10 vermag in höheren Konzentrationen auch die Aktivität von $CD4^+$-*Forkhead-box-Protein-3 positiven* (FOXP3+) T_{reg}-Zellen und deren Ausschüttung des proentzündlichen IL-17 zu vermindern und im Gegenzug $CD8^+$ T-Killer-Zellen mit tumorhemmenden Eigenschaften zu stimulieren. Hierdurch ergeben sich zentrale Eigenschaften von IL-10 in der Mediation der frühzeitigen Eliminierung von sich im unkontrollierten Entartungsprozess befindlichen Zellen, die einer raschen Apoptose oder Zytolyse vermittelt durch zytotoxische T-Zellen oder NK bedürfen. In Versuchen mit APCmin/$^+$/Bacteroides fragilis Mäusen mit KRK konnte oral supplementiertes IL-10 das Wachstum der Tumorzellen unterdrücken und bietet hier möglicherweise ergänzende therapeutische Optionen (Gu, et al., 2017).

Gleichwohl ermöglichen die pleiotropen Effekte des IL-10 den Tumorzellen auch eine Flucht vor den immunologischen Kontrollinstanzen. Bolpetti et al. konnten an Versuchen mit Mäusen zeigen, dass sich die Wachstumsrate von mit HPV-Subtyp 16 infizierten Zervixkarzinomzellen erhöht, wenn dort eingewanderte Makrophagen die IL-10 Produktion steigern und die regulatorische T-Zellaktivität anregen. Hier wird einmal mehr die Möglichkeit von *Escape*-Mechanismen durch maligne Zellen aufgezeigt, die je nach Region und Gewebetyp unterschiedliche Signalwege unterwandern und für sich nutzbar machen können (Bolpetti, et al., 2010). Sato et al. gehen sogar davon aus, dass eine Blockade von IL-10 Signalwegen über Impfungen oder Antikörper und dadurch eine Verbesserung der Th-1-vermittelten Immunantwort maßgeblich das Tumorwachstum hemmen könnte (Sato, et al., 2011).

Von vitaler Bedeutung bei Patienten unter platinhaltiger Chemotherapie sind ausreichende, endogene IL-10 Spiegel allerdings für die Blockade von TNF-α mRNA und *VCAM-1*, die in renalen Epithelzellen nach Ischämie induziert werden und die nephrotoxischen Effekte der Platinsalze mitverursachen (Deng, et al., 2001).

Für antitumorigene und antiangiogenetische Effekte von IL-10 spricht ferner auch, dass es jene für die Vitalität der Tumorzellen notwendige VEGF-Aktivität vermindern kann, wie Kohno et al. und Huang et al. an malignen Ovarialzellen bzw. Melanom- und Prostatazellen untersucht haben (Kohno, et al., 2003; Huang, et al., 1996). Wu et al. zeigen allerdings, dass nur bei Makrophagen der Phänotypklasse M1 aus dem Knochenmark mit NOS2-generiertem VEGF das IL-10 dessen Produktion vermindern kann, sich dieser Effekt bei hypoxischen Zuständen aber ins Gegenteil verkehrt. M2-Makrophagen mit Arginase-vermittelter VEGF-Erhöhung, wie sie im Milieu von Tumorzellagglomeraten vermehrt auftreten, reagieren auf Prostaglandinstimulation gar mit konstanter VEGF- und gesteigerter IL-10 Produktion, sodass externe Modulationen der IL-10 Signalgebung unerwartet proliferative Nebeneffekte haben könnten (Wu, et al., 2010).

Bei der nach Geschlecht gegliederten Auswertung zeigen sich teilweise Unterschiede zwischen Männern und Frauen. So liegen in der gesamten Tumorkohorte vor Therapiebeginn schwach signifikant erhöhte und unter Therapie vor der zweiten Chemotherapie-Gabe signifikant erhöhte Mittelwerte der Frauen vor.

In der Bauch-Becken-Gruppe liegen bei den Frauen vor Therapie mit 194,74 pg/ml zu 161,36 pg/ml signifikant höhere Mittelwerte vor. Im Verlauf der Therapie zeigt sich jedoch nur noch vor dem zweiten Chemo-Kurs eine schwache Signifikanz der erhöhten Werte der Frauen gegenüber den Männern. Bei den Kopf-Hals-Patienten findet sich bei den geringen Stichprobenumfängen bei Frauen kein signifikanter Unterschied, wenngleich auch hier die Werte höher liegen als bei den Männern, abgesehen von der letzten Messung.

Womöglich liegen die beschriebenen Unterschiede in der immunologischen Aktivität einer Dominanz der T_H2-Antikörper-Immunglobulin vermittelten Reaktion bei Frauen zu Grunde. Da IL-10 zwar von sämtlichen Immunzellpopulationen, insbesondere aber zusammen mit IL-4 von T_H2-Zellen ausgeschüttet wird, liegt hierin eine denkbare Erklärung. Es kann sein, dass abermals die lokoregionären Unterschiede der beiden Entitäts-Gruppen eine etwas stärkere Reaktion von IL-10 bei den Frauen der Bauch-Becken-Gruppe auslösen. Bei den Kopf-Hals-Patienten bleiben bei den Männern Mittelwert und Verteilungsbreite der Messwerte ohne statistische Signifikanz im Laufe der Therapie konstant, was nur für eine geringe Einschränkung der immunmodulatorischen Fähigkeiten in dieser Gruppe spricht. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern erkennbar, aber uneinheitlich über den Verlauf und die Einflüsse der Radiochemotherapie teilweise messbar, ohne dass eine klare Linie auszumachen ist.

