Material und Methoden

Studiendesign

Diskussion des Studiendesigns

Für die Erfolgreiche Durchführung von Biomarker-Studien werden ausreichend große Patientenkohorten benötigt, die mit aktuellen Therapiestrategien beahndelt werden. Durch eine multizentrische nationale oder internationale Ausrichtung von Studien können eine höhere Rekrutierungszahl erreicht und die Zeiträume vo Studien verkürzt werden, sodass im Falle der retrospektiv durchgeführten Studien die Therapie der aktuellen Standardtherapie entspricht. Die multizentrisch generierten Studienergebnisse sind dabei besonders robust, weil Einzelzentrumseffekte und anderer Sektionsbias damit reduziert werden.

Das Deutsche Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK) ist ein nationales Forschungsnetzwerk, das im Oktober 2012 gegründet wurde(). In der Radioonkologie-Gruppe des DKTK (DKTK-ROG) sind alle 8 Partnerstandorte des DKTK organisiert. Im Rahmen der ersten gemeinsamen Studie der DKTK-ROG, sollen prognostische und prädiktive Biomarker für die lokoregionäre Kontrolle nach primärer bzw. nach postoperativer Radiochemotherapie in Patienten mit lokoregionären fortgeschrittenen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom zunächst im retrospektiven Teil der Studie identifiziert, in dem prospektiven Studienteil validiert und in einer Interventionsstudie angewendet werden. Mittelfristiges Ziel des Gesamtprojektes ist die Etablierung von Markern, die nach prospektiver Validierung geeignet sind, als Grundlage individualisierter Therapieentscheidungen zu dienen. Ein aus den Studienleitern der jeweiligen Standorte gebildeter Lenkungsausschuss und die gemeinsame Co-Ownerschaft stellen den hohen Standard der Studie sicher. Die Studie wird durch die DKTK-ROG-Studienzentrale in Dresden betreut.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind Teil der retrospektiven Untersuchung der multizentrischen Studie, in der immunhistochemisch messbare Biomarker für den Stammzellgehalt von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen angefärbt und evaluiert wurden. Anschließend erfolgte die Korrelation mit den klinischen Ergebnissen der postoperativen Radiochemotherapie.

Patientenkollektiv und Tumormaterial

Das Patientenkollektiv bestand aus 221 Patienten mit lokal fortgeschritten Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs, die im Zeitraum zwischen 2004 und 2012 in den 8 Partnerzentren des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) behandelt wurden. Die Ethikkommissionen aller DKTK-Partnerstandorte haben die ethische Genehmigung für multizentrische retrospektive Analysen klinischer und biologischer Daten eingeholt (AZ EK299092012).

Einschlusskriterien waren ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, des Oro- oder Hypopharynx. Alle Patienten hatten nach der primären onkologischen Tumorresektion aufgrund des hohen Rezidivrisikos (Tumorstadium pT4 und/oder mikroskopischer Tumorrest nach Operation und/oder kapselüberschreitendes Wachstum der Lymphknotenmetastasen oder >3 Lymphknotenmetastasen) an einem der 8 Partnerstandorte des DKTK eine postoperative Cisplatin-basierte Radiochemotherapie (PORT-C) gemäß Standardprotokolle in kurativer Intension erhalten. Darüber hinaus war für den Studieneinschluss, neben klinischen Parametern unter anderem auch das Vorhandensein von FFPE-Tumormaterial (vor jeder tumorspezifischen Behandlung), Bestrahlungspläne sowie die Daten des klinischem follow-up mit Bildgebung / bildgebender Diagnostik (CT-, MRT- oder PET-CT) zur späteren Lage-Beurteilung eines möglichen Tumorrezidivs verpflichtend und wurden zentral am DKTK-Standort Dresden gesammelt(). Die analysierten Gewebeproben entstammten überwiegend aus Primärresektaten, wobei im Falle von fehlendem Primärtumorresektaten in wenigen Fällen auf Tumorbiopsien, die im Rahmen einer diagnostischen Planendoskopie entnommen wurden, oder Lymphknotenmetastasen zurückgegriffen wurde. Die Mindestnachbeobachtungszeit musste 24 Monate betragen (Letzte Rekrutierung 2010). Der Raucherstatus und Alkoholkonsum wurden nicht für alle Patienten konsistent aufgezeichnet und konnten daher nicht analysiert werden. Alle Einschlusskriterien sind in Tabelle 31 nochmals übersichtlich dargestellt. Die Patientenmerkmale sind in der Tabelle 41 dargestellt.

