

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. H. Lehnert

Die Expression der Cyclooxygenase-2 als unabhängiger prognostischer Faktor bei Patienten mit malignen Lymphomen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Alexandra Zuske-Matthäus

aus Berlin

Lübeck 2011

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Thomas Wagner

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr.rer.physiol. Martin Tegtmeier

Tag der mündlichen Prüfung:

31.05.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.05.2011

1 Inhalt

2	EINLEITUNG	4
2.1	MALIGNEN LYMPHOME	4
2.2	CYCLOOXYGENASE-2.....	8
2.3	ZIELSETZUNG	13
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	STUDIENDESIGN.....	14
3.2	PATIENTENKOLLEKTIV	18
3.3	METHODEN	19
4	DATENZUSAMMENFASSUNG UND AUSWERTUNG	22
5	ERGEBNISSE	23
5.1	STUDIENKOHORTE	23
5.2	THERAPIEANSPRECHEN UND GESAMTÜBERLEBEN	27
5.3	COX-2-EXPRESSION UND THERAPIEANSPRECHEN	32
5.4	VEGF-, IL-6- UND IL-8-SERUMSPIEGEL UND THERAPIEANSPRECHEN	37
6	DISKUSSION	41
6.1	STUDIENCHARAKTERISTIKA	41
6.2	COX-2-ANALYSE	42
6.3	ANALYSE VEGF, IL-6 UND IL-8	46
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	49
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	51
9	ANHANG	59
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	59
9.2	ECOG (EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP PERFORMANCE STATUS).....	60
9.3	STADIENEINTEILUNG MULTIPLES MYELOM NACH DURIE UND SALMON.....	60
9.4	ETHIKVOTUM	61
10	DANKSAGUNG	62
11	LEBENS LAUF	63

2 Einleitung

2.1 Maligne Lymphome

Lymphomerkrankungen sind eine heterogene Gruppe von Neoplasien des lymphatischen Systems, die sich im biologischen Verhalten und im klinischen Verlauf stark unterscheiden. Maligne Lymphome lassen sich histologisch in die zwei Gruppen der Hodgkin-Lymphome (auch Morbus Hodgkin oder Lymphogranulomatose genannt) und der Non-Hodgkin-Lymphome einteilen. Die Non-Hodgkin-Lymphome werden in niedrig- und hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome unterteilt. Insgesamt sind etwa 3,4% der Tumorerkrankungen auf maligne Lymphome zurückzuführen (Parkin et al., 2001). In Deutschland beträgt die Inzidenz für das Auftreten eines Hodgkin-Lymphoms 2-4 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr, der Altersdurchschnitt der Patienten liegt zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr, wobei ein zweiter Häufigkeitsgipfel ab dem 60. Lebensjahr besteht. Im Vergleich dazu, treten Non-Hodgkin-Lymphome mit 7-10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr deutlich häufiger auf (Robert-Koch-Institut, 2008). Der Häufigkeitsgipfel liegt über dem 60. Lebensjahr, variiert aber in Abhängigkeit von der Erkrankungsentität. Insgesamt treten niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome 2,5mal häufiger auf im Vergleich zu hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Die Häufigkeit von Non-Hodgkin-Lymphomen ist bis etwa 1995 stetig angestiegen. Mitverantwortlich dafür ist die Tatsache, dass etwa drei Viertel der Patienten mit sogenannten niedrigmalignen oder indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen älter sind als 60 Jahre. In dem Maße, wie der Anteil älterer Mitbürger wächst, nehmen deshalb auch Non-Hodgkin-Lymphome zu.

Als ursächlich für die Entstehung von malignen Lymphomen werden verschiedene Faktoren diskutiert, so werden neben ionisierender Strahlung und chemischen Noxen, bakterielle und virale Infekte, wie zum Beispiel das Epstein-Barr-Virus, HIV und das Bakterium *Helicobacter pylori* zu den ätiologischen Faktoren gerechnet (Fisher et al., 2004; Hjalgrim und Engels, 2008). Zusätzlich können viele molekulargenetische Veränderungen nachgewiesen werden, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten verschiedener Lymphomerkrankungen assoziiert sind (Abele et al., 2002). Das Zusammenspiel dieser Faktoren führt zu einer klonalen Expansion

lymphatischer Zellen (Küppers, 2005). Hodgkin-Lymphome zeichnen sich histologisch durch den Nachweis von sogenannten Hodgkin-Zellen und Sternberg-Reed-Zellen aus, welche die klonale neoplastische Zellpopulation darstellen, die sich zum größten Teil aus den B-Lymphozyten des Keimzentrums entwickeln (Küppers et al., 2002). Non-Hodgkin-Lymphome entstehen durch klonale Expansion von B- oder T-Lymphozyten in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung und werden in Abhängigkeit der Histologie, Immunhistologie und Zytologie in verschiedene Lymphomentitäten unterteilt (Harris et al., 2000; Swerdlow et al., 2008).

Durch die Proliferation des malignen Zellklons kommt es zu verschiedenen klinischen Manifestationsformen der Lymphomerkkrankung. Neben einer Lymphadenopathie sind die Infiltration von Knochenmark und Milz als häufige Organmanifestationen zu nennen. Ein Befall von extralymphatischem Gewebe, der sogenannte Extranodalbefall, ist ebenfalls möglich (Armitage, 2005). Aufgrund der Freisetzung verschiedener Zytokine entwickelt ein Teil der Patienten eine sogenannte B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Bei klonaler Expansion differenzierter B-lymphozytärer Zellen kann durch eine gesteigerte Immunglobulinsynthese eine monoklonale Gammopathie nachweisbar sein. In Abhängigkeit des Ausbreitungsgrades der Erkrankung im Körper werden Hodgkin-Lymphome und die meisten Non-Hodgkin-Lymphome nach der Ann Arbor-Klassifikation in vier Stadien eingeteilt. Ein Stadium I liegt bei nodalem Befall einer einzelnen Lymphknotenregion oder dem Vorliegen eines einzelnen extranodalen Herdes vor, Stadium II beschreibt den nodalen Befall und/ oder lokalisierten Extranodalbefall in mehr als zwei Regionen auf einer Seite des Zwerchfells. Stadium III bezeichnet den nodalen Befall und/ oder lokalisierten extranodalen Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells und das Stadium IV liegt vor, bei disseminiertem Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall. Zusätzlich geben Buchstaben wie A, B und E Auskunft über die Abwesenheit (A) beziehungsweise das Vorhandensein von B-Symptomen (B) und extranodalem Befall (E). Ausgenommen von dieser Stadieneinteilung sind einige Non-Hodgkin-Lymphome, wie zum Beispiel das Multiple Myelom (Kyle und Rajkumar, 2009). Für diese Entitäten gelten eigene Stadieneinteilungen, welche sich ebenfalls auf den klinischen Ausbreitungsgrad der Erkrankung beziehen (siehe Anhang Seite 60).

Insgesamt kann durch die Bestimmung des Stadiums bereits im Vorfeld einer Therapie eine Prognoseabschätzung durchgeführt werden und gegebenenfalls eine Therapieeskalation beziehungsweise –Deeskalation erfolgen.

Die Therapie der Lymphomerkrankungen besteht in den meisten Fällen in einer systemischen Chemotherapie, in Abhängigkeit der klinischen Manifestation der Erkrankung auch in einer Kombination mit einer darauf folgenden Strahlentherapie. Aufgrund der intensiven Forschung in Hinblick auf die Verbesserung und Modifizierung bekannter Therapieschemata und durch die Entwicklung neuer Medikamente, wie zum Beispiel den monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab, konnten in den letzten Jahren die Remissionsraten und die Langzeitüberlebensdaten deutlich verbessert werden (Held et al., 2006). So können zum Beispiel, in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung und dem Vorliegen weiterer Risikofaktoren, bei den hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen komplette Remissionsraten von bis zu 90% erreicht werden, mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von bis zu 93% (Coiffier et al., 2002, Pfreundschuh et al., 2006). Hodgkin-Lymphome weisen ähnliche Remissionsraten auf, jedoch zeigt sich auch hier eine deutliche Abhängigkeit der Remissionsrate und des Rezidivrisikos von verschiedenen Risikofaktoren, wie zum Beispiel dem Extranodalbefall oder dem Vorliegen eines großen mediastinalen Tumor-*Bulk* (Engert et al., 2008). Ähnliches zeigt sich bei den niedrigmalignen Lymphomen. Auch hier können unter Einbeziehung neuerer Therapiekonzepte zum Beispiel beim Multiplen Myelom Ansprechraten von 48-80% erreicht werden (Laubach et al., 2009).

Unabhängig von den genannten Daten, haben Patienten, die nach Beendigung der Chemotherapie nicht in einer kompletten Remission sind oder sogar eine Tumorprogression unter der Therapie aufweisen, weiterhin eine deutlich schlechtere Prognose und statistisch ein kürzeres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit einem guten Ansprechen auf die Therapie (Cabanillas et al., 1988). Es ist das Bestreben, diese Patienten frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls einer primär intensiveren Therapie zuzuführen. Durch verschiedene internationale, randomisierte Studien konnten Risikofaktoren identifiziert werden, die für eine prognostische Einschätzung der Erkrankung in Hinblick auf das Ansprechen auf eine Therapie und die Remissionsdauer von Bedeutung sind. So wurde zum Beispiel für hochmaligne

Non-Hodgkin-Lymphome der Internationale Prognostische Index (IPI) definiert, mit dessen Hilfe eine Einteilung der Patienten in Risikogruppen erfolgen kann (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993; Yang et al., 2009). In Abhängigkeit von der Anzahl der Risikofaktoren, zu denen die Laktatdehydrogenase, das Alter, das Stadium der Erkrankung, der Allgemeinzustand und die Anzahl der Extranodalbefälle zählen, werden vier Risikogruppen (IPI-Score 1-4) unterschieden. Während bei Patienten mit fehlenden Risikofaktoren Raten an kompletten Remissionen von bis zu 87% erreicht werden können, zeigen sich mit zunehmender Zahl der Risikofaktoren abnehmende Remissionsraten von bis zu 44%, so dass diese Patienten mittlerweile häufig innerhalb großer multizentrischer Studien primär einer intensiveren Therapie zugeführt werden, um die Prognose zu verbessern. Dennoch gibt es weiterhin Patienten, die trotz fehlender bekannter Risikofaktoren ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie aufweisen oder schnell rezidivieren. Die Bestrebungen sind, weitere Risikofaktoren zu finden, die bereits zu Beginn der Erkrankung einen Hinweis auf eine schlechtere Prognose beziehungsweise ein fehlendes Therapieansprechen liefern können, um diese Patienten möglichst frühzeitig zu identifizieren und ebenfalls einer intensiveren Therapie zuzuführen. Da die bisher definierten Risikofaktoren klinische Variablen reflektieren aber unabhängig von der Pathogenese der Tumorerkrankung sind, ist es denkbar, dass pathogenetische Determinanten die biologischen Verhaltensweisen der Lymphomerkrankungen genauer reflektieren könnten. Die Bestimmung dieser Parameter könnte in der Verlaufsbeobachtung unter Chemotherapie beziehungsweise vor Einleitung einer Therapie eine Verbesserung in der Einschätzung der Prognose liefern. So könnten frühzeitig Patienten identifiziert werden, bei denen ein schlechtes Ansprechen auf die Standardtherapien zu erwarten ist, um gegebenenfalls primär intensivere Therapien oder engmaschige Verlaufsuntersuchungen durchzuführen. Des Weiteren könnte die Identifizierung dieser Risikofaktoren dazu beitragen, neue gezielte Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, um Patienten in individueller Anpassung an die Tumorbilogie zu behandeln.

2.2 Cyclooxygenase-2

In dem Bestreben neue prognostische Faktoren und neue Therapieansätze für die Behandlung von Lymphomerkrankungen zu finden, die die Pathogenese der Erkrankung in die Betrachtung miteinbeziehen, rücken in den letzten Jahrzehnten immer mehr pro-inflammatorische und pro-angiogenetische Zytokine, wie zum Beispiel die Cyclooxygenasen, in den Blickpunkt. Cyclooxygenasen sind Enzyme, welche die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure katalysieren, die ein Netzwerk vielgestaltiger Anpassungen der Körperzellen steuern.

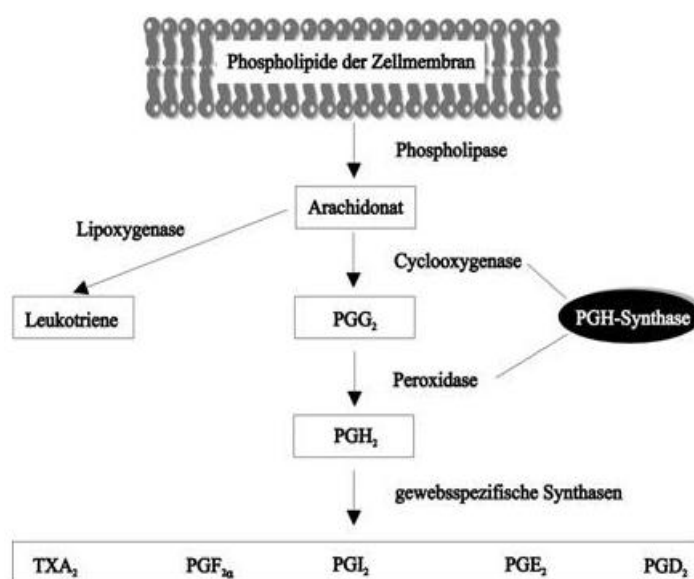


Abbildung 2.2.1 Die Cyclooxygenase-vermittelte Prostaglandinsynthese

(Fürstenberg, 2004)

Durch die Phospholipase A₂ wird aus Membranphospholipiden die Arachidonsäure abgespalten. Anschließend wird die Arachidonsäure durch die Cyclooxygenaseaktivität zunächst zum instabilen Prostaglandin G₂ (PGG₂) oxidiert und anschließend durch die Peroxidaseaktivität der Cyclooxygenase zum Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgewandelt. Davon ausgehend werden, je nach enzymatischer Ausstattung der Zelle, weitere Prostaglandine und das Thromboxan A₂ (TXA₂) hergestellt

Es sind zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase (COX) bekannt, die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2). Die COX-1 wird nahezu in allen Körperzellen exprimiert und ist über die physiologische Prostaglandinsynthese und die damit verbundene Synthese von Thromboxan A₂, Prostacyclin und auch Prostaglandin E₂, an der basalen Regulation des zellulären Metabolismus beteiligt, wie zum Beispiel die Regulation des renalen Blutflusses oder die Zytoprotektion der Magenschleimhaut und die Thrombozytenaggregation (Simmons et al., 2004). Die COX-2 hingegen wird nur wenig oder gar nicht in gesundem Gewebe exprimiert, jedoch kommt es zu einer verstärkten Expression durch Makrophagen und Endothelzellen in entzündetem Gewebe, wobei unter anderem durch den endothelialen Wachstumsfaktor (EGF), den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), Interleukin- α und den Tumor-Nekrose-Faktor- α die COX-2-Expression induziert wird (DuBois et al., 1998; Masferrer et al., 2000). Eine wesentliche physiologische Aufgabe der COX-2 liegt in der Unterhaltung einer Entzündungsreaktion im Gewebe. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass über die Synthese verschiedener Prostaglandine, wie zum Beispiel das Prostaglandin E₂ (PGE₂), ein regulatorischer Einfluß auf die Angiogenese, also auf die Gefäßneubildung im Körper, besteht (Fosslien, 2000).