Zusammenfassend scheint IL-10 je nach individueller Beschaffenheit der Tumorzellumgebung sowohl antitumorigene als auch proliferative Eigenschaften zu besitzen. Eine globalsystemische Blockade der IL-10 Signalgebung, ohne nur spezifisch wachstumsfördernde Wege wie über NOS2 und VEGF zu hemmen (Wu, et al., 2010) ist unter den gegenwärtigen Kenntnissen kritisch zu sehen und könnte in unerwünschter Weise das Tumorwachstum begünstigen und bei dem weit verbreiteten Einsatz von Platinderivaten deren Nebenwirkungen augmentieren.

4.4 Darm, Mikrobiom und Inflammation

Die Integrität der Darm-Mukosa als Ausdruck einer guten Gesundheit humanbiologischer Organismen lässt sich über die Aktivierung verschiedener immunologischer Marker beurteilen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen hier, korrelierend zu bisherigen Analysen, dass auch chronisch an verschiedenen Malignitäten erkrankte Patienten vermutlich eine veränderte Aktivierung im Bereich der Schleimhaut des Verdauungstraktes aufweisen und sich neue Therapiemöglichkeiten eröffnen (Bischoff, et al., 2018). Untersuchungen mit ursprünglich lebenden Völkern und Kulturen ergeben bei diesen vermehrt das Fehlen der in der westlichen Welt verbreiteten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems oder entzündlich-rheumatologischen Krankheiten (Kaplan, et al., 2017). Ausgrabungen und Untersuchungen an mehreren tausend Jahren alten Mumien in Ägypten und Südamerika lassen Spekulationen über ein nahezu vollständiges Fehlen von Krebserkrankungen dieser Völker zu (David, et al., 2010). Im Gegensatz dazu liegen ein höheres Stuhlvolumen und eine wesentlich umfangreichere mikrobielle Diversität z.B. bei den indigenen Stämmen der Yanomami in Lateinamerika vor (Clemente, et al., 2015).

Beschrieben sind auch Zusammenhänge zwischen Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa und der erhöhten Prävalenz gastrointestinaler Tumore (Dyson, et al., 2012; Canavan, et al., 2006). Bei diesen Erkrankungen stellen sich spezifisch entzündliche Aktivitäten der Darmmukosa an zumeist umschriebenen Abschnitten des Intestinums dar. Es kommt unter anderem zu der Aktivierung von STAT-3 und STAT-5 durch kontinuierliche Phosphorylierung vermittelt über IL-6, TNF-α und weiteren, proentzündlichen Mediatoren wie IL-17 und If-α.

Durch eine gesteigerte iNOS-Aktivität mit vermehrter NO-Bildung erhöht sich die Durchblutung der betroffenen Areale und verbessert sich die Zirkulation der Mediatoren, die den Prozess damit weiter protrahieren (Christophi, et al., 2012). Wie auch in der Mikroumgebung von Tumorkonglomeraten, steigt zudem auch bei CED die Produktion von VEGF an und liefert somit die Grundlage für infrastrukturelle Anpassungen der Blutversorgung (Hu, et al., 2015).

Diese chronisch ablaufenden Prozesse zeigen auf der molekularen Ebene deutliche Parallelen zu denjenigen des Tumormikromilieus, wo molekulare Behandlungsstrategien auch auf eine Blockade der VEGF-Signalgebung setzen (Finley, et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse mit teilweise gesteigerter, entzündlicher Aktivität bei allen Tumorentitäten könnten die These stützen, dass Alterationen der Darmflora durch ungünstige Lebens- und Ernährungsgewohnheiten in den westlichen Industrieländern für zahlreiche auch onkologische Erkrankungen mitverantwortlich sind und den Verlauf dieser beeinflussen können. Durch Bewegungsmangel, Alkohol und Tabak sowie eine ungünstige Lebensmittelauswahl mit hoher Kalorien- und Zusatzstoffkonzentration, aber geringer Mikronährstoff- und Ballaststoffdichte, werden den Darm-Mikroben unzureichende Substratmengen angeboten und ihre Zusammensetzung verändert sich (Menni, et al., 2017; Defois, et al., 2018)

Seit kurzem etablieren sich verbesserte Diagnoseverfahren, die zunehmend auch in der klinischen Routine gute Anhaltspunkte bei der Beurteilung des Zustands der Flora-Diversität sowie der inflammatorischen Aktivität im Humanorganismus liefern.
Mittels *Next-Generation-Sequencing* (NGS) und DNA-Mikrobiomanalyse kann inzwischen aus einer einfachen Stuhlprobe eine große Bandbreite der intestinalen Flora abgebildet und die Verteilung der Mikroben beurteilt werden (Koboldt, et al., 2013). Neue Biomarker wie Zonulin oder lösliches IgA *(sIgA)* können Hinweise für Störungen der lokalen Barriere liefern (Fasano, 2012; Sturgeon, et al., 2016). Durch Cytokin-Profile ist nach gezielter Stimulation mit Antigenen die Reaktivität von $CD4^+$ T-Zellen, Natürlichen Killerzellen oder Makrophagen mit der Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Markern wie IL-6, TNF-α, IL-10 und Weiteren individuell messbar (Alonso, et al., 2011; Damsker, et al., 2010)

Schwierigkeiten liegen derzeit noch in der eindeutigen Interpretation dieser Befunde und deren therapeutischer Konsequenzen. Es erscheint problematisch, Referenzwerte für ein normales Mikrobiom festzusetzen. Zwar lässt sich aus drei Leitgattungen der *Bacteroides, Firmicutes* und *Ruminococcus* zumeist ein dominierender Enterotyp mit gewisser Konstanz bestimmen. Die tatsächliche mikrobiellen Zusammensetzung unterliegt aber täglichen Schwankungen durch Nahrungsmittelauswahl, Medikamente (Antibiotika), Stress und anderen Noxen (Arumugam, et al., 2013).