Tabelle 31: Einschlusskriterien für Patienten

Nachträglich wurden 26 Patienten aufgrund von unzureichendem Biomaterial oder Nichterfüllen der Einschlusskriterien ausgeschlossen. Folglich waren für das vorliegender Projekt 195 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE) Operationspräparate verfügbar die nach standardisierten Verfahren am DKTK-Partnerstandort Dresden verarbeitet wurden und für die Biomarkeranalyse zur Verfügung standen.

Immunhistologische Analysen

Tissue-Microarray

Die Tissue-Microarray Technik wurde erstmals 1998 beschrieben () und ermöglicht eine effiziente und auf den Tumor fokussierte simultane Auswertung der einzelnen Gewebeproben. Die Methode hat seither die Art und Weise wie gewebebasierte Forschung, insbesondere im onkologischen Bereich stattfindet maßgeblich geprägt. Die TMA-Technik ermöglicht es, Gewebsproben verschiedener Patienten bzw. verschiedene Gewebeproben eines Patienten hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Proteinexpression simultan und unter gleichen methodischen Bedingungen standardisiert zu untersuchen. Ein TMA-Block kann bis zu 150 - 200 zylindrisches Probematerial von verschiedenen Patienten mit einem Durchmesser von jeweils 0,6 – 1,0 mm enthalten. Die Gewebezylinder werden mit einer Hohlnadel aus einem vorher ausgewählten repräsentativen Bereich eines Spender-Paraffinblocks entnommen und danach in vorgefertigte Löcher in einem ursprünglich leeren Empfänger-Paraffinblock eingebracht.

Herstellung der Referenzschnitte (HE-Färbung)

Um das Vorhandensein eines Plattenepithelkarzinoms histologisch zu bestätigen und um repräsentative Tumorregionen im FFPE-Material für die zu untersuchenden Stanzungen zu definieren, wurden für alle FFPE-Tumorproben des Kollektivs zunächst Objektträger mit Gewebeschnitten in Hämatoxylin- und Eosinfärbung (HE-Färbung) angefertigt. Dabei wurden je 3 μm Schnitte der 195 zu untersuchenden FFPE-Blöcke mit einem Mikrotom angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert (Xylol, Propanol, Ethanol 96%, Ethanol 70%, Aqua dest.) und in TRIS-Puffer gewaschen. Nach der Inkubation mit Hämatoxylin und anschließendem Waschen mit Leitungswasser wurden die Schnitte mit Eosin inkubiert. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe erfolgte die Entwässerung. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Deckgläsern versehen. Diese Referenzschnitte wurden histologisch beurteilt und die repräsentativen Tumorregionen markiert (HNSCC, Lymphknoten Gewebe und normales Plattenepithel der Kopf-Hals Bereiches). Anschließend erfolgte die Übertragung der Markierung auf die (Spender-) Paraffinblöcke.

Herstellung der TissueMicroarray Blöcke für die Biomarkeranalyse

Nachdem die mikroskopisch repräsentativen Bereiche der in Paraffin eingebetteten Operationsresektate entsprechend der HE-Referenzpräparate auf dem Spenderlock übertragen wurden, erfolgte die Anfertigung von Gewebe-Mikroarrays (tissue micro arrays, TMA). Dazu wurden mit einem semiautomatischen Gewebe-Mikro-Arrayer (MiniCore®, Alphelys) 1 mm dicke Gewebezylinder über eine Hohlnadel aus vorher ausgewählten repräsentativen Tumorarealen im Spenderblock ausgestanzt. Diese Gewebezylinder wurden in leere Stanzlöcher eines Empfängerblocks überführt. Idealerweise wurden je Fall drei Stanzzylinder entnommen, um die Heterogenität innerhalb des Tumors zu berücksichtigen. Somit war es möglich pro Trägerblock bis zu 112 Stanzen einzubringen. Durch Erhitzung auf 60°C über 5 Minuten konnte ein Verbund des Träger- und Gewebeparaffins erreicht werden. Die Anordnung der Stanzzylinder im Empfängerblock erfolgte über einen zuvor definierten Lageplan, der für die spätere Auswertung eine eindeutige Zuordnung zum pseudonymisierten Patienten gewährleistet. In Abbildung sind der Aufbau und das Prinzip der TMA-Technik sowie der Dokumentation beispielhaft dargestellt.

