

UNTERSUCHUNGEN ZUR ABSOLUTEN ZELLZAHL VON LEUKOZYTEN UND T-
ZELLSUBTYPEN IM PERIPHEREN BLUT BEI PATIENTEN MIT KOPF- HALS-
MALIGNOMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Kristina Pieper
aus Attendorn

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. Andreas Gerstner
2. Gutachter: Professor Dr. med. Percy Knolle

Tag der Mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2008

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Chirurgie,
Universitätsklinikum Bonn

Direktor: Professor Dr. med. Friedrich Bootz

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG	10
1.1. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich.....	10
1.1.1. Risikofaktoren	10
1.1.2. Karzinogenese	11
1.1.3. Diagnostik	13
1.1.4. Oropharynxkarzinom.....	14
1.1.5. Hypopharynxkarzinom	15
1.1.6. Larynxkarzinom.....	17
1.1.7. Nasopharynxkarzinom	19
1.1.8. Herkömmliche Therapie, ihre Problematik und Grenzen	20
1.1.9. Prognostische Faktoren	22
1.2. Das Immunsystem.....	23
1.2.1. Erworbene und angeborene Immunität.....	23
1.2.2. Zellen des Immunsystems und ihre Genese	24
1.2.3. Eigenschaften reifer Lymphozyten.....	25
1.2.4. Tumorummunologie	26
1.3. Objekträgerbasierte Zytometrie (SBC)	28
1.3.1. Laser-Scanning-Zytometer.....	29
1.4. Zielsetzung der Dissertation	31
2. MATERIALIEN UND METHODEN	32
2.1. Materialien.....	32
2.1.1. Patienten.....	32
2.1.2. Reagentien.....	33

2.1.3. Spezielle Geräte und Software	33
2.2. Methoden	34
2.2.1. Probengewinnung- und Aufbewahrung	34
2.2.2. Präparation für die Laser-Scanning-Zytometrie	34
2.2.3. Laser-Scanning-Zytometrie.....	38
2.2.4. Datenerhebung und Softwarekonfiguration.....	38
2.3. Methoden der statistischen Auswertung.....	41
2.3.1. Prüfung der Validität der Methode	41
2.3.2. Signifikanzbestimmung	41
2.3.3. Verwendete Software.....	42
3. ERGEBNISSE.....	43
3.1. DNA-Färbung und Triggerung auf DRAQ 5.....	43
3.2. Immunphänotypisierung und Gating.....	43
3.3. Erhobene Daten zur Prüfung der Validität der Methode.....	44
3.3.1. Korrelation der oberen und der unteren Kammer.....	44
3.3.2. Korrelation der Mittelwerte des ersten und zweiten Scans	45
3.3.3. Korrelation der mit dem LSC erhobenen Leukozytenzahlen mit dem Routinelabor	46
3.4. Klinische Aspekte der erhobenen Daten	46
3.4.1. Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit bzw. ohne Kopf-Hals-Karzinom	46
3.4.2. Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Kopf-Hals-Karzinom Patienten mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen	48

4.	DISKUSSION.....	51
4.1.	Immunphänotypisierung und Erhebung absoluter Zellzahlen mit dem LSC	51
4.2.	Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit bzw. ohne Kopf-Hals-Karzinom.....	52
4.3.	Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Kopf-Hals-Karzinom Patienten mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen	54
4.4.	Fehlerquellen der Methode.....	55
4.5.	Absolute Zellzählung und Prädiktive Medizin	58
4.6.	Weitere klinische Anwendungsgebiete der Absoluten Zellzählung.....	59
4.7.	Kombination von Laser-Scanning-Zytometrie und funktionellen Analysen.....	60
5.	ZUSAMMENFASSUNG	63
6.	ANHANG.....	65
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (engl. Acquired immune deficiency syndrome)
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
CD	immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen (engl. Cluster of differentiation)
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen (engl. Cyclin-dependent kinases)
CT	Computertomografie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DsRED	rot fluoreszierendes Protein aus der Koralle <i>Discosoma</i> sp. (engl. red fluorescent protein from <i>Discosoma</i> sp. reef coral)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	erweiteretes grün fluoreszierendes Protein (engl. enhanced green fluorescent protein)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. Epidermal growth factor receptor)
GADD	(engl. Growth arrest DNA damage)
HBs-Ag	Hepatitis-B-Oberflächenantigen (engl. Hepatitis B surface antigen)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (engl. Human immunodeficiency virus)
HLA	humane Leukozytenantigen-System (engl. Human leukocyte antigene)

HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (engl. Head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Humanes Papillomvirus
LGL	Lymphozyten mit azurophilen Granula (engl. Large granular Lymphocytes)
LSC	Laser-Scanning-Zytometrie
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major histocompatibility complex)
MRT	Magnetresonanztomografie
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reactive oxygen species)
SARS	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom (engl. Severe acute respiratory syndrome)
SBC	Objekträgerbasierte Zytometrie (engl. Slide based cytometry)
SFM	Scanning Fluorescence Mikroskopie
SKY	Spectral Karyotyping
TCR	T-Zellrezeptor

1. EINLEITUNG

1.1. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

1.1.1. Risikofaktoren

Die Genese von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich ist multifaktoriell bedingt. Als Risikofaktoren sind neben genetischer Prädisposition, Virusinfektionen, beruflicher Exposition mit Karzinogenen und mangelhafter Mund- und Zahnhygiene vor allem Nikotin und Alkohol zu nennen. Hierbei zeigt der Effekt von Alkoholkonsum in Kombination mit Rauchen einen synergistischen Effekt auf die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes [Brugere et al., 1986]. Dieser wird vermutlich ausgelöst durch eine Epithelatrophie mit einer folgenden Hyperregenerationsphase [Mascres et al., 1984]. Damit ist Alkohol ein wesentliches Kokarzinogen bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren. Es erleichtert die Tumorentstehung oder die Tumorpromotion [Riedel und Hörmann, 2004]. Maier et al. zeigten in einer retrospektiven Studie 1999, dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Alkoholkonsum und der Inzidenz von Kopf-Hals-Karzinomen besteht, mit einer maximalen Risikoerhöhung für das Hypopharynxkarzinom. Liegt das relative Risiko bei 1,0 bei einer täglichen Alkoholmenge von 25g, steigt dieses mit einer höheren Alkoholmenge und erreicht ein Maximum bei einer Alkoholmenge von mehr als 100g/Tag. Das Risiko an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken, ist dann im Vergleich zu Nichttrinkern um das 11,7fache erhöht [Maier und Tisch, 1999]. Wie Deleyiannis et al. 1996 zeigen konnten, haben Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom mit hohem Alkoholkonsum eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten ohne Alkoholkonsum. Ursache für diese Prognoseverschlechterung könnten neben metabolischen Einflüssen auch systemische, immunsuppressive Effekte von Alkohol sein [Riedel und Hörmann, 2004]. Dazu zählen eine nachgewiesene T-Zell-Depression und eine verminderte zytotoxische Wirkung der natürlichen Killer- (NK-)Zellen [Riedel et al., 2003].

Ein weiterer nicht unwesentlicher Risikofaktor scheint nach neueren Studien eine Infektion mit Humanen Papillom Viren (HPV) zu sein. Mehrere Studien konnten belegen,

dass Patienten mit simultaner HPV-Infektion ein signifikant höheres Risiko haben, an Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu erkranken [D'Souza et al., 2007; Gillison et al., 2000; Ringström et al., 2002; van Houten et al., 2001]. Vor allem Tonsillenkarcinome zeigen im Vergleich zu anderen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich eine deutlich erhöhte Viruslast an HPV 16 [Chen et al., 2005]. HPV 16 und HPV 18 E6 können eine p53-Degradation induzieren oder p53 durch Komplexbildung inaktivieren. Dieses führt zu genetischer Instabilität der DNS. Die Folgen sind in 1.1.2. beschrieben. HPV-positive Karzinome haben allerdings eine bessere Prognose als HPV-negative Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts [Ritschie et al., 2003].

1.1.2. Karzinogenese

Durch die Einwirkung der in 1.1.1. genannten Risikofaktoren kommt es zu Mutationen der DNS der Schleimhautepithelzellen. Hierbei spielen vor allem Defekte in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle. Werden Tumorsuppressorgene durch eine Mutation inaktiviert, wird ein ungehemmtes Zellwachstum möglich. Zusätzlich zum Wegfall der Suppressoren können Onkogene, die Zellwachstum und -teilung stimulieren, aktiviert werden [Weinberg et al., 1996]. Die Mehrschritt-Theorie der Karzinogenese geht davon aus, dass sich der maligne Tumor über verschiedene Vorstadien entwickelt. Diese korrelieren mit einer Reihe von Defekten in verschiedenen Genen [Böcker et al., 2001].

Das am häufigsten inaktivierte Tumorsuppressorgen bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC= engl.: head and neck squamous cell carcinoma) ist p53 [Ku et al., 2007]. Lokalisiert ist das p53-Gen auf dem Chromosomenort 17p13. Es kodiert für den Transkriptionsfaktor p53, der nur eine geringe Halbwertszeit besitzt und bei Auftreten eines genetischen Schadens im Genom einer Zelle kurzfristig hochreguliert wird. Es kommt zu einer Aktivierung einer Reihe von Zielgenen, die die Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase bewirken (über Hemmung von Zyklin-/ zyklinabhängigen Kinasen), DNS-Reparaturmechanismen (GADD 45 = growth arrest DNA damage) aktivieren bzw. den programmierten Zelltod einleiten, wenn der Schaden nicht behoben werden kann. Dies geschieht über die Aktivierung des BAX-Gens, die mit der Bildung von bax-Proteinen einhergeht, die den Apoptoseablauf starten können [Böcker et al., 2001]. Mutationen im Bereich dieses Gens können zum Funktionsverlust des p53-

Proteins führen, wodurch es zur Störung der Zellzykluskontrolle und chromosomaler Instabilität kommt.

Weiterhin relevant für die Genese von HNSCC sind Veränderungen auf Chromosom 3p. In dieser Tumorentität konnten 1992 durch Latif et al. bereits Allelverluste (LOH= Loss of heterozygosity) distal des 3p14-Lokus und proximal des 3p25-Lokus nachgewiesen werden.

Califano et al. entwickelten bereits 1996 ein vorläufiges Modell zur Tumorprogression bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Dieses beginnt mit dem Nachweis von LOHs in der Region 9p bereits in Plattenepithelhyperplasien. Es folgen Verluste auf den Loci 3p und 17p bei Dysplasien, sowie Deletionen im Bereich von 11q, 13q und 14q bei einem in-situ-Karzinom. Bei invasiven Plattenepithelkarzinomen konnten DNS-Verluste in den chromosomalen Regionen 6p, 8p und 4q nachgewiesen werden [Califano et al., 1996]. Diese Ergebnisse konnten durch weitere Studien im Jahr 2000 gesichert werden [Califano et al., 2000].

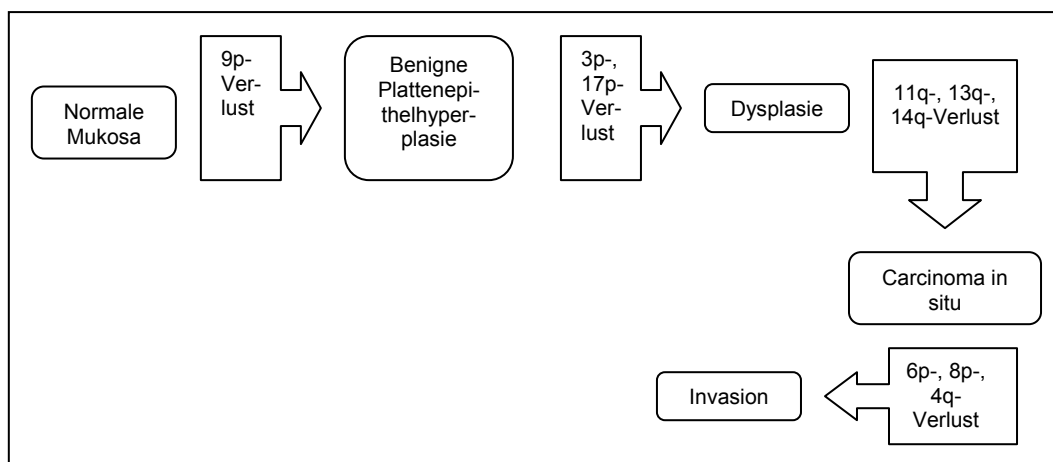


Abbildung 1: Molekulares Modell der Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich in Anlehnung an Califano et al. (1996)

Allerdings stehen Beobachtungen und Messungen an humanen Krebszellen zentralen Hypothesen dieses Konzepts entgegen [Gerstner, 2008]. Ungefähr 50 % der bekannten Karzinogene sind nicht mutagen [Oshimura und Barrett, 1983], Onkogene sind nicht

klonal exprimiert und fehlen somit in einem Teil der Tumorzellen [Walch et al., 2000]. Weiterhin ist zu bemerken, dass in Tumorzellen nicht wie bisher postuliert nur einzelne bis wenige Gene mutiert sind [Vogelstein und Kinzler, 1993], sondern Tausende von Genmutationen vorliegen [Pollack et al., 2002]. Damit erhält die Hypothese, dass die Aneuploidie die Ursache von Krebs ist, aktuell wieder mehr Zuspruch [Stock und Bialy, 2003; Meijer, 2005]. Diese wird gestützt durch ein von Duesberg entwickeltes Modell, nach dem die Karzinogenese eine Kettenreaktion von Aneuploidisierungen ist [Duesberg und Li, 2002; Duesberg et al., 2005].

1.1.3. Diagnostik

Den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. entsprechend, werden die Erhebung einer Anamnese und eines HNO-Status, sowie die Palpation und Sonographie des Halses, die Panendoskopie zum Ausschluss eines synchronen Zweitkarzinoms, die Biopsie mit histologischer Begutachtung und ein Röntgen des Thorax empfohlen. In einzelnen Fällen können außerdem weitere bildgebende Maßnahmen wie CT oder MRT, sowie eine Exfoliativzytologie nützlich sein. Weiterhin sollte bei manifestem Karzinom ein interdisziplinäres Tumorstaging (z.B. Abdomensonographie) durchgeführt werden [Bootz et al., 2000]. Die Ergebnisse des Stagings werden in Form der TNM-Klassifikation eingeteilt und festgehalten [Bootz et al., 2000].

Abhängig von der Lokalisation zeigen sich bei der Erstdiagnose deutliche Unterschiede in der Tumorausdehnung, was wahrscheinlich auf das zeitlich unterschiedliche Auftreten von Symptomen zurückzuführen ist. Persistierende Heiserkeit oder Stimmveränderungen sind die am häufigsten genannten Probleme, die den Patienten zum Arzt führen. So ist auch erklärbar, warum glottische Karzinome häufiger in frühen Tumorstadien erkannt werden als supraglottische Karzinome oder Hypopharynxkarzinome [Brouha et al., 2005a].

1.1.4. Oropharynxkarzinom

Die überwiegende Mehrzahl der Oropharynxkarzinome entspricht zu 95% histologisch einem verhornenden Plattenepithelkarzinom. Die Inzidenz liegt in Europa bei 10,3/100.000/Jahr und 85% der Patienten sind älter als 50 Jahre. Zu ca. 80% sind die Karzinome in den Gaumentonsillen und im Zungengrund lokalisiert. Je nach Entstehungsort können sie lange klinisch stumm bleiben. Leitsymptome sind neben Schluckbeschwerden und Dysphagie auch die eingeschränkte Zungenbeweglichkeit, Schwellung, Foetor ex ore, Otalgien (stechender Schmerz im Ohr) und Sensibilitätsstörungen. In fortgeschrittenen Stadien kann es zu Kieferklemme oder Hirnnervenläsionen kommen. Aufgrund der möglicherweise sehr langen Inapparenz können klinische Symptome auch erst durch Lymphknotenschwellungen im Bereich des Halses (häufig bilateral) hervorgerufen werden. In 75% der Fälle können bereits bei Erstdiagnose zervikale Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Eingeteilt werden die Oropharynxkarzinome nach der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1).

Die Prognose ist aufgrund der oben genannten Faktoren schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 70% (T1), 50% (T2), 30% (T3N0-1) bzw. 20% (T4). Tumore der Tonsille und des weichen Gaumens haben gegenüber Tumoren der Rachenhinterwand und des Zungengrundes eine bessere Prognose [Boenninghaus und Lenarz, 2004].

Primärtumor		
T1		≤ 2cm
T2		> 2cm und ≤ 4cm
T3		> 4cm in größter Ausdehnung
T4		Infiltration von Nachbarstrukturen
	a	Larynx, äußere Muskulatur der Zunge, harter Gaumen, Unterkiefer
	b	M. pterygoideus lateralis, Schädelbasis, A. carotis interna

Lymphknotenmetastasen		
N1		Ipsilateral, solitär ≤ 3cm
N2	a	Ipsilateral, solitär > 3cm und ≤ 6cm
	b	Ipsilateral, multipel ≤ 6cm
	c	Ipsi- und/oder kontralateral ≤ 6cm
N3		> 6cm
Fernmetastasen		
M1		Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Oropharynxkarzinoms

1.1.5. Hypopharynxkarzinom

Der Hypopharynx ist in drei Unterbezirke aufgeteilt:

1. Postcricoidregion: äußere Hinterwand des Larynx bis zur Unterkante des Ringknorpels
2. Sinus piriformis: bilateral der aryepiglottischen Falte kaudal bis an den Ösophagusmund
3. Hypopharynxhinterwand: kaudal des Zungenbeinniveaus.

Ähnliche Grundsätze wie bei dem in 1.1.4 beschriebenen Oropharynxkarzinom gelten auch bei Hypopharynxkarzinomen. Sie sind mit 90% zumeist im Sinus piriformis und an der lateralen Hypopharynxwand lokalisiert. Die restlichen 10% finden sich an der Hypopharynxhinterwand und in der Postkrikoidregion. Die Inzidenz ist mit 2-3 Neuerkrankungen/100.000/Jahr geringer als beim Oropharynxkarzinom. Der Altersgipfel liegt im 5./6. Lebensjahrzehnt, Männer sind siebenmal häufiger betroffen als Frauen [Arnold und Ganzer, 2005].

Die klassischen, allerdings erst spät auftretenden Symptome sind Schluckbeschwerden, Aspiration, Otagien, Kloß- oder Fremdkörpergefühl. Häufig werden allerdings zuerst Lymphknotenmetastasen am Kieferwinkel bzw. hinter und unter dem Ohr an der Schädelbasis bemerkt. In 60-70% der Fälle findet sich eine regionale Metastasierung bei Erstuntersuchung.

Damit ist anatomisch erklärt, dass auch ein leichtes Übergreifen des Tumors auf den Larynx möglich ist. Heiserkeit und Dyspnoe sind Symptome bei Larynxinfiltration bzw.

Läsion des N. laryngeus recurrens. Die Einteilung der Hypopharynxkarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 2).

Die Prognose ist sehr schlecht, da der Tumor durch seine uncharakteristischen Symptome erst spät erkannt wird und bereits früh bilateral in die zervikalen Lymphknoten metastasiert [Boenninghaus und Lenarz, 2004].

Primärtumor		
T1		Auf einen Unterbezirk begrenzt und /oder \leq 2cm in größter Ausdehnung
T2		Auf zwei Unterbezirke begrenzt und /oder $>$ 2cm und \leq 4cm; ohne Fixation des Hemilarynx
T3		$>$ 4cm in größter Ausdehnung oder Fixation des Hemilarynx
T4		Infiltration von Nachbarstrukturen
	a	Schild-/ Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
	b	Prävertebrale Faszie, A.carotis interna, Strukturen des Mediastinums
Lymphknotenmetastasen		
N1		Ipsilateral, solitär \leq 3cm
N2	a	Ipsilateral, solitär $>$ 3cm und \leq 6cm
	b	Ipsilateral, multipel \leq 6cm
	c	Ipsi- und/oder kontralateral \leq 6cm
N3		$>$ 6cm
Fernmetastasen		
M1		Fernmetastasen

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Hypopharynxkarzinoms

1.1.6. Larynxkarzinom

Der Kehlkopf gliedert sich in drei Etagen:

1. Supraglottis: Suprahyoidale Epiglottis, aryepiglottische Falte, Arytaenoidregion, infrahyoidale Epiglottis, Taschenfalten
2. Glottis: Stimmlippen, vordere Kommissur, hintere Kommissur
3. Subglottis: bis 1cm unterhalb der Stimmlippenebene

Plattenepithelkarzinome finden sich zu 70% in der Stimmlippenregion, 30% liegen supraglottisch. Die primäre Karzinomentstehung in der Subglottis ist äußerst selten [Arnold und Ganzer, 2005].