Dennoch liefern die bisherigen Daten solide Belege für die Auswirkungen verschiedener Ernährungsstrategien oder die gezielte Zufuhr spezifischer Bakterien.
So ist *Akkermansia muciniphila* als ein die Darmschleimhaut schützendes und Barriere-stärkendes Bakterium gut untersucht, das zugleich proentzündliche Signalkaskaden drosseln kann. Zum einen regt es die Produktion von 2-palmitoyl-glycerol an, zum anderen vermindert es die LPS-induzierenden Effekte von E.coli generierten Vesikeln und verringert damit die über CD14 und TLR4-MD2 ausgelöste Cytokinproduktion in Makrophagen (Everard, et al., 2013; Hänninen, et al., 2018). *Faecalibacterium prausnitzii* ist einer der wichtigsten Produzenten kurzkettiger Fettsäuren (SCFA*)* wie der Buttersäure und hat durch T_H-17-hemmende Eigenschaften ebenfalls einen günstigen Einfluss auf die Immunreaktivität im Darm (Zhang, et al., 2014). Es zeigt sich bei CED vermindert und kann bei Supplementation die Entzündungsaktivität vermindern (Cao, et al., 2014).

Bewegung und sportliche Aktivität haben ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms und führen zu einer größeren Diversität (Monda, et al., 2017). Durch die selektive Auswahl von biologisch angebauten Lebensmitteln, magerem unverarbeitetem Fleisch und marinen Produkten wie Hering, Lachs oder Makrele mit geringer Schwermetallbelastung, jedoch hoher Konzentration der antiinflammatorisch wirkenden Omega-3-Fettsäuren Eicosapentaen- (EPA) und Docosahexaensäure (DHA), kann auf molekularer Ebene bereits im Intestinum die Grundlage für eine verminderte Inflammation im gesamten Körper gelegt werden (Costantini, et al., 2017). Wird zudem der Verbrauch von rotem Fleisch reduziert, das mit hohen Mengen der n-6-Arachidonsäure als Ausgangssubtrat für Enzyme mit proentzündlicher Wirkung wie Cyclo- (COX) und Lipoxygenasen (LOX) sowie TMAO als diskutiertem Kanzerogen die Inflammation und Tumorgenese begünstigen kann, summieren sich protektive Faktoren (Chai, et al., 2017).

Dass sich Veränderungen des Mikrobioms nicht nur ungünstig im Darm, sondern bereits in der Mundhöhle auf den gesamten Organismus und die Krankheitsentstehung auswirken können, lassen aktuelle Erhebungen vermuten (Yamashita, et al., 2017; Gao, et al., 2018).
Im Vergleich zu der inzwischen sehr profunden Studienlage betreffs des Darms und seiner Flora ist diese in Bezug auf die Mundhöhle derzeit aber noch sehr spärlich.

4.5 Schlussfolgerungen

Wie die vorliegende Ausarbeitung darlegt, können Cytokine ein Gradmesser für den immunologischen Aktivitätszustand in humanbiologischen Organismen sein. Gegenüber Gesunden sind in beiden Entitätsgruppen zwei der drei Mediatoren signifikant erhöht. Auch zwischen den Geschlechtern sind vor und unter der Radiochemotherapie volatile und teils signifikante Unterschiede, in tendenziell stärkerem Umfang bei Bauch-Becken-Tumoren, feststellbar, die durch immunonkologische Unterschiede von Männern und Frauen begründet sein können.

Inwieweit Rückschlüsse auf tumorigene Effekte und Wechselwirkungen durch Strahlen- und Chemotherapie tatsächlich zulässig sind, ist gegenwärtig widersprüchlich. Das in der Wissenschaft häufige „Henne-Ei-Problem“ tritt auch hier zu Tage. IL-6 und TNF-α können, im Verbund mit weiteren Mediatoren, über die zur zunächst zur Abwehr von Pathogenen erwünschte, wechselseitige Induktion von ROS zu Schäden an der zellulären Matrix führen. Im Regelfall kommt es zum Verlust des Funktionsapparates der pathogenen Partikel oder infiltrierten Zellverbände. Durch parallel dazu eingeleitete Gegenmaßnahmen über modulierende Mediatoren wie IL-10 oder IL-4 wird alsbald eine Re-Balancierung der Immunzellaktivität mit Normalisierung der Spiegel an proentzündlichen Mediatoren wie IL-6 und TNF-α oder Interferonen angestrebt. (Bulua, et al., 2011)

Anhaltende, womöglich subklinisch gesteigerte Spiegel der proinflammatorischen Signalgebung, wie teilweise bei den Patienten dieser Studie, und die Kombination aus Erbanlage, ungünstigen Lebensumständen, gestörter Darmflora sowie chronischen Erkrankungen führen kumulativ zu einer Schädigung der gesunden Infrastruktur humaner Zellen. Dieses ohne jene, bei Infektionskrankheiten wie einer Virusgrippe nur begrenzte und klinisch spürbare, Inflammation mit starkem Krankheitsgefühl. Im Normalfall wird die Energie-Homöostase einer infizierten oder kranken Zelle durch Permeabilitätsdefekte der mitochondrialen Membran so gestört, dass eine Apoptoseeinleitung über Bcl/Bax bzw. DD-TRADD-FADD und Effektor-Caspasen 8 und 9 eingeleitet wird (Löffler et al., 2014).

Sofern dieser Mechanismus jedoch nicht geregelt abläuft und die Zellen zügig eliminiert werden können, sind einerseits protrahiert mutagene Prozesse mit strukturellen DNA-Schäden und damit die Entstehung von nicht mehr kontrollierbaren Krebszellen möglich.