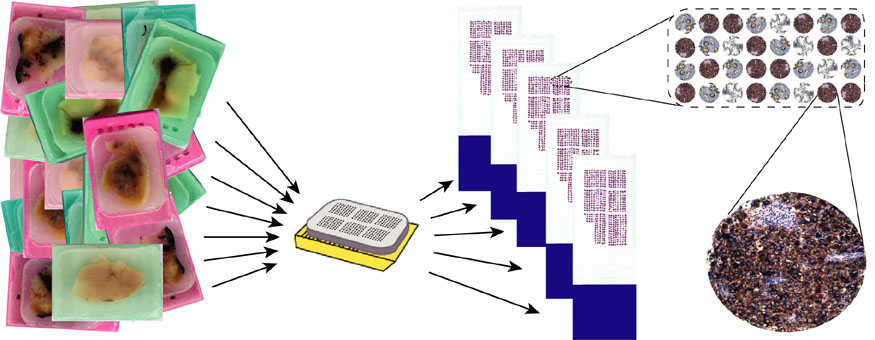
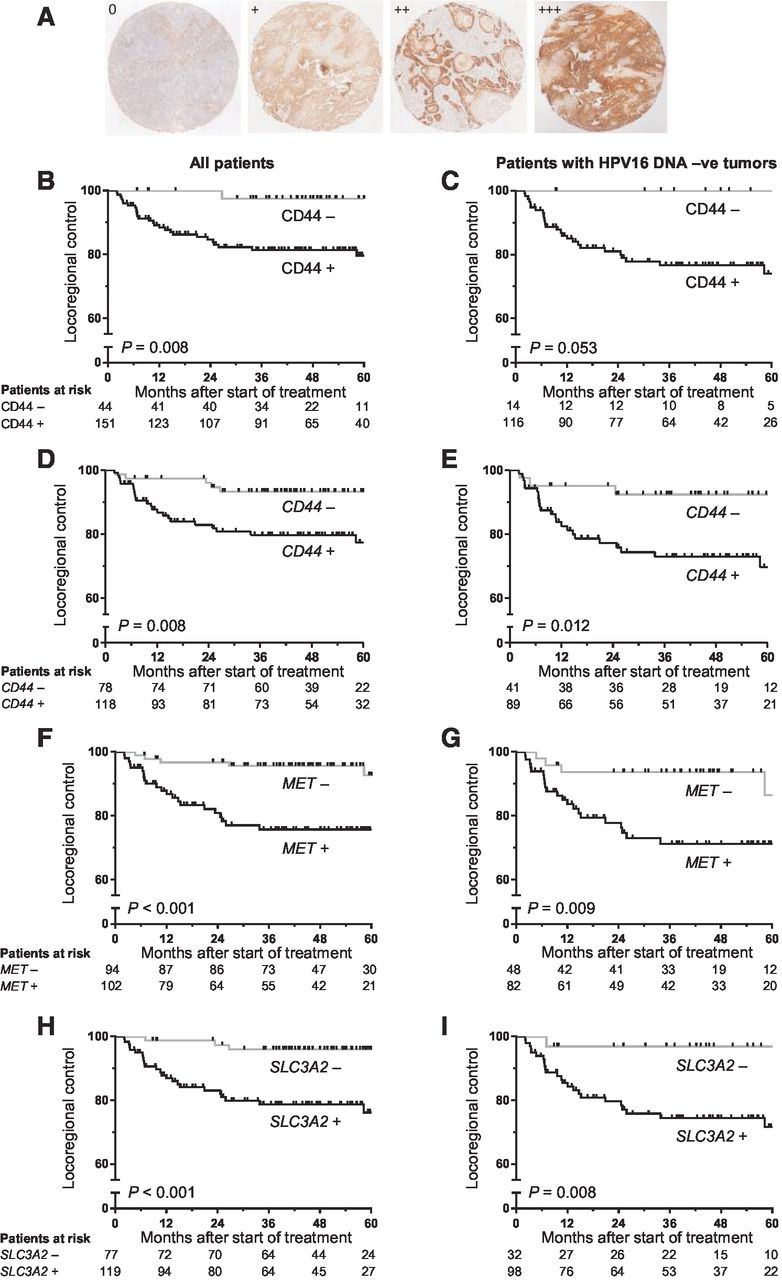