Durch die komplexen Einflüsse auf die Prostaglandinsynthese, die Zytokinfreisetzung und somit auch auf die Angiogenese, ist die COX-2 für die Tumorgenese von Bedeutung. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, welche die Rolle der COX-2 in der Tumorentstehung erklären könnten. Zum einen scheint die Überexpression der COX-2 die Apoptose der Tumorzellen zu hemmen, unter anderem über eine erhöhte bcl-2-Expression (Tsujii und DuBois, 1995). Für mehrere Tumorentitäten (Kolonkarzinom, Mammakarzinom und Prostatakarzinom) konnte gezeigt werden, dass Medikamente mit selektiver COX-2-Hemmung eine Apoptose der Tumorzellen induzieren können (Hara et al., 1997; Liu et al., 1998; Sheng et al., 1998, Fosslien, 2000). Zum anderen wird der Einfluss der COX-2 auf die Tumorangiogenese als ein weiterer Faktor zur Tumorentstehung beschrieben, zum Beispiel über die Induktion von pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF und den „*basic fibroblast growth*“ Faktor (bFGF) (Shweiki et al., 1992; Liu et al., 1995), Interleukin-6 (IL-6) (Yan et al., 1995) und Interleukin-8 (IL-8) (Karakurum et al.,

1994) sowie über die Bildung von PGE₂. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine aufgrund fehlender COX-2-Expression geringere VEGF-Expression, eine verminderte Tumorangiogenese und ein vermindertes Tumorstadium nach sich zieht (Williams et al., 2000). *Gallo et al. (2001)* konnten aufzeigen, dass eine COX-2-Aktivierung in epidermalen Tumorzell-Linien zu einer raschen Induktion von VEGF-mRNA und VEGF-Produktion führt. *Cianchi et al. (2001)* konnten anhand einer Studie an 31 kolorektalen Karzinomen nachweisen, dass eine erhöhte COX-2 und VEGF-Expression signifikant mit einer verstärkten „*microvessel density*“, als Ausdruck einer verstärkten Angiogenese, im Tumorgewebe korreliert. Des Weiteren konnte für solide Tumore gezeigt werden, dass eine erhöhte VEGF-Expression mit verstärktem Tumorstadium und Metastasierung (Weidner et al., 1991; Claffey et al., 1996) einhergeht. Den Interleukinen IL-6 und IL-8 konnte durch verschiedene Studien ebenfalls eine pro-angiogenetische Wirkung bei Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (Negaard et al., 2009) und IL-6 scheint ein prognostischer Faktor bei verschiedenen soliden Tumoren zu sein (Berek et al., 1991; Blay et al., 1992).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die COX-2 in verschiedenen Tumorerkrankungen überexprimiert wird (Molina et al., 1999; Soslow et al., 2000). *Eberhart et al. (1994)* konnten nachweisen, dass die COX-2-Expression, unter anderem, über das p53-Onkogen reguliert wird und dass circa 50% der Patienten mit kolorektalen Adenomen eine Überexpression von COX-2 aufweisen. Patienten mit Kolonkarzinomen zeigen in circa 80% der Fälle eine deutliche Überexpression, wohingegen in gesunder Kolonmukosa nur eine sehr geringe COX-2-Expression nachweisbar ist. Der Einfluß der COX-2-Expression auf die Tumorentstehung und das Tumorstadium konnte an verschiedenen Tiermodellen dargestellt werden. *Ohshima et al. (1999)* konnten zeigen, dass bei COX-2-knockout-Mäusen die Tumorentstehung gehemmt ist. In weiteren Tiermodellen konnte eine dosisabhängige Hemmung der Bildung und der Proliferation von Mammarkarzinomzellen durch medikamentöse Therapie mit einem selektiven COX-2-Hemmer nachgewiesen werden (Abou-Issa et al., 2001). *Alshafie et al. (2000)* konnten im Tiermodell eine signifikante Wachstumshemmung von Mammarkarzinomen durch selektive COX-2-Hemmer nachweisen, mit einer Tumorreduktion von bis zu 32% im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Auch eine unselektive medikamentöse Hemmung beider COX-Isoformen zeigte ein verringertes Tumorwachstum (Baron et al., 2003; Chan et al., 2005), jedoch werden ein erhöhtes Risiko an gastrointestinalen Ulcerationen und ein erhöhtes Blutungsrisiko durch die Hemmung der COX-1 beschrieben. Viele klinische Studien bestätigen die oben genannten Ergebnisse, so konnte für viele Tumorentitäten der klinische Zusammenhang zwischen der medikamentösen COX-Hemmung und der signifikanten Risikoreduktion für das Auftreten von Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (Koki und Masferrer, 2002). In einer prospektiven Kohortenstudie konnte eine signifikante Risikoreduktion von 30% für das Auftreten von Kolonkarzinomen unter regelmäßiger Einnahme von Acetylsalicylsäure und anderen unselektiven COX-Hemmern in Abhängigkeit der Dosis gezeigt werden (Chan et al., 2005). *Smalley et al. (1999)* beschrieben eine Risikoreduktion von 40-50% für das Auftreten von kolorektalen Karzinomen unter Einnahme nicht-selektiver COX-Inhibitoren. Bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis kann durch den Einsatz des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib eine signifikante Reduktion der Größe und Anzahl der Polypen erzielt werden (Phillips et al., 2002; Thun et al., 2002).

Auch in malignen Lymphomen kann eine erhöhte Expression der COX-2 nachgewiesen werden. *Wun et al. (2004)* konnten in Burkitt-Lymphom-Zelllinien, im Vergleich zu gesunden B-Lymphozyten, eine zwei- bis vierfach erhöhte Expression von COX-2 nachweisen. Zusätzlich konnte die Studiengruppe in-vitro eine Proliferationshemmung der Lymphomzellen und eine Apoptoseinduktion durch hohe Dosen des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib belegen. *Hazar et al. (2004)* konnten aufzeigen, dass die COX-2-Expression mit zunehmendem Stadium der Lymphomkrankung ansteigt. Insgesamt scheint ein fehlender Nachweis einer COX-2-Expression mit einem besseren Therapieansprechen einherzugehen. Auch die COX-2-induzierte VEGF- und bFGF-Bildung scheint über die Stimulation der Angiogenese eine wichtige Rolle in der Entstehung und der Prognose von hämatologischen Neoplasien zu spielen. Im Knochenmark von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) konnte eine erhöhte „microvessel density“ und eine erhöhte Konzentration im Plasma an bFGF nachgewiesen werden (Aguayo et al., 2000). *Koomagi et al. (2001)* zeigten, dass die VEGF-Konzentration im Knochenmark von Patienten mit ALL-Rezidiv höher ist im Vergleich zu den Konzentrationen bei

Patienten mit erstdiagnostizierter ALL. Patienten mit höheren VEGF-Konzentrationen zum Diagnosezeitpunkt zeigten ein vermindertes Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit niedrigeren VEGF-Konzentrationen, jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Expression der COX-2 in Lymphomzellen und auch die Höhe der Expression ein prognostischer Marker in Hinblick auf das Ansprechen auf eine Therapie darstellen könnten. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der COX-2-Expression in Lymphomerkrankungen und des möglichen Zusammenhanges mit dem Therapieansprechen beziehungsweise der Mortalität sind notwendig, um die vorgestellten Ergebnisse zu verifizieren und gegebenenfalls den Einsatz von selektiven COX-Hemmern in der Therapie von Lymphomen zu diskutieren.

2.3 Zielsetzung

Unabhängig von der intensiven Forschung und Entwicklung neuer Therapiekonzepte innerhalb der Behandlung von Lymphomerkrankungen gibt es weiterhin Patienten, die auf die etablierten Chemotherapien kein gutes Ansprechen zeigen oder frühzeitig ein Rezidiv erleiden und somit eine deutlich schlechtere Prognose in Hinblick auf das Gesamtüberleben haben. Trotz der Identifizierung verschiedener klinischer Parameter, die Risikofaktoren für ein fehlendes Ansprechen auf die Therapien darstellen, verbleiben Patienten, die unerwarteter Weise kein Ansprechen auf die Therapie zeigen. Es besteht die Notwendigkeit, weitere prognostische Risikofaktoren zu finden, um diese Patienten frühzeitig zu identifizieren und sie somit gegebenenfalls einer intensiveren Therapie zuführen zu können.

In vorausgegangenen Studien wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen einer erhöhten COX-2-Expression in hämatologischen Neoplasien und einer verstärkten Tumorangiogenese sowie einem verminderten Therapieansprechen beschrieben. Ziel dieser prospektiven Kohortenstudie ist es, über die Bestimmung der Expression der COX-2 in Non-Hodgkin-Lymphomen und der Ermittlung des Therapieansprechens und des Gesamtüberlebens nach stattgehabter Chemotherapie, einen möglichen Zusammenhang aufzuzeigen und die Rolle der Expression der COX-2 als prognostischen Marker zu prüfen. Des Weiteren sollen durch die Messung der Expression von VEGF, IL-6 und IL-8 weitere Zusammenhänge zwischen Therapieansprechen und Angiogenese bei Lymphomerkrankungen geklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser prospektiven Kohortenstudie wurde die Expression von verschiedenen Zytokinen im Tumor und im Serum von Lymphompatienten gemessen, um anhand der Ergebnisse Hinweise auf das biologische Verhalten der Lymphome und somit eine prognostische Einschätzung der Erkrankung zu erlangen. Die Durchführung dieser Studie wurde mittels Ethikantrag (Aktenzeichen 05-211, siehe Anhang Seite 61) beantragt und von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck bewilligt.

Es wurden Patienten eingeschlossen, bei denen die histologisch gesicherte Diagnose einer Lymphomerkrankung gestellt wurde und die einer Chemotherapie zugeführt werden sollten. Die histologische Typisierung der Lymphome erfolgte nach der internationalen histologischen Klassifikation von Lymphomen der *World Health Organisation* (WHO) durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Die Applikation der Chemotherapie erfolgte entweder stationär in der onkologischen Abteilung der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, oder ambulant in der hämatologisch/ onkologischen Poliklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Vor Einleitung einer Chemotherapie erfolgte die Durchführung von Knochenmarksbiopsie, Computertomographie, Sonographie und gegebenenfalls weiterer bildgebender Diagnostik zur genauen Stadieneinteilung der jeweiligen Lymphomerkrankung. Zusätzlich wurde bei Patienten, die an einem hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt waren, der Internationale Prognostische Index (IPI) ermittelt, der über die Ermittlung verschiedener Parameter eine Risikoeinschätzung in Hinblick auf die Prognose der Erkrankung erlaubt (Tabelle 3.1.1).

*Tabelle 3.1.1 Prognose entsprechend IPI bei hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen
(The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993)*

Risikogruppe (IPI-Score)	Anzahl der Risikofaktoren	Rate an kompletten Remissionen (%)	Rezidivfreies Gesamtüberleben (%)	5-Jahres- Überleben (%)
niedrig (1)	0-1	87	61	73
niedrig- intermediär (2)	2	67	34	51
hoch-intermediär (3)	3	55	27	43
Hoch (4)	4-5	44	18	26

Die Angaben hinsichtlich der Prognose von Non-Hodgkin-Lymphomen in Abhängigkeit vom Internationalen Prognostischen Index (IPI) beziehen sich auf die Gesamtzahl der Patienten (n=2031) innerhalb der Studiengruppe. Zu den Risikofaktoren entsprechend dem IPI zählen: Alter >60 Jahre, Performance Status (ECOG) 2-4 (die ECOG-Einteilungskriterien sind im Anhang, Seite 60, definiert), Stadium III-IV, erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH), extranodaler Befall in mindestens 2 Regionen. Für Patienten unter 60 Jahren gibt es den altersadaptierten IPI: ECOG 2-4, Stadium III-IV, erhöhte LDH

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Blutentnahmen, erfolgten vor und nach der Erstapplikation der Chemotherapie zusätzliche Blutabnahmen von 9 ml Vollblut für die Messung von IL-6, IL-8 und des VEGF. Dies beinhaltete im Einzelnen eine Blutentnahme vor Therapiebeginn und jeweils nach 7, 14 und 21 Tagen. Eine weitere Blutentnahme erfolgte 10 Wochen nach Applikation der Chemotherapie, zum Zeitpunkt der erneuten Staginguntersuchungen für die Remissionsbeurteilung der Erkrankung. Das entnommene Blut wurde umgehend gekühlt bei 4 C°, innerhalb von einer Stunde nach Abnahme zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -20 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Zusätzlich zu den Blutentnahmen wurden im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, aus den, für die Diagnosestellung gewonnenen, Schnittpräparaten des Lymphoms immunhistochemische Färbungen für die Bestimmung der COX-2-Expression durchgeführt.

Das Ansprechen auf die durchgeführte Chemotherapie wurde nach klinischen Maßgaben nach Applikation von drei Zyklen der Chemotherapie durch erneute Staginguntersuchungen kontrolliert. Alle Patienten wurden nach Beendigung der Chemotherapie nachbeobachtet mit einem medianen Beobachtungszeitraum von 535 Tagen und die Remissionsdauer sowie das Eintreten eines Rezidives der Erkrankung oder Todesfälle wurden dokumentiert.