Andererseits lernen die entarteten Zellen durch die anhaltende, aber nur mäßige intensive Einwirkung der ROS, sich über HIF an den oxidativen Stress und die Hypoxie zu adaptieren und vermeiden dadurch den im Normalfall bei balancierter Immunlage eingeleiteten Zelltod (Ralph, et al., 2010). Die Tumorzelle erhält sich somit selbst mit Hilfe der für sie jetzt nutzbringenden Cytokine, die eigentlich für ihre Eliminierung zuständig sind. Cytokine könnten daher eine Art Blaupause für die Beurteilung ungünstiger onkogener Zustandsformen des Immunsystems darstellen und damit auch eine Rolle in der Früherkennung und Prävention von Tumorentitäten einnehmen. Unter Einbezug der geschlechterspezifischen Unterschiede in der immunologischen Signalgebung sind Gender-spezifische Molekulartherapeutika als Ergänzung der bisherigen Interventionen zunehmend denkbar (Mirandola, et al., 2015).

5 Ausblick

Die Möglichkeiten der labortechnisch-molekularmedizinischen Analytik und Therapie nehmen in einer beeindruckenden Geschwindigkeit zu. Die Integration von *Big Data* und die Synthese der Ergebnisse von einer zunehmenden Zahl kostengünstiger zu erhebenden Parametern stellen Herausforderung und Chance innerhalb eines Paradigmenwechsels in der Medizin dar. Durch die flächendeckende Digitalisierung und *Quantified-Self* mit leichtem Zugang zu Gesundheitsdaten werden die Optionen, für Ärzte wie Patienten frühzeitig individuelle Besonderheiten und Risikomarker zu ermitteln, stetig zunehmen.

Auch Cytokine können als schnell reagierende Marker bei richtiger Auswahl im Verbund eine rasche Interpretation von immunogenen Prozessabläufen in Humanorganismen ermöglichen. Cytokin-Profile, die nicht mehr nur speziellen Forschungslabors, sondern zunehmend auch der medizinischen Basisversorgung zugänglich werden, stehen für die Chancen, die sich in der Früherkennung und Prävention nicht nur onkologischer Erkrankungen bieten. Hier wäre eine Vereinheitlichung der Analysestandards zur besseren Vergleichbarkeit erhobener Parameter von großem Mehrwert.

Durch *direct-tracking* mittels vom Großlabor entwickelter App können die laboranalytischen Prozesse mittlerweile in Echtzeit auf mobilen Endgeräten mit dem Arzt und Patienten geteilt werden und therapeutische Interventionen unmittelbar erfolgen.
Herausforderungen für wissenschaftliche und ärztliche Kräfte sind der Umgang mit den großen Datenmengen und vor allem die Synopsis und Reduktion dieser zu validen, einfach anwendbaren und für die Patienten nützlichen Maßnahmen.

Der „Tod sitzt im Darm“, war der Arzt und Denker Paracelsus im 16. Jahrhundert überzeugt. Vielleicht ist die positiv konnotierte Formulierung „Der gesunde Darm ist die Wurzel aller Gesundheit“ des Hippokrates 300 v.Chr. zwar die chronologisch ältere, aber in Hinblick auf die vielversprechende Datenlage jüngere wie hoffnungsfrohere Botschaft.

Die Hoffnung auf eine weitere Reduktion der Inzidenzen und Verbesserung der Sterblichkeitsraten onkologischer Erkrankungen dürfte somit bei den Fortschritten sowohl in der (Risiko-)Früherkennung und Prävention als auch bei der Synergie chirurgischer, radiologisch-chemotherapeutischer und molekularbiologisch-immunonkologischer Therapieoptionen berechtigterweise weiter zunehmen.

Literaturverzeichnis

Alberts, B, et al. 2017. Molekularbiologie der Zelle. S. 1520ff.

Aomatsu, et al. 2013. Gender difference in tumor necrosis factor-α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon-γ. *Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 8;441(1):220-5*

Arasteh, et al. 2013. *Duale Reihe Innere Medizin.* Thieme, S. 421-422, 598 , 1347-1355.

Arpin, et al. 2005. Early variations of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels during thoracic radiotherapy are predictive for radiation pneumonitis. *J Clin Oncol. 2005 Dec 1;23(34):8748-56.*

Arumugam, et al. 2013. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature. PMC 2013 Jul 31.*

Aune, D, et al. 2011. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ. 2011 Nov 10 ; 343:d6617*

Baltgalvis und Carson. 2010. Interleukin-6 as a Key Regulator of Muscle Mass during Cachexia. *Exerc Sport Sci Rev. 2010 Oct; 38(4): 168–176.*

Bastard, et al. 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw. 2006 Mar;17(1):4-12*

Bernier, et al. 2005. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck. 2005 Oct;27(10):843-50*

Bettelli, E, et al. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T-cells. *Nature. 2006 May 11;441(7090):235-8*

Bischoff, et al. 2018. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol. 2014 Nov 18;14:189*

Böcker, W, Denk, H und Heitz, Ph.U. 2004. Pathologie, 3. Auflage. 2004, S. 62-63; 294-296.

Bolpetti, et al. 2010. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol. 2010 Jun 7;11:27*

Bulua, et al. 2011. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med. 2011 Mar 14; 208(3): 519–533*

Burd, Eileen M. 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev. 2003 Jan; 16(1): 1–17.*

Cao, Shen und Ran. 2014. Association between Faecalibacterium prausnitzii Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterol Res Pract. 2014;2014:872725*

Cartier, et al. 2009. Sex differences in inflammatory markers: what is the contribution of visceral adiposity? *Am J Clin Nutr. 2009 May;89(5):1307-14*

Chai, et al. 2017. Dietary Red and Processed Meat Intake and Markers of Adiposity and Inflammation: The Multiethnic Cohort Study. *J Am Coll Nutr. 2017 Jul; 36(5): 378–385*

Christophi, et al. 2012. Immune Markers and Differential Signaling Networks in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis. 2012 Dec; 18(12): 2342–2356.*

Clemente, et al. 2015. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv. 2015 Apr 3;1(3). pii: e1500183.*