Abbildung 31: Aufbau der TissueMicroarray-Technik sowie Prinzip der Ortsdokumentation der einzelnen Tumor-Spots



Immunhistologische Reaktionen

Die immunhistologische Färbereaktion wurde nach der indirekten Avidin-Biotin-Komplex- (ABC)-Methode durchgeführt.

Für die immunhistochemische Färbung wurden von jedem TMA-Block jeweils 3 μm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Für die anschließende Demaskierung der Primärantikörper-Bindungsstellen wurden die Objektträger in Zitratpuffer (pH 6; Dako) für 35 min bei 650W in einer Mikrowelle erhitzt und nach dem Abkühlen mit Waschpuffer gespült. Anschließend erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität (DAKO RealTM Peroxidase Blocking Solution; 10 min). Die TMA-Schnitte wurden mit dem monoklonalen Primärantikörper Maus anti-human CD44-Antikörper (Clone DF 1485; Verdünnung 1:100; Dako) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Negativkontrolle wurde entsprechend mit IgG1-Kontrollreagenz (Mouse IgG1; Dako) inkubiert. Nach Zugabe des Visualisierungs-reagenz (Dako REAL EnVision) und anschließender Spülung der Objektträger mit Waschpuffer ergab sich die Farbreaktion durch Zugabe von DAB-Chromogenlösung entsprechend der Antigenverteilung im Gewebe. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämalaun (nach Mayer). Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in aufsteigenden Alkohollösungen und Xylol dehydriert und mit Eukitt eingedeckelt.

Immunhistologische Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten TMA-Schnitte erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher (A.L. und C.v.N.; <5% Abweichung zwischen den Ergebnissen beider Untersucher). Die Auswertung erfolgte semiquantitativ bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung am Axioskop 50 (Zeiss, Germany) unter Berücksichtigung der Färbeintensität (negativ, +, ++). Jede Gewebestanze wurde zunächst separat bewertet. Als nicht auswertbar galten neben nicht vorhandenen Stanzen solche, die nicht oder nur zu einem kleinen Teil (<10%) aus Tumorgewebe bestanden, außerdem jene, welche sich inhomogen anfärbten. Bei mehreren auswertbaren Stanzen pro Patientenprobe wurde nur die stärkste Färbeintensität berücksichtigt. Karzinome mit mäßiger oder starker CD44-Expression (+, ++) wurden als CD44-positiv angesehen und Karzinome mit nicht nachweisbarer CD44-Expression (0) wurden als CD44-negativ für die weitere statistische Auswertung berücksichtigt. Ein Tumor galt insgesamt als nicht bewertbar, wenn weniger als zwei auswertbare Stanzen vorhanden waren. Nicht bewertbare Tumoren gingen nicht in die Statistik mit ein. Insgesamt waren jedoch TMA-Kerne von 195 Patienten hinsichtlich der CD44-Proteinexpression auswertbar.

