

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Verlauf immunologischer Parameter bei Mammakarzinom unter
Therapie mit Mistel-Extrakten: eine Anwendungsbeobachtung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Peer Walter Schleyerbach

aus

Bremen

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1.Berichterstatter: Frau Professor Dr. R. Klein

2.Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	7
1.1	Grundlagen der immunologischen Tumorabwehr	7
1.2	TH-1 /TH-2 – Paradigma	7
1.3	Aspekte der Anwendung von Mistelextrakten	8
1.3.1	Geschichtlicher Überblick	8
1.3.2	Inhaltsstoffe der Mistel.....	8
1.3.3	Eigenschaften.....	9
1.3.4	Zytotoxische Wirkung	10
1.3.5	Klinische Anwendung	10
1.3.6	Antikörperbildung gegen Mistelinhaltsstoffe	12
1.4	Immunglobuline G	12
1.5	Mammakarzinom	16
1.5.1	TNM-System.....	17
1.5.2	Stadieneinteilung.....	18
1.5.3	Grundlagen der Primärtherapie	18
1.5.4	Prognosefaktoren und Adjuvante Therapie	19
1.6	Zielsetzung der Untersuchung	21
2	<i>Patienten und Methoden</i>	22
2.1	Studiendesign /Datenerhebung	22
2.1.1	Einschlusskriterien.....	22
2.1.2	Zeitlicher Verlauf.....	24
2.1.3	Mistelpräparat und Dosierung	24
2.2	Labor	25
2.3	Statistik	27
3	<i>Ergebnisse</i>	32
3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs	32
3.1.1	Alter	32
3.1.2	Tumorausgangsstadium	32

3.1.3 Allergieanamnese.....	32
3.1.4 Chemotherapie.....	33
3.1.5 Radiotherapie.....	34
3.1.6 Hormontherapie.....	35
3.1.7 Risikostratifizierung.....	35
3.1.8 Verlaufsschlüssel.....	36
3.1.9 Nebenwirkungen.....	37
3.2 Serokonversion für Anti-ML-1-Antigen.....	38
3.2.1 Prävalenzen für Anti-ML1-IgG-Antikörper.....	38
3.2.2 Prävalenzen für einzelne Anti-ML-1-IgG-Subklassen.....	39
3.2.3 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe mit auffälligem Verlauf.....	40
3.2.4 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe mit unauffälligem Verlauf.....	41
3.2.5 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe mit ausgeprägter Eosinophilie.....	42
3.2.6 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe ohne ausgeprägte Eosinophilie.....	43
3.3 Deskriptive Statistik der Messwerte für ML1-IgG-Subklassen und Eosinophile.....	44
3.3.1 Anti-ML-1-IgG1.....	44
3.3.2 Anti-ML-1-IgG2.....	46
3.3.3 Anti-ML-1-IgG3.....	47
3.3.4 Anti-ML-1-IgG4.....	48
3.3.5 Eosinophile.....	50
3.4 Analytische Statistik.....	52
3.4.1 Eosinophile.....	52
3.4.2 Beschreibung der individuellen Anti-ML1-IgG-Verläufe durch Geradensteigungen.....	54
3.4.3 Bivariate Korrelationen der Mittelwerte (Monate 3 bis 24).....	59
3.4.4 Beziehung der Eosinophilen zum Verlauf.....	59
3.5 Weitere, nicht signifikante Ergebnisse.....	62

3.6 Stammdatentabelle	63
4 Diskussion	66
4.1 Diskussion der Methoden	66
4.1.1 Patientengruppe	66
4.1.2 Studienpräparat	67
4.1.3 Laboruntersuchungen.....	68
4.1.4 Statistische Auswertung	69
4.2 Diskussion der Ergebnisse	69
4.2.1 Charakterisierung der Patientengruppe.....	69
4.2.2 Prävalenzen für Anti-ML-1-IgG	74
4.2.3 Deskriptive Statistik der IgG-Subklassen und der Eosinophilen	76
4.2.4 Wilcoxon-Test für eosinophile Leukozyten	77
4.2.5 Modell der Anti-ML-1-IgG-Geradensteigungen.....	78
4.2.6 Bivariate Korrelationen	80
4.2.7 Logistische Regression und Kontingenzanalyse	81
4.2.8 Vergleich mit Probandenstudie.....	82
4.2.9 Vergleich mit Mammakarzinom - Studie	84
4.3 Allgemeine Diskussion	85
4.3.1 Das TH-1/TH-2 Paradigma.....	85
4.3.2 Tumoren im immunologischen Kontext	87
4.3.3 Diskussion der Mistel im Verhältnis zur immunologischen Hypothesenbildung	88
4.3.4 Eosinophile und Tumorgeschehen	90
4.4 Schlußfolgerungen	92
5 Zusammenfassung	94
6 Verzeichnisse	96
6.1 Abkürzungsverzeichnis	96
7 Literaturverzeichnis	97
8 Danksagung	109

9 *Lebenslauf*..... 110

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der immunologischen Tumorabwehr