3.1.1 Remissionsbeurteilung

Als Ansprechen auf die Chemotherapie wurde das Vorliegen einer kompletten Remission oder einer partiellen Remission, üblicherweise nach Applikation von drei Kursen der Chemotherapie, definiert. Die Anwendung der Diagnostik und die Interpretation der Befunde erfolgten durch den behandelnden Arzt. In einem Zeitraum von 2-6 Wochen nach Beendigung der Chemotherapie wurde erneut eine Remissionskontrolle durchgeführt. Die Remissionsbeurteilung erfolgte jeweils nach den international anerkannten standardisierten Remissionskriterien. So wurde exemplarisch die Remissionsbeurteilung der hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphome nach den Empfehlungen des *International Workshop to Standardize Response criteria for Non-Hodgkin's Lymphoma* (Cheson et al., 1999) durchgeführt und die Remissionsbeurteilung der Plasmozytomerkrankung entsprach den Kriterien der *European Group for blood and marrow transplantation (EBMT)*. In Hinblick auf die hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphome wird eine komplette Remission definiert als das Verschwinden aller Krankheitszeichen (klinisch, radiologisch und labordiagnostisch), aufgrund des Lymphombefalls vergrößerte Organe müssen in ihrer Größe zurückgegangen sein und dürfen keine Raumforderungen mehr aufweisen. Bei vorausgegangenem Knochenmarkbefall muss durch eine Knochenmarkbiopsie abgesichert sein, dass das Knochenmark lymphomfrei ist. Eine partielle Remission liegt vor, wenn weiterhin Lymphomgewebe nachweisbar ist, jedoch eine deutliche Volumenreduktion um mindestens 50% des Lymphombefalls in allen Befallslokalisationen vorliegt, eine vollständige Normalisierung des Blutbildes besteht und keine neuen Lymphommanifestationen nachweisbar sind. Ein Progress ist definiert als das Wiederauftreten von Krankheitssymptomen und das Auftreten

neuer lymphatischer oder extralymphatischer Läsionen, beziehungsweise eine deutliche Zunahme der Lymphommanifestationen um mehr als 25% im Vergleich zum Initialbefund. Als „*no change*“ wird das persistierende Vorliegen von Lymphommanifestationen bezeichnet mit nur geringer Größenzunahme oder Größenabnahme, wobei keine Lymphommanifestation um mehr als 25% zugenommen hat oder die Rückbildung weniger als 50% beträgt. Eine Größenabnahme von 25-50% wird auch als „*minor response*“ bezeichnet. Ein Rezidiv liegt vor, wenn nach mindestens 3 Monaten andauernder Remission das Wiederauftreten von Krankheitssymptomen, neuer lymphatischer oder extralymphatischer Läsionen oder eine deutliche Zunahme der Lymphommanifestation um mehr als 25% nachweisbar sind. Bei kürzerem Intervall wird der Fall als Progress gewertet.

Die Remissionsbeurteilung bei Plasmozytomerkrankungen erfolgt gemäß *EBMT* nach folgenden Kriterien: eine komplette Remission liegt vor, wenn kein monoklonales Protein in Serum und Urin nachweisbar ist, weniger als 5% Plasmazellen im Knochenmark zu finden sind und keine Zunahme der Zahl oder Größe von Osteolysen darstellbar ist sowie Weichteilplasmozytome nicht mehr nachweisbar sind. Die Kriterien für das Vorliegen einer partiellen Remission beinhalten eine mindestens 50%ige Reduktion des monoklonalen Proteins im Serum, eine Reduktion monoklonaler freier Leichtketten im 24-Stunden-Urin um mehr als 90%, eine über 50%ige Reduktion von Weichteilplasmozytomen sowie keine Zunahme der Zahl oder Größe von Osteolysen. Für das Vorliegen einer sogenannten minimalen Remission ist eine 25-49%ige Reduktion des monoklonalen Proteins im Serum, eine 50-89%ige Reduktion monoklonaler Leichtketten im 24-Stunden-Sammelurin, eine 25-49%ige Reduktion von Weichteilplasmozytomen und eine fehlende Zunahme der Zahl oder Größe von Osteolysen gefordert. Ein „*no change*“ liegt vor, wenn die Kriterien für eine partielle Remission oder eine minimale Remission nicht erfüllt sind und eine Reduktion des monoklonalen Proteins im Serum und der Leichtketten im Urin von weniger als 25% für mindestens drei Monate vorliegt. Ein Progress der Erkrankung ist durch das Vorliegen eines der folgenden Kriterien definiert: eine Zunahme von mehr als 25% des monoklonalen Proteins im Serum oder der monoklonalen Leichtketten im 24-Stunden-Sammelurin, eine Größenzunahme bekannter

Weichteilplasmozytome oder das Auftreten neuer Weichteilplasmozytome, eine Zunahme der Zahl oder Größe von Osteolysen oder eine Zunahme der Plasmazellen im Knochenmark von mehr als 25%.

3.2 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus insgesamt 36 Patienten, bei denen eine Lymphomerkrankung diagnostiziert worden ist. Hierbei handelte es sich entweder um eine Erstdiagnose oder um ein Rezidiv einer vorbekannten Non-Hodgkin-Lymphomerkrankung. Alle Patienten befanden sich in stationärer oder ambulanter Behandlung durch die Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, und wurden schriftlich über die Studieninhalte informiert, des Weiteren erfolgte eine mündliche Aufklärung des Patienten über die Studie durch die behandelnden Ärzte. Vor Einschluss in die Studie wurde eine schriftliche Einverständniserklärung des Patienten über die Teilnahme an der Studie eingeholt.

Die Rekrutierung erfolgte ab Dezember 2005 und endete im Juli 2007. Die Nachbeobachtungszeit endete am 26.01.2009.

3.3 Methoden

3.3.1 Messung der COX-2-Expression im Tumor

Die COX-2-Expression in den paraffinfixierten Schnittpräparaten der Lymphome wurde mittels immunhistochemischer Analyse durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bestimmt. Die Immunhistochemie ist eine Methode zur spezifischen Markierung von Proteinen mittels Antikörper, die mit einem Chromogen kombiniert werden, so dass lichtmikroskopisch erkennbar wird, ob das gesuchte Protein in dem aufbereiteten Gewebe nachweisbar ist. Zunächst werden die Schnittpräparate entparaffinisiert und anschließend mit Wasserstoffperoxid behandelt, um unspezifische Anfärbungen aufgrund einer endogenen Peroxidasereaktion zu vermeiden. Anschließend wird durch Hinzugabe eines humanen „*pre-antibody-blocking Serum*“ verhindert, dass die später zugegebenen Antikörper unspezifisch binden. Im Anschluss wird auf den Präparaten die Primärantikörper-Lösung aufgetragen. Diese Primärantikörper setzen sich spezifisch an den Epitopen der gesuchten Antigene fest. Anschließend wird ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der an den Primärantikörper binden kann und mit einer Peroxidase konjugiert ist, welche durch Zugabe eines Chromogens den Sekundärantikörper sichtbar macht. Somit können COX-2 exprimierende Zellen lichtmikroskopisch dargestellt werden. Die kommerziell erworbenen Primär- und Sekundärantikörper sowie „blocking-Reagenzien“ wurden nach Angaben des Herstellers verwendet (Tabelle 3.3.1).

Neben der Expression im Tumor wurde zusätzlich die intrazelluläre Expression der COX-2 im Lymphom-umgebenden Stroma bestimmt, wobei es sich insgesamt um keine quantitative Messung handelte. Eine Doppelfärbung, zur genauen Identifizierung der COX-2-exprimierenden Stroma-Zellen, ist im Rahmen dieser Studie nicht erfolgt, in vorausgehenden Studien konnte eine COX-2-Expression u.a. in Makrophagen und Endothelzellen nachgewiesen werden (Crofford, 1997; Koki et al., 1999). Zeigte sich in der Analyse eine Expression der COX-2 im Präparat, wurde diese in der Auswertung als „*COX-Gesamt*“ zusammengefasst. In der weiterführenden Analyse wurde dann unterteilt in COX-2-Expression im Stroma (COX-Stroma) und COX-2-Expression im Lymphom (COX-Tumor).

Tabelle 3.3.1 Verwendete Antikörper

Reagenz	Hersteller
PowerVision+Poly-Hrp-Anti Ms/Rb/Rt IgG Biotin-free, Ready-To-use-KIT mit Post-antibody blocking Reagenz und Poly-Hrp-Anti-mouse/rabbit/rat igG	ImmunoLogic, Duiven, Niederlande
Rabbit Monoclonal Antibody SP21RM-9121-XXX	Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA

3.3.2 Messung VEGF-Spiegel im Patientenserum

Die VEGF-Spiegel im Patientenserum wurden mittels „enzyme linked immuno sorbent assays“ (ELISA) im hämatologischen Labor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bestimmt. Bei dem verwendeten „Sandwich-ELISA“ ist ein spezieller Antikörper gegen das zu quantifizierende Zytokin an eine Mikrotiterplatte gebunden. Nach Zugabe der Patientenprobe bindet dieser Antikörper spezifisch das dort enthaltene Zytokin. Ein zweiter, Enzym-gekoppelter, Antikörper bindet danach an ein anderes Epitop des gebundenen Zytokins. Nachdem ein Chromogen hinzugegeben wurde, katalysiert das Enzym eine Farbreaktion. Die Menge des farbigen Reaktionsproduktes ist abhängig von der Menge des gebundenen sekundären Antikörpers und damit auch von der Konzentration des Zytokins. Zur Quantifizierung wurde die Absorption mit einem Photometer gemessen. Die unbekannte Konzentration wurde anschließend aus der Regressionsgeraden einer mitgeführten Standardkurve berechnet. Die kommerziell erworbenen ELISA (Tabelle 3.3.2) wurden ebenfalls nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tabelle 3.3.2 Verwendete ELISA

ELISA	Hersteller
Humanes VEGF Immunoassay, Quantikine®	R&D Systems, Inc Minneapolis, USA

3.3.3 Messung von IL-6 und IL-8 im Patientenserum

Die Zytokine IL-6 und IL-8 wurden mit der Methode des „*bead-based multiplex sandwich immunoassay*“ bestimmt. Dieser Assay beruht auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA, jedoch ist bei dieser Methodik die gleichzeitige Messung mehrerer Zytokine in einer Probe möglich. Polystyrol-Perlen, die sogenannten „*beads*“, enthalten fluoreszierende Farbstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen und sind an einen Antikörper gegen das jeweils zu quantifizierende Zytokin gebunden. Hierbei sind die „*beads*“ mit gleichem Konzentrationsverhältnis des Farbstoffes jeweils mit Antikörpern gegen ein bestimmtes Zytokin konjugiert. Nach Zugabe der Patientenprobe werden die Zytokine spezifisch an den Antikörper gebunden und es wird ein zweites fluoreszierendes „*Reporter-Molekül*“ hinzugegeben, welches ebenfalls spezifisch an das Zytokin bindet. Anschließend werden die fluoreszierenden Farbstoffe durch zwei Laser stimuliert, wobei ein Laser die Fluoreszenz des Farbstoffgemisches in den „*beads*“ aktiviert und ein zweiter Laser die Fluoreszenz des „*Reporter-Moleküls*“ stimuliert. Durch die Fluoreszenz kann so für jedes Zytokin, welches jeweils an ein „*bead*“ mit einem bestimmten Konzentrationsverhältnis des Farbstoffes bindet, eine genaue Quantifizierung erfolgen. Der „*bead-based multiplex sandwich immunoassay*“ wurde ebenfalls kommerziell erworben und die Messungen erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers.

Tabelle 3.3.3 Materialien für den „bead-based multiplex sandwich immunoassay“

Materialien	Hersteller
Bio-Plex Cytokine Reagent Kit, 1x96-well (Assaypuffer, Waschpuffer, Detektionsantikörper-Diluent, Streptavidin-PE, Filterplatte 96-well)	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bio-Plex Human Cytokines Group I 5-plex1x96-well, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-12 (p70), IFN-gamma (mit Antikörpern konjugierte Beads, Detektionsantikörper und Antigenstandard zur Detektion von IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-gamma)	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland

4 Datenzusammenfassung und Auswertung

Datenanalyse: Die statistische Datenanalyse und die graphische Darstellung erfolgten mit dem Computerprogramm SPSS 17 für Windows (SPSS Statistics Data Document, Version 17,0). Als Signifikanzniveau wurde $\alpha < 0,05$ definiert. Die Überlebenszeitschätzung erfolgte nach Kaplan-Meier. Als Signifikanztest wurde der Log-Rank-Test verwendet.

Teilweise vorkommende Differenzen der Fallzahlen in den Tabellen sind durch fehlende Werte der Zytokinmessungen bedingt. Qualitative Merkmale wie IPI, das Ansprechen auf die Therapie oder der zeitliche Verlauf von Zytokinkonzentrationen im Serum wurden in Kreuztabellen zusammengefasst. Zusammenhänge dieser Variablen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ermittelt.

Zytokine: Aus der quantitativen Analyse der Zytokinkonzentration im Serum der Patienten wurde das qualitative Merkmal Anstieg bzw. Abfall aus der Differenz der seriellen Messungen gebildet.

Definition der seriellen Messpunkte: Die Zeitpunkte der Blutabnahmen wurden wie folgt zugeordnet: W0: vor Therapie; W1: bis 13 Tage nach Therapie; W2: bis 20 Tage nach Therapie; W3: bis 27 Tage nach Therapie, aber vor der nächsten Chemotherapie.

5 Ergebnisse

5.1 Studienkohorte

Die untersuchte Patientengruppe besteht aus 23 Männern und 13 Frauen. Das mittlere Alter bei Eintritt in die Studie liegt bei den Frauen bei 72 Jahren und bei den Männern bei 64 Jahren. Der mediane Beobachtungszeitraum beträgt 535 Tage.

Tabelle 5.1.1 Patientencharakteristika

Geschlecht	Anzahl	Mittleres Alter
männlich	23	64,8
weiblich	13	72,7
Gesamtanzahl	36	68,7

Innerhalb der Studienpopulation wurde bei 31% der Patienten ein niedrigmalignes Non-Hodgkin-Lymphom diagnostiziert und bei 69% der Patienten konnte ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom nachgewiesen werden (Tabelle 5.1.2). In der Subgruppenanalyse finden sich unter den hochmalignen Lymphomen 16 diffus-großzellige B-Zell-Lymphome, 8 nicht näher zu klassifizierende hochmaligne B-Zell-Lymphome und ein T-Zell-Lymphom. Das Multiple Myelom stellt mit 36% der Patienten den größten Anteil unter den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen innerhalb der Studienpopulation dar. Des Weiteren finden sich unter den Patienten mit niedrigmalignem Lymphom 3 Patienten mit Mantelzell-Lymphom, jeweils ein Patient mit Haarzell-Leukämie und Immunozytom sowie zwei Patienten mit follikulärem Lymphom (Abbildung 5.1.1).