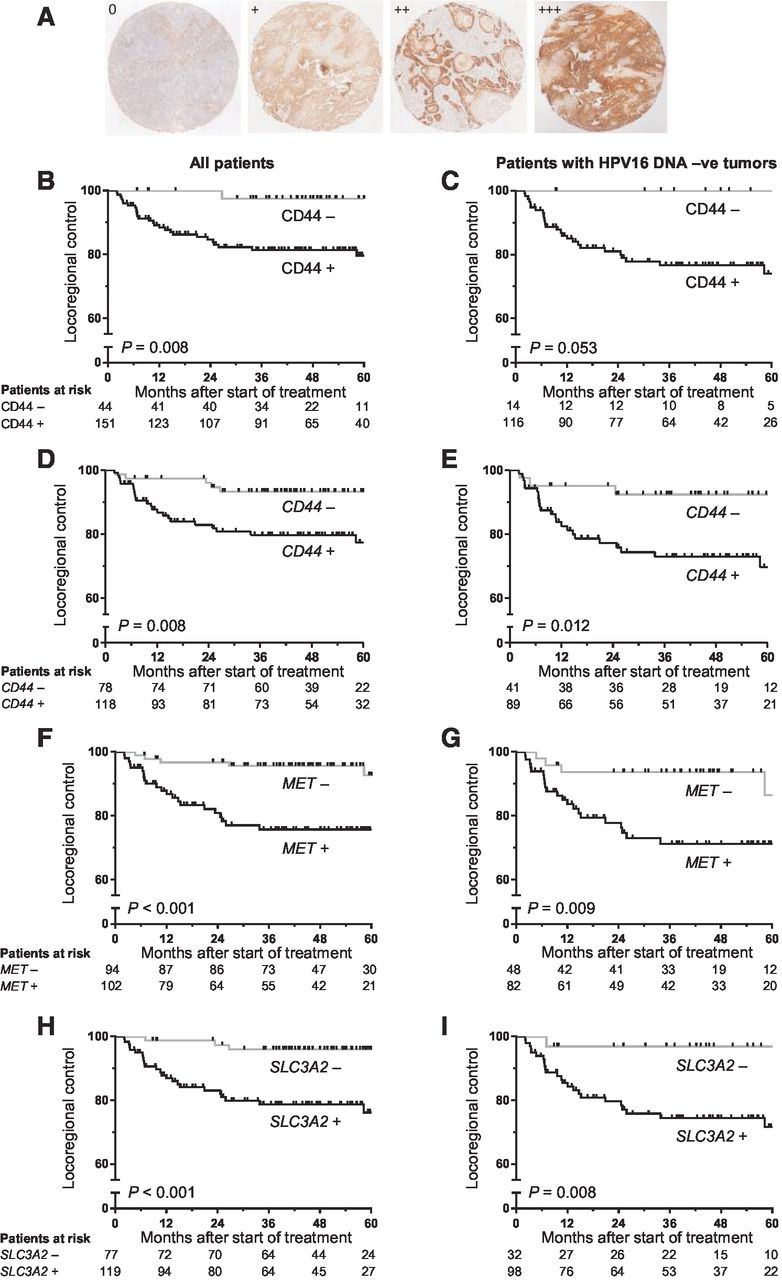


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung von CD44 mit unterschiedlichen Färbeintensitäten. Alle Färbeintensitäten (+, ++, +++) wurden als positive Färbung angesehen

Mit Hilfe des Tissue-Microarray(TMA)-Verfahrens konnte das Karzinomgewebe (n = 169) auf 11 TMA- Blöcke überführt werden. Davon wurden 10 für das Tonsillen-Karzinomgewebe verbraucht. Das Gewebe der Lymphknotenmetastasen wurde auf einen separaten TMA-Block überführt. Insgesamt lagen 1.401 Gewebestanzen vor. Von insgesamt 169 Fällen waren 166 (98,2%) auswertbar. Bei den verbliebenen 3 Fällen (0,8%) ließ sich kein Tumorgewebe im Schnittpräparat diagnostizieren. Das Gewebe der Lymphknotenmetastasen war in 96% (n = 26) der Fälle auswertbar. Die geringe Anzahl der Ausfälle kam dadurch zustande, dass jedes Karzinomgewebe pro Fall dreimal gestanzt wurde.

Statistische Methoden und klinische Endpunkte

Zunächst wurden alle Daten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel erfasst. Nach Verschlüsselung der Patientenidentitäten wurden diese anonymisiert in das SPSSS-Software-Programm (Statistical Package for the Social Science Version 28.0 für Mac OS) übernommen, mit dem die statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte.