Mit ca. 40% sind Tumore des Kehlkopfes die häufigsten Kopf-Hals-Malignome, was etwa 1-2% aller bösartigen Tumore entspricht. Die Inzidenz liegt in Mitteleuropa bei 9-10 Neuerkrankungen/100.000/Jahr, der Altersgipfel liegt im 6. und 7. Lebensjahrzehnt. Weniger durch die verbesserte Diagnostik und die längere Lebenserwartung, sondern vielmehr durch die Zunahme äußerer Noxen, vor allem des Zigarettenrauchens, kann die steigende Inzidenz in den vergangenen Jahren erklärt werden. Männer sind acht- bis neunmal häufiger betroffen als Frauen.

Die Klinik und der Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome sind abhängig von der Tumorage und -ausbreitung. Beim Stimmlippenkarzinom zeigt sich relativ frühzeitig eine Beeinträchtigung der Stimme, während bei supraglottischen Karzinomen zunächst nur ein uncharakteristisches Druckgefühl und erst später Stimmveränderungen beschrieben werden. Daneben können Schluckstörungen bei Übergreifen auf den Oropharynx auftreten [Boenninghaus und Lenarz, 2004]. Leitsymptome subglottischer Karzinome sind Dyspnoe und inspiratorischer Stridor. Die Einteilung der Larynxkarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 3).

Die Prognose ist bei Stimmlippenkarzinom relativ günstig, da meist früh Heiserkeit auftritt und diese Region bei der Spiegeluntersuchung gut einsehbar ist und so ein zeitiger Behandlungsbeginn möglich wird. Die Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei adäquater Therapie 90-95% (T1), 70-80% (T2), 50-60% (T3) bzw. <40% (T4). Supraglottische Karzinome sind prognostisch wesentlich ungünstiger. Durch spätes Erkennen bestehen bereits in 30-70% bei Erstuntersuchung regionale Lymphknotenmetastasen, in 15% der Fälle bereits bilateral [Arnold und Ganzer, 2005]. Dadurch ergeben sich folgende Fünf-Jahres-

Überlebenswahrscheinlichkeiten: 90% (T1), 60-70% (T2), 40-50% (T3) bzw. <30% (T4). Primärtumore der Subglottis sind sehr selten und haben eine besonders ungünstige Prognose, da sich die Tumore zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist schon im T3- bzw. T4-Stadium befinden. Außerdem liegen bei Diagnosestellung bereits in 30-40% der Fälle regionäre Metastasen vor, die sich überwiegend in den paratrachealen Lymphknoten finden. Mit einer kaudalen Ausbreitung von mehr als 10mm verschlechtert sich die Prognose noch einmal wesentlich [Jahnke, 1994].

Supraglottis	
T1	Auf Supraglottis begrenzt mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Überschreitung der Supraglottis (z.B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis) mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Auf Larynx begrenzt mit Stimmlippenfixation und/oder Überschreitung laryngealer Grenzen (Postkrikoidbezirk)
T4	Infiltration von Nachbarstrukturen
	a Schildknorpel und/oder Trachea, Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus
	b Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A.carotis interna
Glottis	
T1	Auf Stimmlippe(n) begrenzt mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
	a Eine Stimmlippe
	b Beide Stimmlippen
T2	Ausbreitung auf Supra- und/oder Subglottis, normale oder eingeschränkte Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Auf Larynx begrenzt, Stimmlippenfixation und/oder Infiltration der Postkrikoidregion und/oder des präepiglottischen Gewebes
T4	Infiltration von Nachbarstrukturen
	a Schildknorpel und/oder Trachea, Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus
	b Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A.carotis interna

Subglottis		
T1		Auf Subglottis begrenzt, normale Stimmlippenbeweglichkeit
T2		Ausbreitung auf Stimmlippe(n), normale oder eingeschränkte Stimmlippenbeweglichkeit
T3		Auf Larynx begrenzt mit Stimmlippenfixation
T4		Infiltration von Nachbarstrukturen
	a	Schildknorpel und/oder Trachea, Halsweichteile, Schilddrüse, Ösophagus
	b	Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A.carotis interna

Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Larynxkarzinoms

1.1.7. Nasopharynxkarzinom

Histologisch finden sich zu etwa 50% verhornende und nicht verhornende Plattenepithelkarzinome. Die andere Hälfte stellen undifferenzierte (anaplastische, alte Nomenklatur: lympho-epitheliale) Karzinome. Frühsymptome sind neben einer einseitigen Schalleitungsschwerhörigkeit mit Paukenerguss auch zervikale und/oder nuchale Lymphknotenmetastasen. In 50% der Fälle sind sie erstes Symptom des Nasopharynxkarzinoms. Erst in fortgeschrittenen Stadien kommt es zu behinderter Nasenatmung, rezidivierendem Nasenbluten, therapieresistenten Kopfschmerzen und Befall der Hirnnerven, vor allem des N. abducens, durch Infiltration der Schädelbasis [Arnold und Ganzer, 2005]. In Mitteleuropa gibt es 0,5-1 Neuerkrankung/100.000/Jahr. Der Tumor tritt bevorzugt im mittleren Lebensalter auf, ist aber auch im Kindesalter zu finden. Die Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei verhornenden und nicht verhornenden Karzinomen bei ca. 20%.

Die Einteilung der Nasopharynxkarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 4).

Primärtumor		
T1		Tumor auf Nasopharynx begrenzt
T2		Tumorausbreitung auf Weichteile von Oropharynx und/oder Nasenhöhle
	a	Ohne parapharyngeale Ausbreitung
	b	Mit parapharyngealer Ausbreitung
T3		Tumor infiltriert Knochenstrukturen und/oder Nasennebenhöhlen
T4		Tumor mit intrakranieller Ausbreitung und/oder Befall eines oder mehrerer Hirnnerven, Fossa infratemporalis, Hypopharynx, Orbita, Spatium masticatorium
Lymphknotenmetastasen		
N1		Unilateral über Supraclaviculargrube ≤ 6cm
N2		Bilateral über Supraclaviculargrube ≤ 6cm
N3		> 6cm über Supraclaviculargrube oder Ausdehnung in Supraclaviculargrube
	a	> 6cm über Supraclaviculargrube
	b	Ausdehnung in Supraclaviculargrube
Fernmetastasen		
M1		Fernmetastasen

Tabelle 4: TNM-Klassifikation des Nasopharynxkarzinoms

1.1.8. Herkömmliche Therapie, ihre Problematik und Grenzen

Die Therapie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich ist multimodal und setzt sich aus chirurgischer und ggf. Strahlen- oder Chemotherapie zusammen.

Ziel der chirurgischen Therapie ist eine R0-Resektion. Die Grenzen der Operabilität werden sowohl durch die Größe des Primärtumors als auch durch die Lymphknotenmetastasen bestimmt [Bootz et al., 2000]. Abhängig von der Ausbreitung des Tumors kann zusätzlich zur Entfernung des Primärtumors eine Neck Dissection

(Entfernung der Halslymphknoten) notwendig werden. Den Umfang bestimmen außer der Lage des Primärtumors auch die Anzahl, Größe und Lage der Lymphknotenmetastasen. Sie wird ggf. uni- oder bilateral durchgeführt. Nachteilig ist, dass nach ausgedehnter Resektion funktionell beeinträchtigende Defekte entstehen, die mit Hilfe rekonstruktiver Verfahren verschlossen werden können. Hier haben sich mikrovaskulär reanastomosierte Transplantate, wie z.B. der faziokutane Unterarmklappen, bewährt. Ist durch die klinische Untersuchung (physikalische Untersuchung und bildgebende Verfahren) eine Lymphknotenmetastasierung nicht nachzuweisen (N0), so kann dennoch eine Ausräumung verschiedener Lymphknotengruppen, entsprechend des typischen Metastasierungswegs des Primärtumors angezeigt sein (elektive Neck Dissection) [Bootz et al., 2000].

Prinzipiell wird die Radiotherapie entweder als alleinige Behandlungsmethode oder als zusätzliche Maßnahme vor oder nach der Operation eingesetzt. Vorteil der postoperativen Radiotherapie ist die Möglichkeit der strengeren Indikationsstellung aufgrund der auf pathologisch-anatomischen Befunden begründeten Stadieneinteilung. Eine kurative Resektion nach "neoadjuvanter" (geplante präoperative Radio- und/oder Chemotherapie) Therapie sollte entsprechend den ursprünglichen (primären, prätherapeutischen) Tumorgrenzen erfolgen. Lokoregionär fortgeschrittene Tumoren werden in der Regel in Abhängigkeit von der Lokalisation primär operiert und postoperativ bestrahlt. Alternativ kann in besonderen Fällen eine primäre Radiochemotherapie erwogen werden [Bootz et al., 2000]. Die simultane Radiochemotherapie erbringt in Studien signifikant höhere Raten an lokoregionärer Tumorfreiheit sowohl im Vergleich zur alleinigen (konventionell fraktionierten) Radiotherapie als auch zur sequentiellen Radio-Chemotherapie und wird deshalb vermehrt angewandt, wenn patientenspezifische Ko-Morbiditäten nicht eine Kontraindikation darstellen [Gellrich et al., 2004].

Die alleinige Chemotherapie wird bislang nur in palliativer Absicht bei Patienten mit Metastasen oder bei lokoregionärem Rezidiv ohne weitere chirurgische oder strahlentherapeutische Optionen eingesetzt. Dabei haben sich bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches folgende Substanzen als wirksam erwiesen: Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Methotrexat, Cyclophosphamid,

Ifosfamid, Vincaalcaloide und Paclitaxel. Die höchsten Remissionsraten haben die Kombinations-Chemotherapie mit Cisplatin bzw. Carboplatin und einer 5-Fluorouracil-Dauerinfusion [Bootz et al., 2000]. Signifikant höhere Überlebensraten lassen sich jedoch nicht erzielen. Von den neuen Substanzen sind Taxane (Paclitaxel, Docetaxel), Gemcitabine und Vinorelbin am besten untersucht. Durch eine Monochemotherapie mit einem Taxan werden Remissionsraten um 40% in der first-line-Chemotherapie berichtet [Gellrich et al., 2004].

1.1.9. Prognostische Faktoren

Die Prognose von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtrakts ist insgesamt schlecht.

Wesentlich für die Prognose der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich ist die frühzeitige Erkennung. Die Zeitspanne vom Auftreten erster Symptome bis zum Aufsuchen eines Arztes und Einleitung einer tumorspezifischen Therapie ist oft patientenbedingt verzögert [Habermann et al., 2001]. Diese Verzögerung ist assoziiert mit dem vermehrten Auftreten von fortgeschrittenen Tumorstadien [Brouha et al., 2005b]. Insgesamt beträgt die Zeit der totalen diagnostischen Verzögerung, die sich zusammensetzt aus patienten- und ärztlich-bedingter Verzögerung, etwa drei bis vier Monate [Habermann et al., 2001].

Weitere gesicherte Prognosefaktoren sind nach Wittekind die anatomische Ausbreitung und die R-Klassifikation sowie der N-Status [Wittekind, 1999]. So reduziert sich die Überlebenswahrscheinlichkeit auf die Hälfte, wenn bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen.

Um allerdings die Prognose auch in Abhängigkeit von der Tumorbiologie besser einschätzen zu können, ergibt sich die Frage nach der Notwendigkeit neuer genetischer Marker. In einer Pilotstudie von Haas et al. korrelierten beispielsweise die Zellzykluskomponenten CDK4 und Cyclin D1 signifikant mit einer schlechteren allgemeinen Überlebenszeit der Patienten nach primär akzelerierter Radiochemotherapie. Anhand dieser immunhistochemischen Marker könnte man somit eine kurative Intention bei der Therapie weit fortgeschrittener Kopf-Hals-Tumore

einschränken und einen mehr palliativ orientierten Therapieansatz in Erwägung ziehen [Haas et al., 1999]. Bockmühl et al. konnten im Jahr 2000 eine 11q13-Amplifikation sowie eine 3q-Überrepräsentierung als chromosomalen Prognoseparameter bei Kopf-Hals-Karzinomen identifizieren. Sowohl für die rezidiv- und metastasenfreie Überlebenszeit als auch für das Gesamtüberleben erwiesen sich diese Parameter als statistisch signifikant und somit aussagekräftig [Bockmühl et al., 2000]. Im Vergleich zu etablierten klinisch-pathologischen Prognosefaktoren eröffnet die Untersuchung chromosomaler Alterationen bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich die Möglichkeit eines „genetischen Tumorgradings“. Dies könnte zukünftig eine wertvolle Zusatzinformation darstellen und die Prognoseeinschätzung insgesamt verbessern [Bockmühl et al., 2000].

Daneben konnte das Vorliegen einer DNS-Aneuploidie als eigenständiger Prognosefaktor für Kopf-Hals-Karzinome etabliert werden [Gerstner, 2008]. Der größte Teil der Tumore ist DNS-aneuploid; Patienten mit DNS-diploiden Tumoren haben sowohl hinsichtlich lokoregionärer Metastasen als auch hinsichtlich der 5-Jahres-Überlebensrate eine bessere Prognose [Bueno et al., 1998; Wang et al., 1990].

Zum Stellenwert der absoluten Zellzahlen der Lymphozytensubpopulationen für die Prognose von Patienten mit Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich vgl. Diskussion Kapitel 4.2.

1.2. Das Immunsystem

1.2.1. Erworbene und angeborene Immunität

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem gliedert sich in eine zelluläre Komponente, zu der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zählen, und eine humorale Komponente, die u.a. die Komplementfaktoren umfasst. Während die angeborene Immunantwort nur eine unspezifische Reaktion darstellt, beinhaltet das erworbene Immunsystem eine Möglichkeit zur spezifischen Reaktion auf ein bestimmtes

Pathogen. Bei diesem Prozess spielen Lymphozyten als zellulärer Bestandteil des Systems eine zentrale Rolle [Böcker et al., 2001].

1.2.2. Zellen des Immunsystems und ihre Genese

Alle zellulären Bestandteile des Blutes (einschließlich der Lymphozyten der erworbenen Immunantwort) entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Diese pluripotenten Stammzellen teilen sich und erzeugen so zwei spezialisierte Typen von Zellen [Janeway et al., 2002].

Aus den myeloischen Vorläuferzellen entstehen neben den Megakaryozyten und Erythroblasten auch die Myeloblasten, die sich zu neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten weiterentwickeln. Zusätzlich entspringen dieser Reihe Monozyten und dendritische Zellen. Makrophagen stellen die gereifte Form der Monozyten in verschiedenen Geweben dar. Als Beispiele für Makrophagensubklassen sind die Alveolarmakrophagen der Lunge oder die Kupffer-Stern-Zellen der Leber zu nennen. Mastzellen, deren Vorläufer im Blut nicht genau bekannt sind, differenzieren ebenfalls in den Geweben [Janeway et al., 2002]. Die Gesamtheit dieser Zellen bezeichnet man als Phagozyten.

Der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle entspringen die Lymphozyten, die sich nach ihrer Funktion und Antigenexpression in zwei Hauptgruppen unterteilen lassen: B-Lymphozyten, die sich nach Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren, und T-Lymphozyten.

Die Ausreifung und Differenzierung der T-Vorläuferzellen erfolgt im Thymus. Wichtig sind hierbei der Einfluss von Zytokinen und der Kontakt mit anderen Zellen, z.B. Makrophagen. Nur die Zellen, die das passende MHC-Molekül erkennen und nicht gegen Autoantigene gerichtet sind, können ausreifen und gelangen als funktionsfähige T-Zellen in die Zirkulation [Pezzutto et al., 2007]. Neben dem T-Zell-Rezeptor sind für die weitere Differenzierung bzw. Aktivierung und Antigenerkennung weitere Hilfsmoleküle erforderlich. Diese, durch monoklonale Antikörper erkannten Antigene werden mit der international gültigen Bezeichnung CD (Cluster of Differentiation) und einer Nummerierung bezeichnet.

Die B-Zell-Entwicklung vollzieht sich während der Embryonal- und Fetalperiode zunächst im Dottersack, später in der Leber und schließlich im Knochenmark. Die Differenzierung wird durch spezialisierte Stromazellen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren reguliert. Im weiteren Verlauf kommt es zur Entwicklung von Plasmazellen, die zur Produktion und Sekretion von Immunglobulinen befähigt sind [Böcker et al., 2001].

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen die dritte Gruppe von Lymphozyten dar und machen ca. 10% der Blutlymphozyten aus. Im Blut zirkulieren sie als große Lymphozyten mit azurophilen Granula (large granular lymphocytes, LGL) [Pezzutto et al., 2007].

1.2.3. Eigenschaften reifer Lymphozyten

Besonderes Merkmal der Lymphozyten ist ihre Fähigkeit, eine spezifische Immunantwort gegen praktisch jedes fremde Antigen zu entwickeln [Janeway et al., 2002].

Ca. 80 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten sind T-Zellen. Bei der Genese entstehen Zellen, die entweder den $\alpha\beta$ - (TCR-2) oder den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor (TCR-1) tragen. Beide Rezeptoren sind mit dem Oberflächenantigen CD3 assoziiert und bilden den CD3-/T-Zell-Rezeptor-Komplex. Der überwiegende Teil der im Blut zirkulierenden T-Zellen exprimiert TCR-2. Hierunter fallen ca. 66% CD4-positive und 33% CD8-positive T-Zellen [Pezzutto et al., 2007]. Die CD4-positiven Zellen werden auch als Helferzellen bezeichnet und sind für die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung wesentlich. Ihre Antigenerkennung erfolgt über den Major histocompatibility complex (MHC) Klasse II. Sie sind zur Zytokinproduktion befähigt. Das CD8-Molekül ist für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle, die sich auf allen kernhaltigen Zellen finden, zuständig. Die CD8-exprimierenden Zellen werden in T-Suppressor-Zellen und zytotoxische T-Zellen unterteilt. Erstere werden direkt durch Antigene stimuliert und wirken regulierend. Letztere sind in der Lage, Virus-infizierte Zellen und Tumorzellen zu erkennen und direkt zu lysieren. Sie werden dabei über MHC-Klasse-I-Moleküle stimuliert.

B-Zellen und die sich davon ableitenden Plasmazellen sind befähigt, Immunglobuline zu produzieren. Diese werden zum Teil an der Oberfläche exprimiert und dienen als spezifische Antigenrezeptoren. Außerdem lassen sich Oberflächenmarker wie z.B. CD21, CD22, CD23 und CD37 nachweisen, die ebenfalls wesentliche funktionelle Eigenschaften vermitteln und zur Charakterisierung von B-Zell-Subpopulationen dienen [Böcker et al., 2001]. B-Zellen fungieren zusätzlich als antigenpräsentierende Zellen.

Reife natürliche Killerzellen (NK-Zellen) finden sich überwiegend in den Sinusoiden der Leber und in der roten Pulpa der Milz. Sie weisen weder einen TCR noch einen Immunglobulinbesatz auf und sind CD3-negativ. Zur Identifikation werden meist CD16 und CD56 verwendet. Sie können fremde Zellen, Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen ohne vorherige Aktivierung oder Immunisierung töten [Pezutto et al., 2007].

1.2.4. Tumorummunologie

Gegenstand der Forschungsgebiete der Tumorummunologie sind die Immunogenität von Tumoren und Metastasen sowie die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze. Tumorzellen weisen eine Vielzahl von Antigenen auf, die in ihrer Struktur stark verändert oder übermäßig exprimiert sind und als Peptide auf MHC-Molekülen präsentiert werden [Boon et al., 1997]. T-Zellen sind in der Lage, Tumorantigene zu erkennen. So werden diese nach intrazellulärem Abbau als MHC-I-gebundene Peptide den CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Tumorzellen sind jedoch keine professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Ihnen fehlen bestimmte kostimulatorische Moleküle, es kommt zu einem Expressionsverlust von MHC-I-Molekülen oder aktiver Downregulation der T-Zell-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion, was möglicherweise das Versagen der Immunantwort erklärt. Die Folge sind T-Zell-Anergie und Toleranz [Pezutto et al., 2007]. Weitere sogenannte Immun-„escape“-Mechanismen sind die Produktion immunsuppressiver Substanzen (z.B. IL-10, TGF- β) und Einstellung der Synthese des Tumorantigens.