Die Tumorerkrankung wird initial als Versagen der Homöostase zwischen proliferativen und antiproliferativen bzw. apoptoseinduzierenden physiologischen Faktoren auf zellulärer Ebene insbesondere hervorgerufen durch Mutationen verstanden [13]. Aufgrund verschiedener Phänomene können maligne Tumorzellen der Immunüberwachung entgehen. Neben geringer Antigenität, Antigenmaskierung oder Antigenverlust kann eine tumorbedingte sekundäre Immunsuppression durch Zytokine (TGF- β , IL-10 u.a.), lösliche Immunkomplexe oder Rezeptoren (IL-2R u.a.), lösliche Adhäsionsmoleküle, Prostaglandine oder saure Proteine auftreten. Diese Seite der *immunological escape*-Phänomene muss im Zusammenhang gesehen werden mit einerseits einer gestörten genetischen Wachstumskontrolle (Onkogene, Tumorsuppressorgene und Apoptosegene), andererseits einer unzulänglichen immunologischen Wachstumskontrolle auf humoraler, zellulärer oder auf Zytokin-Ebene [58].

In einem komplexen Zusammenspiel von spezifischem und unspezifischem Immunsystem werden als zur Tumorabwehr geeignete Zelltypen einerseits zytotoxische T-Zellen, andererseits NK-Zellen, Makrophagen und eosinophile Granulozyten bereitgestellt. Die jeweilige Ausprägung der Immunreaktion hängt dabei von der Dichte und Art des präsentierten Antigens, der wechselseitigen Beeinflussung von Zytokinmilieu und T-Helfer-Zell-Populationen, sowie von co-stimulatorischen Signalen ab [13].

1.2 TH-1 /TH-2 – Paradigma

Für die jeweilige Ausprägung einer Immunreaktion spielt die Steuerung des Immunsystems durch T-Helfer-Zellen eine Schlüsselrolle. Nach einer heute weithin akzeptierten Vorstellung können sich TH-Vorläufer-Zellen (TH-P) in zwei polare Untergruppen differenzieren, TH-1 und TH-2, welche jeweils unterschiedliche Funktionen und Zytokinprofile besitzen [111]. Die Lenkung der Differenzierung erfolgt über das Zytokinmuster der Mikroumgebung für TH-1 primär über IL-12 und für TH-2 primär über IL-4. Unter neutralen Bedingungen ist auch eine Differenzierung in TH-0-

Zellen möglich [37]. TH-1 Zellen produzieren als „Leitsubstanz“ Interferon- γ (IFN- γ), ferner auch IL-2 und TNF- β und sind vornehmlich für die Abwehr intrazellulärer Pathogene zuständig. TH-2-Zellen produzieren als Leitsubstanz Interleukin 4 (IL-4), sowie IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13, die bei der Abwehr von Parasiten (extrazellulär) aber auch bei allergischen Reaktionen eine Schlüsselrolle spielen. Die Produktion diverser Zytokine (z.B. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ) ist jedoch nicht exklusiv auf TH-Zellen beschränkt, sondern durch diverse PBMC (peripheral blood mononuclear cells) möglich. Eosinophile Leukozyten können beispielsweise selber IL-4, IL-5 und IL-6 produzieren. Es wurde daher vorgeschlagen, statt TH-1-Reaktion besser von einer Typ 1 Reaktion und statt TH-2-Reaktion von Typ 2 Reaktion zu sprechen. [101].

1.3 Aspekte der Anwendung von Mistelextrakten

1.3.1 Geschichtlicher Überblick

Die Verwendung der Mistel (*Viscum album* L.) als Heilmittel läßt sich bis in das Corpus hippocraticum verfolgen [29]. In der Volksmedizin wird sie über die Jahrhunderte für die unterschiedlichsten Indikationen genannt [57]. Die erstmalige Einführung der Mistel als Heilmittel bei Krebs geht auf *Steiner* zurück, der durch goetheanistische Menschen- und Naturbetrachtung zu seiner Empfehlung kam [142]. In der Therapie maligner Tumoren werden seit über 80 Jahren injizierbare Mistelextrakte (abgekürzt VAE für *Viscum album* extracts) angewendet [27, 149]. Das aktuelle wissenschaftliche Interesse an der Mistel richtet sich stark auf die mittlerweile belegte Zytotoxizität und ihre immunmodulatorische Potenz als *biologic response modifier* (BRM) [9, 61, 62, 128]. Die antitumoröse Wirksamkeit einer Therapie mit VAE ist noch umstritten, wenngleich bisher eine Mehrzahl der aussagekräftigen Anwendungsstudien und eine Fülle von Einzelfalldarstellungen für eine Wirksamkeit sprechen [85, 88, 106].

1.3.2 Inhaltsstoffe der Mistel

Die Inhaltsstoffe der Mistel sind außergewöhnlich gut untersucht. Zu den hochmolekularen Verbindungen gehören die Lektine ML-1, ML-2 und ML-3 (Glykoproteine), die Viscotoxine (Polypeptide) und Pektine (Polysaccharide).

Niedermolekulare Inhaltsstoffe sind u.a. Flavonoide, Aminosäuren, Lipide und Amine [64].