Costantini, et al. 2017. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci. 2017 Dec; 18(12): 2645*

Croteau, et al. 2016. PET Metabolic Biomarkers for Cancer. *Biomark Cancer. 2016 Sep 20;8(Suppl 2):61-9.*

D`Souza und Dempsey. 2011. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med. 2011 Oct 1; 53(Suppl 1): S5–S11.*

Daïen, Claire Immediato Daïen, et al. 2017. Detrimental Impact of Microbiota-Accessible Carbohydrate-Deprived Diet on Gut and Immune Homeostasis: An Overview. *Front Immunol. 2017; 8: 548.*

David und Zimmerman. 2010. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer. 2010 Oct;10(10):728-33.*

Deng, et al. 2001. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int. 2001 Dec;60(6):2118-28.*

Dennis, et al. 2013. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol. 2013 Nov; 25(6): 637–645.*

Driessler, F, et al. 2004. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-κB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol. 2004 Jan; 135(1)*

Duan, et al. 2015. IL-6 signaling contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via the up-regulation of anti-apoptotic and DNA repair associated molecules. *Oncotarget. 2015 Sep 29;6(29):27651-60.*

Eck, M.J. und Sprang, S.R. 1989. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J.Biol.Chem. 264: 17595-17605.*

Elsea, Collin R ., Kneiss, Janet A und Wood, Lisa. 2015. Induction of IL-6 by Cytotoxic Chemotherapy Is Associated With Loss of Lean Body and Fat Mass in Tumor-Free Female Mice. *Biol Res Nurs. 2015 Oct; 17(5): 549–557.*

Engler, H, et al. 2017. Selective increase of cerebrospinal fluid IL-6 during experimental systemic inflammation in humans: association with depressive symptoms. *Molecular Psychiatry volume 22, pages 1448–1454 (2017) .*

Erdman, et al. 2003. CD4(+)CD25(+) regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):6042-50.*

Fairweather, Frisancho-Kiss und Rose. 2008. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *Am J Pathol. 2008 Sep; 173(3): 600–609.*

Finley und Popel. 2013. Effect of tumor microenvironment on tumor VEGF during anti-VEGF treatment: systems biology predictions. *J Natl Cancer Inst. 2013 Jun 5;105(11):802-11.*

Fischer, CP. 2006. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev. 2006;12:6-33.*

Fleishman, et al. 2010. Testosterone levels and quality of life in diverse male patients with cancers unrelated to androgens. *J Clin Oncol. 2010 Dec 1;28(34):5054-60.*

Fontenot, Jason D., Gavin, Marc A. und Rudensky, Alexander Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology volume 4, pages 330–336 (2003).*

Forman, David, et al. 2014. *World Cancer Report 2014.* IARC - WHO. S. 16ff.

Galic, Oakhill und GR., Steinberg. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol. 2010 Mar 25;316(2):129-39.*

Goldszmid, Romina S. und Dzutsev, Amiran and Trinchieri, Giorgio. 2014. Host immune response to infection and cancer: unexpected commonalities. *Cell Host Microbe. 2014 Mar 12; 15(3): 295–305.*

Gopinathan, et al. 2015. Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Res. 2015 Aug 1;75(15):3098-107.*

Grivennikov, Sergei I., Greten, Florian und Michael, Karin. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell. 2010 Mar 19; 140(6): 883–899.*

Grobecker, Claudia, Pötsch, Olga und Sommer, Bettina. 2016. *Datenreport 2016 .* Bundeszentrale für politische Bildung - bpb. Berlin : Bundeszentrale für politische Bildung - bpb, S. 16ff.

Ham, et al. 2016. The diverse roles of the TNF axis in cancer progression and metastasis. *Trends Cancer Res. Author manuscript; available in PMC 2016 Dec 5.*

Harbarth, et al. 2001. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med. 2001 Aug 1;164(3):396-402.*

Harman, et al. 2001. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab. 2001 Feb;86(2):724-31.*

Hayes, et al. 2018. Association of Oral Microbiome With Risk for Incident Head and Neck Squamous Cell Cancer. *JAMA Oncol. 2018 Mar 1;4(3):358-365.*

Heidecke, et al. 2002. Neoadjuvant treatment of esophageal cancer: Immunosuppression following combined radiochemotherapy. *Surgery. 2002 Sep;132(3):495-501.*

Herdegen, Thomas, Böhm, Ruwen und Cimin-Bredéé, Nuray. 2008. *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie* : Thieme, S. 338.

Hetzler, et al. 2015. Sex differences in the relationship of IL-6 signaling to cancer cachexia progression. *Biochim Biophys Acta. 2015 May;1852(5):816-25.*

Hiddemann,et al. 2004. Die Onkologie. Bd. 1 + 2, S. 185, 412, 472, 693.

Hovsepian, E und et.al. 2013. IL-10 Inhibits the NF-κB and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in Trypanosoma cruzi-Infected Cardiomyocytes. *PLoS One. 2013; 8(11): e79445.*

Hu, et al. 2015. Chronic inflammation and colorectal cancer: the role of vascular endothelial growth factor. *Curr Pharm Des. 2015;21(21):2960-7.*

Hüber, J. 2012. Komplementäre Onkologie. S. 10, 13, 443ff.

Hübner, J. 2013. Onkologie interdisziplinär. S. 43-46 , 122-123.

Hubner, RA und Houlston, RS. 2009. Folate and colorectal cancer prevention. *Br J Cancer. 2009 Jan 27; 100(2): 233–239.*

John, St., et al. 2004. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004 Aug;130(8):929-35.*

Kaplan, et al. 2017. Coronary atherosclerosis in indigenous South American Tsimane: a cross-sectional cohort study. *Lancet. 2017 Apr 29; 389(10080): 1730–1739.*

Karow, Th und Lang-Roth, Ruth. 2011. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 2011. S. 898 , 899, 900.