Trotz dieser Mechanismen konnte in verschiedenen Arbeitsgruppen eine spontane Immunreaktivität bei verschiedenen Malignomerkrankungen beobachtet werden [Müller-Berghaus et al., 2006, Choi et al., 2005, Schmitz-Winnenthal et al., 2005]. Es konnte die Generierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zell-Antworten nachgewiesen werden

[Dhodapkar et al., 2002, Peiper et al., 2002, Suzuki et al., 2002]. Bisher ist allerdings weitestgehend unklar, welche Rolle CD4-positive T-Zellen bei Tumor-Immunreaktionen spielen. Dies ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Einen guten Überblick dazu geben Alhamarneh et al. [2008].

Eine Therapieform der Zukunft im Bereich von HNSCC stellt möglicherweise die Immuntherapie dar. Insgesamt lassen sich vier Prinzipien einer immuntherapeutischen Intervention unterscheiden: aktiv oder passiv und spezifisch oder unspezifisch [Hoffmann et al., 2005].

Zunächst zu nennen sind die unspezifische Immunstimulation mit rekombinant hergestellten Zytokinen (Interferone, Interleukin-2) und die unspezifisch multimodale Immuntherapie, bei der den Patienten eine perilymphatische Injektion einer von mononukleären Leukozyten produzierten Zytokinmischung sowie systemisch Cyclophosphamid, Indometacin und Zink verabreicht wurde. Die von Barrera et al. [2000] beschriebene Remissionsrate lag bei 53%.

Einen weiteren Ansatz stellt die adoptive Zelltherapie, als Form der passiven Immuntherapie, dar. Hierbei wird eine Reinfusion von ex-vivo konditionierten Lymphozyten durchgeführt.

Bei der Gentherapie erfolgt der Transfer genetisch modifizierter und dadurch in ihrer Immunogenität veränderter Zellen bzw. der direkte Gentransfer. Auch bei dieser Methode bestehen nach wie vor technische Schwierigkeiten. Für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs wurde der Transfer für HLA-B7 und β 2-Mikroglobulin mit dem Ziel der vollständigen Reexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Tumeroberfläche durchgeführt [Hoffmann et al., 2005].

Ein weiteres aktuelles Konzept der Immuntherapie basiert auf der Erkennung von Tumorantigenen durch spezifische monoklonale Antikörper. Hier ist eine Vielzahl von verschiedenen Antikörpern in Erprobung, wie z.B. ein Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. Epidermal growth factor receptor = EGFR), der bei HNSCC regelmäßig überexprimiert ist. Der

Effekt zeigt sich in einer antiproliferativen Wirkung durch Apoptose [Hoffmann et al., 2005].

Abschließend ist die Tumorstimmung oder „Anti-Tumor-Impfung“ zu nennen. Sie bietet vor allem Möglichkeiten im Bereich der adjuvanten Therapie. So führten Dyckhoff und Herold-Mende eine Anti-Tumor-Impfung bei Patienten mit vorwiegend fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren durch [Dyckhoff und Herold-Mende, 2005]. Das Prinzip beruht auf einer tumorspezifischen Aktivierung von T-Zellen. Insgesamt zeigte sich bei dieser Studie ein verbessertes Gesamtüberleben und es ließen sich T-Gedächtniszellen im peripheren Blut der geimpften Patienten nachweisen, die den immunologischen Effekt der Vakzinierung zeigten.

1.3. Objekträgerbasierte Zytometrie (SBC)

Im Zentrum der Objekträgerbasierte Zytometrie (SBC) steht ein invertiertes oder aufrechtes Fluoreszenzmikroskop, welches mit einem in x- und y- Achse motorisierten Tisch ausgerüstet ist. So können Objekte die Fläche eines konventionellen Objektträgers einnehmen. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt mittels Quecksilberdampfampe oder Laser, die Detektion des emittierten Lichts geschieht als Messung des gesamten Spektrums oder über den Einsatz von Kombination aus dichroischen Spiegeln und Bandpass-Filtern. Gemeinsam sind diesen zytometrischen Verfahren (Laser Scanning Mikroskopie = LSM, Laser Scanning Cytometrie = LSC, Spectral Karyotyping = SKY, Scanning Fluorescence Mikroskopie = SFM) die biochemischen und physikalischen Grundlagen der Markierung relevanter Zellstrukturen mit Fluorochromen [Gerstner et al., 2007]. Unterschiede zeigen sich allerdings bei der Art der Detektion der Fluorochrome. Der Vorteil zur Durchflusszytometrie besteht darin, dass die Probe nicht als Suspension vorliegen muss, damit sie die Detektionskammer passieren kann. So können auch Zellverbände und nicht nur einzelne Zellen mittels SBC analysiert werden.

1.3.1. Laser-Scanning-Zytometer

Das Laser-Scanning-Zytometer vereint als Objektträger-basiertes Verfahren die Merkmale der Durchflusszytometrie und der mikroskopisch bildgebenden Verfahren in einem Gerät. Es ist besonders dann von Vorteil, wenn nur minimale Probenmengen zur Verfügung stehen und die Morphologie der gemessenen Ereignisse dokumentiert werden soll [Tárnok und Gerstner, 2002]. Die Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau eines Laser-Scanning-Zytometers.

Die mit dem Ansatz befüllte Neubauer-Zählkammer wird auf dem in x- und y-Achse motorisierten Tisch eingespannt und parallel zur x-Achse durch den Laserstrahl bewegt. Dabei kommt es zum wechselnden Einsatz des Argon-Lasers (Emission bei 488nm) und des Helium-Neon-Lasers (Emission bei 633nm). Die Laserstrahlen treffen zunächst auf einen oszillierenden Spiegel. Dieser sorgt für eine Auslenkung des Strahls, so dass der Laser nicht punktförmig auf das Messfeld der Neubauer-Zählkammer auftrifft, sondern als Scan-Linie in y-Achse das Feld abfährt. Gleichzeitig bewegt sich der computergesteuerte Tisch in Richtung der x-Achse. Die von den Zellen emittierten Fluoreszenzen werden zu vier Filterwürfeln und Photomultipliern weitergeleitet. Ein Filterwürfel setzt sich aus einem dichroischen Spiegel und einem Bandpass-Filter zusammen. Jeder dieser optischen Filter misst das Licht in verschiedenen Wellenlängenbereichen, so dass insgesamt vier verschiedene Spektralbereiche simultan gemessen werden können [Tárnok und Gerstner, 2002]. Ein weiteres Signal, das vom Gerät generiert wird, ist der sog. Forward Scatter. Dieser entsteht durch die von den Zellen in der Neubauer-Zählkammer verursachte Lichtbrechung und wird über eine Linse und einen Kondensator zu einer Photodiode unterhalb des Objektträgers geleitet.

Die Signale werden anhand der vorher angepassten Einstellungen (Trigger, Threshold, etc.) in Pixel umgerechnet, so dass für die gesamte gemessene Fläche eine sog. „pixel-per-pixel-map“, ähnlich einer Landkarte, entsteht [Tárnok und Gerstner, 2002]. So erhält man schließlich Informationen über die Fläche und Position des Objekts in der Neubauer-Zählkammer, was die Relokalisation einzelner Zellen - auch nach dem Scanvorgang - möglich macht. Außerdem werden die Integralhelligkeit für jeden gemessenen Kanal und das Pixel mit der hellsten Fluoreszenz („MaxPixel“) bestimmt.

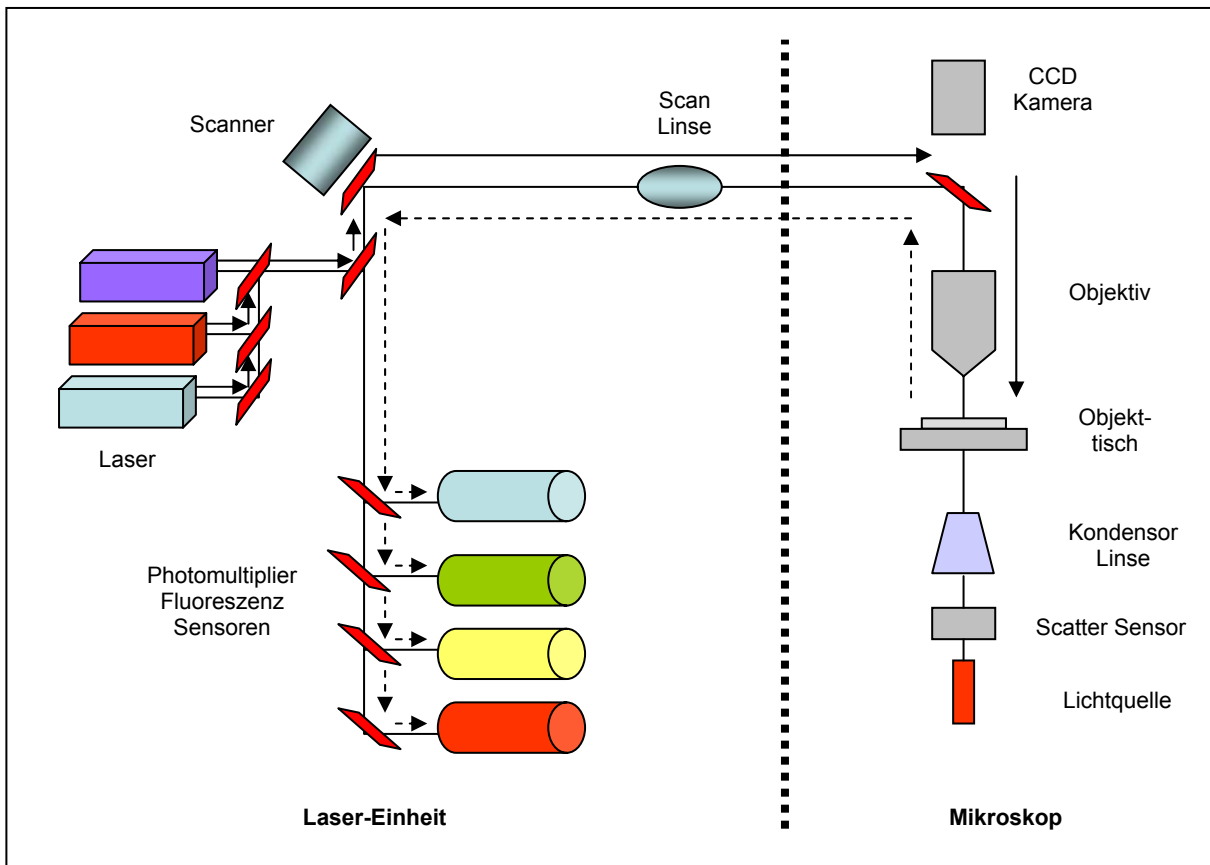


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bauelemente des LSC und der Weg der optischen Signale

Zusammengefasst bietet das LSC folgende Vorteile:

- 1) nur minimale Probenmengen sind zur Analyse notwendig;
- 2) die gemessenen Ereignisse sind relokalisierbar und können erneut unter modifizierten Bedingungen analysiert werden;
- 3) die Morphologie des Objektes kann mittels mikroskopischer Bildanalyse dokumentiert werden.

1.4. Zielsetzung der Dissertation

Mit dieser Arbeit soll zum einen ein Assay etabliert werden, der es möglich macht, die absoluten Zellzahlen von peripheren Blutleukozyten zu bestimmen.

Zum zweiten sollen die Lymphozytensubpopulationen von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Hals-Kopf-Bereich untereinander sowie mit Durchschnittswerten von Patienten ohne Karzinom verglichen werden, um eine Abweichung in den absoluten Zellzahlen der Subpopulationen nachzuweisen.

Weiterhin soll geprüft werden, ob ein Unterschied zwischen den absoluten Zellzahlen der Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit Halslymphknotenmetastasen im Vergleich zu Patienten mit nicht-metastasierten Karzinomen im Hals-Kopf-Bereich vorliegt.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Patienten

Während des Zeitraumes von März 2005 bis Dezember 2005 wurden bei insgesamt 76 Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Chirurgie der Universität Bonn die absoluten Zellzahlen der Leukozyten und der Leukozyten-Subpopulationen im peripher-venösen Blut bestimmt.

In der Gruppe der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen wurden achtzehn Oropharynxkarzinome (acht ♀/zehn ♂), fünf Hypopharynxkarzinome (fünf ♂), drei Larynxkarzinome (eine ♀/zwei ♂) und drei Nasopharynxkarzinome (zwei ♀/ein ♂) diagnostiziert. Die Klassifikation erfolgte anhand der in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums erhobenen Befunde.

Die Ethikkommission der Universität Bonn hat das Forschungsprojekt begutachtet und diesem zugestimmt.

Gruppendiagnose	Anzahl gesamt	♀	♂
Oropharynxkarzinom	18	8	10
Hypopharynxkarzinom	5	0	5
Larynxkarzinom	3	1	2
Nasopharynxkarzinom	3	2	1
Patienten ohne Karzinom	47	30	17

Tabelle 5: Gruppeneinteilung der Patienten

2.1.2. Reagentien

- a) Erythrozytenlysereagenz: Quicklysis™ Lysing Solution (Cytognos; Salamanca, Spanien)
- b) DNS-Färbung: Draq5 (Alexis Corporation; Lausen, Schweiz)
- c) Monoklonale Antikörper konjugiert mit Fluorochromen (Caltag; Burlingame, CA, USA) für folgende Antigene:

Human CD3 – R- Phytoerythrin (R-PE) Konjugat

Human CD4 – Alexa 488 Konjugat

Human CD8 – Tricolor (PE-Cy5) Konjugat

2.1.3. Spezielle Geräte und Software

- a) EDTA-Monovetten (Monovette; Sarstedt), Kanülen (Monovetten-Kanüle; Sarstedt), Desinfektionsspray (Kodan Tinktur forte; Schülke und Mayr), Stauschlauch, sterile Tupfer
- b) Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, BRD): 0,1-2,5µl, 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl
- c) Pipettenspitzen (Sarstedt; Nümbrecht, BRD): 10µl, 200µl, 1000µl
- d) Micro-Tubes (Sarstedt; Nümbrecht, BRD): 1,5ml
- e) Neubauer Zählkammer (Brand GmbH+CO KG; Wertheim, BRD) und Deckgläschen
- f) Laser-Scanning-Cytometer (LSC) mit Argon- und Helium-Neon-Laser (CompuCyte; Cambridge, MA, USA)
- g) WinCyte Version 3.7 (CompuCyte; Cambridge, MA, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Probengewinnung- und Aufbewahrung

Bei allen Patienten wurde im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahme zur stationären präoperativen Aufnahme ein EDTA-Blutröhrchen zusätzlich abgenommen. Die standardisierte periphere venöse Blutabnahme erfolgte am späten Vormittag durch den Stationsarzt.

Das Blut wurde direkt nach Entnahme durch leichtes Schwenken mit dem in der Monovette enthaltenem EDTA vermischt. Anschließend wurde es bei Raumtemperatur gelagert, bis spätestens nach sechs Stunden die Weiterverarbeitung erfolgte.

2.2.2. Präparation für die Laser-Scanning-Zytometrie

Die Weiterverarbeitung des Blutes erfolgte nach einem standardisierten Schema, welches in Bezug auf die Zeitverläufe streng eingehalten wurde. So ergaben sich lediglich minimale Verzögerungen während der Verarbeitung der Proben.

Für jeden Ansatz wurden 1µl DRAQ5 und jeweils 0,5µl der monoklonalen Antikörper CD3, CD4 und CD8 in ein Micro-Tube pipetiert. Dazu wurde jedesmal die Pipettenspitze gewechselt. Vor der Entnahme von 10µl EDTA-Vollblut aus der Monovette wurde diese nochmals geschwenkt. Um sicherzugehen, dass auch wirklich 10µl in der Pipettenspitze enthalten sind, wurde diese dreimal in der Monovette aufgezogen und wieder entleert. Nach der Zugabe des EDTA-Vollbluts in den Micro-Tube wurden Blut und Antikörper nochmals gut vermischt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte im Dunkeln und bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 188µl Erythrozyten-Lyse-Puffer (Quicklysis™) in den Micro-Tube pipetiert. Somit liegt nun ein Gesamtvolumen von 200,5µl vor, was einer Verdünnung der 10µl EDTA-Vollblut von 1:20 entspricht. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Ziel, die in der Probe vorhandenen Erythrozyten zu lysieren.

Daraufhin erfolgte die Befüllung des oberen und unteren Feldes der Neubauer-Zählkammer, die zuvor mit einem Deckgläschen versehen wurde, mit jeweils 10 μ l des fertigen Ansatzes. Die Messfelder der Neubauer-Zählkammer umfassen eine Fläche von 3mm x 3mm. Die Kammer hat eine Höhe von 0,1mm. Um die absolute Zellzahl pro Mikroliter zu errechnen, wurde die vom LSC ermittelte Zellzahl pro Feld mit der Endverdünnung von 1:20 multipliziert und anschließend durch das analysierte Volumen von 0,9 μ l (3mm Breite x 3mm Länge x 0,1mm Höhe = 0,9mm³) geteilt:

$$(\text{Zellzahl} \times 20) / (3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 0,1\text{mm}) = \text{Zellen}/\mu\text{l}$$

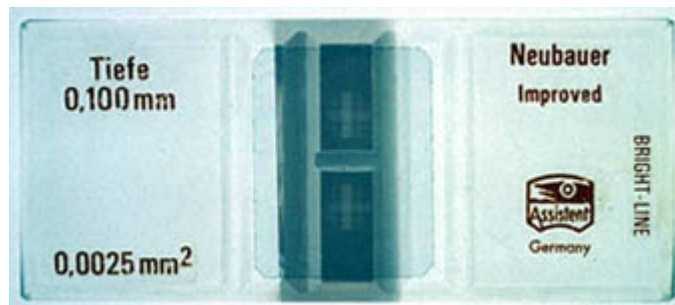


Abbildung 3: Neubauer-Zählkammer mit Deckglas, Ansicht von oben; die zwei Zählnetze sind als Kreuz erkennbar (nach: http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_D/Lab/count_manual.htm Zugriff am 09.01.2008)



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Neubauer-Zählkammer, Seitansicht mit aufgelegtem Deckglas (nach: http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_D/Lab/count_manual.htm; Zugriff am 09.01.2008); blau = Kammertiefe

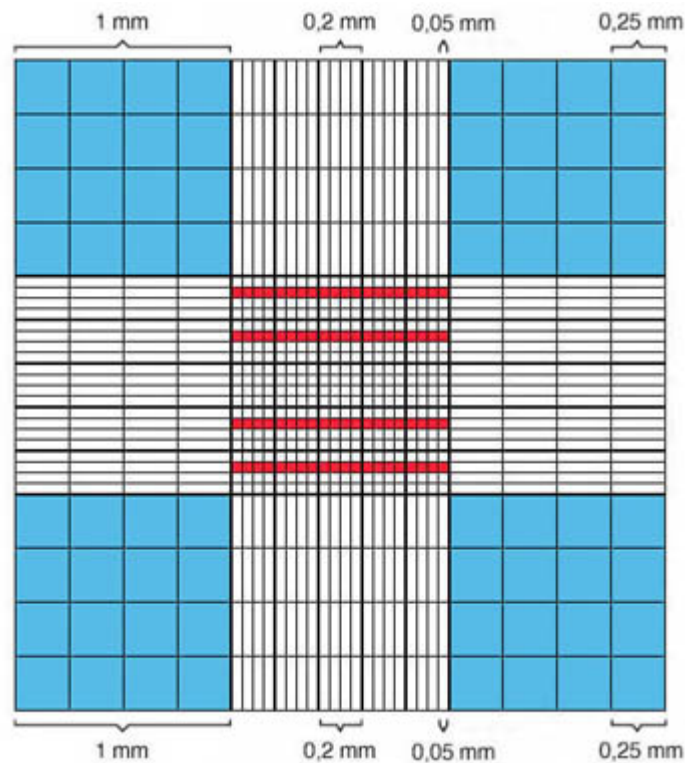


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zählnetzes der Neubauer-Zählkammer (nach: http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_D/Lab/count_manual.htm; Zugriff am 09.01.2008)

Die Messung durch das LSC erfolgte direkt nach Befüllung der Kammer. Ein kompletter Scanvorgang, der das obere und untere Feld der Neubauer-Zählkammer umfasst, dauert ca. 15 Minuten. Nach dem ersten Scanvorgang wurde eine zweite Probe aus dem Ansatz entnommen, auf die gleiche Weise in eine zweite Neubauer-Zählkammer pipettiert und vom LSC ausgezählt. Um die lysierende Wirkung des Erythrozyten-Lyse-Puffers während des ersten Scanvorgangs zu minimieren, wurde der Ansatz bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Anschließend wurden die gemessenen Fluoreszenzen gegeneinander in Punktwolken-Diagrammen dargestellt.