Unter Lektinen fasst man eine im Pflanzenreich weit verbreitete heterogene Gruppe von Glykoproteinen zusammen, die die Möglichkeit besitzen, Zucker zu binden. Boyd bezeichnete sie 1957 zum ersten Mal mit dem Begriff Lektin, abgeleitet von lat. *legere* für auswählen. Sie besitzen gemeinsam mit Enzymen und Antikörpern die Eigenschaft der spezifischen Erkennung und reversiblen Bindung von zuckerartigen Stoffen und erfüllen vielfältige Aufgaben in biologischen Informationsprozessen [122]. Unter ihnen befinden sich sowohl solche mit mitogenen oder Lymphozyten stimulierenden Eigenschaften, als auch solche, die zytotoxisch wirken oder aber keinen Effekt ausüben [54].

Die drei Mistellektine ML-1, ML-2 und ML-3 sind glykosylierte, toxische Proteine, die zur Gruppe der Ribosomen inaktivierenden Lektine gehören und aus zwei Polypeptidketten, einer toxophoren A und einer zuckerbindenden B-Kette zusammengesetzt sind. Die Verbindung besteht aus einer Disulfidbrücke. Sie erkennen Kohlenhydrate und Glykokonjugate, die D-Galaktose (ML-1) oder N-Acetylgalaktosamin (ML-2 und ML-3) enthalten [126]. Ein neu gefundenes viertes Mistellektin Visalb-CBL besteht aus einer P-Kette und bindet Chitin [114]. Die B-Kette des ML-1 ist für die endozytische Aufnahme der A-Kette in die Zelle verantwortlich und besitzt mehrere Zuckerbindungsstellen, an die bevorzugt Galactose-Reste gebunden werden [147]. Die Bedeutung von ML-1 für die Immunmodulation von VAE wird aufgrund tierexperimenteller Befunde besonders hoch eingeschätzt [16].

1.3.3 Eigenschaften

VAE führen neben direkten zytotoxischen Wirkungen sowohl zu einer Aktivierung des unspezifischen Immunsystems wie auch zur Stimulation des afferenten und des efferenten Schenkels des spezifischen Immunsystems [13]. Im Verlauf einer Behandlung mit VAE erfolgt häufig eine spezifische Antikörperbildung auf Antigene der Inhaltsstoffe, u.a. gegen Mistellektine oder Viscotoxine. Eine unspezifische Aktivierung trifft die auch an der Tumorkontrolle beteiligten NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen oder Neutrophile Granulozyten [63, 67, 90, 140]. Welchen Anteil die eine

oder die andere Schiene an den beobachteten klinischen Effekten hat, ist noch nicht sicher zu sagen [23].

1.3.4 Zytotoxische Wirkung

Die zytotoxischen Wirkungen der Mistelextrakte beruhen wesentlich auf der apoptoseinduzierenden Potenz, die in vitro durch die Mistellektine vermittelt wird und die der Viscotoxine weit übertrifft. Mehrfach konnte in vitro eine Inhibition des Zellwachstums und Apoptose-Induktion bei zahlreichen Tumorzelllinien für ML-1 nachgewiesen werden [77, 109]. In einer neueren Untersuchung zeigte sich an 25 Zelllinien eine mit Doxorubicin vergleichbare, dosisabhängige Wirkung bei wesentlich geringerer Konzentration (0,17 –1 ng ML /ml) [19].

Die Mechanismen, die dabei zur Auslösung der Kaskade des programmierten Zelltodes führen, sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung, wobei eine Schlüsselfunktion der Aktivierung von Transmembranrezeptoren zugesprochen wird [22]. Es konnte gezeigt werden, dass die B-Kette von ML-1 an Zellrezeptoren (CD95) bindet, worauf ein Eindringen der A-Kette in die Zelle ermöglicht wird. Es kommt zu einem Ca^{2+} -Anstieg und zur Interaktion der A-Kette mit den Ribosomen. Diese wird analog der Interaktion der A-Kette von Ricin, einem verwandten Lektin, vorgestellt [109, 156].

Neuere Studien belegen, dass die zytotoxische Wirkung von ML-1 von Proteasen (Kaspasen) abhängt und auch unabhängig von der Expression von CD95 Rezeptoren über die Freisetzung von Cytochrom C verläuft. Zusätzlich wurde eine Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von Chemotherapeutika, die über das Cytochrom C wirken, gezeigt [9]. Es konnten auch synergistische Wirkungen verschiedener Mistelkomponenten, z.B. der ML und der Vesikel dargestellt werden [131]. Neben der direkten Stimulierung intrazellulär wirkt ML-1 auch über Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α und IFN- γ indirekt zytotoxisch [60, 62].

1.3.5 Klinische Anwendung

In der Monographie der Kommission C über *Viscum album L.* werden als Anwendungsgebiete unter anderem die Behandlung von bösartigen und gutartigen Geschwulsterkrankungen, von bösartigen Erkrankungen und begleitenden Störungen

der blutbildenden Organe sowie von definierten Präkanzerosen und die Vorbeugung gegen Geschwulstrezidive angegeben. In sehr seltenen Fällen treten unter Behandlung mit subkutanen Dosen von Mistelextrakten Nebenwirkungen in Form von stärkeren örtlichen oder allgemeinen allergischen Reaktionen wie Urtikaria, Schüttelfrost, Atemnot oder Schock auf, die ein Absetzen des Präparates und eine notfallmäßige Behandlung nötig machen [91].