Tabelle 5.1.2 Anteil der niedrig-und hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphome in der Studienpopulation

	Patientenanzahl	Anteil in Prozent
Niedrigmaligne Lymphome	11	31
Hochmaligne Lymphome	25	69
Gesamtanzahl	36	100

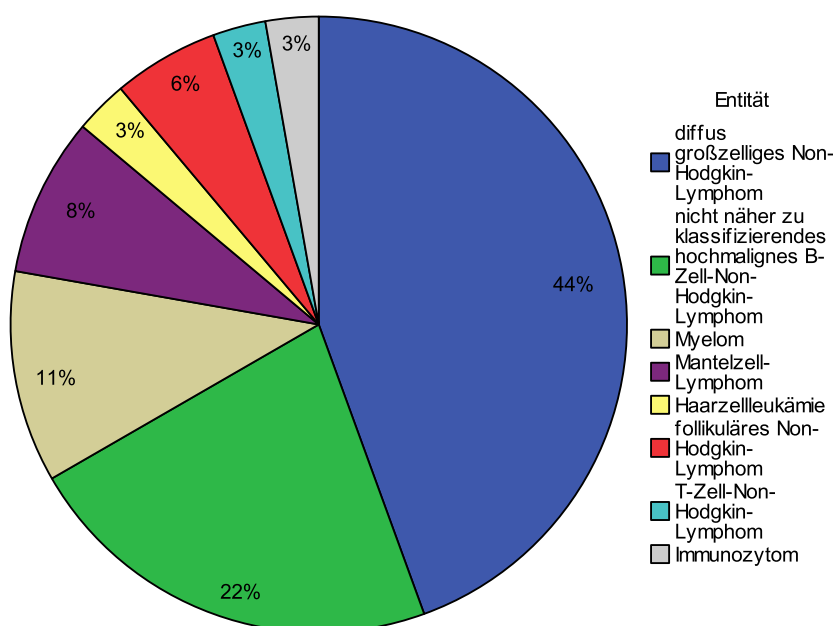


Abbildung 5.1.1 Häufigkeitsverteilung der Lymphomsubgruppen innerhalb der Patientenpopulation in Prozent

In der Patientengruppe, die an einem diffus-großzelligen Non-Hodgkin-Lymphom beziehungsweise an einem nicht näher zu klassifizierenden hochmalignen B-Zell-Lymphom erkrankt ist, konnte bei zehn Patienten ein IPI-Risikoscore von 3 ermittelt werden. Sieben Patienten haben einen IPI –Score von 4. Ein niedriger IPI-Score findet sich, im Vergleich dazu, bei deutlich weniger Patienten. Nur insgesamt 7 Patienten haben bei Diagnosestellung einen prognostisch günstigen IPI-Risikoscore von 1 oder 2 (Abbildung 5.1.2).

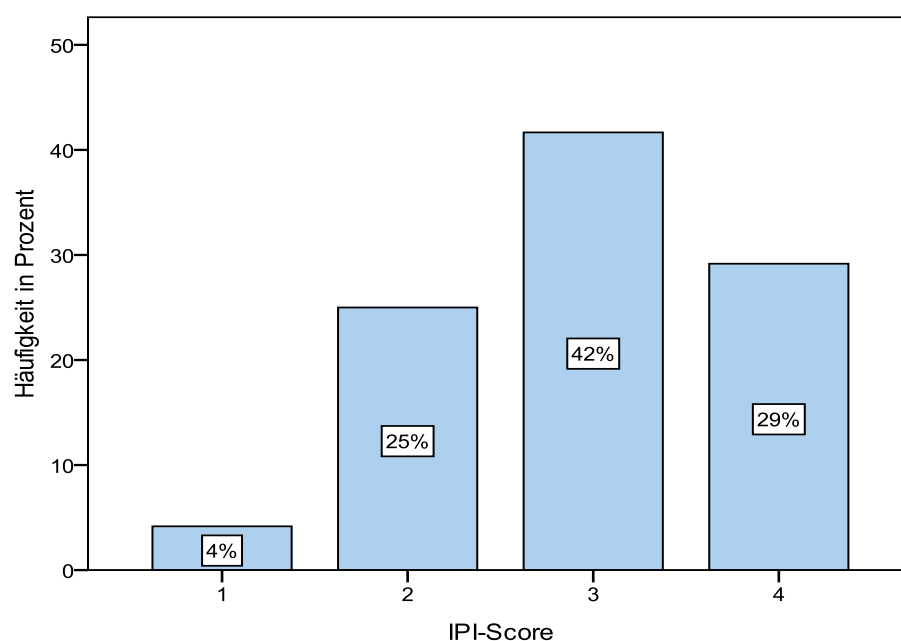


Abbildung 5.1.2 Häufigkeitsverteilung der verschiedenen IPI-Risikogruppen

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen IPI-Risikogruppen innerhalb der Patientenpopulation, die an einem hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt ist (die Definition des IPI-Score ist auf Seite 15 beschrieben). Eingeschlossen in die Auswertung wurden Patienten mit diffus-großzelligem Non-Hodgkin-Lymphom und Patienten, die an einem nicht näher zu klassifizierenden hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt sind

Gemäß der Stadieneinteilung der Ann Arbor-Klassifikation weisen 59% der Patienten bei Diagnosestellung ein Stadium IV der Erkrankung auf. Nur bei 2 Patienten liegt bei Diagnosestellung ein Stadium I vor.

Tabelle 5.1.3 Einteilung der Lymphomerkrankungen nach der Ann Arbor-Klassifikation

Stadium	Patientenanzahl	Anteil in Prozent
I	2	6
II	4	13
III	7	22
IV	19	59
Gesamtanzahl	32	100

Die Kriterien für die Stadieneinteilung von Lymphomerkrankungen gemäß Ann-Arbor-Klassifikation sind auf Seite 5 beschrieben. Die Gesamtanzahl der aufgeführten Patienten beträgt n=32, da die Stadieneinteilung der 4 Patienten, die an einem Multiplen Myelom erkrankt sind, nach den Kriterien gemäß Durie und Salmon erfolgt (siehe Anhang, Seite 60)

Die vier Patienten, die an einem Multiplen Myelom erkrankt sind, haben, gemäß der Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (siehe Anhang, Seite 60), bei Therapiebeginn ein Stadium III.

5.2 Therapieansprechen und Gesamtüberleben

Von den insgesamt 36 auswertbaren Patienten sind während des Beobachtungszeitraumes 19 Patienten (52,8%) verstorben. Die mediane Überlebensdauer liegt bei 754 Tagen.

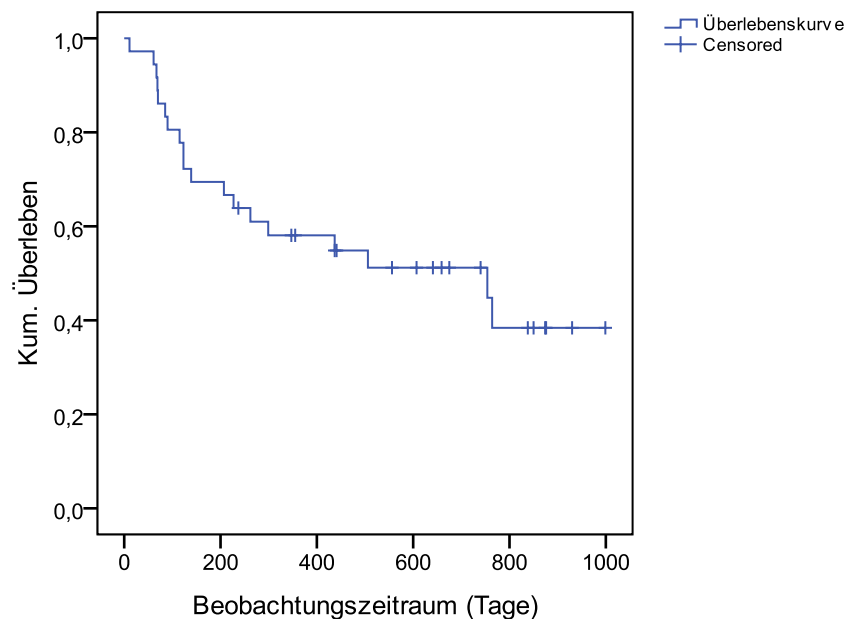


Abbildung 5.2.1 Gesamtüberleben innerhalb der Patientenpopulation

In Bezug auf den IPI zeigt sich in der Gruppe der hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphome eine Abhängigkeit des Gesamtüberlebens vom IPI-Score. In der Patientengruppe mit einem IPI-Score von 1 sind während des Beobachtungszeitraumes keine Todesfälle aufgetreten. In der Patientengruppe mit einem IPI von 2 verstarb ein Patient. In der IPI3-Gruppe sind 5 Patienten verstorben und 5 Patienten verstarben mit einem IPI-Score von 4 (Abbildung 5.2.2). Diese Ergebnisse repräsentieren die bereits bekannten Daten hinsichtlich einer Abnahme der Gesamtüberlebensdauer mit steigendem IPI-Score (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

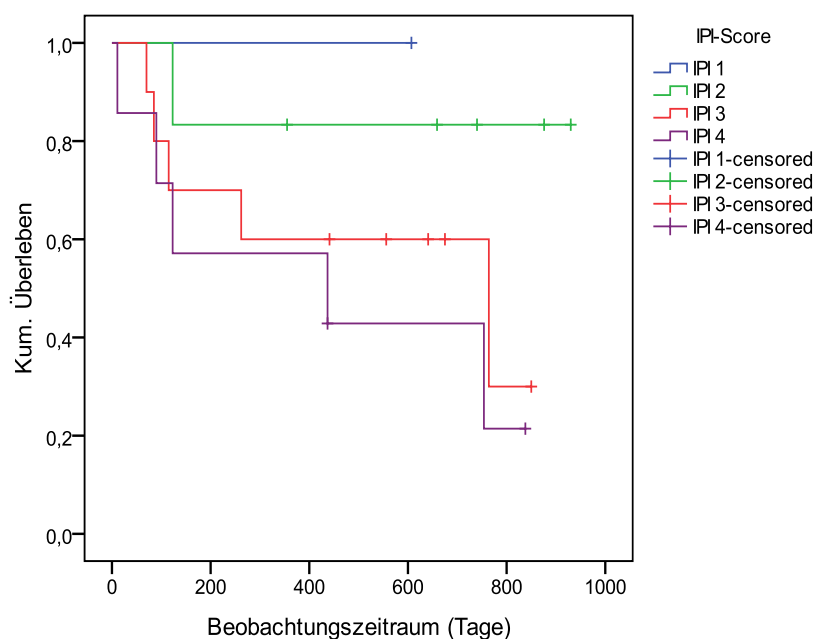


Abbildung 5.2.2 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom IPI-Score

Dargestellt ist das Gesamtüberleben innerhalb der Patientengruppe, die an einem diffus-großzelligen oder nicht näher zu klassifizierenden Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt ist, in Abhängigkeit der IPI-Risikogruppe (die Definition des IPI-Score ist auf Seite 15 beschrieben)

Innerhalb der Patientenpopulation zeigen während des Beobachtungszeitraumes 33% der Patienten eine komplette Remission (CR). 28% der Patienten entwickeln einen Progress der Erkrankung (PD) (Tabelle 5.2.1). In der Subgruppenanalyse zeigt sich, dass 44% der Patienten mit einem hochmalignen Lymphom eine komplette Remission nach stattgehabter Therapie aufzeigen und 24% der Patienten einen Lymphomprogress aufweisen. Innerhalb der Gruppe der niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphome überwiegt mit 54,5% der Anteil der Patienten, die eine partielle Remission (PR) nach der Therapie aufweisen, 36% der Patienten haben einen Erkrankungsprogress.

Tabelle 5.2.1 Remissionsstatus innerhalb der Patientenpopulation

Remissionsstatus	Patientenanzahl	Anteil in Prozent
CR	12	33
PR	14	39
PD	10	28
Gesamtanzahl	36	100

CR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PD: Erkrankungsprogress

Patienten, bei denen nach Applikation der Chemotherapie mindestens eine partielle Remission diagnostiziert werden konnte, weisen ein signifikant höheres Gesamtüberleben auf im Vergleich zu Patienten, bei denen nach stattgehabter Therapie ein Lymphomprogress vorliegt (Abb.5.2.3).

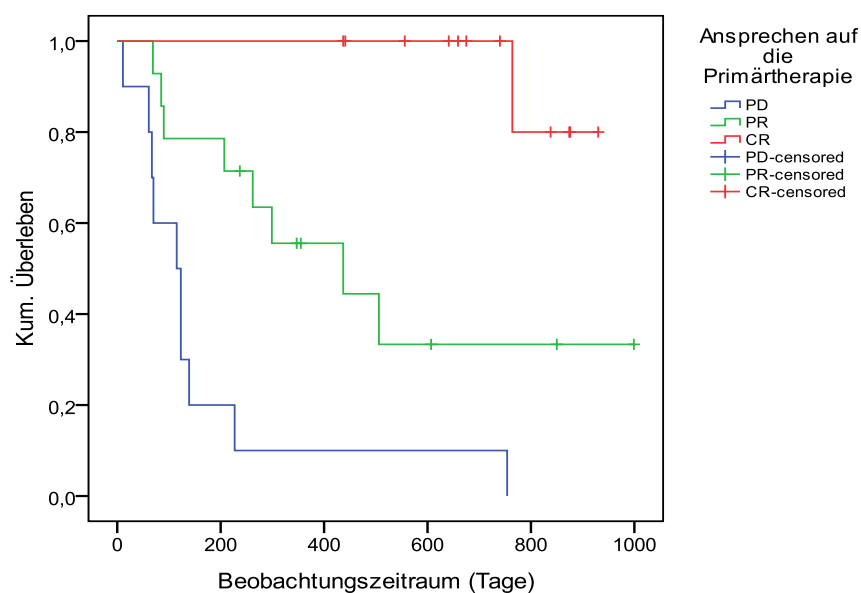


Abbildung 5.2.3 Gesamtüberleben der Patientenpopulation in Abhängigkeit vom Therapieansprechen

CR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PD: Erkrankungsprogress

Insgesamt sind in der Patientengruppe, die mindestens eine partielle Remission unter der Therapie erreichen konnte, 35% der Patienten während des Beobachtungszeitraumes verstorben. Patienten, die unter der Therapie einen Progress aufweisen, sind während des Beobachtungszeitraumes der Studie alle verstorben (Tabelle 5.2.2). Die mittlere Überlebenszeit bei Patienten, die mindestens eine partielle Remission haben, liegt bei 731 Tagen, bei Patienten mit progredienter Erkrankung bei 169 Tagen.