Zusätzlich wurde zu jedem Fall die Leukozytenzahl des Routine-Labors dokumentiert, um die mit dem LSC ermittelten Daten mit der bisherigen Routine-Diagnostik zu vergleichen.

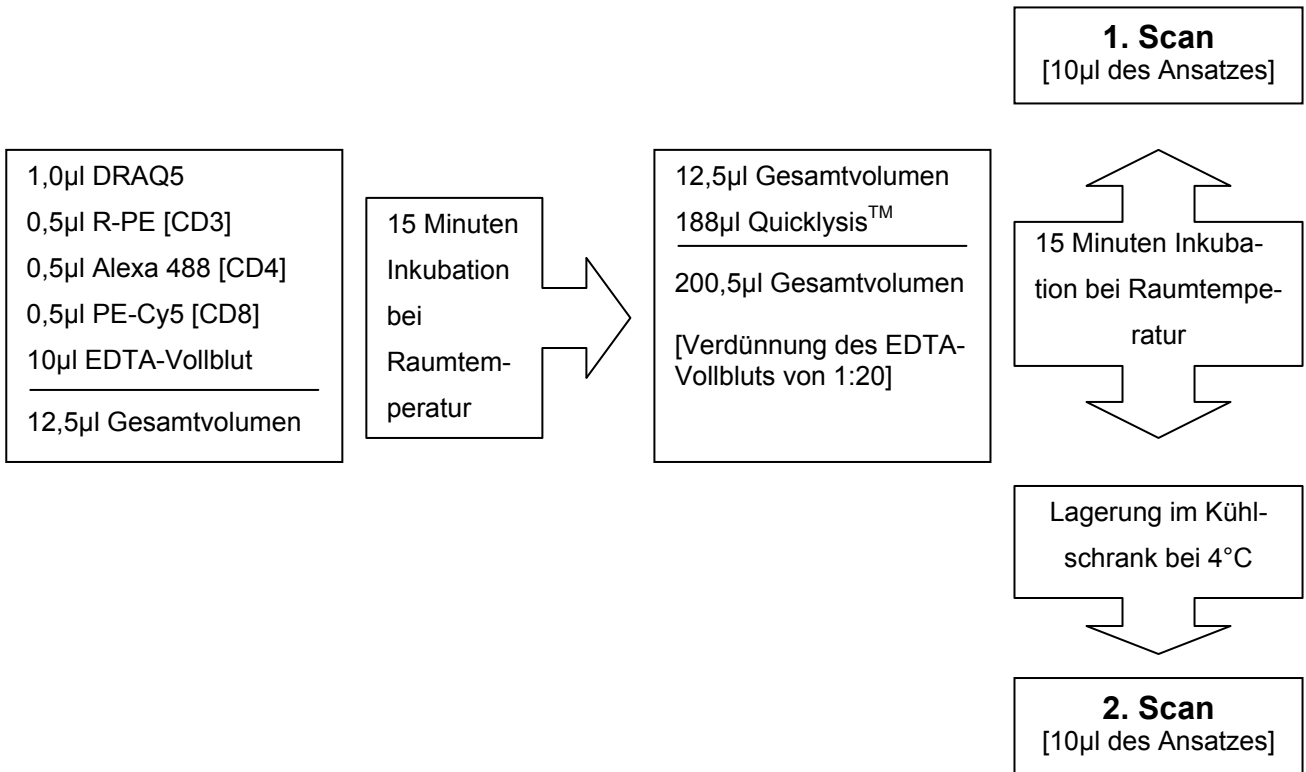


Abbildung 6: Schema der Präparation für die Laser-Scanning-Zytometrie

Es werden pro Kammer ca. 8 Minuten Scanzeit benötigt, womit ein Scan, der aus dem Scan der oberen und unteren Kammer besteht, ca. 15 Minuten dauert. Der Wechsel der Zählkammern unter dem LSC, der zwischen dem ersten und dem zweiten Scan liegt, dauert ca. 3 Minuten. Der Scan beginnt jeweils mit der oberen Kammer. Somit unterliegen die Zellen der unteren Kammer des zweiten Scans einer ca. 30 Minuten längeren Einwirkzeit der Reagentien als die Zellen der oberen Kammer des ersten Scans.

2.2.3. Laser-Scanning-Zytometrie

Die Messungen der Ansätze wurden mit einem Laser-Scanning-Cytometer (LSC) der Firma CompuCyte durchgeführt. Das Gerät verfügt über zwei Laser: einen Argon-Ion-Laser, der bei 488nm emittiert, sowie einen Helium-Neon-Laser, der bei 633nm emittiert. Zur Detektion des emittierten Lichts enthält das LSC weiterhin vier optische Filter, Photomultiplier und folgende Bandpass-Filter:

PMT	Filtername	Farbe	DRLP[nm]	Range[nm]	Fluorochrom
#1	X	blau	HQ	463/30	(nicht aktiviert)
#2	Cube D	grün	555	530/30	Alexa 488
#3	Cube J1	gelb	605	580/30	R-PE
#4	Cube H1	rot	full mirror	650	PE-Cy5; Draq5

Tabelle 6: Konfiguration der Photomultiplier (PMT)

2.2.4. Datenerhebung und Softwarekonfiguration

Die emittierten Fluoreszenzen wurden mit den in 2.2.2. genannten Photomultipliern gemessen. Für die Immunphänotypisierung der Leukozyten wurden folgende Fluorochrome (angegeben ist zusätzlich der anregende Laser sowie der Messkanal) verwendet:

Fluorochrom	Laser	Messkanal
Alexa 488	Argon	PMT#2
R-PE	Argon	PMT#3
PE-Cy5	Argon	PMT#4
Draq 5	Helium-Neon	PMT#4

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Fluorochrome mit dem jeweils anregendem Laser und Messkanal

Als Trigger wurde das Signal von PMT#4 nach Helium-Neon-Laser-Anregung (DRAQ5) benutzt. Bei jeder Messung wurde zu Beginn die korrekte Lage der Scan area, die Einstellung des Thresholds, der Konturparameter sowie der Photomultiplier kontrolliert. Bei Abweichungen erfolgte jeweils eine Korrektur der oben genannten Messkomponenten. Zu Beginn der Versuchsreihe wurden die Photomultiplier auf die Proben justiert, so dass diese Einstellungen über den gesamten Zeitraum der Messungen beibehalten werden konnten. Die dynamische Hintergrundkalkulation („Dynamic background settings“) war für alle Parameter aktiviert, der Argon-Laser wurde auf die Stärke von 5mW gesetzt. Die übrigen Einstellungen lauten wie folgt:

Fluorochrom	Voltage	Offset	Gain
DRAQ5 (PMT#4)	45%	2073	255
R-PE (PMT#3)	60%	2098	255
Alexa 488 (PMT#2)	50%	1998	255
PE-Cy5 (PMT#4)	50%	2073	255

Tabelle 8: LSC-Einstellungen während der Versuchsreihe

Die mit diesen Einstellungen erhobenen Daten wurden mit Hilfe der WinCyte-Software in Punktwolkendiagrammen dargestellt.

Es folgte eine lineare Darstellung für die mit DRAQ5 markierten Leukozyten in der Neubauerzählkammer (Abbildung 7a). In einem zweiten Schritt wurden die Zellen anhand ihrer X- und Y-Position in der oberen bzw. unteren Kammer lokalisiert und entsprechende „Areas“ angelegt (Abbildung 7b). So wurde eine getrennte Auswertung der oberen und unteren Kammer möglich. Durch elektronisches Gaten konnten dann die einzelnen Lymphozytensubpopulationen mittels ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzmerkmale voneinander graphisch getrennt werden. Dazu wurde zunächst das DRAQ5-Integral gegen das CD3-Integral aufgetragen, womit eine Unterscheidung von CD3-positiven von CD3-negativen Leukozyten möglich wurde (Abbildung 7c).

Entsprechend wurde in einem letzten Schritt das CD4-Integral gegen das CD8-Integral aufgetragen, um CD4-positive Lymphozyten von CD4-negativen bzw. CD8-positive Lymphozyten von CD8-negativen zu unterscheiden (Abbildung 7d). Bei diesen Diagrammen wurde eine logarithmische Skalierung gewählt. Es folgte die Kalkulation der verschiedenen Prozentzahlen sowie der absoluten Zellzahlen.

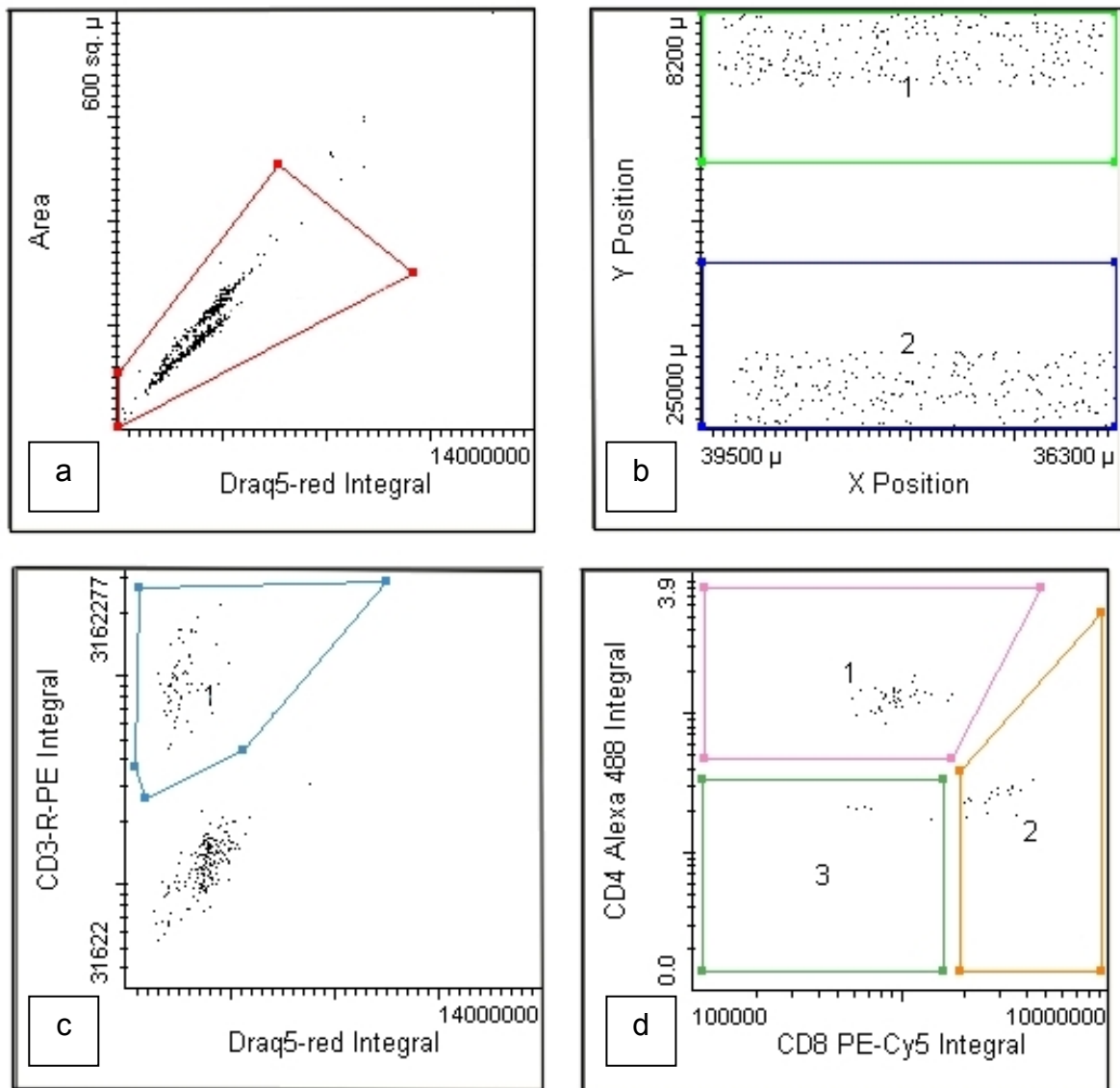


Abbildung 7: Gatingkaskade für Leukozytensubpopulationen: (a) alle gemessenen Zellen; (b) Verteilung der gemessenen Zellen auf die obere (grün) und untere (blau) Kammer; (c) Darstellung der CD3-positiven Zellen der oberen Kammer im blau markierten Areal 1; (d) Darstellung der CD4-positiven Zellen im rosa markierten Areal (1) bzw. der CD8-positiven Zellen im gelb markierten Areal (2) der oberen Kammer

2.3. Methoden der statistischen Auswertung

2.3.1. Prüfung der Validität der Methode

Zunächst wurden die Messergebnisse für Leukozyten, CD3-positive, CD4-positive und CD8-positive Lymphozyten der oberen und der unteren Kammer innerhalb eines Scans mittels Korrelationsanalyse verglichen. Es wurde der Brevais'sche Korrelationskoeffizient nach Pearson r berechnet. Dies wurde sowohl beim Scan nach 15 Minuten als auch beim Scan nach 30 Minuten durchgeführt.

Nach der Bestimmung des Mittelwerts für die erhobenen Werte im ersten und zweiten Scan wurden diese ebenfalls mittels Korrelationsanalyse verglichen.

Es folgte der Vergleich der ermittelten Leukozytenzahlen mit den im Routinelabor erhobenen Leukozytenzahlen.

2.3.2. Signifikanzbestimmung

Mit den erhobenen Mittelwerten der oberen und unteren Kammer wurde der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt, um signifikante Unterschiede in den Leukozytenzahlen und den Zahlen der Leukozytensubpopulationen bei den Tumorpatienten bzw. den Patienten ohne Kopf-Hals-Malignom zu belegen.

Außerdem wurde der t-Test für unabhängige Stichproben mit den bereits oben genannten Parametern durchgeführt, um signifikante Unterschiede in den Zellzahlen bei Patienten mit nicht-metastasiertem bzw. metastasiertem Kopf-Hals-Karzinom darzustellen.

Beide Tests wurden bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt, somit lag das Konfidenzintervall bei 95%.

2.3.3. Verwendete Software

Sämtliche Auswertungen der Versuchsergebnisse wurden mit dem Programm Microsoft Excel XP mittels Erstellung von Tabellen der Einzelergebnisse und deren Verwendung für Mittelwerttabellen durchgeführt.

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung sämtlicher Diagramme erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel XP und SPSS 13.0.

3. ERGEBNISSE

3.1. DNA-Färbung und Triggerung auf DRAQ 5

Die DNA-Färbung erfolgte mit DRAQ 5. Über diesen Farbstoff konnte gut getriggert werde, da alle Zellkerne diesen Farbstoff anreicherten, sich aber sowohl Zellaggregate als auch Debris durch ihre Mehr- bzw. Minderanreicherung gut abgrenzen und eliminieren ließen. So war es möglich die Proben auf ihre relevanten Bestandteile, die unterschiedlichen, zu beurteilenden Zellpopulationen, zu untersuchen.

Es erfolgte die lineare Darstellung der Zellen in Form von Punktwolkendiagrammen, womit später eine Lokalisierung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer möglich war (siehe Abbildung 8).

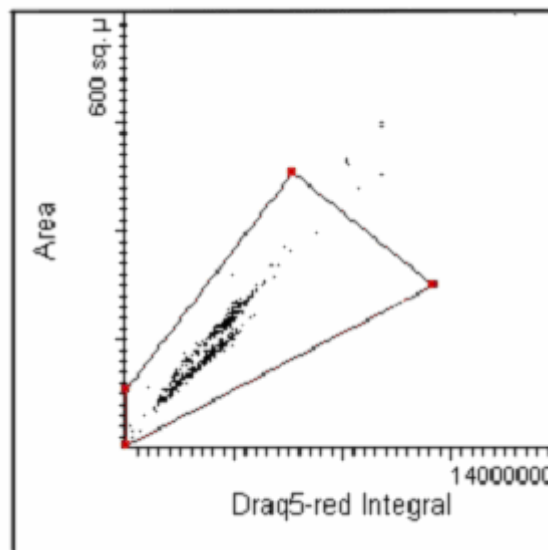


Abbildung 8: Lineare Darstellung der Leukozyten mittels Punktwolkendiagramm

3.2. Immunphänotypisierung und Gating

Durch eine Gatingkaskade (vgl. Kapitel 2.2.4, Abbildung 7) konnten anhand der verwendeten Antikörper (CD3-R-PE, CD4-Alexa-488, CD8-PE-Cy5) sowohl die Lymphozyten als auch ihre Subpopulationen, die T-Helfer-Zellen und die zytotoxischen T-Zellen, gemäß ihres immunologischen Phänotyps voneinander getrennt werden.

3.3. Erhobene Daten zur Prüfung der Validität der Methode

Nach dem in 3.1. und 3.2. beschriebenen Untersuchungsgang wurden folgende Datensätze erhoben:

		Leukozyten	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Scan 1	Obere Kammer [O1]				
	Untere Kammer [U1]				
Scan 2	Obere Kammer [O2]				
	Untere Kammer [U2]				
	Routinelabor [RL]		X	X	X

Tabelle 9: Datensatz, der bei jedem Probanden erhoben wurde; bei den mit X gekennzeichneten Feldern liegen keine Daten vor.

Insgesamt wurden so für jeden Probanden fünf Werte die Leukozyten betreffend erhoben. Für die Lymphozytensubpopulationen ergaben sich vier Werte, da diese im Routinelabor nicht bestimmt wurden.

3.3.1. Korrelation der oberen und der unteren Kammer

Jede Probe wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten gescannt. Der erste Scan bei Minute 0, der zweite 15 Minuten später. Bei beiden Messungen erhielten wir Zellzahlen für die obere und untere Kammer der Neubauer-Zählkammer. Um die Zuverlässigkeit der beiden Zellzählungen zu zeigen, verglichen wir die Zellzahlen der oberen mit denen der unteren Kammer. Diese so genannte interne Scan-Korrelation war zu beiden Messzeitpunkten für alle ermittelten Zellpopulationen gut (siehe Tabelle 10)

Zellpopulation	r Scan 1	r Scan 2
Leukozyten	0,874	0,856
CD3 ⁺	0,866	0,860
CD4 ⁺	0,837	0,826
CD8 ⁺	0,878	0,880

Tabelle 10: Interne Scan-Korrelation

Nahezu alle Werte befinden sich über $r = 0,85$, mit Ausnahme der Ergebnisse für CD4⁺-Alexa 488. Dies zeigt eine gute Korrelation der gemessenen Zellzahlen der oberen und unteren Kammer sowohl im ersten als auch im zweiten Scan.

3.3.2. Korrelation der Mittelwerte des ersten und zweiten Scans

Der nächste Schritt bestand darin, den Mittelwert aus den Zellzahlen der oberen und unteren Kammer eines Scans zu bilden und die Korrelation des ersten Scans nach 0 Minuten mit dem nach 15 Minuten zu ermitteln. Diese so genannte Inter-Scan-Korrelation fiel mit Werten von ca. 0,9 noch besser aus als die zuvor erhobene interne Scan-Korrelation (siehe Tabellen 10 und 11).

Zellpopulation	r Inter-Scan
Leukozyten	0,935
CD3 ⁺	0,903
CD4 ⁺	0,883
CD8 ⁺	0,899

Tabelle 11: Inter-Scan-Korrelation

3.3.3. Korrelation der mit dem LSC erhobenen Leukozytenzahlen mit dem Routinelabor

Schließlich erfolgte der Vergleich der erhobenen Daten mit den Werten des Routinelabors des Universitätsklinikums in Bonn, um zu zeigen, dass die Zuverlässigkeit der ermittelten Zellzahlen nicht nur innerhalb der neuen Methode bestätigt werden kann. Es wurden die Mittelwerte der Leukozyten-Zellzahlen aus oberer und unterer Kammer beider Scans benutzt. Dabei zeigte sich, dass der zweite Scan mit $r = 0,929$ besser mit den Zellzahlen des Routinelabors korrelierte als der erste mit $r = 0,895$.