Der Beobachtungszeitraum wurde für alle Ereigniszeitanalysen wurde vom ersten Tag der Strahlentherapie bis zum Datum des Ereignisses oder der Zensur berechnet. Die Mindestnachbeobachtungszeit der einzelnen Patienten musste (gemäß der Einschlusskriterien) 24 Monate betragen, um in der statistischen Datenauswertung berücksichtigt zu werden. Der primäre Endpunkt war die lokoregionäre Kontrolle (LRC) und sekundäre Endpunkte waren das metastasenfrei Überleben (MFS) und das Gesamtüberleben (GS). Die verscheidenn klinischen Endpunkte wurden wie folgt definiert:

Der Endpunkt für das Gesamtüberleben (OS) war entweder das tumorbedingte Sterbedatum oder der zuletzt erfasste Zeitpunkt, an dem die Patienten am Leben waren. Die Endpunkte für das metastasenfreie Überleben (MFS) und die lokoregionäre Kontrolle (LRC) waren entweder das Diagnosedatum der Metastase bzw. des Rezidivs oder das zuletzt erfasste Datum der Nachbeobachtung, zu dem keines der beiden Ereignisse eingetreten war. Die Diagnosesicherung des Rezidivs erfolgte hierbei pathologisch nach bioptischer Probenentnahme.

Die Dauer der Ereignisfreien Zeit / Überelebnseiz (Follow-Up) wurde für alle o.g. Endpunkte mithilfe der Kaplan-Meier-Methode geschätzt und in entsprechende Überlebenskurven grafisch dargestellt. Für alle Endpunkte wurden die entsprechenden Überlebsraten und (wenn möglich) mediane Überlebszeit angegeben. Die berechneten Zeitwerte der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden, wenn möglich jeweils als Median gemessen.

Bei der Analyse von Überlebenszeitdaten wird das Kaplan-Meier-Verfahren benutzt. Es können Überlebensraten und die mediane Überlebenszeit angegeben werden. Mit Hilfe des Log-rank-Tests kann man die Überlebenszeiten von zwei Gruppen miteinander vergleichen. Für multivariable Modelle verwendet man die Cox-Regression. Das Hazard Ratio als deskriptives Maß für den Unterschied von Überlebenszeiten wird erläutert.

Nachbeobachtungszeit wurde vom Zeitpunkt der primären Tumorresektion berechnet und die Überlebsnwahrscheinlichkeit für alle Endpunkte mit hilfe der Kaplan-maier-methode geschätzt.

Die Überlebenszeitanalysen wurden mit dem univariaten Verfahren nach Kaplan- Meier durchgeführt und die geschätzten Überlebenszeiten in Kaplan-Meier Ereigniskurven dargestellt

Kaplan meier kurven daruas überlebsraten und mediane überlebesnzeit wenn weniger alks bei der hälfte ein ereignis eigetreten wa

Falls der Kaplan-Meier-Schätzer in der gesamten Beobachtungszeit über 50 % liegt, ist die mediane Überlebenszeit nicht zu bestimmen. In diesem Fall ist bis zur maximalen Beobachtungszeit für weniger als die Hälfte der Patienten ein Ereignis eingetreten.

Die mediane Überlebenszeit bzw. mediane ereignisfreie Zeit kann man nur bestimmen, falls der Kaplan-Meier Schätzer unter 0,5 fällt. Falls im Beobachtungszeitraum bei weniger als 50% der Klienten ein Ereignis eingetreten ist, kann die mediane Überlebenszeit nicht angegeben werden.

Als Alternative zur medianen Überlebenszeit wird irrtümlich manchmal statt der medianen Überlebenszeit die mittlere oder durchschnittliche Überlebenszeit angegeben. Diese Maßzahl ist aber bei Vorliegen von Zensierungen unbrauchbar und nicht mehr zu interpretieren. Vorsicht ist vor allem deshalb geboten, da diese Maßzahl standardmäßig von vielen Programmen berechnet wird.

Die Berechnung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Überlebenskurven zweier Subgruppen erfolgte mit dem LogRank Test, bei dem das Signifikanzniveau auf 5% (p<0,05) gesetzt wurde. Ein signifikanter Unterschied wurde somit bei einem p-Wert von <0,05 (Kaplan-Meier-Methode) und <0,1 (Cox-Regression) angenommen. Bei einem p<0,05 (LogRank) in der Kaplan-Meier-Analyse wurde ggf. eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression durchgeführt, um die Signifikanz zu validieren.

Der Einfluss potenzieller prognostischer Variablen auf die Endpunkte wurde mit dem univunivariaten Cox-Regressionsmodell bewertet. Parameter, die in der univariaten Analyse als signifikant befunden wurden, wurden in ein multivariates Cox-Modell aufgenommen. Bei dieser Methode wurde ein signifikanter Unterschied bei einem p-Wert von <0,1 angenommen.