Regelmäßig kommt es zu dosisabhängigen, individuell unterschiedlich ausgeprägten Begleitreaktionen, die nicht mit unerwünschten Nebenwirkungen verwechselt werden dürfen. Dazu gehören häufig Rötung und Schwellung am Applikationsort von < 5 cm Durchmesser sowie Temperaturreaktionen, sowohl im Sinne einer pyrogenen Wirkung als auch einer Betonung der zirkadianen Rhythmik [67, 143].

VAE zählen zu den am häufigsten additiv angewandten „biological response modifier“ bei Tumorerkrankungen und werden unter unterschiedlichen Gesichtspunkten therapeutisch eingesetzt. Eine Übersicht findet sich bei Schäffler [128]. Insbesondere zu unterscheiden ist die lokale Infiltration in den Tumor, bei der mit dem Erreichen direkt zytotoxischer Schwellendosen gerechnet werden kann, von der üblicheren subkutanen Applikation. Bei letzterer ist eine Stimulation des unspezifischen Immunsystems in vivo nachgewiesen, jedoch ist noch nicht belegt, wie diese mit einer Beeinflussung des Tumorstwachstums korreliert [138, 85]. Eine solche Stimulation scheint aber therapeutisch sinnvoll, denn PBMC von Tumorpacienten zeigen auf Mitogenexposition in vitro eine reduzierte Freisetzung von Zytokinen des TH-1-Pfades (IFN- γ , IL2 und IL1- α) und solchen der Monozyten/Makrophagen-Reihe (TNF- α , IL6)[36, 157]. Auch die Plasmakonzentrationen von TH-1- und TH-2-spezifischen (IL4, IL5) Zytokinen waren bei Tumorpacienten geringer [154].

Regelmäßig kommt es auch zu einer Aktivierung des spezifischen Immunsystems mit Bildung von spezifischen Antikörpern gegen Lektine oder Viscotoxine [89]. Die Frage einer spezifisch tumorhemmenden Wirkung von Mistelpräparaten ist nach wie vor umstritten, wobei insbesondere der Zusammenhang von den genannten Einflüssen auf das Immunsystem mit der In-vivo-Tumorentwicklung schwierig zu belegen ist [13].

Eine ganze Reihe von Immunparametern und funktionellen immunologischen Testsystemen wurde zur Charakterisierung des Immunstatus entwickelt, für die sich eine Übersicht bei *Hager* findet [59].

1.3.6 Antikörperbildung gegen Mistelinhaltsstoffe

Die toxische Wirkung der Mistellektine wird durch Antikörperbildung beeinflusst. Diese Mistellektin-1-spezifischen Antikörper wurden erstmals 1990 beschrieben [143] und können zu einer Neutralisation der ML1-vermittelten Zytotoxizität führen. Es ist offen, ob bei systemischer Anwendung in vivo die Mistellektine langfristig einen Einfluss auf das Immunsystem ausüben können oder dieser durch Antikörper vollständig neutralisiert wird. Denkbar ist aber, dass trotz Antikörperbildung ein anderes Epitop des Lektins immunologisch interagiert oder dass weitere Inhaltsstoffe von VAE für eine Wirksamkeit verantwortlich sind. Inzwischen ist die Bildung von Antikörpern auch gegen Viscotoxine beschrieben [89]. Neben Anti-ML1-IgG wurden auch IgE-Antikörper und vereinzelt solche vom IgA und IgM-Typ beobachtet [40]. Für die Anti-ML1-IgG lässt sich sagen, dass in jüngeren Untersuchungen, die über 3 bis 6 Monate durchgeführt wurden, bevorzugt Antikörper der Subklassen 1 und 3 gebildet wurden [89, 40], während in der Untersuchung von Stettin 1990 nach 2 Jahren einer Behandlung mit Helixor® daneben auch die Subklassen 2 und 4 häufig auftraten [143].

1.4 Immunglobuline G

Nach einem Antigenkontakt können die B-Lymphozyten unter Vermittlung von T-Helfer-Zellen sich in Plasmazellen differenzieren und als solche spezifische Antikörper synthetisieren. Diese Immunglobuline sind eine Gruppe von Glykoproteinen, die als Grundeinheit jeweils aus 4 Proteinketten, zwei schweren und zwei leichten, aufgebaut sind. Es gibt fünf Arten von schweren Ketten, nach denen sich die Immunglobulinklassen A, G, M, D und E unterscheiden.

Die Klassen unterscheiden sich in der Zahl und dem Ort von Disulfidbrücken und Kohlenhydratketten, sowie in der Anzahl ihrer Domänen und z.T. ihrer Aminosäuresequenz. Antikörper der Klassen IgA und IgM treten als Polymere auf. Disulfidbrücken verbinden die leichte mit der schweren Kette und tragen zur Faltung

der Domänen innerhalb der Ketten bei. Als Domänen unterscheidet man zwei variable Domänen am aminoterminalen Endstück der schweren und der leichten Kette (VH und VL) sowie vier konstante Domänen, die sich auf die leichte Kette (CL) und auf die schwere Kette (CH1, CH2, CH3) verteilen.