3.4. Klinische Aspekte der erhobenen Daten

3.4.1. Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit bzw. ohne Kopf-Hals-Karzinom

Die Probanden wurden in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen die Gruppe mit Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. In dieser Gruppe wurden achtzehn Oropharynxkarzinome (acht ♀ / zehn ♂), fünf Hypopharynxkarzinome (fünf ♂), drei Larynxkarzinome (eine ♀ / zwei ♂) und drei Nasopharynxkarzinome (zwei ♀ / ein ♂) diagnostiziert, so dass sich eine Gesamtzahl von 29 Patienten ergibt.

Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten mit verschiedenen nicht-malignen otorhinolaryngologischen Erkrankungen. In dieser Gruppe befinden sich insgesamt 47 Patienten (30 ♀ / 17 ♂).

Mit den durch das Gaten erhaltenen absoluten Zellzahlen der Leukozyten und deren Subpopulationen wurde der Wilcoxon-Rangsummentest für unabhängige Stichproben durchgeführt. Hierbei ergaben sich folgende Ergebnisse: Es gab einen signifikanten Unterschied in den Leukozytenzahlen zwischen den beiden oben beschriebenen Gruppen. Sowohl im ersten Scan mit $p = 0,015$ als auch im zweiten Scan mit $p = 0,013$ ist das mit $\alpha = 0,05$ festgesetzte Signifikanzniveau deutlich unterschritten. Dies bedeutet, es liegt ein Ergebnis mit statistischer Signifikanz vor. Dies wird ebenfalls deutlich in den Abbildungen 9a und b.

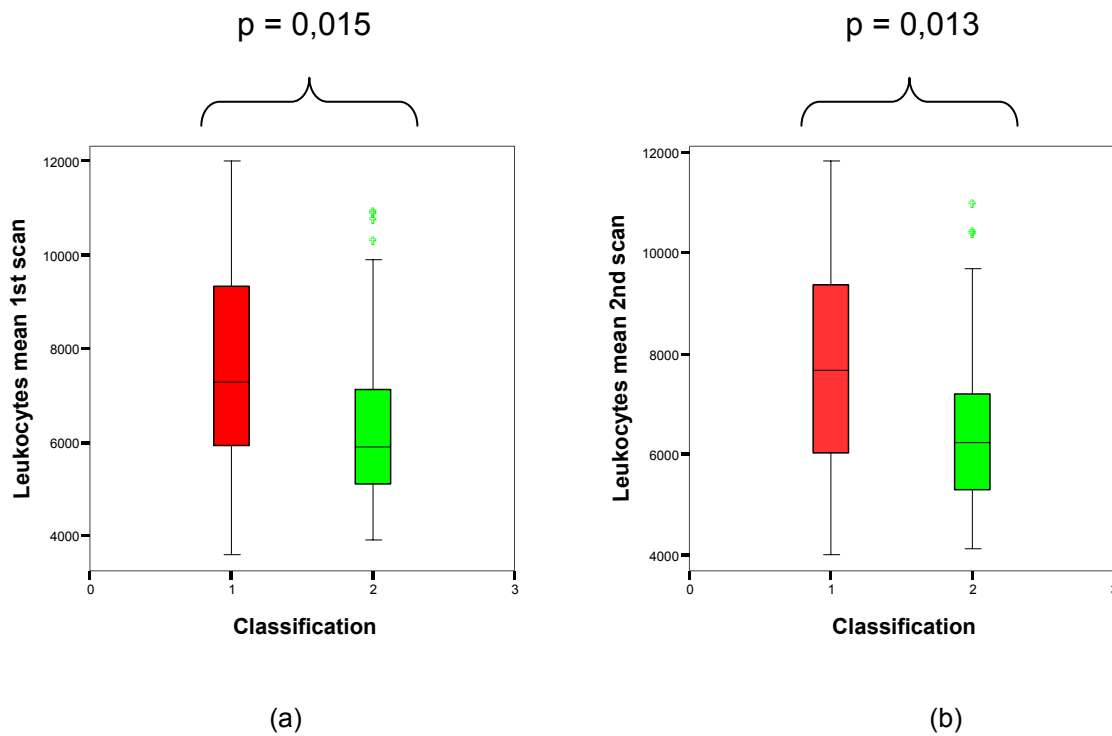


Abbildung 9: (a) Mittelwert der absoluten Leukozytenzahlen des ersten Scans für beide Patientengruppen (1-rot: Tumorpatienten, 2-grün: Nicht-Tumor-Patienten); (b) Mittelwert der absoluten Leukozytenzahlen des zweiten Scans für beide Patientengruppen (1-rot:Tumorpatienten, 2-grün: Nicht-Tumor-Patienten); Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Man erkennt, dass die Leukozyten signifikant erhöht sind in der Gruppe der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich. Dies gilt sowohl für den ersten als auch den zweiten Scan.

Mit den Leukozytensubpopulationen wurde der gleiche Test durchgeführt. Hierbei ergaben sich in den Zellzahlen zwischen Tumorpatienten und Kontrollgruppe jedoch keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 12).

Leukozytensubpopulation	p Scan 1	p Scan 2
Mittelwert CD3 ⁺	0,979	0,945
Mittelwert CD4 ⁺	0,199	0,355
Mittelwert CD8 ⁺	0,806	0,732

Signifikanzniveau: $\alpha = 0,05$

Tabelle 12: Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen der Tumor-Patienten-Gruppe und der Kontrollgruppe

3.4.2. Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Kopf-Hals-Karzinom Patienten mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen

Weiterhin sollte untersucht werden, ob in der Gruppe mit den Probanden mit Kopf-Hals-Karzinom ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit ($n = 13$) bzw. ohne ($n = 9$) Lymphknotenmetastasen besteht. Mit den jeweils durch Gating erhobenen Zellpopulationen wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, da sich für den Wilcoxon-Rangsummentest die Stichprobenzahl als zu gering erwies. Wie Tabelle 13 zeigt, ergab sich kein signifikanter Unterschied in den absoluten Zellzahlen der beiden Gruppen. Weder die Gesamtleukozytenzahl noch die Leukozytensubpopulationen bewegen sich im Bereich des Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$.

Zellpopulation	p Scan 1	p Scan 2
Mittelwert Leukozyten	0,386	0,693
Mittelwert CD3 ⁺	0,435	0,827
Mittelwert CD4 ⁺	0,476	0,366
Mittelwert CD8 ⁺	0,119	0,247

Signifikanzniveau: $\alpha = 0,05$

Tabelle 13: Ergebnisse des t-Tests zwischen Gruppe mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen

Die einzige Lymphozytensubpopulation, die mit $p = 0,119$ im ersten bzw. $p = 0,247$ im zweiten Scan deutlich näher als die anderen Populationen an das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ heranreicht, sind die CD8-positiven Lymphozyten. Zur Verdeutlichung zeigt die folgende Tabelle die erhobenen absoluten Zellzahlen. Diese sind in der Gruppe der Patienten mit Lymphknotenmetastasen höher als in der Gruppe der Probanden ohne Metastasen. In der Abbildung 10 wird dies noch einmal graphisch deutlich.

CD8⁺	Scan 1	Scan 1	Scan 2	Scan 2
	LKN+	LKN-	LKN+	LKN-
Obere Kammer	590	395	566	353
Untere Kammer	668	336	614	412
Mittelwert	629	365	590	383

Tabelle 14: Absolute Zellzahlen der CD8-positiven Lymphozyten bei Lymphknoten-positiven bzw. –
negativen Probanden

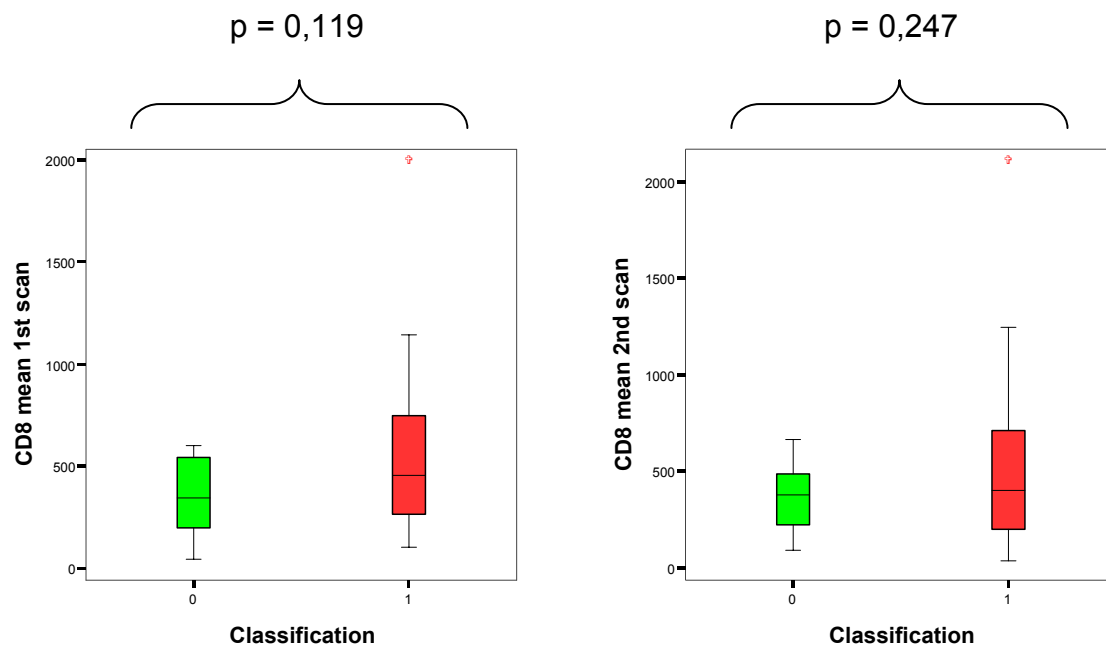


Abbildung 10: (a) Mittelwert der absoluten CD8-positiven Lymphozyten des ersten Scans für beide Patientengruppen (0-grün: keine Lymphknotenmetastasen, 2-grün: Lymphknotenmetastasen); (b) Mittelwert der absoluten CD8-positiven Lymphozyten des zweiten Scans für beide Patientengruppen (0-grün: keine Lymphknotenmetastasen, 2-grün: Lymphknotenmetastasen); Signifikanzniveau: $\alpha = 0,05$

4. DISKUSSION

4.1. Immunphänotypisierung und Erhebung absoluter Zellzahlen mit dem LSC

Die Bedeutung der Zytologie und zellbasierter Untersuchungsverfahren nimmt in allen Bereichen der Medizin beständig zu. Trotz einiger Defizite gilt bisher die durchflusszytometrische Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellen als Standardverfahren [Gerstner et al., 2005]. Nachteilig an dem Verfahren ist beispielsweise, dass die Zellen in Form einer Suspension, die relativ großvolumig sein muss, vorliegen müssen. Weiterhin können keine Aussagen über die Zellmorphologie getroffen werden und eine erneute Messung derselben Suspension ist nicht möglich, da diese nach dem Messvorgang verworfen wird. Auch die Analyse von Zellverbänden, wie z.B. Gewebekulturen und histologische Schnitte, ist mit der Durchflusszytometrie (engl. flow cytometry, FCM) nicht leistbar. Dies führte zur Entwicklung der objektträgerbasierten Zytometrie. Die Vorteile dieses Verfahrens wurden bereits in der Einleitung beschrieben (vgl. Kapitel 1.3.2).

Ein weiteres Anwendungsgebiet der objektträgerbasierten Zytometrie ist die Ermittlung absoluter Zellzahlen. Dabei wird, wie in dem von uns etablierten und in Kapitel 2.2.2. beschriebenen Ansatz, hinsichtlich der spektralen Charakteristika auf die bewährten Verfahren der Durchflusszytometrie zurückgegriffen. Die Zellen (hier in Form von EDTA-Vollblut) werden mittels Pipette auf die Neubauer Zählkammer gebracht. Somit kann ein vorab definiertes, im Vergleich zur FCM-Analyse minimales Probenvolumen analysiert werden. Damit können auch minimale Zellpopulationen mit dem LSC detektiert und analysiert werden [Pachmann et al., 2001], was auch die Möglichkeit der Untersuchung kleiner oder hypozellulärer Proben, wie z.B. Feinnadelbiopsien, eröffnet [Gerstner et al., 2003]. Außerdem besteht die Möglichkeit eine weitere Messung mit derselben Probe mit anderen Einstellungen durchzuführen [Laffers, 2004].

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit diesem neuen Analyseverfahren eine Anwendung zu etablieren, mit der durch eine objektträgerbasierte Methode zuverlässige absolute Zellzahlen erhoben werden können. Der Ansatz ist nach den Prinzipien der objektträgerbasierten Zytometrie mit nur minimalem Material- und Kostenaufwand

durchzuführen. Dabei führt das beschriebene Gesamtkonzept zurück auf die Anfänge der Zellzählung und wird kombiniert mit der neueren Methode der Markierung von Zelloberflächenmerkmalen durch fluoreszierende Antikörper [Ross und McMaster, 1983].

4.2. Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit bzw. ohne Kopf-Hals-Karzinom

Die Fakten den Immunstatus von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom betreffend sind in der Literatur durchaus heterogen und werden kontrovers diskutiert.

Bereits 1986 untersuchten Furusaka et al. die prozentualen T-Zellsubpopulationen im peripheren Blut und fanden heraus, dass es keinen signifikanten Unterschied in den Anteilen von CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten zwischen Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich und gesunden Probanden bzw. Patienten mit anderen nicht malignen Erkrankungen gibt. Auch Aarstad et al. [2006] konnten keinen erhöhten Anteil von CD3-positiven Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit HNSCC im Vergleich zur Normalpopulation nachweisen.

In einer Studie von Kuss et al. [2004] wurden die absoluten Zellzahlen und Prozentzahlen der T-Lymphozyten und ihrer Subpopulationen im peripheren Blut bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs mittels eines Flow-Zytometers erhoben. Es erfolgte der Vergleich mit den Werten von nicht an einem Karzinom erkrankten Probanden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die absoluten Zellzahlen von CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Zellen in der Patientenpopulation signifikant erniedrigt waren, während die Prozentzahlen der zirkulierenden T-Lymphozyten sich im Normbereich bewegten [Kuss et al., 2004]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der absoluten Zellzählung, die auch in unserer Studie mit dem LSC-Ansatz propagiert wird. Weiterhin konnten Kuss et al. zeigen, dass sich die erniedrigten absoluten Zahlen der CD8-positiven Lymphozyten bei Patienten mit nicht mehr nachweisbarer Erkrankung, d.h. mit Zustand nach Operation oder Operation in Kombination mit postoperativer Radiotherapie, wieder normalisierten. Dies war bei den

CD4-positiven T-Zellen nicht der Fall [Kuss et al., 2005]. Kuss et al. führen dieses sog. Lymphozytenungleichgewicht auf die Apoptoseneigung zirkulierender CD8-positiver Zellen bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom zurück, die bereits von mehreren Autoren beschrieben wurde [Hoffmann et al., 2002; Tsukishiro et al., 2003]. Dieses Phänomen der gestörten T-Zell-Homöostase kann die Patienten auch zu Infektionen prädisponieren oder aber nach erfolgter Therapie ein Hinweis auf ein erneutes Auftreten der Erkrankung oder ein Sekundärmalignom anderer Lokalisation sein [Kuss et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls die Lymphozytensubpopulationen sowie die Gesamtleukozytenzahl bei Patienten mit und ohne Kopf-Hals-Malignom erhoben und miteinander verglichen. Dabei ergab sich mit $p=0,015$ (1.Scan) bzw. $p=0,013$ (2.Scan) bei $\alpha = 0,05$ eine signifikante Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl bei den Patienten mit Malignom. Dies ist möglicherweise auf einen generell aktivierten Status des Immunsystems oder eine chronische Entzündung im Bereich des Tumors zurückzuführen. Innerhalb der Lymphozytensubpopulationen konnten allerdings keine signifikant veränderten Werte bei den Karzinompatienten nachgewiesen werden (vgl. Tab. 12, Kapitel 3.4.1). Dies könnte für eine bessere Prognose der untersuchten Patientenpopulation sprechen, berücksichtigt man Ergebnisse aus anderen klinischen Forschungsbereichen (siehe unten sowie Kapitel 4.7). Somit würde sich eine Follow-up-Studie mit Ermittlung des Therapieverlaufs, der Rezidivrate und des Gesamtüberlebens anbieten, um die prognostischen Auswirkungen der ermittelten absoluten Zahlen der Lymphozyten-Subpopulationen zu prüfen.

Die erhobenen Ergebnisse sind also anscheinend nicht unwesentlich für die Prognose der Patienten. In einer Studie von Nozoe et al. [2005] waren die Überlebensraten von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus deutlich besser bei hohen Messwerten für CD4-positive Lymphozyten. Dagegen ist bei einer erhöhten Anzahl an CD8-positiven Lymphozyten mit einer schlechten Prognose zu rechnen [Nozoe et al., 2005]. Folglich ist auch die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit einer hohen CD4/CD8-Ratio besser, als die derjenigen mit einer niedrigen Ratio. Diese Korrelation von Prognose und Messwerten für CD4- bzw. CD-8-positive Lymphozyten wurde bereits im Jahr 2003 von Cho et al., bezogen auf im Tumorzellnest-/stroma gemessene Lymphozyten, beschrieben.

4.3. Vergleich der absoluten Zellzahlen der Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen bei Kopf-Hals-Karzinom Patienten mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gesamtleukozytenzahl sowie die Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignom mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen erhoben und miteinander verglichen. Es besteht kein signifikanter Unterschied in den absoluten Zellzahlen der beiden Gruppen. Weder die Gesamtleukozytenzahl noch die Leukozytensubpopulationen bewegen sich im Bereich des Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$. Betrachtet man allerdings die absoluten Zellzahlen, was besonders bezogen auf die CD8-positiven Lymphozyten zutrifft, fallen erhöhte absolute Zellzahlen bei den Lymphknotenmetastasen-positiven Patienten auf, auch wenn diese Erhöhung das Signifikanzniveau nicht erreicht (vgl. Tab. 14 in Kapitel 3.4.2). Vermutlich wäre ein größerer Stichprobenumfang nötig, um das Signifikanzniveau zu erreichen. Allerdings bedeutet ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis nicht, dass diese Werte keine praktische Relevanz haben. Nun stellt sich die Frage, ob die Patienten mit den Lymphknotenmetastasen diese haben, weil die CD8-positiven Lymphozyten im Vergleich zu denen der Patienten ohne LKN-Metastasen erhöht sind oder ob die Anzahl der CD8-positiven Lymphozyten erhöht ist, weil Metastasen vorhanden sind. Diese Beobachtung passt zu der von Nozoe et al. [2005] gemachten Aussage, dass bei Patienten mit einer erhöhten Zahl von CD8-positiven Lymphozyten im peripheren Blut eine schlechtere Prognose zu erwarten ist. Insgesamt ist aber anhand der Lymphozytensubpopulationen kein eindeutiger Rückschluss auf das Vorhandensein von Halslymphknotenmetastasen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich zu ziehen.

Hier könnte aber bald die sog. *in vivo*-Zytometrie Lösungen bringen. Ziel bei dieser Technologie ist es, die Krebszellen in ihren verschiedenen Charakteristika - Proliferation, Infiltration, aber auch Metastasierung - nicht-invasiv im lebenden Organismus nachzuweisen [Wessels et al., 2007]. Mittels genetischer Reportersysteme (eGFP, DsRED) wird es möglich, eine Zelle bzw. einen Zellverband (z.B. eine Metastase) im Versuchstier anhand der Expression fluoreszierender Proteine zu detektieren. Auf diese Art können komplexe Prozesse wie die Metastasierung im

Versuchstier besser untersucht und nachvollzogen werden und das nicht erst, wenn es bereits zum Endpunkt in Form der makroskopischen Metastase gekommen ist [Sahai, 2007]. Dazu steht mittlerweile eine Vielzahl an Farbstoffen zur Verfügung, die fortlaufend immer besser an die gewünschten Anwendungen angepasst werden [Levenson und Mansfield, 2006]. Alternativ zur oben beschriebenen Expression eines Fluorochroms durch die Zelle kann die Zelle auch mit einem Farbstoff markiert werden, wie dies ja auch bei Ansätzen für das LSC der Fall ist. Für die *in vivo*-Zytometrie haben sich sog. Quantum Dots bewährt [Gao et al., 2004]. Quantum Dots sind fluoreszierende Nanostrukturen, die meist aus Halbleitermaterial bestehen. Bis diese Techniken allerdings zum diagnostischen Einsatz beim Menschen genutzt werden können, müssen noch einige Hindernisse überwunden werden: beispielsweise setzen die Quantum Dots Schwermetalle frei, die sowohl zu lokalen als auch systemischen toxischen Nebenwirkungen führen können [Gerstner, 2008].