Khaibullin, Timur, et al. 2017. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol. 2017; 8: 531.*

Kiadaliri, Aljasgar, et al. 2013. Alcohol Drinking Cessation and the Risk of Laryngeal and Pharyngeal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One. 2013; 8(3): e58158.*

Klein, Eili Y., et al. 2015. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *PNAS April 10, 2018 115 (15) E3463-E3470.*

Koboldt, et al. 2013. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell. 2013 Sep 26; 155(1): 27–38.*

La Vecchia, C, Zhang, ZF und Altieri, A. 2008. Alcohol and laryngeal cancer: an update. *Eur J Cancer Prev. 2008 Apr;17(2):116-24.*

Lauw, FN, et al. 2000. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J Immunol. 2000 Sep 1;165(5):2783-9.*

Leon, LR, Kozak, W und Kluger, MJ. 1998. Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice. *Ann N Y Acad Sci. 1998 Sep 29;856:69-75.*

Löffler, Georg und Petrides, Petro. 2014. *Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie.*: Springer, 2014. S. 409-411, 423-425; 458-473., 633-658.

Lorimore, SA und Wright, EG. 2003. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. *Int J Radiat Biol. 2003 Jan;79(1):15-25.*

Mager, Lukas F., Wasmer, Marie-Hélène und Krebs, Tilman T. Rau and Philippe. 2016. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol. 2016; 6: 96.*

Maso, Dal, et al. 2016. Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models. *Eur J Epidemiol. 2016 Apr;31(4):385-93.*

Mast, G, et al. 2009. Kopf-Hals-Malignome. Tumorzentrum München. S. 72-97.

Mirandola, et al. 2015. Sex-driven differences in immunological responses: challenges and opportunities for the immunotherapies of the third millennium. *Int Rev Immunol. 2015 Mar;34(2):134-42.*

Monda, et al. 2017. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxid Med Cell Longev. 2017; 2017: 3831972.*

Muñoz-Cánoves, et al. 2013. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J. 2013 Aug 20; 280(17): 4131–4148.*

Murphy, K.M., Travers, P und Walport, M. 2014. Janeway Immunologie, 7.Auflage. S. 107ff. , 453ff. , 467-469 , 1007ff.

Naucler, P, et al. 2009. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst. 2009 Jan 21;101(2):88-99.*

Obeed, Omar A Al, et al. 2014. Increased expression of tumor necrosis factor-α is associated with advanced colorectal cancer stages. *World J Gastroenterol. 2014 Dec 28; 20(48): 18390–18396.*

O'Hara, et al. 1998. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clin Cancer Res. 1998 Aug;4(8):1943-8.*

Pedersen, Bente Klarlund, Steensberg, Adam und Schjerling, Peter. 2001. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol. 2001 Oct 15; 536(Pt 2): 329–337.*

Ralph, et al. 2010. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med. 2010 Apr;31(2):145-70.*

Ramesh, G und Reeves, Brian W. 2006. Cisplatin increases TNF-alpha mRNA stability in kidney proximal tubule cells. *Ren Fail. 2006;28(7):583-92.*

Ramesh, G, et al. 2007. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF-alpha production by renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Feb;292(2):F812-9.*

Ramos, EJ, et al. 2004. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2004 Jul;7(4):427-34.*

Reers, et al. 2013. Cytokine changes in response to radio-/chemotherapeutic treatment in head and neck cancer. *Anticancer Res. 2013 Jun;33(6):2481-9.*

Reihmane und Dela. 2014. Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *Eur J Sport Sci. 2014;14(3):242-50.*

Riedel, F, et al. 2005. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res. 2005 Jul-Aug;25(4):2761-5.*

Robert-Koch-Institut. 2017. *Krebs in Deutschland für 2013/2014.* GEMEINSAME PUBLIKATION DES ZENTRUMS FÜR KREBSREGISTERDATEN UND DER GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. Berlin : 2017. S. 18ff.

Roncarolo, MG, et al. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev. 2006 Aug;212:28-50.*

Rong, Xu, QuanQiu, Wang und and Li, Li. 2015. A genome-wide systems analysis reveals strong link between colorectal cancer and trimethylamine N-oxide (TMAO), a gut microbial metabolite of dietary meat and fat. *BMC Genomics. 2015; 16(Suppl 7): S4.*

Sato, et al. 2011. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res. 2011 Dec;51(2-3):170-82.*

Sauer, R, et al. 2004. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med. 2004 Oct 21;351(17):1731-40.*

Scheller, J, et al. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta. 2011 May;1813(5):878-88.*

Schünke, et al., 2005. *Prometheus - Lernatlas der Anatomie Hals und Innere Organe*. Thieme, S. 150ff.

Schünke, et al., 2006. *Prometheus Lernatlas der Anatomie- Kopf- und Neuroanatomie.* Thieme, S. 102ff. , 196 , 230.

Singh, Rasnik K., et al. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med. 2017; 15: 73.*

Spencer, Tara, et al. 2016. HPV Associated Head and Neck Cancer. Cancers (Basel). 2016 Aug; 8(8): 75.

Sperry, et al. 2008. Male gender is associated with excessive IL-6 expression following severe injury. *J Trauma. 2008 Mar;64(3):572-8; discussion 578-9.*

Strienz, Dr. Joachim. 2016. *Mit meinem Immunsystem stimmt etwas nicht! Was Sie bei Fibromyalgie, Hashimoto und anderen Erkrankungen tun können.*

Sun, Yi-Sheng, et al. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci. 2017; 13(11): 1387–1397.*

Thomas, L, et al. 2005. Labor und Diagnose. 2005, S. 1039 ff. ; 1047-1049.

Tiller, Friedrich-Wilhelm und Fahr, Anne-Marie. 2005. Das klinische Labor. S. 440.