Das Immunglobulin kann durch Papain in 3 Stücke aufgespalten werden: zwei Fab-Fragmente bestehen jeweils aus den Domänen VH, VL, CL, und CH1 und ein Fc-Fragment, bestehend aus 2 CH2 und 2 CH3 Domänen. Für die Bindung von Antigenen sind die variablen Regionen am Fab zuständig. Die Domänen des Fc bestimmen den Weg der Prozessierung und Eliminierung des gebundenen Antigens. Indem die Anzahl und Distribution der Disulfidbrücken einer Immunglobulinklasse variieren, lassen sich Subklassen unterscheiden. Die Halbwertszeit der Immunglobuline im Plasma ist für IgG mit 23 Tagen am größten [146].

75 % der Immunglobuline des Plasmas entfallen bei Gesunden auf IgG. Das Auftreten von IgG entspricht einer gereiften Immunantwort nach vorangegangenem Antigenkontakt, die die langdauernde Bereitschaft mit sich bringt, bei erneuter Exposition das Antigen mit hoher Affinität zu binden und nachfolgende Reaktionen auszulösen. Diese können je nach Art des Fc-Segmentes und der lokalen Interaktionen in einer Komplementaktivierung, und/oder Phagozytosestimulierung durch Opsonisierung bestehen. Während die Komplementaktivierung durch Bindung des C1q an die CH2-Domäne erfolgt, obliegt die Phagozytoseinduktion einer Brückenbildung durch das IgG, welches mit seiner variablen Region das Antigen, mit dem Fc-Fragment aber an den Fc-Rezeptor der Effektorzelle (z.B. Makrophage) bindet. Erst daraufhin können jeweils Phagozytose, Endozytose, zelluläre Zytotoxizität, Zytokinfreisetzung, Antigenpräsentation oder Abbau von Immunkomplexen erfolgen [102].

1.4.1.1 Immunglobulin G-Subklassen

Es konnten 4 Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) definiert werden, die sich am stärksten in der sog. *hinge*-region am Scharnier zwischen Fab und Fc unterscheiden, wo durch eine unterschiedliche Anzahl und Verteilung von Disulfidbrücken die Flexibilität zwischen Fab und Fc sowie zwischen den beiden Fc-Abschnitten variiert [20, 49]. Diese Beweglichkeit der Abschnitte zueinander kann die Effektor- und Bindungsfunktion

beeinflussen. Sie ist bei IgG2 am geringsten, gefolgt von IgG4 und IgG1. Einen Sonderfall stellt IgG3 dar, da es eine verlängerte *hinge*-Region mit zahlreichen Disulfidbrücken besitzt, die eine unflexible Doppelhelix bildet, andererseits aber den Fab-Abschnitten die größte Flexibilität bietet [123]. Je nach Subklasse besteht eine unterschiedliche Affinität zu den jeweils exprimierten Fcg-Rezeptoren der Effektorzellen: Der Fcg-Rezeptor-1(CD64) auf Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und dendritischen Zellen bindet kaum IgG2 und IgG4 zehn mal schwächer als IgG1 und IgG3. FcgR-2 (CD32) zeigt Isoformen für die IgG2-Bindung und bindet kaum IgG4. FcgR-3 (CD16) auf NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und einigen T-Zellen bindet fast ausschließlich IgG1 und IgG3. Die Eigenschaften der IgG-Subklassen sind in Tabelle 1-3 zusammengefasst [102, 105]:

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Serumkonzentration bei Erwachsenen in g/dl	7,1 +/- 1,7	3,0 +/- 0,54	0,65 +/- 0,31	0,6 +/- 0,39
Prozentualer Anteil am Gesamt IgG	58,4-71,5	19,4-31,0	4,2-8,4	0,7-6,5
Halbwertszeit in Tagen	12-21	12-21	7-8	11-21
Komplementaktivierung	++	+	+++	-
Bindung an Fcg-Rezeptoren				
CD64	+++	+	+++	+
CD32	++	+	++	+
CD16	++	+	++	+

Tabelle 1: Biologische Eigenschaften der menschlichen IgG-Subklassen

Effektorzellen	CD64	CD32	CD16
----------------	------	------	------

Monozyten	+	+	–
Makrophagen	+	+	+
Neutrophile	–	+	+
Eosinophile	–	+	–
B-Zellen	–	+	–
Thrombozyten	–	+	–
NK-Zellen	–	–	+
T-Zellen	–	–	+

Tabelle 2: Expression der Fcγ-Rezeptoren durch verschiedene Effektorzellen

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Molekülgewicht	146 kd	146 kd	170 kd	146 kd
Aminosäuren in hinge-Region	15	12	62	12
Disulfidbrücken in hinge-Region	2	4	11	2

Tabelle 3 : Chemische Eigenschaften der menschlichen IgG-Subklassen

Die Distribution der IgG-Subklassen einer spezifischen Immunantwort variiert mit der Struktur des Antigens (Art des Antigenträgers, Anzahl und Eigenschaft der Epitope, physiko-chemische Eigenschaften), seiner Dosis, Expositionsfrequenz und der Eintrittspforte. Einen weiteren Einfluß haben genetische Faktoren. Bei Proteinen bakterieller oder viraler Herkunft dominiert die Bildung von IgG1, manchmal in Kombination mit IgG3, während IgG2 nur eine marginale Rolle spielt [39]. Polysaccharid-Antigene hingegen, die im allgemeinen T-Zell unabhängig IgG induzieren, führen oft zu einer fast ausschließlichen IgG2-Antwort [133]. Komplettes Fehlen einzelner oder mehrerer IgG-Subklassen bei einem Individuum ist sehr selten und wird durch Gendefekte auf Chromosom 14 bedingt [113].