4.4. Fehlerquellen der Methode

Bei der Datenerhebung mittels des LSC ergaben sich mit dem Programm WinCyte 3.7 drei Software-spezifische Probleme. Zunächst sahen wir uns mit dem Problem der sog. Doubletten konfrontiert. Dies sind Zellen, die in der Neubauer-Zählkammer zu eng beieinander liegen, so dass das LSC nicht in der Lage ist, die reflektierten Emissionen als zwei Einzelemissionen zu erkennen (siehe Abbildung 11). Dieses Problem ist jedoch lösbar, da es mittels der Software möglich ist, die Doubletten zu markieren und auszusortieren, so dass diese Zellen nicht in die Messung eingehen. Ähnlich wurden Artefakte (z.B. Staubkörner) vom LSC wahrgenommen, die aber ebenfalls eliminiert wurden und nicht in die Messergebnisse eingegangen sind.

Das zweite Problem ergab sich direkt zu Beginn einer jeden Messung. Das LSC analysiert die Fläche der Neubauer-Zählkammer durch Anfertigung von 42 einzelnen Scan-Bildern (siehe Abbildung 12). Dabei wurde regelmäßig beobachtet, dass die Zellen des ersten Scan-Bildes nicht gezählt wurden, was sich allerdings auf die obere Kammer beschränkte. Das Scannen und Erfassen der Zellzahlen der unteren Kammer erfolgte

dann vollständig und problemlos. Folglich fehlen in der oberen Kammer bei jedem Scan 1/42 der Zellen. Das entspricht 2,4% der Gesamtzellzahl.

Weiterhin wurden Zellen, die zu nah am Rand eines Scan-Bildes lagen, nicht vom LSC erfasst (siehe Abbildung 11). Dies ist zunächst auch sinnvoll, damit Zellen, die auf der Grenze von zwei Scan-Bildern liegen, nicht doppelt gezählt werden. Andererseits fehlen natürlich Zellen in den endgültig gemessenen Zellzahlen. Fusioniert man die 42 einzelnen Scan-Bilder zu einer gesamten Scan-Area, lassen sich die randständigen Zellen erfassen. Wenn man die beiden absoluten Zellzahlen von den einzelnen Scan-Bildern mit der gesamten Scan-Area vergleicht, fehlen pro Scan ca. 10% der Zellen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch im Vergleich mit dem Routinelabor wieder, dessen gemessene Zellzahlen regelmäßig um 10% höher liegen als die mit dem LSC erhobenen Zahlen.

Schlussendlich wurde allerdings keine Multiplikation der mit dem LSC erhobenen absoluten Zellzahlen durchgeführt, da dies keine Auswirkung auf die Korrelation der Daten hat. Somit ist es allerdings auch nicht möglich, diese Zahlen als Referenzwerte zu benutzen. Sollte man diese Methode als Routineverfahren zur absoluten Zellzählung benutzen wollen, müssten zunächst neue Ober- und Untergrenzen der Zellzahlen festgelegt werden.

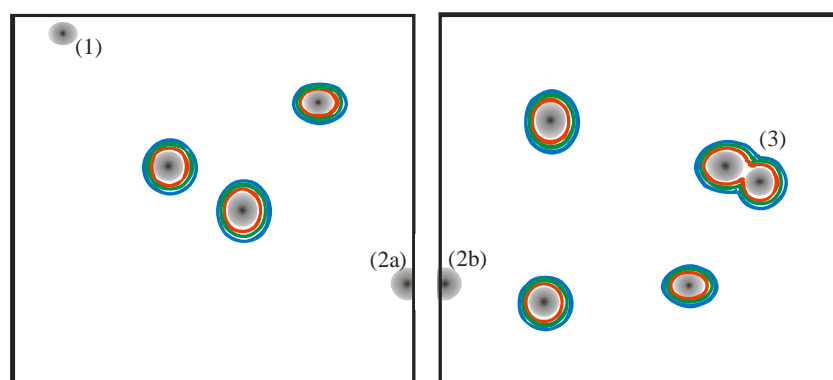


Abbildung 11: Schematische Darstellung zwei nebeneinander liegender einzelner Scan-Bilder mit vollständig unerkannter Randzelle (1), nicht erkannter Randzelle im linken (2a) und rechten (2b) Scan-Bild sowie einer Doublette (3)

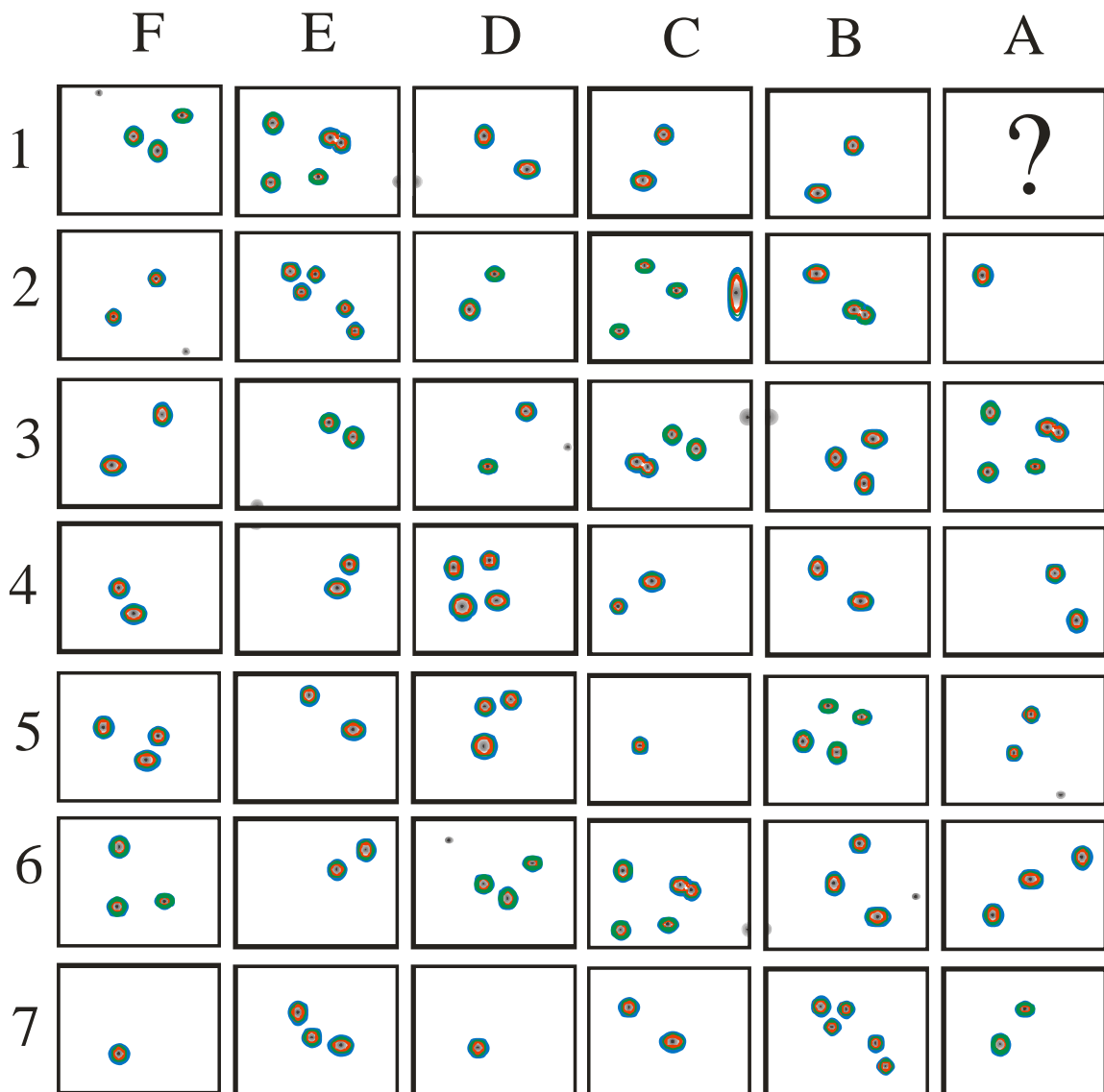


Abbildung 12: Schematische Darstellung der 42 einzelnen Bild-Scans und Zusammensetzung zur Scan-Area der oberen Zählkammer

Neben den Software-spezifischen Problemen lässt sich auch ein physikalischer Fehler vermuten, der begründet, warum in der unteren Kammer der beiden Scans jeweils mehr Zellen gemessen werden als in der oberen: der Sedimentationseffekt. Der Inhalt der Neubauer-Zählkammer wurde unmittelbar nach Befüllen der beiden Kammern mittels LSC analysiert. Die Zellen brauchen aber eine gewisse Zeit, um auf den Boden der

Kammer zu sedimentieren, um dort optisch vom LSC erkannt werden zu können. Liegen sie nicht in dieser Ebene, werden sie beim Scan-Prozess auch nicht wahrgenommen.

4.5. Absolute Zellzählung und Prädiktive Medizin

Die Möglichkeit der absoluten Zellzählung einer bestimmten Subpopulation von Zellen könnte sich zu einer wesentlichen Methode für die Prädiktive Medizin entwickeln [Valet, 2005]. Sie lässt sich in die als „*Cytomics*“ bezeichnete Wissenschaft eingliedern, die sich mit der Untersuchung von heterogenen Zellsystemen auf einer Einzel-Zell-Ebene mittels verschiedener zytometrischer Methoden beschäftigt. Durch die prädiktive Medizin gesteuerte Therapieansätze, wie z.B. die frühere Reduzierung oder Einstellung einer spezifischen Therapie, könnten dazu führen, dass wesentliche therapeutische Nebenwirkungen in Zukunft vermieden werden können [Valet und Tárnok, 2003]. Die Zell-orientierte Analyse ist für solche Ansätze essentiell, da Krankheiten charakterisiert sind durch signifikante Abweichungen von den normalen molekularen Prozessen in Zellverbänden oder Organen.

Auch im Bereich der Hämatookologie spielt die Ermittlung von absoluten Zellzahlen im Hinblick auf die Prognose eine wichtige Rolle. Das Potential, bereits vor Therapiebeginn Hochrisikopatienten oder sog. Non-Responder zu identifizieren, ist somit von sehr hohem klinischen Interesse: es wird die Möglichkeit eröffnet, beispielsweise Hochrisikopatienten direkt von Behandlungsbeginn an mit therapeutischen Alternativen zu unterstützen. Valet et al. [2003] beschreiben eine prätherapeutische Identifikation von Hochrisikopatienten mit AML durch die kombinierte Analyse zytometrisch-immunphänotypischer, zytogenetischer und klinischer Daten. Damit wird die Erstellung individualisierter Therapieprotokolle möglich [Valet et al., 2003].

Weiterhin beschrieben im Jahr 2006 Behl et al. die prognostische Aussagekraft der absoluten Lymphozyten-Zählung bei akuter myeloischer Leukämie. De Angulo et al. [2008] zeigten ebenfalls, dass die absoluten Lymphozyten-Zahlen ein wichtiger prognostischer Marker bei der akuten lymphatischen und der akuten myeloischen Leukämie sind. Die absolute Lymphozyten-Zählung erfolgte in der Studie während der Induktionsphase der chemotherapeutischen Behandlung. Dabei korrelierten sowohl die

Rezidivrate als auch die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate gut mit den erhobenen Lymphozytenzahlen. Liegen diese unter 350 Zellen/ μ l, ist mit einer schlechten Gesamtüberlebensrate und hohem Rezidivrisiko zu rechnen, während bei Zahlen von mehr als 350 Zellen/ μ l eine gute Prognose erwartet werden kann [De Angulo et al., 2008].

Ein weiteres Beispiel für wachsende Bedeutung der absoluten Zellzählung bezogen auf Lymphozytensubpopulationen gibt die Arbeitsgruppe um Milasiene et al. [2007]. Die Ergebnisse zeigen, dass Patienten mit höheren absoluten Zahlen an Lymphozytensubpopulationen vor der operativen Therapie eines Magen- oder kolorektalen Karzinoms im Stadium III eine bessere Prognose bezogen auf die Gesamtüberlebensrate haben [Milasiene et al., 2007].

Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit, weitere Methoden zur Untersuchung des Immunstatus zu entwickeln, sowie die Erforschung immunmodulatorischer Therapieansätze voranzutreiben.

4.6. Weitere klinische Anwendungsgebiete der absoluten Zellzählung

Neben der Prädiktiven Medizin gibt es weitere wichtige Anwendungsgebiete der absoluten Zellzählung von Lymphozytensubklassen.

Dazu gehört unter anderem die Bestimmung der Anzahl von CD4-positiven T-Lymphozyten im peripheren Blut bei HIV-positiven Patienten. Diese ist essentiell zur Therapieplanung und Verlaufskontrolle. Denn nach den Leitlinien der Deutschen Aids-Gesellschaft wird das Stadium der Erkrankung sowohl anhand der Viruslast und der klinischen Symptomen als auch durch die Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten bestimmt [Arastéh et al., 2005]. Das Risiko für opportunistische Erkrankungen steigt mit der Abnahme der CD4-positiven Lymphozyten im peripheren Blut. Zusammen mit der CD4/CD8-Ratio und der Viruslast sind diese die wichtigsten Surrogatmarker zur Abschätzung des Immundefekts und der Aktivierung des Immunsystems [Braun und Dorman, 2003]. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der steigenden Zahlen von HIV-Patienten gerade in den Entwicklungsländern, ergibt sich die Notwendigkeit einfacher und kostengünstiger diagnostischer Verfahren. Der bisherige relativ teure Standard zur

Analyse von Lymphozytensubpopulationen ist die Durchflusszytometrie. In der aktuellen Literatur finden sich Berichte zur Entwicklung von günstigeren Messmethoden; so beschreiben sowohl Rodriguez et al. [2005] als auch Cheng et al. [2007] die Entwicklung eines Mikrochips zur Messung von CD4-positiven Lymphozyten. Die Methode zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie als Standardmethode ($r=0,95$) [Rodriguez et al., 2005]. Eine weitere vergleichende Studie von Dieye et al. [2005] untersucht verschiedene Methoden zur CD4-Zählung und spricht sich ebenfalls für die Entwicklung volumetrisch-basierter Analysemethoden aus.

Ein weiteres klinisches Anwendungsgebiet der Immunphänotypisierung von Blutleukozyten ist die Differentialdiagnostik der im Kindesalter vorkommenden Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML). Diese ist für die Abgrenzung verschiedener Subtypen relevant. So beschreibt die Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrischen Onkologie und Hämatologie [Schrappe und Creutzig, 2005], dass sich beispielsweise eine reife T-Vorläufer-Zell-ALL durch die Anwesenheit von CD3-positiven Lymphozyten auszeichnet.

Weiterhin relevant ist die Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen für Krankheitsbilder wie angeborene Immundefekte, die Sarkoidose oder die exogen allergische Alveolitis [Gruber, 2007].

4.7. Kombination von Laser-Scanning-Zytometrie und funktionellen Analysen

Die Laser-Scanning-Zytometrie ist eine sich immer mehr etablierende Technologie, die es ermöglicht, Bildanalyse und quantitative Analyse auch von einzelnen Zellen in Geweben *in situ* miteinander zu vereinen [Harnett, 2007]. Mit dem LSC können auch Proben untersucht werden, die sich bisher einer zytometrischen Analyse entzogen. Als Beispiel sind hier histologische Schnitte oder Gewebeverbände im Rahmen des „tissue engineering“ und Zellkulturen zu nennen [Gerstner et al., 2005]. Da die auf einem Objektträger fixierte Probe nicht verworfen wird, ist eine Nachfärbung und somit die Analyse eines anderen Charakteristikums der Zelle möglich. Außerdem besteht die Möglichkeit der Archivierung der Proben für spätere Analysen. Gleichzeitig werden

durch die Option der Relokalisation der Zellen kinetische Analysen in Echtzeit durchführbar [Harnett, 2007]. Damit wird auch die Untersuchung von Immunantworten *in situ* möglich. Hinsichtlich der Analyse der molekularen Grundlagen der Immunregulation sowie ihrer Dysfunktion bietet die Laser-Scanning-Zytometrie das Potential, zum einen Ereignisse eine Zelle betreffend zu quantifizieren, zum anderen auch Interaktionen zwischen Zellpopulationen in ihrer physiologischen Umgebung zu beobachten [Gerstner et al., 2004; Grierson et al., 2005; Smith et al., 2004]. Dadurch wird die Erstellung sog. „Gewebekarten“ (engl. tissue map) möglich, die wiederum die o. g. *in situ* Analyse ermöglichen. So wird es auch machbar, die Ereignisse auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen, die es Pathogenen erlauben, eine Immunantwort zu umgehen. Diese Vorgänge können darüber hinaus nicht mehr nur *in vitro* studiert werden, sondern im Tiermodell bereits *in vivo* [Harnett, 2007]. Das Repertoire an Möglichkeiten, mehrere Fluorochrome gleichzeitig zu detektieren, wird ständig erweitert: durch Kombination von polychromatischer Zytometrie (Färbung der Probe mit acht oder mehr verschiedenen Fluorochromen gleichzeitig), schrittweisen Färbungen bzw. Nachfärbung und Methoden wie Photobleaching, Photoaktivierung oder Photodestruktion, wird eine „hyperchromatische“ Analyse möglich. Dadurch kann alles „Anfärbbare“ in einer Zelle gemessen werden [Mittag et al., 2006].

Die Zukunft liegt in der Entwicklung einer Generation von LSCs, die es ermöglicht, Rückschlüsse von der Gewebeebene (durch Struktur und Funktion) auf die Genebene zu ziehen (*Tissomics*). Das schließt eine quantitative Analyse von physiologischen Zellinteraktionen, sowohl in den Zellen selbst als auch innerhalb des Gewebeverbandes, ein [Ecker und Tárnok, 2005].

Neuere Ansätze beinhalten die Kombination der Laser-Scanning-Zytometrie mit funktionellen Analysen, wie beispielsweise in der Studie von Tokimitsu et al. [2007]. Die Arbeitsgruppe entwickelte ein Microarray-System für lebende Zellen, um die Antworten einzelner Zellen analysieren zu können. Dazu benutzten sie einen Microwell array chip, der 234.000 kleinste Bohrlöcher (mit je einem Durchmesser von 10µm und einer Tiefe von 15µm, im Abstand von 20µm) beinhaltet, die gerade groß genug sind, um eine einzelne Zelle zu beherbergen [Yamamura et al., 2005], kombiniert mit einem Zell-Scanner. Beispielsweise erfolgte zur Erkennung des Aktivierungszustandes der Zelle die

mehrfache Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration, was durch die Immobilisierung der einzelnen Zelle in einer Position möglich ist. So wird eine Analyse großer Zellzahlen auf einer Einzelzell-Ebene durchführbar. Tokimitsu et al. [2007] verwendeten dieses System zur Detektion von humanen B-Lymphozyten im peripheren Blut von HBs-Ag-geimpften Probanden, die in der Lage sind, spezifische Antikörper gegen dieses Antigen zu bilden, und erhielten so HBs-Ag-spezifische humane monoklonale Antikörper. Diese waren in der Lage, durch neutralisierende Aktivität eine HBV-Infektion von humanen Hepatozyten zu verhindern. Die oben beschriebene Technologie könnte somit dazu beitragen, auch für andere Erkrankungen, die durch ein infektiöses Agens ausgelöst werden, wie z.B. AIDS oder SARS, humane monoklonale Antikörper zu produzieren. Weiterhin könnte es mit diesem Ansatz auch möglich sein, antigenspezifische T-Zellen zu detektieren und zu analysieren [Tokimitsu et al., 2007].