Tabelle 5.2.2 Anzahl der Todesfälle in Abhängigkeit vom Remissionsstatus

	Remissionsstatus			Gesamtanzahl
	CR	PR	PD	
Nicht verstorben	11	6	0	17
Verstorben	1	8	10	19
Gesamtanzahl	12	14	10	36

CR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PD: Erkrankungsprogress

In Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen dem IPI-Score und dem Ansprechen auf die durchgeführte Primärtherapie, zeigt sich bei kleiner Fallzahl innerhalb der Patientenpopulation kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Risikogruppen (Tabelle 5.2.3). Insgesamt zeigen innerhalb der Patientengruppe mit einem diffus-großzelligen Non-Hodgkin-Lymphom oder einem nicht näher zu klassifizierenden hochmalignen B-Zell-Lymphom nur 6 Patienten ein fehlendes klinisches Ansprechen auf die erste Chemotherapie, so dass, zusammengefasst, bei 75% dieser Patienten ein klinischer Rückgang der Lymphommanifestationen nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 5.2.3 Klinisches Ansprechen auf die Primärtherapie in Abhängigkeit zum IPI-Score

IPI Score					
Ansprechen	1	2	3	4	Gesamtanzahl
nein	0	1	2	3	6
ja	1	5	8	4	18
Gesamtanzahl	1	6	10	7	24

Dargestellt ist das klinische Ansprechen innerhalb der Patientengruppe, die an einem diffus-großzelligen oder nicht näher zu klassifizierenden Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt ist, in Abhängigkeit der IPI-Risikogruppe (die Definition des IPI-Score ist auf Seite 15 beschrieben)

Tabelle 5.2.4 Remissionsstatus in Abhängigkeit zum IPI-Score

IPI-Score					
Remissionsstatus	1	2	3	4	Gesamtanzahl (%)
CR	0	4	5	2	11 (46)
PR	1	1	3	2	7 (29)
PD	0	1	2	3	6 (25)
Gesamtanzahl	1	6	10	7	24

Dargestellt ist der Remissionsstatus innerhalb der Patientengruppe, die an einem diffus-großzelligen oder nicht näher zu klassifizierenden Non-Hodgkin-Lymphom erkrankt ist, in Abhängigkeit der IPI-Risikogruppe (die Definition des IPI-Score ist auf Seite 15 beschrieben). CR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PD: Erkrankungsprogress

Tabelle 5.2.4 stellt den Remissionsstatus nach stattgehabter Therapie in Abhängigkeit zum IPI-Score dar. Insgesamt konnte bei 46% der Patienten eine komplette Remission erreicht werden und 25% der Patienten mit hochmalignem B-Zell-Lymphom zeigen im Verlauf einen Progress der Erkrankung. In der Subgruppenanalyse konnte aufgrund der kleinen Fallzahl kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Rate an Lymphomprogressen und kompletten Remissionen in Abhängigkeit von der IPI-Risikogruppe ermittelt werden.

5.3 COX-2-Expression und Therapieansprechen

Bei insgesamt 30 von 36 Patienten innerhalb der Studienpopulation ist eine Expression der COX-2 nachweisbar, bei sechs Patienten kann keine COX-2-Expression nachgewiesen werden (Tabelle 5.3.1). In der weiteren Analyse hinsichtlich eines möglichen Zusammenhanges zwischen der COX-2-Expression und dem Therapieansprechen zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der COX-2-Gesamtexpression und dem Ansprechen auf die Therapie gibt. Somit zeigt sich kein Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und der COX-2-Gesamtexpression.

Tabelle 5.3.1 COX-2-Gesamtexpression und Therapieansprechen

Remissionsstatus	COX-2-negativ (Patientenanzahl)	COX-2-positiv (Patientenanzahl)	Gesamtanzahl
PD	3	7	10
Mind. PR	3	23	26
Gesamtanzahl	6	30	36

Mind. PR: Vorliegen einer kompletten Remission oder einer partiellen Remission; PD: Erkrankungsprogress;

COX-2-positiv: Nachweis einer COX-2-Expression im untersuchten Material

COX-2-negativ: Fehlen einer COX-2-Expression im untersuchten Material

In der weiteren Analyse zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) im Therapieansprechen in Verbindung mit der COX-2-Expression im Stroma (Tabelle 5.3.2). Bei insgesamt 22 Patienten konnte eine COX-2-Expression im Stroma nachgewiesen werden. Diese Patienten haben ein signifikant besseres Therapieansprechen im Vergleich zu Patienten mit fehlender COX-2-Expression im Stroma. 64% der Patienten ohne nachweisbare COX-2-Expression im Stroma weisen ein fehlendes Therapieansprechen mit einem Lymphomprogress auf, wohingegen

95% der Patienten mit positiver COX-2-Expression im Stroma mindestens eine partielle Remission haben.

Tabelle 5.3.2 COX-2-Expression im Stroma und Therapieansprechen

Remissionsstatus	COX-2-Stroma-negativ (Patientenanzahl)	COX-2-Stroma-positiv (Patientenanzahl)	Gesamtanzahl
PD	9	1	10
Mind. PR	5	21	26
Gesamtanzahl	14	22	36

Mind. PR: Vorliegen einer kompletten Remission oder einer partiellen Remission; PD: Erkrankungsprogress;

COX-2-Stroma positiv: Nachweis einer COX-2-Expression im Stroma

COX-2-Stroma negativ: Fehlen einer COX-2-Expression im Stroma

Dieser Zusammenhang zwischen der Expression der COX-2 im Stroma und dem Remissionsstatus spiegelt sich auch im Gesamtüberleben der Patienten wieder. Patienten mit positiver Expression weisen mit einem medianen Überleben von 671 Tagen ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben auf ($p < 0,01$) im Vergleich zu Patienten mit negativer Expression im Stroma (369 Tage). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstarben 11 (79%) der 14 Patienten mit fehlender COX-2-Expression im Stroma, wohingegen von den 22 Patienten mit Nachweis einer COX-2-Expression im Stroma 8 Patienten (36%) verstarben.

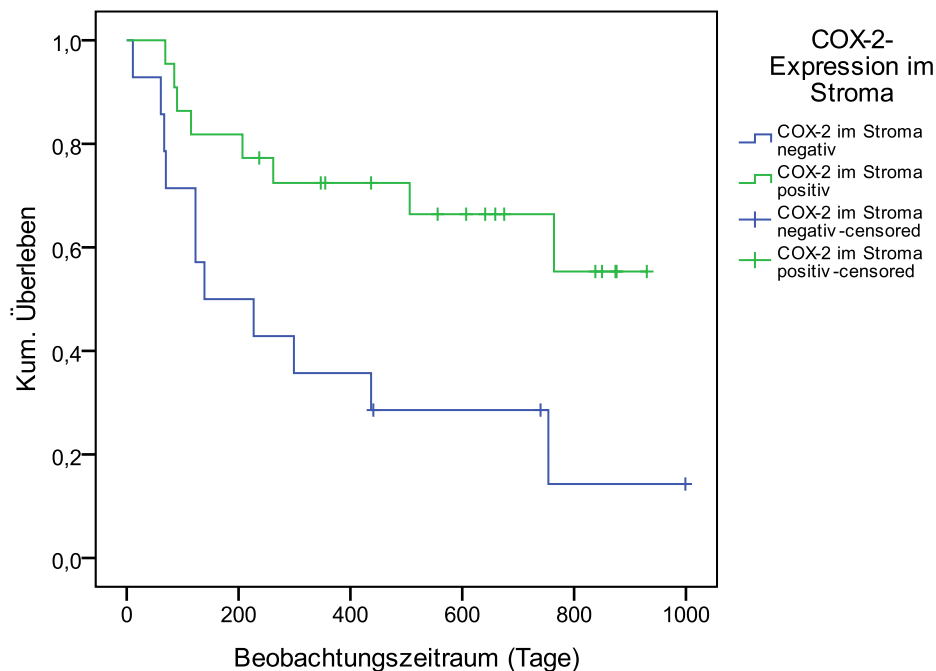


Abbildung 5.3.1 Gesamtüberleben innerhalb der Patientenpopulation in Abhängigkeit von der COX-2-Expression im Stroma

COX-2-Stroma positiv: Nachweis einer COX-2-Expression im Stroma; COX-2-Stroma negativ: fehlender Nachweis einer COX-2-Expression im Stroma

In der weiteren Analyse hinsichtlich der COX-2-Gesamtexpression und des Remissionsstatus zeigt sich, dass von den 6 Patienten, bei denen keine COX-2-Expression nachgewiesen werden konnte, drei Patienten mindestens eine partielle Remission nach Therapie aufweisen und 3 Patienten einen Lymphomprogress haben.

Unter den Patienten mit nachweisbarer COX-2-Gesamtexpression weisen 16 Patienten (53,3%) eine isolierte Expression im Stroma auf und bei 8 Patienten (26,7%) gelang der Nachweis einer COX-2-Expression nur im Tumorgewebe. Von diesen 8 Patienten erlitten nach stattgehabter Therapie 75% einen Lymphomprogress (Tab.5.3.3) im Vergleich zu 50% innerhalb der Patientengruppe mit fehlendem Nachweis einer COX-2-Expression. Alle Patienten mit isoliertem Nachweis der COX-2-Expression im Stroma haben mindestens eine partielle Remission.

Bei 6 Patienten kann sowohl im Stroma als auch im Tumorgewebe eine COX-2-Expression nachgewiesen werden. Von diesen Patienten kann bei einem Patienten ein Lymphomprogress nachgewiesen werden, die anderen fünf Patienten weisen mindestens eine partielle Remission auf.

Tabelle 5.3.3 Häufigkeitsverteilung des Remissionsstatus innerhalb der Patientenpopulation in Abhängigkeit von der COX-2-Expression

	Fehlende COX-2-Expression	COX-2-Expression nur im Tumor	COX-2-Expression nur im Stroma	COX-2-Expression im Stroma und Tumor	Gesamtanzahl
PD	3	6	0	1	10
Mind. PR	3	2	16	5	26
Gesamtanzahl	6	8	16	6	36

Mind. PR: Vorliegen einer kompletten Remission oder einer partiellen Remission, PD: Erkrankungsprogress

Von den insgesamt 8 Patienten mit Nachweis einer COX-2-Expression im Stroma, die während des Beobachtungszeitraumes verstorben sind, zeigen 5 Patienten einen isolierten Nachweis der COX-2-Expression im Stroma und bei 3 Patienten ist sowohl eine COX-2-Expression im Stroma als auch im Tumor nachweisbar. Innerhalb der Patientengruppe mit isoliertem Nachweis der COX-2-Expression im Tumorgewebe verstarben 7 Patienten (Tabelle 5.3.4).

Tabelle 5.3.4 Anzahl der Todesfälle innerhalb der Patientenpopulation in Zusammenhang mit der Lokalisation der COX-2-Expression

	Fehlende COX-2-Expression	COX-2-Expression nur im Tumor	COX-2-Expression nur im Stroma	COX-2-Expression im Stroma und Tumor	Gesamtanzahl
Nicht verstorben	2	1	11	3	17
verstorben	4	7	5	3	19
Gesamtanzahl	6	8	16	6	36

Insgesamt haben Patienten mit alleiniger Expression der COX-2 im Stroma ein deutlich verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit isoliertem COX-2-Nachweis im Tumor (Abbildung 5.3.2), wobei, aufgrund der kleinen Fallzahl innerhalb der Subgruppenanalyse, die Ergebnisse hinsichtlich des Gesamtüberlebens statistisch nicht signifikant sind.

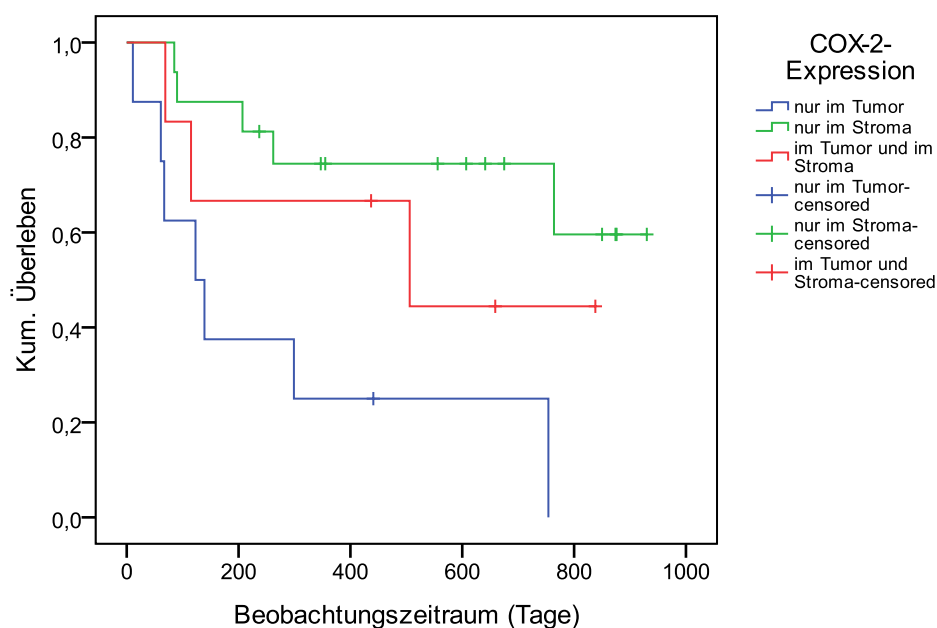


Abbildung 5.3.2 Gesamtüberleben innerhalb der Patientenpopulation in Abhängigkeit von der Lokalisation der COX-2-Expression

5.4 VEGF-, IL6- und IL-8-Serumspiegel und Therapieansprechen

Die Bestimmung der VEGF-Spiegel im Serum vor und nach der durchgeführten Chemotherapie konnte aufgrund fehlenden Probenmaterials nur bei 26 der insgesamt 36 Patienten durchgeführt werden. Insgesamt konnte bei der Hälfte der Patienten ein Abfall der VEGF-Spiegel nach Applikation der ersten Chemotherapie nachgewiesen werden. Die Höhe des gemessenen VEGF-Wertes vor Beginn der Therapie und dessen Abweichung vom Median zeigt, bei insgesamt kleiner Fallzahl, keinen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die Therapie.

In Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen VEGF-Abfall im Serum nach Chemotherapie, definiert als Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert, und Remissionsstatus sind die ermittelten Ergebnisse aufgrund der kleinen Patientenzahl und teilweise lückenhafter VEGF-Verlaufsspiegel nur eingeschränkt zu bewerten. 62% der Patienten ohne VEGF-Abfall unter der Therapie zeigen im Verlauf

mindestens eine partielle Remission der Erkrankung, 38% der Patienten entwickeln einen Lymphomprogress. In der Patientengruppe mit nachgewiesenem VEGF-Abfall unter der Therapie zeigen 92% der Patienten eine partielle oder komplette Remission.

Tabelle 5.4.1 Remissionsstatus und VEGF-Abfall im Serum nach Chemotherapie

Remissionsstatus	VEGF-Abfall		Gesamtanzahl
	nein (Patientenanzahl)	ja (Patientenanzahl)	
CR	4	8	12
PR	4	4	8
PD	5	1	6
Gesamtanzahl	13	13	26

CR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PD: Erkrankungsprogress. VEGF-Abfall: Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert

Auch in Hinblick auf das Ansprechen auf die durchgeführte erste Chemotherapie zeigen sich Unterschiede in den beiden Patientengruppen (Tabelle 5.4.2). Alle Patienten, die einen Abfall der VEGF-Spiegel im Verlauf haben, zeigen nach stattgehabter Chemotherapie ein klinisches Ansprechen auf die Therapie, wohingegen 38% der Patienten ohne nachweisbaren VEGF-Abfall kein klinisches Ansprechen nach der Ersttherapie zeigen.