1.4.1.2 Immunreaktionslage und IgG-Subklassen

Die Autoregulation des Verteilungsmusters der IgG-Subklassen ist nur anfänglich aufgeklärt und unterliegt der Beeinflussung durch verschiedene Zytokine, so etwa IL-2, IL-4, IL-6 und IFN- γ [82, 87]. Die Anordnung der Gene für die die

Subklasseneigenschaft determinierenden konstanten Regionen der schweren Kette auf Chromosom 14 zeigt eine Nachbarschaft für Subklasse 3 und 1 sowie für Subklasse 2 und 4. Die Synthese der einzelnen Subklassen ist unabhängig reguliert. Die Gene für den variablen Abschnitt eines Immunglobulins werden zuerst transkribiert. IgM, das als erster Isotyp hergestellt wird, liegt diesen variablen Abschnitten am nächsten. Dieser Zusammenhang von örtlicher Nähe und zeitlicher Abfolge wird kausal aufgefasst in dem Sinne, dass eine *downstream*-Aktivierung der Genorte vorgestellt wird. Denn gewöhnlich wird ein Anstieg der Subklassen 1 und 3 zuerst beobachtet. In die „Standardvorgabe“ der Subklassenabfolge 3-1-2-4 können jedoch T-Zellen mit Zytokinen des Typ 1 oder Typ 2 modulierend eingreifen [110].

Die Induktion von IgG1- und IgG3 durch menschliche Plasmazellen wird mit einer Aktivierung von TH-1-Zellen in Verbindung gebracht, während IgG4 Synthese und die Produktion von IgE durch B-Zellen von einer TH-2- Stimulierung mit IL-4 Sekretion abhängig sind [111]. Autoimmunkrankheiten bieten häufig typische IgG-Subklassen-Muster, die in Zusammenhang mit einer Typ 1 oder Typ 2-Reaktionslage gesehen werden können [102]. Die Induktion einer TH-1-polarisierten Immunantwort wird für viele Tumorarten als vorteilhaft bewertet, da sie nicht nur die CTL des spezifischen Immunsystems, sondern auch NK-Zellen und Makrophagen des unspezifischen Immunsystems stimuliert [13]. Es wurde spekuliert, ob aus der Polarität der Antikörpersubklassenbildung gegen ML-1 auf die gleichzeitige Polarität der Tumorabwehr geschlossen werden kann [94].

1.5 Mammakarzinom

Mammakarzinome werden auf Vorschlag der WHO in 2 histologische Gruppen unterteilt: das nicht-invasive Karzinom (Carcinoma in Situ) und das invasive Karzinom. Die häufigsten histologischen Tumorformen umfassen das:

- duktal invasive Karzinom (75%)
- lobulär invasive Karzinom (10%)
- medulläre Karzinome und das Kolloidkarzinom (3-5%) [51]

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach dem TNM-System. Auf dieser Grundlage folgt dann eine Gruppierung in einzelne Stadien [4].

1.5.1 TNM-System

Der Primärtumor (T) wird nach seiner Grösse eingestuft in:

- T1: Tumor <2.0 cm
- T1a: Tumor > 0.1 aber nicht > 0.5 cm
- T1b: Tumor > 0.5 cm aber nicht > 1.0 cm
- T1c: Tumor > 1.0 cm aber nicht > 2.0 cm
- T2: Tumor > 2.0 cm aber nicht > 5.0 cm
- T3: Tumor > 5.0
- T4: Tumor jeder Größe mit Beteiligung von Thoraxwand (a) oder Haut (b) ,
Haut und Thoraxwand (c) oder inflammatorisch (d)

Die regionäre Lymphknotenbeteiligung (N) wird nach Grösse und Lokalisation eingestuft:

- N0: Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
- N1: Metastasen in ipsilaterale axilläre Lymphknoten ohne Fixierung
- N1a: Nur Mikrometastasen (keine größer als 0,2 cm)
- N1b: Metastasen > 0,2 cm
- N2: Metastasen in ipsilaterale axilläre Lymphknoten mit Fixierung
- N3: Metastasen in ipsilaterale Lymphknoten der A. mammaria interna –
Region

Die Einteilung nach Fernmetastasen (M) ist dichotom:

- M0: Keine Fernmetastasen
- M1: Fernmetastasen (einschließlich ipsilateral supraclaviculär)

1.5.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms ist in Tabelle 4 dargestellt.