Auch Zurgil et al. [2006] nutzen einen Lebendzellansatz mit Mikrolöchern in bienenwabenartiger Struktur angeordnet, um Zellantworten, wie z.B. die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, oft ungenau als „Sauerstoffradikale“ bezeichnet), zu beobachten. Diese haben in der letzten Zeit an Bedeutung gewonnen, da ihre wesentliche Beteiligung an multiplen physiologischen Prozessen durch Modulation von Signalwegen bekannt geworden ist. Die unangemessene Produktion dieser Radikale und ihrer Metaboliten führt auf den verschiedensten Wegen zur Entwicklung von Krankheiten [Zurgil et al., 2006].

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung der Zytologie und zellbasierter Untersuchungsverfahren nimmt in allen Bereichen der Medizin beständig zu. So auch in der Diagnostik der Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Bei der Entstehung und Therapie dieser spielt der Immunstatus der Patienten eine wichtige Rolle. Daher ergibt sich auch der Bedarf nach neuen Methoden der Immunphänotypisierung sowie der Ermittlung von absoluten Zellzahlen von peripheren Blutleukozyten. Die Durchflusszytometrie galt bisher als Goldstandard in diesem Bereich, ist aber mit der Weiterentwicklung von objekträgerbasierten Verfahren, wie der Laser-Scanning-Zytometrie (LSC), von diesen eingeholt worden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Ansatz zur absoluten Immunphänotypisierung mittels LSC vorgestellt, der die einfachste Form der Zellzählung - die Neubauer-Zählkammer - und modernste Mikroskop-Technik miteinander vereint.

Die Detektion der Leukozyten wurde mittels der DNS-Färbung durch den Farbstoff DraQ5 möglich; dieses Signal wurde außerdem als Trigger verwendet. In gleichem Zuge erfolgte die Markierung der Lymphozytensubpopulationen mit den fluorochromkonjugierten Antikörpern CD3-R- Phytoerythrin (R-PE), CD4-Alexa 488 und CD8-Tricolor (PE-Cy5) über ihre Oberflächenantigene. Nach einem Lyse-No-wash-Prozess wurde die Probe mit einer Verdünnung von 1:20 in die Neubauer-Zählkammer transferiert. Es folgte die Analyse durch das LSC zum Zeitpunkt 0 und 15 Minuten später.

Die Korrelation der oberen und der unteren Kammer erwies sich für alle ermittelten Zellpopulationen mit $r > 0,85$ zu beiden Messzeitpunkten als gut. Dies gilt mit $r = 0,9$ auch für die sog. Inter-Scan-Korrelation, die die Korrelation aus den Mittelwerten von oberer und unterer Kammer zwischen den beiden Scan-Zeitpunkten beschreibt. Außerdem zeigt der Vergleich der erhobenen Daten mit dem Routinelabor des Universitätsklinikums Bonn ($r = 0,895$ im ersten bzw. $0,929$ im zweiten Scan) die Zuverlässigkeit der entwickelten Methode.

Beim Vergleich der absoluten Zellzahlen der Patienten mit Kopf-Hals-Malignom mit denen der Probanden ohne Malignom durch den Wilcoxon-Rangsummentest für unabhängige Stichproben zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Leukozytenzahlen. Sowohl im ersten Scan mit $p = 0,015$ als auch im zweiten Scan mit $p = 0,013$ ist das mit $\alpha = 0,05$ festgesetzte Signifikanzniveau deutlich unterschritten. Dies ist vermutlich auf das generell aktivierte Immunsystem der Patienten oder eine chronische Entzündung im Bereich des Tumors zurückzuführen. Dagegen ergaben sich in den Zellzahlen zwischen Tumorpatienten und Kontrollgruppe jedoch keine signifikanten Unterschiede, was eine günstigere Prognose des Patientenkollektivs vermuten lässt.

Es folgte der Vergleich der Gesamtleukozytenzahl sowie der Lymphozytensubpopulationen bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignom mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen mittels t-Test. Es besteht kein signifikanter Unterschied in den absoluten Zellzahlen der beiden Gruppen. Betrachtet man allerdings die CD8-positiven Lymphozyten fallen erhöhte absolute Zellzahlen bei den Lymphknotenmetastasen-positiven Patienten auf, was auf eine schlechtere Prognose der Patienten schließen lässt.

Insgesamt ist also anhand der absoluten Zellzahlen der Lymphozytensubpopulationen kein eindeutiger Rückschluss auf das Vorhandensein eines Kopf-Hals-Karzinoms generell bzw. die Existenz von Halslymphknotenmetastasen bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignom zu ziehen. Um hier eindeutigere Aussagen herbeizuführen sollten zukünftige Studien die Methode der Absoluten Zellzählung mit funktionellen Analysen auf Einzelzell-Ebene kombinieren.

Mit dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Immunphänotypisierung von peripheren Blutleukozyten mittels der Laser-Scanning-Zytometrie etabliert. Außerdem zeigt sie die Notwendigkeit auf, im Rahmen der Prädiktiven Medizin weitere Methoden zur Untersuchung des Immunstatus von Patienten mit Kopf-Hals-Malignom zu entwickeln sowie die Erforschung immunmodulatorischer Therapieansätze voranzutreiben.

6. ANHANG

Zeichenerklärung

#	laufende Nummer des Probanden
CD3 O/U 1/2	Anzahl CD3-positive Lymphozyten in der oberen bzw. unteren Kammer im ersten bzw. zweiten Scan
CD4 O/U 1/2	Anzahl CD3-positive Lymphozyten in der oberen bzw. unteren Kammer im ersten bzw. zweiten Scan
CD8 O/U 1/2	Anzahl CD3-positive Lymphozyten in der oberen bzw. unteren Kammer im ersten bzw. zweiten Scan
Leukos O/U 1/2	Anzahl der Leukozyten in der oberen bzw. unteren Kammer im ersten bzw. zweiten Scan
LeukosRoutineLab	Leukozytenzahl des Routinelabors des Universitätsklinikums in Bonn
LKN Status	Halslymphknoten-Status

I. Erhobene Zellzahlen bei Patienten mit Oropharynxkarzinom

#	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
1	911	978	467	511	400	422	5.911	6.244
2	1.422	2.000	1.067	1.600	289	333	8.044	9.667
3	1.244	1.378	911	1.133	200	178	6.956	7.044
4	1.044	1.044	378	533	578	444	4.422	4.067
5	267	356	200	267	22	22	5.000	5.267
6	1.556	867	1.311	711	133	133	6.244	5.333
7	2.578	2.600	1.644	1.844	756	667	9.400	9.978
8	1.356	1.467	578	800	689	600	7.022	7.178
9	1.533	1.756	644	622	889	978	7.022	7.000
10	178	222	67	133	111	44	12.400	11.644
11	1.311	1.422	733	844	400	511	9.600	8.200
12	2.133	2.111	1.200	1.511	733	444	12.289	10.311
13	1.200	1.311	333	378	311	311	4.956	4.778
14	1.089	911	511	578	422	267	11.044	9.578
15	867	800	622	511	200	244	6.956	7.067
16	1.200	1.222	978	1.044	89	44	6.511	6.778
17	422	644	333	356	22	111	8.756	11.689
18	1.200	1.156	422	644	511	289	4.733	4.600
	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
Median	1.200	1.189	600	633	356	300	6.989	7.056
Mittelwert	1.195	1.236	689	779	375	336	7.626	7.579
Standardabweichung	570	591	407	463	261	242	2.416	2.337
Max	2.578	2.600	1.644	1.844	889	978	12.400	11.689
Min	178	222	67	133	22	22	4.422	4.067

#	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
1	978	911	511	444	444	422	5.911	5.800	7.260
2	1.444	1.911	1.111	1.556	289	311	7.556	8.644	8.750
3	1.111	956	911	756	133	178	5.933	7.000	7.550
4	1.156	978	600	422	511	467	5.022	4.267	4.850
5	356	600	222	333	44	22	5.244	5.356	5.110
6	1.111	889	978	800	111	89	5.600	5.267	6.240
7	2.778	2.733	2.000	1.911	578	667	9.378	9.022	9.700
8	1.511	1.644	1.067	867	756	622	6.689	6.911	6.420
9	2.244	1.511	778	667	1.400	822	7.533	7.489	7.840
10	600	289	67	244	489	22	11.600	11.156	13.270
11	1.600	1.933	800	911	622	822	9.844	14.378	11.510
12	1.911	2.378	1.267	1.556	444	533	10.756	10.933	10.530
13	1.533	1.533	289	400	200	333	6.400	6.444	5.640
14	1.289	956	733	711	422	200	10.489	9.089	12.350
15	1.067	778	822	644	111	133	6.956	7.178	7.430
16	1.489	1.022	1.200	778	111	89	7.378	6.600	7.190
17	378	400	244	222	67	67	9.467	8.844	11.060
18	1.400	1.267	600	622	400	356	4.822	5.089	5.150
	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
Median	1.344	1.000	789	689	411	322	7.167	7.089	7.490
Mittelwert	1.331	1.260	789	769	396	342	7.588	7.748	8.214
Standardabweichung	586	646	450	456	320	259	2.085	2.480	2.547
Max	2.778	2.733	2.000	1.911	1.400	822	11.600	14.378	13.270
Min	356	289	67	222	44	22	4.822	4.267	4.850

II. Erhobene Zellzahlen bei Patienten mit Hypopharynxkarzinom

#	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
1	489	533	222	267	178	244	3.556	4.222
2	1.533	1.356	489	422	644	800	4.822	5.622
3	2.400	2.533	1.378	1.244	978	1.200	4.933	5.689
4	1.067	1.622	822	1.156	222	267	6.933	8.022
5	3.622	3.600	1.333	1.378	1.978	1.711	12.444	10.467
	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
Mittelwert	1.822	1.929	849	893	800	844	6.538	6.804
Median	1.533	1.622	822	1.156	644	800	4.933	5.689
Standardabweichung	1096	1052	456	456	658	561	3145	2200
Max	3.622	3.600	1.378	1.378	1.978	1.711	12.444	10.467
Min	489	533	222	267	178	244	3.556	4.222

#	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
1	578	356	267	178	200	156	3.644	3.778	6.490
2	1.489	1.400	422	600	844	622	4.600	5.711	7.050
3	3.044	3.578	1.756	2.133	1.089	1.289	9.689	9.956	6.910
4	1.356	1.689	978	1.089	311	533	7.911	9.067	7.490
5	3.800	4.378	1.556	1.444	1.978	2.467	10.733	13.156	11.830
	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
Mittelwert	2.053	2.280	996	1.089	884	1.013	7.316	8.333	7.954
Median	1.489	1.689	978	1.089	844	622	7.911	9.067	7.050
Standardabweichung	1185	1477	592	676	638	813	2776	3288	1964
Max	3.800	4.378	1.756	2.133	1.978	2.467	10.733	13.156	11.830
Min	578	356	267	178	200	156	3.644	3.778	6.490

III. Erhobene Zellzahlen bei Patienten mit Larynxkarzinom

#	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
1	978	1.133	511	844	44	156	8.244	7.089
2	1.356	1.822	911	1.111	289	600	8.889	10.578
3	1.933	2.178	111	467	222	222	10.467	9.289
	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
Mittelwert	1.422	1.711	511	807	185	326	9.200	8.985
Median	1.356	1.822	511	844	222	222	8.889	9.289
Standardabweichung	393	434	327	264	103	195	934	1440
Max	1.933	2.178	911	1.111	289	600	10.467	10.578
Min	978	1.133	111	467	44	156	8.244	7.089

#	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
1	1.044	1.933	578	1.400	0	89	8.667	10.711	8.700
2	1.200	1.333	644	556	400	600	8.622	9.667	11.110
3	1.756	1.956	111	467	178	222	9.133	9.467	8.170
	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
Mittelwert	1.333	1.741	444	807	193	304	8.807	9.948	9.327
Median	1.200	1.933	578	556	178	222	8.667	9.667	8.700
Standardabweichung	305	288	237	420	163	216	231	546	1279
Max	1.756	1.956	644	1.400	400	600	9.133	10.711	11.110
Min	1.044	1.333	111	467	0	89	8.622	9.467	8.170

IV. Erhobene Zellzahlen bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom

#	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
1	1.156	1.444	800	689	267	533	6.689	7.244
2	1.156	956	600	556	467	378	8.756	7.267
3	1.311	1.133	578	511	644	556	6.622	6.089
	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
Mittelwert	1.207	1.178	659	585	459	489	7.356	6.867
Median	1.156	1.133	600	556	467	533	6.689	7.244
Standardabweichung	73	202	100	76	154	79	990	550
Max	1.311	1.444	800	689	644	556	8.756	7.267
Min	1.156	956	578	511	267	378	6.622	6.089

#	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
1	1.444	1.800	756	1.044	422	578	6.533	8.089	7.130
2	1.111	1.222	733	689	222	378	9.911	10.822	9.230
3	1.622	1.511	822	667	556	733	7.489	8.289	6.700
	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
Mittelwert	1.393	1.511	770	800	400	563	7.978	9.067	7.687
Median	1.444	1.511	756	689	422	578	7.489	8.289	7.130
Standardabweichung	212	236	38	173	137	146	1422	1244	1105
Max	1.622	1.800	822	1.044	556	733	9.911	10.822	9.230
Min	1.111	1.222	733	667	222	378	6.533	8.089	6.700

V. Erhobene Zellzahlen bei Patienten ohne Kopf-Hals-Karzinom

#	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
1	533	844	400	578	89	200	4.156	4.778
2	1.111	1.200	689	822	311	289	7.889	7.956
3	1.889	1.844	1.400	1.489	400	222	7.244	7.356
4	978	1.022	511	689	400	244	5.378	5.222
5	689	400	400	222	244	156	6.400	6.244
6	1.267	1.422	644	1.000	289	422	7.267	7.667
7	2.511	1.844	2.000	1.289	378	511	7.333	6.022
8	1.178	1.044	667	533	356	400	4.800	5.467
9	1.289	1.133	467	467	689	467	5.800	5.156
10	1.467	1.933	800	1.222	489	511	6.178	7.800
11	1.222	1.089	800	600	333	378	4.756	5.444
12	1.067	444	533	289	311	89	6.400	3.289
13	1.933	2.067	1.467	1.378	356	622	10.156	10.022
14	1.578	2.044	933	1.289	489	667	4.844	6.178
15	1.956	2.222	1.200	1.267	578	867	11.444	10.644
16	956	800	511	400	333	244	4.689	4.000
17	1.244	1.822	889	1.222	333	556	4.400	5.467
18	689	844	556	511	67	133	4.467	4.600
19	1.933	1.556	1.511	578	422	711	6.956	6.333
20	822	1.156	600	756	222	378	5.444	6.156
21	1.600	1.778	1.067	978	511	822	6.178	6.467
22	1.333	1.333	756	578	556	444	6.000	6.311
23	1.022	1.200	667	711	356	467	4.844	5.289
24	778	1.178	578	733	200	333	5.956	7.111
25	911	1.044	600	711	289	222	7.711	6.578
26	822	1.044	578	689	133	200	5.178	6.444
27	1.711	1.533	1.244	1.089	356	333	5.711	4.689
28	2.222	2.089	1.067	1.156	800	778	8.889	9.000
29	1.911	1.511	1.378	933	422	622	5.467	5.956
30	1.822	2.000	1.222	1.244	578	733	8.689	11.067
31	1.089	800	689	311	311	422	12.133	7.178
32	2.111	2.800	1.444	1.889	511	600	7.378	8.400
33	1.667	1.222	1.022	578	578	444	6.489	5.022
34	578	800	333	533	244	333	4.356	5.422
35	1.178	1.311	578	644	422	489	4.556	5.244
36	1.578	1.911	1.178	1.467	289	267	6.444	7.333
37	2.178	1.644	1.311	1.267	622	311	8.889	7.289
38	1.578	1.844	1.133	1.200	378	444	4.911	5.200
39	1.089	1.222	978	1.000	89	156	4.244	5.089
40	1.444	1.156	689	644	467	467	6.111	5.600
41	1.133	1.311	778	644	356	556	6.133	5.444
42	1.622	1.289	889	689	311	200	9.489	9.822
43	1.467	1.600	1.111	1.244	311	311	6.844	7.133
44	1.089	978	422	711	311	200	6.089	6.667
45	622	778	511	644	111	111	4.978	6.333

46	533	378	356	267	156	67	10.267	10.089
47	1.733	1.000	1.178	733	244	267	7.400	5.667
	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
Mittelwert	1.343	1.351	867	849	362	397	6.539	6.546
Median	1.267	1.222	778	711	356	378	6.133	6.244
Standardabweichung	489	510	373	372	157	200	1905	1722
Max	2.511	2.800	2.000	1.889	800	867	12.133	11.067
Min	533	378	333	222	67	67	4.156	3.289

#	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
1	711	889	444	667	222	156	3.667	4.889	4.400
2	844	778	578	489	244	267	7.400	7.911	7.920
3	1.578	2.022	1.000	1.422	467	400	9.267	8.689	7.680
4	844	1.044	578	689	267	333	4.800	4.089	5.040
5	444	644	356	467	89	178	5.889	5.622	7.490
6	1.000	911	644	578	289	267	6.867	7.511	9.200
7	2.044	1.756	1.444	1.289	489	378	6.400	5.467	5.900
8	1.356	1.556	911	733	267	689	4.800	5.667	4.910
9	1.400	1.044	533	467	756	511	5.422	5.333	5.780
10	1.556	1.778	1.133	1.156	311	356	5.511	6.556	6.150
11	889	1.111	622	556	222	467	4.467	4.978	5.350
12	667	1.111	400	511	156	244	3.867	7.022	5.020
13	1.533	1.711	1.156	1.356	311	333	9.667	9.378	10.090
14	1.422	1.467	1.022	978	289	444	4.889	5.933	5.350
15	2.111	2.200	1.222	1.289	667	822	10.133	11.156	10.720
16	1.289	1.133	867	644	356	267	4.844	4.267	4.720
17	1.400	1.600	911	1.267	378	289	4.756	4.711	5.960
18	622	511	444	400	111	178	4.422	5.822	5.140
19	1.956	1.800	1.311	733	533	689	6.556	7.267	6.900
20	844	1.622	489	1.067	311	533	6.222	8.200	8.260
21	1.733	1.933	1.089	1.089	578	844	6.067	5.978	6.980
22	1.400	1.489	933	756	467	644	5.578	6.222	6.750
23	867	956	511	511	333	333	4.844	4.311	5.340
24	844	733	533	444	311	222	6.733	6.467	6.460
25	1.000	1.067	533	733	311	267	7.267	7.356	7.210
26	1.267	1.133	911	711	156	333	6.089	7.956	6.900
27	1.578	1.933	1.111	1.289	333	467	6.111	7.511	5.200
28	3.333	2.511	1.622	1.644	1.089	800	12.800	9.356	8.740
29	1.978	1.644	1.200	1.044	711	600	6.356	5.311	6.200
30	1.578	1.978	978	1.200	578	733	7.822	9.622	9.940
31	889	956	467	467	400	378	9.200	8.711	8.430
32	2.378	2.311	1.933	1.489	378	711	6.933	10.044	7.370
33	1.533	1.378	1.067	844	333	333	4.889	4.867	7.060
34	622	778	356	400	200	356	5.289	5.578	6.380
35	1.444	1.467	711	711	356	511	5.289	6.733	6.530

36	1.244	1.600	800	1.200	244	267	5.956	6.178	7.240
37	1.578	1.244	1.067	800	511	422	6.622	6.756	7.180
38	2.089	1.978	1.267	1.378	533	556	5.844	5.489	5.620
39	1.178	1.267	1.000	1.044	156	200	4.133	4.711	5.150
40	1.667	1.867	644	756	733	867	6.800	6.311	6.250
41	1.044	1.089	600	644	378	444	5.044	5.289	5.270
42	1.556	1.711	556	911	89	222	8.289	10.800	12.450
43	1.400	1.711	1.067	1.200	244	444	7.378	6.467	7.940
44	1.022	1.089	644	756	222	311	6.511	6.000	6.310
45	778	1.156	600	778	156	222	5.933	6.200	7.120
46	733	600	156	244	289	156	10.200	9.067	9.930
47	1.711	1.156	1.267	533	267	311	6.178	4.800	5.780
	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
Mittelwert	1.339	1.392	844	858	364	420	6.383	6.693	6.887
Median	1.400	1.378	867	756	311	356	6.089	6.222	6.530
Standardabweichung	541	476	365	344	197	196	1829	1768	1725
Max	3.333	2.511	1.933	1.644	1.089	867	12.800	11.156	12.450
Min	444	511	156	244	89	156	3.667	4.089	4.400