Tabelle 5.4.2 Klinisches Ansprechen auf die Chemotherapie und VEGF-Abfall im Serum

Ansprechen	VEGF-Abfall		Gesamtanzahl
	nein (Patientenanzahl)	ja (Patientenanzahl)	
nein	5	0	5
ja	8	13	21
Gesamtanzahl	13	13	26

VEGF-Abfall: Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert

Die Messung der Interleukine IL-6 und IL-8 konnte ebenfalls nur bei einer relativ kleinen Fallzahl an Patienten durchgeführt werden. Insgesamt konnte bei jeweils 32 Patienten die IL-6- und IL-8-Bestimmung erfolgen. Leider ist die Bestimmung der Interleukine aufgrund von fehlendem Patientenmaterial nicht an allen vorgegebenen Abnahmetagen durchgeführt worden, so dass auch diese erhobenen Ergebnisse nur als Anhaltspunkte gewertet werden können und statistisch nicht signifikant sind. In Hinblick auf den Zusammenhang zwischen dem Remissionsstatus nach stattgehabter Chemotherapie beziehungsweise dem klinischen Ansprechen nach der durchgeführten Therapie und dem Abfall der IL-6 und IL-8-Spiegel konnten keine Unterschiede ermittelt werden. Wie aus den nachfolgenden Tabellen hervorgeht, ist ein gemessener Abfall der Interleukine im Serum nicht einhergehend mit einer erhöhten klinischen Ansprechrate oder einem verbesserten Remissionsstatus nach der Therapie. Als Abfall des IL-6 beziehungsweise IL-8-Spiegels wurde der Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert definiert.

Tabelle 5.4.3 Abfall des IL-6-Konzentration im Serum und Remissionsstatus

Remissionsstatus	IL6-Abfall		Gesamtanzahl
	nein (Patientenanzahl)	ja (Patientenanzahl)	
CR	6	3	9
PR	5	9	14
PD	5	4	9
Gesamtanzahl	16	16	32

CR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PD: Erkrankungsprogress. IL-6-Abfall: Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert

Tabelle 5.4.4 Abfall des IL-6-Spiegel im Serum und klinisches Ansprechen auf die Chemotherapie

Ansprechen	IL6-Abfall		Gesamtanzahl
	nein (Patientenanzahl)	ja (Patientenanzahl)	
nein	5	4	9
ja	11	12	23
Gesamtanzahl	16	16	32

IL-6-Abfall: Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert

Tabelle 5.4.5 Remissionsstatus und Abfall des IL-8-Spiegels im Serum

IL-8-Abfall	Remissionsstatus			Gesamtanzahl
	CR (Patientenanzahl)	PR (Patientenanzahl)	PD (Patientenanzahl)	
nein	8	4	3	15
ja	4	7	6	17
Gesamtanzahl	12	11	9	32

CR: komplette Remission, PR: partielle Remission, PD: Erkrankungsprogress. IL-8-Abfall: Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert

Tabelle 5.4.6 Klinisches Ansprechens auf die Chemotherapie und Abfall des IL-8-Spiegels im Serum

IL-8-Abfall	Therapieansprechen		Gesamtanzahl
	nein (Patientenanzahl)	ja (Patientenanzahl)	
nein	3	12	15
ja	4	13	17
Gesamtanzahl	7	25	32

IL-8-Abfall: Abfall um 20% im Vergleich zum Ausgangswert

6 Diskussion

6.1 Studiencharakteristika

Die vorliegende Kohortenstudie zeichnet sich durch eine ausreichend lange Beobachtungsdauer der Patienten und eine damit verbundene engmaschige Erhebung des Remissionsstatus nach stattgehabter Therapie aus. In Hinblick auf die Geschlechts- und Altersverteilung ist die Studienpopulation dem Verteilungsmuster der Erkrankung innerhalb der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland vergleichbar und somit als repräsentativ anzusehen.

Innerhalb der Studienpopulation sind 69% der Patienten an einem hochmalignen B-Zell-Lymphom erkrankt. Bei diesen Patienten wurde der Internationale Prognostische Index ermittelt und das mediane Überleben innerhalb der einzelnen Risikogruppen miteinander verglichen. Die erhobenen Daten entsprechen den bereits bekannten und allgemein anerkannten Zusammenhängen zwischen einer Verminderung der Gesamtüberlebensrate mit zunehmenden IPI, welche bereits in vorausgegangenen Studien dargelegt werden konnten (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993). *Yang et al.* (2009) konnten aufzeigen, dass diese Zusammenhänge auch unter der Therapie mit Rituximab Gültigkeit behalten. Auch in Hinblick auf die Abhängigkeit des kumulativen Überlebens zum primären Ansprechen auf die Chemotherapie zeigen die erhobenen Daten vergleichbare Ergebnisse wie die großen Multicenter-Studien (Cabanillas et al., 1988). Patienten, die auf die Primärtherapie ein schlechtes Ansprechen zeigen, haben eine signifikant verkürzte Gesamtüberlebensdauer.

Zum einen verdeutlichen diese erhobenen Daten somit die Reproduzierbarkeit und Gültigkeit der Ergebnisse dieser Studie, zum anderen wird hieraus auch die Relevanz des Ansprechens auf die Primärtherapie ersichtlich. Es stellt sich erneut die Frage nach weiteren biologischen Prognosefaktoren, die eine Einschätzung hinsichtlich eines primären Therapieversagens mit der Notwendigkeit einer intensiveren Primärtherapie ermöglichen. Diese biologischen Marker könnten gegebenenfalls auch neue Optionen darstellen, um eine zusätzliche gezielte Therapie („*targeted therapy*“)

durchzuführen. In unserer Studie konnte kein sicherer Zusammenhang zwischen dem IPI und dem Ansprechen auf die durchgeführte Therapie gefunden werden. Weitere, unbekannte Faktoren haben Einfluss auf das Ansprechen auf die Therapie und somit auf das Überleben des Patienten.

6.2 COX-2-Analyse

In Anbetracht der Forschungsergebnisse an soliden Tumoren, rückt zunehmend bei den Lymphomerkrankungen die Rolle der COX-2 in den Fokus klinischer Studien. Durch eine Überexpression der COX-2 im Tumorgewebe kommt es zur erhöhten Produktion von pro-angiogenetischen Faktoren wie Prostaglandin E₂, VEGF und bFGF (Tsuji et al., 1998; Masferrer et al., 2000), Hemmung der Immunabwehrreaktion, unter anderem über Prostaglandin E₂ vermittelte Modulation der Funktion von T-Lymphozyten (Choudhry et al., 1999; Baratelli et al., 2005) sowie Hemmung der Apoptose von Tumorzellen (Sheng et al., 1998; Tsuji et al., 1998).

In-vitro konnte bereits dargestellt werden, dass in Lymphomerkrankungen eine erhöhte COX-2-Expression nachzuweisen ist und durch den Einsatz eines selektiven COX-2-Inhibitors (Celecoxib) die Proliferation der Lymphomzellen gehemmt wird sowie Apoptose ausgelöst werden kann. Hierfür waren allerdings hohe Spiegel des COX-2-Inhibitors notwendig (Wun et al., 2004). Auch in-vivo ist eine erhöhte Expression der COX-2 in Zellen von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen nachweisbar, wobei Patienten mit nachgewiesener COX-2-Expression ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Chemotherapie zeigten und eine schlechtere Prognose aufwiesen (Hazar et al., 2004; Ladetto et al., 2005).

Im Vergleich zu den genannten Daten geht in der hier vorliegenden Studie der Nachweis der COX-2-Gesamtexpression nicht mit einem signifikant verminderten Gesamtüberleben einher, wobei hierbei die nur kleine Fallzahl an Patienten, die eine fehlende COX-2-Expression aufweisen, ursächlich sein mag. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass bei einem Großteil der Patienten eine COX-2-Expression im Lymphompräparat nachweisbar ist und somit auch bei Lymphomerkrankungen die

COX-2-Expression eine Bedeutung in der Tumorgenese zu haben scheint, da in gesunden Lymphozyten kaum COX-2-Expression nachweisbar ist (Wun et al., 2004).

In der weiteren Analyse der Patientengruppe, die eine COX-2-Expression aufweist, zeigt sich jedoch ein interessanter Unterschied: während vorausgegangene Studien bei der Analyse der COX-2-Expression in Tumorerkrankungen nicht zwischen der COX-2-Expression im Stroma und im Tumor unterschieden haben, kann in der vorliegenden Studie ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Therapieansprechens in Abhängigkeit von der Lokalisation der COX-2-Expression (Tumorzelle oder umgebendes Stroma) nachgewiesen werden. Der Nachweis der COX-2-Expression in den Stromazellen ist einhergehend mit einem besseren Therapieansprechen und einer signifikant verlängerten Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit fehlendem Nachweis einer COX-2-Expression im Stroma. Patienten, die COX-2 nur im Tumor exprimieren, haben ein deutlich schlechteres Therapieansprechen. Alle Patienten mit einer isolierten COX-2-Expression im Stroma haben in der Analyse mindestens eine partielle Remission und zeigen sich hinsichtlich des Therapieansprechens auch gegenüber Patienten mit fehlender COX-2-Gesamtexpression im Vorteil. Somit kann die Bestimmung der COX-2-Expression im Stroma möglicherweise als ein prognostischer Marker für das Therapieansprechen von Nutzen sein, jedoch sind Studien an größeren Patientenkollektiven notwendig, um diesen Sachverhalt zu prüfen. Auch sind weitere Untersuchungen nach serologischen Parametern in der Patientengruppe mit fehlender COX-2-Expression im Stroma notwendig, die die Patienten identifizieren, die doch ein Therapieansprechen zeigen. Aufgrund der leider kleinen Gruppengröße innerhalb der durchgeführten Studie ist dieses Vorhaben mit statistischen Mitteln nicht gelungen.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression der COX-2 nicht unbedingt mit einer schlechten Prognose der Erkrankung einhergeht und verdeutlichen erneut die komplexen Mechanismen und Interaktionen von pro- und antiangiogenetischen Faktoren. Während in den vorausgegangenen Studien das Blickfeld auf die pro-angiogenetischen Fähigkeiten der COX-2 gerichtet war, sollte in folgenden Studien auch eine mögliche protektive Rolle der COX-2 gegen die Tumorgenese in Erwägung gezogen werden. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die Expression der COX-2 und die damit verbundene Zytokinfreisetzung im Stroma möglicherweise eine

Abwehrreaktion der Stromazellen (Makrophagen, T-Lymphozyten) gegen die Lymphomzellen darstellt und somit, im Sinne des „*cancer immunoediting*“ (Dunn et al., 2002), als protektive Immunreaktion gegen das Lymphom anzusehen ist. Eine weiterführende Untersuchung hinsichtlich der genauen Klassifizierung der COX-2-exprimierenden Zellen im Stroma in folgenden Studien könnte diese Hypothese stützen.

Da die isolierte COX-2-Expression im Tumor und auch die gleichzeitige COX-2-Expression im Stroma und im Tumor mit einem kürzeren Gesamtüberleben einhergehen, scheint die Expression im Tumor, über die pro-angiogenetischen und Apoptose-inhibitorischen Effekte, dieser möglichen Immunabwehr-Reaktion entgegenzustehen. Es stellt sich die Frage, welche Folgen eine medikamentöse, selektive Hemmung der COX-2 auf die Lymphomkrankung haben könnte. Aufgrund der vorausgegangenen Studien wird der Einsatz von selektiven COX-2-Inhibitoren in der Therapie von verschiedenen Tumorerkrankungen erprobt. In-vitro-Untersuchungen konnten die Fähigkeit dieser Substanzen aufzeigen, über pro-apoptotische, antiangiogenetische und immunmodulatorische Prozesse das Tumorwachstum zu hemmen. Die Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAID) scheint das Risiko, an verschiedenen Tumorleiden zu erkranken, zu verringern (Schreinemachers und Everson, 1994; Collet et al., 1999; Garcia-Rodriguez und Huerta-Alvarez, 2000). Diese antitumoralen Effekte sind auf die COX-2-Inhibition durch diese Medikamente zurückzuführen. Es gibt jedoch Daten, die vermuten lassen, dass die Hinzunahme eines selektiven COX-2-Hemmers zu Standard-Chemotherapien, zum Beispiel bei Bronchialkarzinomen, keinen zusätzlichen therapeutischen Effekt zeigt (Schneider et al., 2008). Für Non-Hodgkin-Lymphome gibt es ebenfalls Daten, die vermuten lassen, dass es durch Einnahme von NSAID zu einer Risikoreduktion an einem Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken kommt (Holly et al., 1999). Jedoch konnten andere Studien diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Cartwright et al., 1988; Zhang et al., 2004). In einigen Studien zeigt sich unter regelmäßiger NSAID-Einnahme sogar ein erhöhtes Risiko an einem Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken (Chang et al., 2005; Flick et al., 2006). *Flick et al.* (2006) konnten in einer *case-control*-Studie keine Risikoreduktion für das Auftreten von Non-Hodgkin-Lymphomen unter NSAID-Einnahme aufzeigen, die regelmäßige Einnahme von selektiven COX-2-

Inhibitoren scheint bei Frauen sogar mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Non-Hodgkin-Lymphomen einherzugehen. Es handelte sich hierbei jedoch um eine kleine Patientenzahl, eine Analyse hinsichtlich des Lymphom-Subtyp ist nicht erfolgt und die Befragung hinsichtlich der Medikamenteneinnahme erstreckte sich über 20 Jahre, so dass hier ein potentieller statistischer Bias vorliegt. In einer bisher nicht veröffentlichten Studie einer Arbeitsgruppe der Abteilung für Hämatologie/Onkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, lässt sich in-vitro anhand einer Studie an Mammakarzinom-Zellreihen ebenfalls keine Wachstumshemmung der Karzinomzellen durch COX-2-Hemmung aufzeigen, jedoch ist in-vivo eine Wachstumshemmung nachweisbar. Diese Ergebnisse unterstreichen die These, dass die COX-2-Expression keinen direkten Effekt auf die Tumorzellen zu haben scheint, sondern vielmehr über Effekte auf das „*microenvironment*“ das Karzinomwachstum zu beeinflussen scheint.