Stadieneinteilung des Mammakarzinoms			
Stadium 0	Tis	N0	
Stadium 1	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Stadium IIIB	T3	N2	M0
	T4	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 4: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms

1.5.3 Grundlagen der Primärtherapie

Die Stadien I, II und IIIa werden, unabhängig vom histologischen Typ, entweder durch ein brusterhaltendes Vorgehen (Lumpektomie, Axillarevision, Radiotherapie) oder durch eine modifizierte Mastektomie mit oder ohne plastischer Rekonstruktion und Axillarevision behandelt [41, 150]. Andere Optionen befinden sich in klinischer Erprobung, z.B. die Sentinel-Lymphknotenbiopsie [92].

Der axilläre Lymphknotenstatus gilt als ausschlaggebend für die postoperative Behandlung. Die Rolle der befallenen Lymphknoten wird passiv und nicht aktiv im Tumorgeschehen gesehen, d.h. sie sind Indikatoren, jedoch nicht Determinanten der Überlebenszeit der Erkrankung, wobei es onkologisch sinnvoll ist, eine zusätzlich

immunsuppressiv wirkende, stärkere Tumorlast der Lymphknoten zu entfernen [30]. Dabei wird neben der Anzahl befallener Lymphknoten auf das Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa, die Überschreitung der Lymphknotenkapsel, den Befall des axillären Fettgewebes und eine Fixierung an umgebende Strukturen geachtet. Bei Lymphknotenbeteiligung von mehr als 3 Lymphknoten oder Beteiligung anderer Strukturen ist die Empfehlung zur Bestrahlung unumstritten [30].

1.5.4 Prognosefaktoren und Adjuvante Therapie

Der wichtigste prognostische Parameter ist der axilläre Lymphknotenstatus [30]. Sind axilläre Lymphknoten nicht befallen, überleben nach 10 Jahren ca. 80 % der Patientinnen krankheitsfrei, bei Befall der Lymphknoten jedoch insgesamt nur ca. 25 %. Eine zunehmende Zahl der befallenen Lymphknoten verschlechtert die Prognose weiter: mit 1-3 positiven Lymphknoten liegt die 10-Jahres-Rate für krankheitsfreies Überleben bei 34-36 %, mit 4 oder mehr Lymphknoten bei 14-16 %. Mit mehr als 20 befallenen Lymphknoten sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate auf etwa 20 %. Häufig wird beim Mammakarzinom zur Erfolgsbeurteilung die 10-Jahres-Überlebensrate herangezogen, da Spätrezidive relativ häufig sind und sogar bei unbehandeltem Brustkrebs die 5-Jahres-Überlebensrate relativ hoch ist [51].

Eine Internationale Konsensus-Gruppe (St. Gallen 1998) hat für Lymphknoten-negative Patientinnen Risikokategorien aufgestellt und Leitlinien für die daraus folgende adjuvante systemische Therapieauswahl, auch für Lymphknoten-positive Patientinnen, formuliert [51]. In Tabelle 5-7 werden die Empfehlungen von 1998 zusammengefasst, die am ehesten im Beobachtungszeitraum zur Geltung kamen, obwohl die Empfehlungen mittlerweile eine gewisse Modifikation erfahren haben [50].

	Low-risk	Intermediate-risk	High-risk
Tumorgröße	≤ 1 cm	1-2 cm	> 2 cm
ER oder PR Status	positiv	positiv	negativ
Histol. Grading	1	1-2	2-3
Alter			< 35 Jahre

Tabelle 5: Risikoeinteilung des nodal negativen Mammakarzinoms

Lymphknoten-negative Patientinnen			
Risikogruppe	Low-risk	Intermediate-risk	High-risk
prämenopausal, HR+	Nil oder TAM	TAM alleine oder TAM + Chemo	Chemo + TAM oder Chemo + Ovar-Ablation
prämenopausal, HR-			Chemo
postmenopausal, HR+	Nil oder TAM	TAM alleine oder TAM + Chemo	TAM alleine oder TAM + Chemo
postmenopausal, HR-			Chemo
> 70 Jahre Alter	Nil oder TAM	TAM alleine oder TAM + Chemo	TAM, wenn HR- Chemo

Tabelle 6: Adjuvante Therapie des nodal negativen Mammakarzinoms (TAM = Tamoxifen, Chemo = Chemotherapie)

Lymphknoten-positive Patientinnen	
Patientencharakteristik	Therapie
prämenopausal, HR+	Chemo + TAM oder Chemo + Ovar-Ablation oder Chemo + TAM + Ovar-Ablation
prämenopausal, HR-	Chemo
postmenopausal, HR+	TAM + Chemo
postmenopausal, HR-	Chemo
> 70 Jahre Alter	TAM, wenn HR- Chemo

Tabelle 7: Adjuvante Therapie des nodal positiven Mammakarzinoms

Der Vorteil einer Hormontherapie mit Tamoxifen hinsichtlich Rezidiv und Mortalität ist für Patientinnen mit unbekanntem oder ER-positivem Rezeptorstatus in großen Studien belegt [32]. Für Rezeptor-negative Frauen ist sie umstritten [74]. Das Risiko, ein Endometriumkarzinom zu entwickeln, ist jedoch unter Behandlung mit Tamoxifen 2- bis 7-fach erhöht [45]. Außerdem erhöht sich das Risiko für Thrombosen [42]. Neben dem am besten untersuchten Tamoxifen stehen weitere Anti-Östrogene, Progesterone (z.B. Medroxyprogesteronazetat) und Aromatasehemmer zur Verfügung, die

insbesondere bei Therapieversagen oder Unverträglichkeit von Tamoxifen zum Einsatz kommen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Ovarablation dar, die auf Organebene oder medikamentös-funktionell (GnRH-Analoga) erfolgen kann und bei prämenopausalen Frauen signifikant die Überlebenszeit beeinflusst [33].