VI. Erhobene Zellzahlen bei Patienten mit Halslymphknotenmetastasen

#	LKN-Status	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
1	1	489	533	222	267	178	244	3.556	4.222
2	1	2.578	2.600	1.644	1.844	756	667	9.400	9.978
3	1	1.089	911	511	578	422	267	11.044	9.578
4	1	867	800	622	511	200	244	6.956	7.067
5	1	1.200	1.156	422	644	511	289	4.733	4.600
6	2	2.400	2.533	1.378	1.244	978	1.200	4.933	5.689
7	2	1.067	1.622	822	1.156	222	267	6.933	8.022
8	2	1.356	1.467	578	800	689	600	7.022	7.178
9	2	1.533	1.756	644	622	889	978	7.022	7.000
10	2	178	222	67	133	111	44	12.400	11.644
11	2b	1.533	1.356	489	422	644	800	4.822	5.622
12	2b	3.622	3.600	1.333	1.378	1.978	1.711	12.444	10.467
13	2b	1.200	1.222	978	1.044	89	44	6.511	6.778
		CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
Mittelwert		1.470	1.521	747	819	590	566	7.521	7.526
Median		1.200	1.356	622	644	511	289	6.956	7.067
Standardabweichung		886	894	450	469	494	477	2824	2214
Max		3.622	3.600	1.644	1.844	1.978	1.711	12.444	11.644
Min		178	222	67	133	89	44	3.556	4.222

#	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
1	578	356	267	178	200	156	3.644	3.778	6.490
2	2.778	2.733	2.000	1.911	578	667	9.378	9.022	9.700
3	1.289	956	733	711	422	200	10.489	9.089	12.350
4	1.067	778	822	644	111	133	6.956	7.178	7.430
5	1.400	1.267	600	622	400	356	4.822	5.089	5.150
6	3.044	3.578	1.756	2.133	1.089	1.289	9.689	9.956	6.910
7	1.356	1.689	978	1.089	311	533	7.911	9.067	7.490
8	1.511	1.644	1.067	867	756	622	6.689	6.911	6.420
9	2.244	1.511	778	667	1.400	822	7.533	7.489	7.840
10	600	289	67	244	489	22	11.600	11.156	13.270
11	1.489	1.400	422	600	844	622	4.600	5.711	7.050
12	3.800	4.378	1.556	1.444	1.978	2.467	10.733	13.156	11.830
13	1.489	1.022	1.200	778	111	89	7.378	6.600	7.190
	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
Mittelwert	1.742	1.662	942	915	668	614	7.802	8.015	8.394
Median	1.489	1.400	822	711	489	533	7.533	7.489	7.430
Standardabweichung	921	1168	550	566	527	635	2401	2471	2457
Max	3.800	4.378	2.000	2.133	1.978	2.467	11.600	13.156	13.270
Min	578	289	67	178	111	22	3.644	3.778	5.150

VII. Erhobene Zellzahlen bei Patienten ohne Halslymphknotenmetastasen

#	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
1	1.422	2.000	1.067	1.600	289	333	8.044	9.667
2	1.244	1.378	911	1.133	200	178	6.956	7.044
3	1.044	1.044	378	533	578	444	4.422	4.067
4	1.156	956	600	556	467	378	8.756	7.267
5	1.311	1.133	578	511	644	556	6.622	6.089
6	1.311	1.422	733	844	400	511	9.600	8.200
7	2.133	2.111	1.200	1.511	733	444	12.289	10.311
8	1.933	2.178	111	467	222	222	10.467	9.289
9	422	644	333	356	22	111	8.756	11.689
	CD3 O1	CD3 O2	CD4 O1	CD4 O2	CD8 O1	CD8 O2	Leukos O1	Leukos O2
Mittelwert	1.331	1.430	657	835	395	353	8.435	8.180
Median	1.311	1.378	600	556	400	378	8.756	8.200
Standardabweichung	467	520	337	444	219	145	2167	2204
Max	2.133	2.178	1.200	1.600	733	556	12.289	11.689
Min	422	644	111	356	22	111	4.422	4.067

#	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
1	1.444	1.911	1.111	1.556	289	311	7.556	8.644	8.750
2	1.111	956	911	756	133	178	5.933	7.000	7.550
3	1.156	978	600	422	511	467	5.022	4.267	4.850
4	1.111	1.222	733	689	222	378	9.911	10.822	9.230
5	1.622	1.511	822	667	556	733	7.489	8.289	6.700
6	1.600	1.933	800	911	622	822	9.844	14.378	11.510
7	1.911	2.378	1.267	1.556	444	533	10.756	10.933	10.530
8	1.756	1.956	111	467	178	222	9.133	9.467	8.170
9	378	400	244	222	67	67	9.467	8.844	11.060
	CD3 U1	CD3 U2	CD4 U1	CD4 U2	CD8 U1	CD8 U2	Leukos U1	Leukos U2	Leukos RoutineLab
Mittelwert	1.343	1.472	733	805	336	412	8.346	9.183	8.706
Median	1.444	1.511	800	689	289	378	9.133	8.844	8.750
Standardabweichung	437	595	352	444	190	238	1844	2645	2042
Max	1.911	2.378	1.267	1.556	622	822	10.756	14.378	11.510
Min	378	400	111	222	67	67	5.022	4.267	4.850

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aarstad HJ, Heimdal JH, Klementsens B, Olofsson J, Ulvestad E. Presence of activated T lymphocytes in peripheral blood of head and neck squamous cell carcinoma patients predicts impaired prognosis. *Acta Otolaryngol* 2006; 126: 1326-1333
- Alhamarneh O, Amarnath SM, Stafford ND, Greenman J. Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head Neck*. 2008; 30: 251-61
- Arastéh K, Gölz J, Marcus U, Rockstroh J, Salzberger B, Vielhaber B. Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion. AWMF-Online: <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/055-001.htm>; Juni 2005; Zugriff: 04.03.2008
- Arnold W, Ganzer U. Checkliste Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag, 2005
- Barrera JL, Verastegui E, Meneses A, Zinser J, de la Garza J, Hadden JW. Combination immunotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck: a phase 2 trial. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126: 345-351
- Behl D, Porrata LF, Markovic SN, Letendre L, Pruthi RK, Hook CC, Tefferi A, Elliot MA, Kaufmann SH, Mesa RA, Litzow MR. Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 29-34
- Bender R, Lange S. Was ist der p-Wert? *Dtsch. Med. Wschr.* 2001; 126: 39-40
- Bender R, Lange S, Ziegler A. Wichtige Signifikanztests. *Dtsch. Med. Wschr.* 2002; 127: 1-3
- Bockmühl U, Küchler I, Petersen I. Verbesserte Prognoseeinschätzung bei Kopf-Hals-Karzinomen durch neue genetische Marker. *HNO* 2000; 48: 451-456
- Boeninghaus HG, Lenarz T. HNO. Berlin - Heidelberg - New York: Springer-Verlag, 2004

- Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997; 18: 267-268
- Bootz F, Breuninger H, Draf W, Ganzer U, Glanz H, Hagen R, Howaldt HP, von Ilberg C, Iro H, Maier H, Müller, RP, Mergenthaler HG, Wendt TG, Werner JA. *Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches. HNO* 2000; 48: 104-118
- Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie. München - Jena: Urban und Fischer, 2001*
- Braun J, Dormann A. *Klinikleitfaden Innere Medizin. München - Jena: Urban und Fischer, 2003*
- Brouha XD, Tromp DM, de Leeuw JR, Hordijk GJ, Winnubst JA. Laryngeal cancer patients: analysis of patient delay at different tumor stages. *Head Neck* 2005a; 27: 289-295
- Brouha XD, Tromp DM, Hordijk GJ, Winnubst JA, de Leeuw JR. Oral and pharyngeal cancer: analysis of patient delay at different tumor stages. *Head Neck* 2005b; 27: 939-945
- Brugere J, Guenel P, Leclerc A et al. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. *Cancer* 1986; 57: 391-395
- Bueno PR, Gias LN, Delgado RG, Cebollada JD, Díaz González FJ. Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity and tongue base. *Head Neck* 1998; 20: 232-239
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56:2488-2492.
- Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 347-352
- Chen R, Aaltonen LM, Vaheri A. Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Rev Med Virol* 2005; 15: 351-363

- Cheng X, Irimia D, Dixon M, Ziperstein JC, Demirci U, Zamir L, Tompkins RG, Toner M, Rodriguez WR. A Microchip Approach for Practical Label-Free CD4+T-Cell Counting of HIV-Infected Subjects in Resource-Poor Settings. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45: 257-261
- Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, Hida Y, Oshikiri T, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Murakami S, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1555-1559
- Choi C, Witzens M, Bucur M, Feuerer M, Sommerfeldt N, Trojan A, Ho A, Schirmacher V, Goldschmidt H, Beckhove P. Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 2005; 105: 2132-2134
- De Angulo G, Yuen C, Palla SL, Anderson PM, Zweidler-McKay PA. Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer* 2008; 112: 407-415
- Deleyiannis FW, Thomas DB, Vaughan TL, Davis S. Alcoholism: independent predictor of survival in patients with head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 542-549
- Dhodapkar MV, Krasovsky J, Olson K. T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13009-13013
- Dieye TN, Vereecken C, Diallo AA, Ondoa P, Diaw PA, Camara M, Karam F, Mboup S, Kestens L. Absolute CD4 T-cell counting in resource-poor settings: direct volumetric measurements versus bead-based clinical flow cytometry instruments. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39: 32-37
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 1944-1956

- Duesberg P, Li R. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2002; 2: 202–210
- Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R. The chromosomal basis of cancer. *Cell Oncol* 2005; 27: 293–318
- Dyckhoff G, Herold-Mende C. Anti-Tumor-Impfung bei HNO-Tumoren-Dem Erfolg auf der Spur. *HNO* 2005; 53: 209-212
- Ecker RC, Tárnok A. Cytomics goes 3D: toward tissomics. *Cytometry A*. 2005; 65: 1-3
- Furusaka T, Yokode Y, Nakajima M, Iida H, Kida A, Kikuchi K, Tomita H. T-lymphocyte subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Auris Nasus Larynx* 1986; 13: 143-148
- Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LWK, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nature Biotech* 2004; 22: 969–976
- Gellrich NC et al. Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge Kopf-Hals-Tumore. Tumorzentrum Freiburg. 2004
- Gerstner AOH. Früherkennung von Kopf-Hals-Tumoren. Entwicklung, aktueller Stand und Perspektiven. *Laryngo-Rhino-Otol* 2008; 87: 1-20
- Gerstner AOH, Lenz D, Bosci J. Technische und methodische Grundlagen der Objektträger-basierten Zytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, Hrsg. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger, 2007: 71-82
- Gerstner AOH, Müller AK, Machlitt J, Tárnok A, Tannapfel A, Weber A, Bootz F. Slide-based cytometry for predicting malignancy in solid salivary gland tumors by fine needle aspirate biopsies. *Cytometry* 2003; 53: 20-25
- Gerstner AOH, Tárnok A, Bootz F. Objektträgerbasierte multiparametrische Zytometrie in der HNO. Perspektiven für Klinik und Forschung. *HNO* 2005; 53: 134-141
- Gerstner AOH, Trumpfheller C, Racz P, Osmancik P, Tenner-Racz K, Tárnok A. Quantitative histology by multicolor slide-based cytometry. *Cytometry* 2004; 59: 210-219

- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-720
- Grierson AM, Mitchell P, Adams CL, Mowat AM, Brewer JM, Harnett MM, Garside P. Direct quantitation of T cell signaling by laser scanning cytometry. *J Immunol Methods*. 2005; 301:140-153
- Gruber R. Charakterisierung der T-Lymphozyten. In Sack U, Tárnok A, Rothe G, Hrsg. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 2007: 258-281
- Haas S, Bosch FX, Klein-Kühne W, Nollert J, Rudat V, Conradt, Dietz A. Expression von Zellzykluskomponenten in fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen. Bedeutung für die Prognose nach primärer akzelerierter Radiochemotherapie. *HNO* 1999; 47: 777-786
- Habermann W, Berghold A, DeVaney TT, Friedrich G. Carcinoma of the larynx: predictors of diagnostic delay. *Laryngoscope* 2001; 111: 653-656
- Harnett MM. Laser scanning cytometry: understanding the immune system in situ. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 897-904
- Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihira T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2553-2562
- Hoffmann TK, Whiteside TL, Bier H. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs. Grundlagen und aktuelle Konzepte der Immuntherapie. *HNO* 2005; 53: 285-298
- Jahnke V. Bösartige Tumore des Larynx. In Herberhold C, Hrsg. *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis. Band 3 Hals*. Stuttgart - New York: Thieme Verlag, 1994: 388-421

- Janeway A, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie, Heidelberg – Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002
- Ku TK, Nguyen DC, Karaman M, Gill P, Hacia JG, Crowe DL. Loss of p53 expression correlates with metastatic phenotype and transcriptional profile in a new mouse model of head and neck cancer. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 351-362
- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3755-3762
- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv Otorhinolaryngol* 2005; 62: 161-172
- Laffers W.; Untersuchungen zum Phänotyp peripherer Blutleukozyten bei Patienten mit Kopf-Hals-Malignomen. Dissertationsarbeit an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig, 2004
- Laffers W, Schlenkhoff C, Pieper K, Mittag A, Tárnok A, Gerstner AOH. Concepts for Absolute Immunophenotyping by Slide- Based Cytometry. *Transfus Med Hemother* 2007; 34: 188-195
- Latif F, Fivash M, Glenn G, Tory K, Orcutt ML, Hampsch K, Delisio J, Lerman M, Cowan J, Beckett M, et al. Chromosome 3p deletions in head and neck carcinomas: statistical ascertainment of allelic loss. *Cancer Res* 1992; 52: 1451-1456
- Levenson RM, Mansfield JR. Multispectral imaging in biology and medicine: slices of life. *Cytometry Part A* 2006; 69A: 748–758
- Maier H, Tisch M. Alkoholkonsum und Krebsrisiko im Bereich des oberen Verdauungstrakts. *HNO* 1999; 47: 764-765
- Mascres C, Ming-Wen F, Joly JG. Morphologic changes of of the esophageal mucosa in the rat after after chronic alcohol ingestion. *Exp Pathol* 1984; 25: 147-153
- Meijer GA. Chromosomes and cancer, Boveri revisited. *Cell Oncol* 2005; 27: 273–275

- Milasiene V, Stratilatovas E, Norkiene V. The importance of T-lymphocyte subsets on overall survival of colorectal and gastric cancer patients. *Medicina (Kauna)* 2007; 43: 548-554
- Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Tárnok A. Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. *Cytometry A*. 2006; 69: 691-703
- Müller-Berghaus J, Ehlert K, Ugurel S, Umansky V, Bucur M, Schirmacher V, Beckhove P, Schadendorf D. Melanoma-reactive T cells in the bone marrow of melanoma patients. *Cancer Res* 2006; 66: 5997-6001
- Nozoe T, Maehara Y, Sugimachi K. Preoperative sorting of circulating T lymphocytes in patients with esophageal squamous cell carcinoma: its prognostic significance. *World J Gastroenterol* 2005 Nov 14; 11: 6689-6693
- Oshimura M, Barrett JC. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ Mutagen*. 1986; 8: 129–159
- Pachmann K, Heiß P, Demel U, Tilz G. Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using laser scanning cytometer (LSC). *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 811-817
- Peiper M, Sato T, Streichert T, Eisenberger CF, Knoefel WT, Izbicki JR. Cytotoxic T lymphocyte mediated recognition of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 2002; 99: 88-92
- Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G. *Taschenatlas Immunologie*. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag, 2007
- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12963–12968
- Riedel F, Goessler U, Hörmann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 543-555

- Riedel F, Hörmann K. Alkoholinduzierte Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. HNO 2004; 52: 590-598
- Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res 2002; 8: 3187-3192
- Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. Int J Cancer 2003; 104: 336-344
- Rodriguez WR, Christodoulides N, Floriano PN, Graham S, Mohanty S, Dixon M, Hsiang M, Peter T, Zavahir S, Thior I, Romanovicz D, Bernard B, Goodey AP, Walker BD, McDevitt JT. A microchip CD4 counting method for HIV monitoring in resource-poor settings. PloS Med 2005; 2: e182
- Ross DW, McMaster K. Neutropenia: the accuracy and precision of the neutrophil count in leukopenic patients. Cytometry 1983; 3: 287-291
- Sahai E. Illuminating the metastatic process. Nature Rev Cancer 2007; 7: 737-749
- Schmitz-Winnenthal FH, Volk C, Z'graggen K, Galindo L, Nummer D, Ziouta Y, Bucur M, Weitz J, Schirmacher V, Büchler MW, Beckhove P. High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. Cancer Res 2005; 65: 10079-10087
- Schrapppe M, Creutzig U. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrischen Onkologie und Hämatologie AWMF-Online: <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF>; Juni 2005; Zugriff: 12.03.2008
- Smith KM, Brewer JM, Rush CM, Riley J, Garside P. In vivo generated Th1 cells can migrate to B cell follicles to support B cell responses. J Immunol. 2004; 173: 1640-1646
- Stock RP, Bialy H. The sigmoidal curve of cancer. Nature Biotech 2003; 21: 13-14
- Suzuki N, Maeda Y, Tanaka S, Hida N, Mine T, Yamamoto K, Oka M, Itoh K. Detection of peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors used for specific immunotherapy of pancreatic cancer. Int J Cancer 2002; 98: 45-50

- Tárnok A, Gerstner AOH. Clinical Applications of Laser Scanning Cytometry. *Cytometry* 2002; 50: 133-143
- Tokimitsu Y, Kishi H, Kondo S, Honda R, Tajiri K, Motoki K, Ozawa T, Kadowaki S, Obata T, Fujiki S, Tateno C, Takaishi H, Chayama K, Yoshizato K, Tamiya E, Sugiyama T, Muraguchi A. Single lymphocyte analysis with a microwell array chip. *Cytometry A*. 2007; 71: 1003-1010
- Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turnover of the CD8(+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 599-607
- Valet G. Cytomics, the human cytome project and systems biology: top-down resolution of the molecular biocomplexity of organisms by single cell analysis. *Cell Prolif*. 2005; 38: 171-174
- Valet G, Repp R, Link H, Ehninger A, Gramatzki M M, SHG-AML study group. Pretherapeutic identification of high-risk acute myeloid leukemia (AML) patients from immunophenotypic, cytogenetic, and clinical parameters. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003; 53: 4-10
- Valet GK, Tárnok A. Cytomics in predictive medicine. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003; 53: 1-3
- van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van Leeuwen B, Denkers F, Smeele LE, Snow GB, Brakenhoff RH. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 232-235
- Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-141
- Walch A, Bink K, Gais P, Stangl S, Hutzler P, Aubele M, Mueller J, Hofler H, Werner M. Evaluation of c-erbB-2 overexpression and Her-2/neu gene copy number heterogeneity in Barrett's adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol* 2000; 20: 25-32

- Wang XL, Chen RM, Wang ZS, Chen WL, Zuo LF. Flow cytometric DNA ploidy as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Chin Med J* 1990; 103: 572-575
- Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am* 1996; 275: 62-70
- Wessels JT, Busse AC, Mahrt J, Dullin C, Grabbe E, Mueller GA. In vivo imaging in experimental preclinical tumor research – a review. *Cytometry Part A* 2007; 71A : 542–549
- Wittekind CH. Prognosefaktoren bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und ihre Evaluation. *Laryngo-Rhino-Otol* 1999; 78: 588-589
- Yamamura S, Kishi H, Tokimitsu Y, Kondo S, Honda R, Rao SR, Omori M, Tamiya E, Muraguchi A. Single-cell microarray for analyzing cellular response. *Anal Chem*. 2005; 77: 8050-8056
- Zurgil N, Shafran Y, Afrimzon E, Fixler D, Shainberg A, Deutsch M. Concomitant real-time monitoring of intracellular reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in individual living promonocytic cells. *J Immunol Methods*. 2006; 316: 27-41