Insgesamt scheint es nicht ausreichend zu sein, nur anhand der COX-2-Gesamtexpression Rückschlüsse auf das biologische Verhalten des Tumors ziehen zu wollen und selektive COX-2-Inhibitoren als Therapieergänzung einzusetzen. In Anbetracht der erhobenen Daten ist es durchaus denkbar, durch eine medikamentöse Hemmung der COX-2-Expression im Stroma, die Prognose des Patienten zu verschlechtern. Die vorliegende Studie konnte anhand der erhobenen Ergebnisse aufzeigen, dass die Effekte der COX-2-Expression auf die Tumorzellen und deren Stroma vielfältig und komplex sind, so dass zunächst weitere Untersuchungen notwendig sind, bevor eine medikamentöse COX-2-Hemmung als reguläre Therapie von Tumorerkrankungen etabliert werden kann.

6.3. Analyse VEGF, IL-6 und IL-8

VEGF ist ein vaskulärer Wachstumsfaktor und spielt eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung, sowohl in Tumoren als auch in gesundem Gewebe (Dvorak, 2002; Ferrara et al., 2003). Eine erhöhte COX-2-Expression führt über eine erhöhte Expression von pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF und bFGF zu einer verstärkten Tumorangiogenese (Tsuji und DuBois, 1995). Auch für die Entstehung von hämatologischen Neoplasien spielt die Stimulation der Angiogenese durch VEGF anscheinend eine wichtige Rolle. Bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen konnten erhöhte Plasma-Spiegel von VEGF und bFGF gefunden werden (Martyre et al., 1997; Di Raimondo et al., 2001) und für die chronische myeloische Leukämie konnte ein vermindertes Überleben bei Patienten mit erhöhten VEGF-Konzentration nachgewiesen werden (Verstovsek et al., 2003). Da die Expression von VEGF unter anderem über die COX-2 reguliert wird, ist anzunehmen, dass bei Lymphomen eine erhöhte COX-2-Expression mit erhöhten Spiegeln von VEGF einhergeht. In Anbetracht der oben genannten Studienergebnisse ist der Einfluss der VEGF-Konzentration auf das Therapieansprechen und das Gesamtüberleben der Lymphompatienten zu diskutieren. Es wäre möglich, dass persistierend erhöhte VEGF-Spiegel unter Therapie ein erhöhtes Risiko für einen schnellen Progress widerspiegeln könnten. Ribatti et al. (1996) konnten bereits eine erhöhte „*microvessel density*“ in Gewebe von Non-Hodgkin-Lymphomen nachweisen. Aggressive, rasch progrediente Lymphome wiesen eine höhere Gefäßdichte auf als indolente Lymphome, was auf eine Beziehung zwischen Angiogenese und Erkrankungsprogression hindeutet. Auch konnte gezeigt werden, dass Non-Hodgkin-Lymphom-Zellen VEGF produzieren (Ho et al., 2002; Potti et al., 2002) und bFGF sowie VEGF bei Hodgkin-Erkrankungen in den Reed-Sternberg-Zellen produziert werden (Ohshima et al., 1999; Doussis-Anagnostopoulou et al., 2002). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass erhöhte VEGF-Spiegel mit einer schlechteren Prognose bei Non-Hodgkin-Lymphomen einhergehen (Salven et al., 1997).

In der vorliegenden Studie konnte nur bei einem Teil der Patienten der VEGF-Spiegel bestimmt werden, so dass die Auswertung der Ergebnisse hinsichtlich des VEGF-Abfalls nach Chemotherapie und dem Ansprechen auf die Therapie lediglich einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang liefern kann. Es zeigt sich, dass unter

der Therapie bei der Hälfte der Patienten ein Abfall der VEGF-Konzentration zu beobachten ist. Diese Patienten weisen ein deutlich besseres Therapieansprechen auf, im Vergleich zu den Patienten, die keinen Abfall der VEGF-Spiegel im Serum zeigen. Diese Ergebnisse bestätigen die vorbeschriebenen Daten hinsichtlich einer prognostischen Bedeutung der VEGF-Konzentration bei Lymphomerkrankungen. Gleichzeitig stellt der Abfall der VEGF-Konzentration im Serum unabhängig vom VEGF-Spiegel zu Beginn der Therapie möglicherweise einen prognostischen Marker zur Einschätzung des Therapieansprechens dar und ist gegebenenfalls ein Indikator für die frühzeitige Intensivierung der Therapie. Größere Studien sind notwendig, um diese Hypothese zu belegen und um zu prüfen, ob Patienten mit fehlendem Abfall der VEGF-Spiegel unter der Chemotherapie gegebenenfalls von einer Therapie mit einem VEGF-Rezeptorantagonisten profitieren würden.

Verschiedenen Interleukinen konnte ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von malignen Neoplasien zugeschrieben werden. Die komplexen Mechanismen dieses Zusammenhanges spiegeln sich in den vielseitigen Aufgaben dieser Zytokine in der Immunabwehr, bei Entzündungsreaktionen und den pro-angiogenetischen Effekten wieder. *Seymour et al. (1995)* sowie *Pedersen et al. (2005)* konnten aufzeigen, dass IL-6 ein unabhängiger prognostischer Marker für das Ansprechen und das Gesamtüberleben von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen zu sein scheint und dass ein Abfall nach stattgehabter Therapie ein Marker für eine bessere Prognose der Patienten darstellen könnte. Auch bei Patienten mit Multiplem Myelom ist IL-6 ein Wachstumsstimulus für Plasmazellen und erhöhte Serumspiegel sind bei dieser Lymphomentität ebenfalls mit einer schlechteren Prognose korreliert (Lauta, 2003). Auch den Interleukinen IL-3, IL-8 und IL-10 kommt ein Einfluss auf die Proliferation von Lymphomzellen zu. *Negaard et al. (2009)* konnten aufzeigen, dass Patienten mit hämatologischen Neoplasien eine erhöhte „*microvessel density*“ im Knochenmark aufwiesen und, damit verbunden, erhöhte Serumspiegel von pro-angiogenetischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 nachweisbar sind. Patienten, die nach stattgehabter Therapie keine komplette Remission erreicht haben, wiesen, im Vergleich zu Patienten mit kompletter Remission, signifikant erhöhte Plasmaspiegel an IL-6 und IL-8 auf.

Aufgrund der kleinen Fallzahl und der fehlenden vollständigen Datenermittlung ist in Hinblick auf die Korrelation zwischen dem Ansprechen auf die Therapie und den Serumspiegeln der verschiedenen Interleukine keine statistisch sinnvolle Auswertung und Subgruppenanalyse in der vorliegenden Studie möglich. In Zusammenschau der Ergebnisse wäre eine weitere Analyse bei den Patienten mit COX-2-Expression im Stroma hinsichtlich der Interleukinspiegel im Serum wünschenswert. Es ist denkbar, dass Patienten, die eine COX-2-Expression in den Stromazellen aufweisen, jedoch ein schlechtes Ansprechen auf die Primärtherapie zeigen, sich hinsichtlich der IL-6 und IL-8-Spiegel im Serum unterscheiden im Vergleich zu Patienten mit COX-2-Expression im Stroma und gutem Therapieansprechen. Dieser Sachverhalt könnte dazu beitragen, Therapie-Non-Responder frühzeitig zu erkennen und gegebenenfalls intensiver zu therapieren.

Insgesamt wird durch die vorliegende Studie deutlich, dass die Einflüsse auf das Tumorwachstum vielgestaltig sind. Durch den Nachweis des Zusammenhanges zwischen Lokalisation der COX-2-Expression und dem Gesamtüberleben konnte gezeigt werden, dass die Einflüsse der verschiedenen Zytokine nicht nur direkt auf die Tumorzelle, sondern vielmehr auch auf die direkte Umgebung der Tumorzelle beziehungsweise auf das „*microenvironment*“ eine wesentliche Rolle im Verständnis der Pathogenese einer Tumorerkrankung spielen und in die Entwicklung neuer prognostischer Marker miteinbezogen werden müssen. Um weitere Zusammenhänge aufzuzeigen und die komplexen Interaktionen zwischen Tumorzellen und umgebendem Stroma genauer zu beleuchten, sind Studien an größeren Patientenzahlen notwendig.

7 Zusammenfassung

Das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels und vermittelt über die Synthese verschiedener Prostaglandine unter anderem die Unterhaltung einer Entzündungsreaktion im Gewebe. Des Weiteren hat die COX-2 über pro-angiogenetische und Apoptose-hemmende Eigenschaften eine wesentliche Rolle in der Entstehung von Tumorerkrankungen. Auch hämatologische Neoplasien weisen eine erhöhte COX-2-Expression auf, die anscheinend mit einem verminderten Ansprechen auf die Primärtherapie und einem verminderten Gesamtüberleben einherzugehen scheint. Somit ist die COX-2-Expression im Tumor ein möglicher prognostischer Faktor in Hinblick auf die Einschätzung des Therapieansprechens einer lymphoproliferativen Erkrankung und kann gegebenenfalls hinzugezogen werden, um Patienten zu identifizieren, die primär einer intensiveren Therapie zugeführt werden sollten.

Im Rahmen einer prospektiven Longitudinalstudie wurden 36 Patienten mit malignen Lymphomen rekrutiert, die den ersten Kurs einer Chemotherapie erhielten und über einen medianen Beobachtungszeitraum von 1,5 Jahren nachbeobachtet wurden. Das Ansprechen auf die Chemotherapie war der primäre und das Überleben der Patienten war der sekundäre Endpunkt der Studie. Durch die Bestimmung der COX-2-Expression im Tumorgewebe und im umgebenden Stromagewebe sowie über die Bestimmung von verschiedenen Zytokinen im Serum wurden Parameter gesucht, die das Ansprechen auf die Chemotherapie vorhersagen.

In der Datenauswertung zeigt sich, dass Patienten mit Nachweis einer COX-2-Expression im Stroma eine signifikant verlängerte mediane Überlebenszeit (671 Tage) im Vergleich zu Patienten mit fehlender COX-2-Expression im Stroma (369 Tage) haben und ein besseres Therapieansprechen aufweisen (95% vs. 36%). Patienten mit isolierter COX-2-Expression im Tumorgewebe haben in der Subgruppenanalyse die schlechtesten Ansprechraten und ein deutlich verkürztes Gesamtüberleben. Insgesamt waren 75% der Patienten mit isoliertem Nachweis einer COX-2-Expression im Tumor im Verlauf progredient erkrankt.

Somit stellt die Expression der COX-2 im Stroma einen möglichen prognostischen Marker dar, um den individuellen Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen vorauszusagen. Weitere Analysen an größeren Patientenkollektiven hinsichtlich der Interleukin-und VEGF-Spiegel im Serum dieser Patienten könnten behilflich sein, Subgruppen zu identifizieren, welche trotz des Nachweises einer COX-2-Expression im Stroma kein Therapieansprechen zeigen. Auch sind weitere Untersuchungen an größeren Patientenzahlen notwendig, um die unterschiedliche Aufgabe der COX-2-Expression im Tumorgewebe und im Stroma zu analysieren.

8 Literaturverzeichnis

1. **Abele U, Brugger W, Käfer G, Berndt S, Kröber S, Bethge W, Bitzer M, Dittmann H, Eckert R, Einsele H, Gäckle R, Metzler G, Ohmenhäuser A, Schraishuhn S, Schreck U, Sökler M, Waidelich P:** Lymphome. Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Hrsg.: Interdisziplinäres Tumorzentrum Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1. Auflage:4-8 (2002)
2. **Abou-Issa HM, Alshafie GA, Seibert K, Koki AT, Masferrer JL, Harris RE:** Dose-response effects of the COX-2 inhibitor Celecoxib on the chemoprevention of mammary carcinogenesis. In: *Anticancer Res* 21:3425-32 (2001)
3. **Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T:** Angiogenesis in acute and chronic leucemias and myelodysplastic syndromes. In: *Blood* 96:2240-2245 (2000)
4. **Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE:** Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model. In: *Oncol Rep* 7:1377-81 (2000)
5. **Armitage JO:** Staging non-Hodgkin lymphoma. In: *CA Cancer J Clin* 55:368-76 (2005)
6. **Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heue-Vourc'h N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S, Dubinett S:** Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+T cells. In: *The Journal of Immunology* 175:1483-1490 (2005)
7. **Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Burke CA:** A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. In: *N Engl J Med* 348:891-899 (2003)
8. **Berek JS, Chung C, Kaldi K, Watson JM, Knox RM, Martinez-Maza O:** Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. In: *Am J Obstet Gynecol* 164:1038-43 (1991)
9. **Blay JY, Negrier S, Combaret V, Attali S, Goillot E, Merrouche Y:** Serum level of interleukin 6 as a prognostic factor in metastatic renal cell carcinoma. In: *Cancer Res* 52:3317-22 (1992)
10. **Cabanillas F, Velasquez WS, McLaughlin P, Jagannath S, Hagemeister F, Redman JR, Swan F, Rodriguez MA:** Results of recent salvage chemotherapy regimens for lymphoma and Hodgkin's disease. In: *Semin Hematol* 25:47-50 (1988)
11. **Cartwright RA, McKinney PA, O'Brien C:** Non-Hodgkin's lymphoma: case-control epidemiological study in Yorkshire. In: *Leuk Res* 12:81-8 (1988)

12. **Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS:** Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. In: JAMA 294:914-923 (2005)
13. **Chang ET, Smedby KE, Hjalgrim H:** Medication use and risk of non-Hodgkin's lymphoma. In: Am J Epidemiol 162:965-74 (2005)
14. **Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP:** Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI sponsored International working group. In: J Clin Oncol 17:1244 (1999)
15. **Choudhry MA, Hockeberger PE, Sayeed MM:** PGE2 suppresses mitogen-induced Ca²⁺ mobilization in T cells. In: Am J Physiol 277:1741-1748 (1999)
16. **Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A:** Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. In: Gastroenterology 121:1339-1347 (2001)
17. **Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ, Dvorak HF:** Expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis and experimental metastasis. In: Cancer Res 56:172-181 (1996)
18. **Coiffier B, Pfreundschuh M, Stahel R, Vose J, Zinzani PL:** Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with Rituximab. In: Anticancer Drugs 13:43-50 (2002)
19. **Collet JP, Sharpe C, Belzile E:** Colorectal cancer prevention by non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects of dosage and timing. In: Br J Cancer 81:62-8 (1999)
20. **Crofford LJ:** COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. In: J Rheumatol 24:15-19 (1997)
21. **Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA:** Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. In: Leukemia 15:976-980 (2001)
22. **Doussis-Anagnostopoulou IA, Talks KL, Turley H:** Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. In: J Pathol 197:677-683 (2002)
23. **DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LBA, Lipsky PE:** Cyclooxygenase in biology and disease. In: FASEB J 12:1063-1073 (1998)