Das Risiko am Tumor zu versterben wurde schließlich in der so genannten Hazard Ratio (HR) ausgedrückt. Bei einer HR=1,0 für eine Patientengruppe gab es keinen Unterschied zur Referenzgruppe; bei einer HR<1,0 hatte die Patientengruppe im Vergleich zur Referenzgruppe ein besseres Überleben und bei einer HR>1,0 hatte die Patientengruppe im Vergleich zur Referenzgruppe ein schlechteres Überleben.

Ein Signifikanter P- Wert bedeutet das die Kovariate einfluss auf das Überleben, die Ereigniszeit hat.

Außerdem gingen folgende Parameter in die univariate Analyse ein:

Klinische Prognosefaktoren

T-Stadium des Tumors

Differenzierungsgrad des Tumors

Status des Resektionsrandes:

Zeitraum zwischen OP und adjuvanter Strahlentherapie (Mittelwert = 63 Tage)

Tumorlokalisation: Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx

UICC – Stadium des Tumors

Pathologische/biologische Prognosefaktoren

HPV16-DNA-Status

CD44-Expressions-Status

den immunhistochemischen Färbeergebnissen der CD44-Proteinexpression, dem HPV16-DNA-Status, der histopathologischen Differenzierungsgraden, der Tumorlokalisation, der Tumorausdehnung (pT-Kategorie), der Stadiengruppierung der Karzinome bezüglich der TNM-Kategorien (UICC-Stadien), des Alters (50-54, 55-59, 60-64,…), der Nikotin- und Alkoholanamnese

Statistische Analysen wurden für alle Patienten und für die Untergruppe der Patienten mit Mundhöhlenkrebs sowie Oropharyngealkarzinomen durchgeführt. Patienten, bei denen ein hypopharyngeales Karzinom diagnostiziert wurde, wurden aufgrund der geringen Anzahl von Fällen von dieser Untergruppenanalyse ausgeschlossen. Für eine weitere Stratifizierung wurden statistische Analysen für die Subgruppen der Patienten mit HPV16 DNA-negativen Tumoren durchgeführt. In der Untergruppe der Patienten mit HPV16 DNA-positiven Tumoren traten nur zwei Rezidiven auf. Daher war es nicht möglich, signifikante Unterschiede in der LRC für diese Teilgruppe zu erkennen.

Patienten mit HPV-assoziierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome besitzen ein insgesamt besserer klinisches Outcome als Patienten mit HPV-negativen Tumoren (; ; ; ; ; ; ). Deshalb wurden univariate Ereignisdatenanalysen hinsichtlich des Einflusses der CD44-Proteinexpression, sowohl für die lokoregionäre Tumorkontrolle als auch für das Fernmetastasen-freie Überleben und Gesamtüberleben stratifiziert nach den viralen Marker HPV16 DNA analysiert, um das diagnostische und prognostische Potential dieser Marker zu prüfen.

Die Sensitivität und Spezifität der CD44-Expression zur Vorhersage eines lokoregionären Rezidivs wurden durch Kreuztabellen bestimmt.

die für die Tumorlokalisierung geschichtet wurden

Zur Vorhersage des 2-Jahres-LRC wurde eine multivariate logistische Regression durchgeführt

Um die Überlebenskurven von Patienten zu vergleichen, die nach HPV16-DNA-Status, CSC-Markerexpression und Hypoxiestatus geschichtet waren, wurden Log-Rank-Tests durchgeführt

Konfindnenzintervall = Vertrauenswahrscheinlichkeit

Statistische Analysen wurden für alle Patienten und für die Untergruppen von Patienten mit Mundhöhlenkrebs sowie Oropharyngealkarzinomen durchgeführt. Patienten, bei denen diagnostiziert wurde, wurden aufgrund der geringen Anzahl von Fällen von dieser Untergruppenanalyse ausgeschlossen.

Die Einteilung der Ordinaten der Kaplan-Meier-Plots erfolgte von 0,00 in Zweierschritten bis 1,00, zur besseren Übersicht in einigen Abbildungen von 0,5 in Einerschritten bis 1,00. Berechnungsziele waren die allgemeine Überlebensrate, die krankheitsfreie Überlebensrate (Patientinnen ohne Metastasen oder lokoregionäres Rezidiv) und die lokale Kontrolle. Die Kaplan-Meier-Kurven wurden mit Hilfe des Log-Rank-Tests auf Signifikanz geprüft.