Tisdale, M.J. 2008. *Catabolic mediators of cancer cachexia.* s.l. : Curr Opin Support Palliat Care. 2008 Dec;2(4):256-61.

Voulgari, PV, Kolios, G und Papadopoulos, GK. 1999. Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol. 1999 Aug;92(2):153-60.*

Wang, et al. 2016. High level of interleukin-10 in serum predicts poor prognosis in multiple myeloma. *Br J Cancer. 2016 Feb 16;114(4):463-8.*

Wang, et al. 2016. IL-6 Inhibition Reduces STAT3 Activation and Enhances the Antitumor Effect of Carboplatin. *Mediators Inflamm. 2016;2016:8026494.*

Wannenmacher, M, Wenz, F und Debus, J. 2013. Strahlentherapie. *2. Auflage.* 2013, S. 47ff. , 87-96 , 249- 267.

Wu, et al. 2008. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab. 2008 Jul;93(7):2737-45.*

Wu, et al. 2010. IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia. *Immunobiology. 2010 Sep-Oct;215(9-10):796-803.*

Yoon, S.I., et al. 2006. Crystal structure of human IL-10. *(2006) J Biol Chem 281 35088-35096.*

Yoshizaki K, et al. 1998. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanised anti-IL-6 receptor antibody. *Springer Semin Immunopathol 1998; 20:247–259.*

Zhang, et al. 2014. Faecalibacterium prausnitzii Inhibits Interleukin-17 to Ameliorate Colorectal Colitis in Rats. *PLoS One. 2014; 9(10): e109146.*

ZHAO, XIANGQIAN, et al. 2016. Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF-κB/p53-apoptosis signaling pathway. *Oncol Rep. 2016 Feb; 35(2): 669–675.*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darm-Mukosa mit veränderter Kolonisationsflora und gestörter Darmbarriere sowie immunologischer Aktivierung

Abbildung 2 Modell des Studiendesigns und der Messzeitpunkte vor, während und nach Radiochemotherapie.

Abbildung 3 Darstellung eines ELISA-Tests im Sandwich-Verfahren

Abbildung 4 Aus Standardkonzentration und OD/ABS logarithmisch errechnete Standardkurve einer Messung für IL-6.

Abbildung 5 Aus Standardkonzentration und OD/ABS erstellte Standardkurve einer Messung für TNF-α.

Abbildung 6 Aus Standardkonzentration und OD/ABS erstellte Standardkurve einer Messung für IL-10.

Abbildung 7 Legende der Boxplot-Darstellung

Abbildung 8 Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) innerhalb der drei Gruppen zum Messzeitpunkt A per Boxplots.

Abbildung 9 Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) zwischen beiden Gruppen zum Messzeitpunkt B per Boxplots.

Abbildung 10 Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) zwischen beiden Gruppen zum Messzeitpunkt C per Boxplots.

Abbildung 11 Darstellung der gemessenen Werte von IL-6 (pg/ml) zwischen beiden Gruppen zum Messzeitpunkt D per Boxplots.

Abbildung 12 Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den drei Gruppen zum Messzeitpunkt A per Boxplots.

Abbildung 13 Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den beiden Gruppen zum Messzeitpunkt B per Boxplots.

Abbildung 14 Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den beiden Gruppen zum Messzeitpunkt C per Boxplots.

Abbildung 15 Darstellung der gemessenen Werte von TNF-α (pg/ml) zwischen den beiden Gruppen zum Messzeitpunkt D.

Abbildung 16 Darstellung der Messwerte von IL-10 (pg/ml) bei den drei Gruppen zum Messzeitpunkt A per Boxplots

Abbildung 17 Darstellung der gemessenen Werte von IL-10 (pg/ml) bei den zwei Patientengruppen zum Messzeitpunkt B per Boxplots.

Abbildung 18 Darstellung der gemessenen Werte von IL-10 (pg/ml) bei den zwei Patientengruppen zum Messzeitpunkt C per Boxplots.

Abbildung 19 Box-Whisker-Plots der gemessenen Werte von IL-10 (pg/ml) bei den zwei Kohorten zum letzten Messzeitpunkt D per Boxplots.

Abbildung 20 Boxplots der Messwerte in der Bauch-Becken-Patientengruppe über den Verlauf zwischen Messzeitpunkt A bis D bei Interleukin-6 (pg/ml).

Abbildung 21 Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangswert A bei Interleukin-6 (pg/ml) in der Bauch-Becken-Kohorte.

Abbildung 22 Boxplots der Messwerte der Kopf-Hals-Patienten über den Verlauf zwischen Messzeitpunkt A und D bei Interleukin-6 (pg/ml).

Abbildung 23 Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangswert A bei Interleukin-6 (pg/ml) in der Kopf-Hals-Gruppe.

Abbildung 24 Darstellung der Bauch-Becken Kohorte über den gesamten Verlauf der Radiochemotherapie zwischen Messzeitpunkt A bis D bei TNF-α (pg/ml).

Abbildung 25 Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangswert A bei TNF-α (pg/ml) in der Bauch-Becken-Kohorte.

Abbildung 26 Kopf-Hals-Kohorte im Vergleich über den gesamten Verlauf der Radiochemotherapie zwischen Messzeitpunkt A und D bei TNF-α (pg/ml).

Abbildung 27 Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangswert A bei TNF-α (pg/ml) in der Kopf-Hals-Kohorte.

Abbildung 28 Boxplots von IL-10 (pg/ml) bei der Bauch-Becken Kohorte über den gesamten Verlauf.

Abbildung 29 Prozentuale Abweichung der MW zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangswert A bei IL-10 (pg/ml) in der Bauch-Becken-Kohorte.

Abbildung 30 Kopf-Hals-Kohorte im Vergleich über den Verlauf der Radio-chemotherapie zwischen Messzeitpunkt A und D bei IL-10 (pg/ml).