24. **Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD:** Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. In: Nat Immunol 3:991-8 (2002)
25. **Dvorak HF:** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. In: J Clin Oncol 20:4368-4380 (2002)
26. **Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN:** Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. In: Gastroenterology 107:1183-8 (1994)
27. **Engert A, Dreyling M, ESMO Guidelines Working Group:** Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. In: Annals of Oncology 19:65-66 (2008)
28. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J:** The biology of VEGF and its receptors. In: Nat Med 9:669-676 (2003)
29. **Fisher SG, Fisher RI:** The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. In: Oncogene 23:6524-34 (2004)
30. **Flick ED, Chan KA, Bracci PM, Holly EA:** Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and non-Hodgkin lymphoma: a population based case-control study. In: American Journal of Epidemiology 164:497-504 (2006)
31. **Fosslien E:** Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. In: Crit Rev Clin Lab Sci 37:431-502 (2000)
32. **Fürstenberg A:** Einfluß des Cyclooxygenase-2-Inhibitors NS-398 auf Proliferation und Apoptose von Ovarialkarzinomzelllinien. Med. Diss. Berlin (2004)
<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/fuerstenberg-antje-2004-05-10/HTML>. (Tag des Zugriffs: 22.12.2010)
33. **Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddì V:** Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. In: Neoplasia 3:53-61 (2001)
34. **Garcia-Rodriguez L, Huerta-Alvarez C:** Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term-users of nonsteroidal antiinflammatory drugs:a pooled analysis of published studies and a new population-based study. In: Epidemiology 11:376-81 (2000)

35. **Hara A, Yoshimi N, Niwa M, Ino N, Mori H:** Apoptosis induced by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human colorectal cancer cell lines. In: Jpn J Cancer Res 88:600-4 (1997)
36. **Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD:** The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November, 1997. In: Hematol J 1:53-66 (2000)
37. **Hazar B, Ergin M, Seyrek E, Erdogan S, Tuncer I, Hakverdi S:** Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in Lymphomas. In: Leuk Lymphoma 45:1395-1399 (2004)
38. **Held G, Pöschel V, Pfreundschuh M:** Rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphomas. In: Expert Rev Anticancer Ther 6:1175-86 (2006)
39. **Hjalgrim H, Engels EA:** Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. In: J Intern Med 264:537-48 (2008)
40. **Ho CL, Sheu LF, Li CY:** Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and their receptors in stage IV non-Hodgkin lymphoma. In: Appl Immunohistochem Mol Morphol 10: 316-321 (2002)
41. **Holly EA, Lele C, Bracci PM:** Case-control study of non-Hodgkin's lymphoma among women and heterosexual men in the San Francisco Bay Area, California. In: Am J Epidemiol 150: 375-89 (1999)
42. **Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K:** Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. In: J Clin Invest 93:1564-70 (1994)
43. **Koki AT, Leahy KM, Masferrer JL:** Potential utility of COX-2 inhibitors in chemoprevention and chemotherapy. In: Expert Opin Investig Drugs 8:1623-1638 (1999)
44. **Koki AT, Masferrer JL:** Celecoxib: a specific COX-2 Inhibitor with anticancer properties. In: Cancer Control 9:28-35 (2002)
45. **Koomagi R, Zintl F, Sauerbrey A, Volm M:** Vascular endothelial growth factor in newly diagnosed and recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia as measured by real-time quantitative polymerase chain reaction. In: Clin Cancer Res 7:3381-3384 (2001)
46. **Küppers R, Schwering I, Bräuninger A, Rajewsky K, Hansmann ML:** Biology of Hodgkin's Lymphoma. In: Ann Oncol 13:11-8 (2002)

47. **Küppers R:** Mechanisms of b-cell lymphoma pathogenesis. In: Nat Rev Cancer 5:251-62 (2005)
48. **Kyle RA, Rajkumar SV:** Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. In: Leukemia 23:3-9 (2009)
49. **Ladetto M, Vallet S, Trojan A, Dell'Aquila M, Monitillo L, Rosato R, Santo L, Drandi D, Palumbo A, Boccadoro M:** Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. In: Blood 105:4784-91 (2005)
50. **Laubach JP, Mahindra A, Mitsiades CS, Schlossman RL, Munshi NC, Ghobrial NM, Carreau N, Hideshima T, Anderson KC, Richardson PG:** The use of novel agents in the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. In: Leukemia 23:2222-2232 (2009)
51. **Lauta VM:** A review of the cytokine network in multiple myeloma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. In: Cancer 15:2440-52 (2003)
52. **Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC:** NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. In: Cancer Res 58:4245-9 (1998)
53. **Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S:** Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. In: Circ Res 77:638-43 (1995)
54. **Martyre MC, Bousse-Kerdiles MC, Romquin N:** Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. In: Br J Haematol 97:441-448 (1997)
55. **Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM:** Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. In: Cancer Res 60:1306-1311 (2000)
56. **Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA:** Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Cancer Res 59:4356-62 (1999)
57. **Negaard HFS, Iversen N, Bowitz-Lothe IM, Sandset PM, Steinsvik B, Østenstad B, Iversen PO:** Increased bone marrow microvascular density in haematological malignancies is associated with differential regulation of angiogenic factors. In: Leukemia 23:162-169 (2009)
58. **Ohshima K, Sugihara M, Suzumiya J:** Basic fibroblast growth factor and fibrosis in Hodgkin's disease. In: Pathol Res Pract 195:149-155 (1999)
59. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P:** Estimating the World Cancer Burden: Globocan 2000. In: Int J Cancer 94:153-156 (2001)

60. **Pedersen LM, Klausen TW, Davidsen UH, Johnson HE:** Early changes in serum IL-6 and VEGF levels predict clinical outcome following first-line therapy in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. In: *Ann Hematol* 84:510-51 (2005).
61. **Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M; MabThera International Trial Group:** CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. In: *Lancet Oncol* 7:379-91 (2006)
62. **Phillips RK, Wallace MH, Lynch PM, Hawk E, Gordon GB, Saunders BP, Wakabayashi N, Shen Y, Zimmerman S, Godio L, Rodrigues-Bigas M, Su LK, Sherman J, Kelloff G, Levin B, Steinbach G; FAP Study Group:** A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. In: *Gut* 50:857-60 (2002)
63. **Potti A, Ganti AK, Kargas S, Koch M:** Immunohistochemical detection of c-kit (CD117) and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in mantle cell lymphoma. In: *Anticancer Res* 22:2899-290 (2002)
64. **Ribatti D, Vacca A, Bertossi M, De Benedictis G, Roncali L, Dammacco F:** Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. In: *Eur J Haematol* 56:45-53 (1996)
65. **Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. :** Krebs in Deutschland 2003–2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage:90-94, Berlin (2008)
66. **Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H:** A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. In: *Blood* 90:3167-3172 (1997)
67. **Schneider BJ, Kalemkerian GP, Kraut MJ, Wozniak AJ, Worden FP, Smith DW, Chen W, Gadgeel SM:** Phase II study of celecoxib and docetaxel in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with progression after platinum-based therapy. In: *J Thorac Oncol* 3:1454-9 (2008)
68. **Schreinemachers DM, Everson RB:** Aspirin use and lung, colon and breast cancer incidence in a prospective study. In: *Epidemiology* 5:138-46 (1994)

69. **Seymour JF, Talpaz M, Cabanillas F, Wetzler M, Kurzock R:** Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. In: *J Clin Oncol* 13:373-382 (1995)
70. **Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN:** Modulation of apoptosis and bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. In: *Cancer Res* 58:362-63 (1998)
71. **Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E:** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. In: *Nature* 359:843-5 (1992)
72. **Simmons DL, Botting RM, HLA T:** Cyclooxygenase Isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. In: *Pharmacol Rev* 56:387-437 (2004)
73. **Smalley W, Ray WA, Daugherty J, Griffin MR:** Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study. In: *Arch Intern Med* 159:161-6 (1999)
74. **Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT:** COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. In: *Cancer* 89:2637-45 (2000)
75. **Swerdlow, SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW:** WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. Auflage, IARC Press, Lyon (2008)
76. **The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project:** A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. In: *N Engl J Med* 329:987-994 (1993)
77. **Thun MJ, Henley SJ, Patrono C:** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. In: *J Natl Cancer Inst* 94:252-66 (2002)
78. **Tsuji M, DuBois RN:** Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. In: *Cell* 83:493-501 (1995)
79. **Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN:** Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. In: *Cell* 93:705-716 (1998)
80. **Verstovsek S, Lunin S, Kantarjian H:** Clinical relevance of VEGF receptors 1 and 2 in patients with chronic myelogenous leukemia. In: *Leuk Res* 27:661-669 (2003)
81. **Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkmann J:** Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. In: *N Engl J Med* 324:1-8 (1991)
82. **Williams CS, Tsuji M, Reese J, Dey SK, DuBois RN:** Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. In: *J Clin Invest* 105:1589-1594 (2000)

83. **Wun T, McKnight H, Tuscano J:** Increased cyclooxygenases-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. In: Leuk Res 28:179-90 (2004)
84. **Yan SF, Tritto I, Pinsky D, Liao H, Huang J, Fuller G, Brett J, May L, Stern D:** Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. In: J Biol Chem 270:11463-71 (1995)
85. **Yang S, Yu Y, Jun-Min L, Jian-Qing M, Qiu-Sheng C, Yu C, Wei-Li Z, Jian-Hua Y, Hui-Jin Z, Yan W, Li W, Shu C, Zhi-Xiang S:** Reassessment of the prognostic factors of international prognostic index (IPI) in the patients with diffuse large B-cell lymphoma in an era of R-CHOP in Chinese population. In: Ann Hematol 88:863-9 (2009)
86. **Zhang Y, Holford TR, Leaderer B:** Prior medical conditions and medication use and risk of non-Hodgkin`s lymphoma in Connecticut U.S. women. In: Cancer Causes Control 15:419-28 (2004)

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
bFGF	Basic fibroblast growth factor
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
COX-Gesamt	Cyclooxygenase-2-Gesamtexpression
CR	Komplette Remission
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EGF	Endothelial growth factor
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IPI	International Prognostic Index
LDH	Lactatdehydrogenase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika
PD	Progress der Erkrankung
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGH-Synthase	Prostaglandin H-Synthase

PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PR	Partielle Remission
TXA ₂	Thromboxan A ₂
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

9.2 ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status)

ECOG = 0 Asymptomatisch, keinerlei Einschränkung der normalen Aktivität

ECOG = 1 Symptomatisch, mäßig eingeschränkte körperliche Aktivität und Arbeitsfähigkeit

ECOG = 2 Arbeitsunfähig, selbständige Lebensführung möglich, Bettlägerigkeit <50% des Tages

ECOG = 3 Selbständige Versorgung nicht möglich, Bettlägerigkeit >50% des Tages

ECOG = 4 Rasche Progredienz der Erkrankung, Bettlägerigkeit 100%

ECOG = 5 Tod

9.3 Stadieneinteilung Multiples Myelom nach Durie und Salmon

Stadium I	Hämoglobin > 10 g/dl Serum Calcium < 12 mg/dl Keine oder nur eine Osteolyse Geringes Paraprotein (IgG < 5 g/dl bzw. IgA < 3 g/dl oder Leichtketten-Ausscheidung im Harn < 4g/24h)
Stadium II	Weder Stadium I noch III
Stadium III	Hämoglobin < 8,5 g/dl Serum Calcium > 12 mg/dl Hohes Paraprotein (IgG > 7 g/dl bzw. IgA > 5 g/dl oder Leichtketten-Ausscheidung im Harn > 12g/24h) Mindestens 2 Osteolyse

9.4 Ethikvotum



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Marxsen
Medizinische Klinik I

im Hause

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Fehm
Direktor der Medizinischen Klinik I

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

Datum: 27.01.2006

Aktenzeichen:
(immer angeben !) 05-211

Sitzung der Ethik-Kommission am 18. Januar 2006

Antragsteller: Herr Dr. Marxsen / Herr Prof. Fehm

Titel: Medizinische Relevanz von Angiogenese und COX-2-Expression bei malignen Lymphomen

Sehr geehrter Herr Dr. Marxsen,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender Hinweise keine Bedenken: Die Dauer der Aufbewahrung des Biomaterials ist in der Patienteninformation auf 5 Jahre begrenzt. Die Kommission empfiehlt, die Frist auf 10 Jahre zu verlängern. Die Aufbewahrungszeit ist auch in der Einwilligungsklärung zu nennen. Im 2. Punkt der Einwilligungserklärung ist das Wort „widersprechen“ durch „widerrufen“ zu ersetzen.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den
weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

☒ Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
Prof. Dr. F. Hohagen
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Dominiak
(Pharmakologie)

☒ Frau H. Müller
(Pflege)
Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
☒ Herr Dr. Fieber
(Richter am Landgericht Lübeck)
☒ Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. H. L. Fehm
(Medizinische Klinik I)
☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
☒ Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
☒ Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. Wagner für die Überlassung des Forschungsthemas, die großzügige und geduldige Unterstützung und die kontinuierliche positive Motivation.

Für die Planung der Studie, die geduldige Hilfe bei der Durchführung der Studie und die engagierte Anteilnahme bei der Auswertung der Daten danke ich Herrn Dr. med. J.H. Marxsen.

Herrn Prof. Dr. med. H. Merz und den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Studie und der Analyse der COX-2-Expression.

Für die Durchsicht des Manuskriptes und die konstruktive Kritik danke ich Frau Dr. rer. nat. S. Stölting.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des hämatologischen Labors des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft bei der Lösung methodischer und technischer Probleme.

Meinem Mann Nico Matthäus danke ich für die rege Anteilnahme an dem Thema und die unendliche Geduld in der Zeit der Fertigstellung der Dissertation. Mein besonderer Dank geht an meine Mutter, Frau Gisela Zuske, ohne deren Unterstützung und Zutrauen die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



11 Lebenslauf

<u>Name:</u>	Alexandra Zuske-Matthäus, geb. Zuske	
<u>Adresse:</u>	Lessingstrasse 10, 23564 Lübeck	
<u>Geburtsdatum/ -ort:</u>	09.09.1974, Berlin	
<u>Familienstand:</u>	verheiratet	
<u>Schulbildung</u>	1981-1987	Besuch der Birken-Grundschule in Berlin
	1987-1994	Besuch des Hans-Carossa-Gymnasiums in Berlin, Abschluss Abitur
<u>Studium</u>	1994-1995	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
	1996-2003	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
	08/1998	Ärztliche Vorprüfung
	03/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	03/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	06/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<u>Derzeitige Tätigkeit</u>	Seit 08/2003	Ass.-Ärztin Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Med. Klinik I
<u>Veröffentlichungen</u>	Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (Mannheim), Februar 2005: Platelet dysfunctions assessed by the platelet function analyzer (PFA®-100) are more frequent than disorders of plasmatic coagulation in emergency ward patients	
	Marxsen JH, ForchheimS, Zuske A, Wagner T: Prevalence of Platelet Dysfunction and Abnormal Coagulation: Results of a Population-Based Study. In: Clin Appl Thromb Hemost 15:421-427(2009)	