Weitere Analysen erfolgten nach dem univariaten Cox-Regression-Modell. Positive Regressionskoeffizienten verringern die Ereigniswahrscheinlichkeit, negative vergrößern diese. Der Exp(B) ist der Wert, um den sich das Risiko für ein Ereignis verändert, wenn die untersuchte Variable um eine Einheit steigt. Ein Wert von eins lässt das Risiko unverändert. Ist der Wert >1 steigt das Risiko für ein Ereignis, ist der Wert <1 sinkt das Risiko.

16

Multivariate Analysen wurden mit dem Cox-Regressions-Modell berechnet. Dabei wurden die signifikanten Variablen der univariaten Analyse in das Modell eingeschlossen. Die Reduktion der Variablen erfolgte über eine schrittweise Rückwärts-Prozedur nach der Wald-Methode.

Häufigkeiten wurden mit Kreuztabellen und dem Chi-Quadrat-Test bewertet. Waren die Voraussetzungen für den Chi-Quadrat-Test nicht gegeben, wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Der Vergleich von Mittelwerten kontinuierlicher Größen erfolgte mit dem zweiseitigen t-Test.

Die deskriptiven Daten wurden mittels absoluter und relativer Häufigkeit sowie Mittelwert, Median und Standardabweichung dargestellt. Mit Hilfe von Kreuztabellen wurde die relative Häufigkeit der möglichen Einflussfaktoren auf die Entstehung des atopischen Ekzems (Alter, Geschlecht, Bildungsstand der Eltern, Wohnort) bivariat ermittelt und mittels Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit überprüft.

Mit der multiplen logistischen Regressionsanalyse wurde anschließend der Zusammenhang zwischen allen potenziellen Einflussfaktoren und den untersuchten Symptomen ermittelt.

Zeitdauer zwischen Therapiebeginn und Rezidiv eines Tumors

Haben Tumorstammzellen ein Einfluss auf das tumorfreie Überleben

Für die deskriptive Statistik wurden Häufigkeiten berechnet und Kreuztabellen erstellt. Mithilfe der Kaplan-Meier-Methode wurden die Überlebens- kurven für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben ermittelt. Das Gesamt- überleben betrachtet die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Tod. Patienten, die am Ende der Beobachtungszeit noch am Leben waren, wurden zensiert. Das rezidiv- freie Überleben betrachtet die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Datum des Rezidivs, das bedeutet Lokalrezidiv oder Fernmetastasen. Patienten, die kein Rezidiv erlitten oder verstarben, wurden zensiert.

Es wurden verschiedene klinische und biologische Faktoren bezüglich ihrer Auswirkung auf die jeweiligen Endpunkte überprüft und die jeweiligen Ereigniszietzen mit der Kaplan-Maier-Methode geschätzt.

Überlebensraten (Überlebenswahrscheinlichkeiten) wurden für folgende 17 Faktoren vergleichend berechnet: gesamt, Alter, Geschlecht, Lokalisationen, Stadium, Therapiekategorien, T-Stadium, N-Stadium, M-Stadium, Operation, Bestrahlung, Chemotherapie und Rezidiv. Prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben wurden in univariaten Analysen mithilfe des Log-Rank-Tests ermittelt. Als statistisch signifikant galt ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,05. Hier wurden Alter, Geschlecht, Lokalisationen, Stadium, T-Stadium, N-Stadium, M-Stadium, Therapiekategorien, Operation, Bestrahlung, Chemotherapie untersucht. Für das Gesamtüberleben wurde außerdem der Parameter Rezidiv betrachtet. Statistisch signi- fikante prognostische Faktoren wurden einer Regressionsanalyse nach Cox zugeführt. In dieser multivariaten Analyse wurde ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 als statistisch signifikant gewertet. Hierbei wurden folgende Parameter in die Analyse ein- geschlossen: Alter, Geschlecht, Lokalisationen, Stadium, T-Stadium, N-Stadium,

M-Stadium, Therapiekategorien, Operation, Bestrahlung, Chemotherapie.