Abbildung 31 Prozentuale Abweichung der Mittelwerte zu den Zeitpunkten B, C, D je vom Ausgangswert A bei TNF-α (pg/ml) in der Kopf-Hals-Kohorte.

Abbildung 32 Gesamte Patientenkohorte im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-6 (pg/ml).

Abbildung 33 Bauch-Becken Patienten im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A-D bei IL-6 (pg/ml).

Abbildung 34 Kopf-Hals Kohorte im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-6 (pg/ml).

Abbildung 35 Gesamte Patientenkohorte im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei TNF-α (pg/ml).

Abbildung 36 Bauch-Becken Patienten im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei TNF-α (pg/ml).

Abbildung 37 Kopf-Hals Gruppe im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei TNF-α (pg/ml).

Abbildung 38 Gesamte Patientenkohorte im Vergleich der Geschlechter zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-10 (pg/ml).

Abbildung 39 Bauch-Becken Patienten im Geschlechtervergleich zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-10 (pg/ml).

Abbildung 40 Kopf-Hals-Kohorte mit männlichen und weiblichen Patienten zwischen Messzeitpunkt A, B, C und D bei IL-10 (pg/ml).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht und Zuordnung pro- und antiinflammatorischer Cytokine.

Tabelle 2 Übersicht über das Probandenkollektiv.

Tabelle 3 Tumorentitäten der Patientengruppe 1 - Bauch-Becken.

Tabelle 4 Tumorentitäten der Patientengruppe 2 - Kopf-Hals.

Tabelle 5 Vorläufiger Stichprobenumfang je Messzeitpunkt.

Tabelle 6 Standardkonzentrationen und OD/ABS einer Messung für IL-6.

Tabelle 7 Standardkonzentration und OD/ABS einer Messung für TNF-α.

Tabelle 8 Standardkonzentrationen und OD/ABS einer Messung für IL-10.

Tabelle 9 Stichprobenumfang Messzeitpunkt A-D für IL-10 und TNF-α

Tabelle 10 Messwerte der gesamten Kohorte für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt A

Tabelle 11 Messwerte der Patientenkohorten für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt B

Tabelle 12 Messwerte der Patientenkohorten für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt C

Tabelle 13 Messwerte der Patientenkohorten für IL-6 (pg/ml) zum Zeitpunkt D

Tabelle 14 Messwerte der gesamten Kohorte für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt A

Tabelle 15 Messwerte der Patientenkohorten für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt B

Tabelle 16 Messwerte der Patientenkohorten für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt C

Tabelle 17 Messwerte der Patientenkohorten für TNF-α (pg/ml) zum Zeitpunkt D

Tabelle 18 Messwerte der gesamten Kohorte für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt A

Tabelle 19 Messwerte der Patientenkohorten für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt B

Tabelle 20 Messwerte der Patientenkohorten für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt C

Tabelle 21 Messwerte der Patientenkohorten für IL-10 (pg/ml) zum Zeitpunkt D

Tabelle 22 Messwerte im Verlauf für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

Tabelle 23 Messwerte im Verlauf für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

Tabelle 24 Messwerte im Verlauf für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

Tabelle 25 Messwerte gesamte Tumorkohorte nach Geschlecht für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner Radiochemotherapie)

Tabelle 26 Messwerte Bauch-Becken-Kohorte (BB) nach Geschlecht für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Tabelle 27 Messwerte Kopf-Hals-Kohorte (KH) nach Geschlecht für IL-6 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Tabelle 28 Messwerte gesamte Tumorkohorte nach Geschlecht für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Tabelle 29 Messwerte Bauch-Becken-Kohorte (BB) nach Geschlecht für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Tabelle 30 Messwerte Kopf-Hals-Kohorte (KH) nach Geschlecht für TNF-α (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Tabelle 31 Messwerte gesamte Tumorkohorte nach Geschlecht für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Tabelle 32 Messwerte Bauch-Becken-Kohorte (BB) nach Geschlecht für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Tabelle 33 Messwerte Kopf-Hals-Kohorte (KH) nach Geschlecht für IL-10 (pg/ml) zu den Messzeitpunkten A-D (B-D unter simultaner RCT)

Danksagung

Vorweg gilt mein Dank allen Patientinnen und Patienten der Station RA 01 in der MNR-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf, die trotz ihrer zumeist schwerwiegenden Erkrankungen die Bereitschaft gefunden haben, an dieser Studie teilzunehmen. Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Station RA01 sowie des Zentrallabors des UKD für Ihre Mithilfe bei der Logistik und Generierung der Proben sowie Prof. Dr. van Griensven von der TU München und seinem Team danken.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank Frau PD Dr. Christiane Matuschek und Herrn Prof. Dr. Edwin Bölke für die Überlassung des Themas und die stets motivierenden Worte und Hilfestellungen betreffs des Abschlusses der Arbeit aussprechen. Als Zweitgutachter gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hubert Schelzig.

Ferner finden Roman Gelzhäuser für unermüdliche Unterstützung bei der Datenaufbereitung, Dr. phil. Johannes von Gehlen für umfangreiche Korrekturlesungen und seine lange freundschaftliche Verbundenheit, Dr. med. Maximilian Hauser für ebenso diese und seine aufmunternden Beiträge auf den gemeinsamen Pfaden, mein Patenonkel Dr. med. Willi Doerges für den wohlmeinenden Zuspruch von Kindheitstagen an sowie meine Eltern Rosalinde und Ulrich Dörges für die immerwährende Ermöglichung und Unterstützung meines Lebensweges meinen tiefen Dank.

Abschließend danke ich meiner Freundin Fabienne aus tiefstem Herzen für Ihre unerschütterliche wie bereichernde Liebe, Freundschaft und Partnerschaft.