Die Verbesserung der 10-Jahres-Überlebenszeit durch eine Chemotherapie ist für Frauen unter 50 Jahren am deutlichsten [34]. Die Studienergebnisse für den Wert einer Kombination der Hormontherapie mit einer Chemotherapie bei postmenopausalen Frauen sind nicht einheitlich, deuten jedoch ebenfalls auf einen signifikanten, jedoch kleinen Überlebenszeit-Vorteil [75]. Für Patientinnen, die sich sowohl einer Chemotherapie wie einer Bestrahlung unterziehen sollen, ist es vertretbar, die Bestrahlung bis zur Beendigung der Chemotherapie um einige Monate hinauszuschieben, wenngleich oft auch die Bestrahlung zwischen verschiedene Zyklen der Chemotherapie eingeschoben wird [117]. Das Risiko für Sekundärtumoren nach adjuvanter Radiotherapie ist sehr gering [144].

Bestimmte ungewöhnliche histologische Typen (tubulär, medullär, muzinös) gelten als prognostisch günstig [150]. Patientinnen mit einer Primärtumorgröße < 1 cm und N0-Status haben eine sehr gute Prognose. Bis zu 90 % sind nach 20 Jahren rezidivfrei [120]. Das Risiko, einen kontralateralen Brustkrebs innerhalb von 5 Jahren zu entwickeln, ist für Patientinnen mit positiver Familienanamnese höher, dies gilt insbesondere für Frauen mit nachgewiesener genetischer Disposition (BRCA-1/-2). Ein höheres lokales Rezidivrisiko scheint jedoch nicht zu bestehen [24].

1.6 Zielsetzung der Untersuchung

Die vielfältigen Ebenen, auf denen VAE mit dem Immunsystem interagieren und die ausgeprägt individuellen Reaktionsmuster der Patienten auf eine Behandlung mit VAE haben eine Zuordnung einer vorherrschenden Richtung der Immunmodulation oder die Definition einer Zielrichtung mehr im Sinne einer TH 1-artigen oder einer TH 2-artigen Reaktionslage bisher verhindert. Obwohl die Bildung von spezifischen Antikörpern gegen Inhaltsstoffe von VAL seit längerem bekannt ist, fehlt bisher eine umfangreichere Darstellung, wie diese unter praktischen Anwendungsbedingungen in der adjuvanten

Tumorthherapie verläuft. Allgemein akzeptierte objektive Verlaufsparemeter für eine Behandlung mit VAE als *Biologic Response Modifier*, die helfen könnten, die Therapie zu lenken und die Erfolgsquote zu erhöhen, fehlen bisher. Vor diesem Hintergrund entstand die Absicht anhand einer breiteren Datengrundlage die Hypothesenbildung darüber voranzubringen, wie das differenzierte Auftreten der verschiedenen IgG-Subklassen im Hinblick auf eine Modulation des Immunsystems durch VAE zu verstehen sein könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aus dem Datenbestand einer onkologischen Schwerpunktpraxis das Auftreten und den Verlauf der Anti-ML1-IgG-Subklassen über 24 Monate bei Patientinnen mit Mammakarzinom zur Diskussion zu stellen und mit anderen Parametern zu vergleichen. Als Verlaufsparemeter wurden zusätzlich die Eosinophilen im peripheren Blut herangezogen. Die Laborparemeter sollen in explorativer Weise in Beziehung gesetzt werden zu den vorhanden Patientencharakteristika. Hierzu wurde eine Risikoeinschätzung anhand des Tumorausgangsstadiums erstellt und der bisherige Verlauf der Therapie auf Rezidive oder Verdachtsmomente eines Rezidivs beurteilt. Außerdem wurde eine der Misteltherapie vorausgehende oder sie begleitende Durchführung von Chemotherapie, Bestrahlung oder Hormontherapie dokumentiert, sowie der Allergiestatus und das Alter erhoben.

2 Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign /Datenerhebung

Die vorliegende Arbeit untersucht im Sinne einer retrospektiven Anwendungsbeobachtung über 24 Monate den Verlauf von Eosinophilen und Anti-ML-1-IgG-Subklassen bei Mammakarzinom-Patientinnen einer onkologischen Schwerpunktpraxis, bei denen eine Behandlung mit dem Mistelpräparat ABNOBAviscum Mali® (AM) erstmals durchgeführt wurde.

2.1.1 Einschlusskriterien

In die Auswahl gezogen wurden alle Patientinnen der Praxis, die zwischen November 1995 und Februar 1999 folgende Einschlusskriterien erfüllten :

- Erkrankung an Mammakarzinom mit kurativer Behandlungsaussicht (R0)
- Keine Fernmetastasierung
- Keine vorausgegangene zweite maligne Tumorerkrankung
- Keine Vorbehandlung mit Mistelextrakten
- Vorliegen von Messwerten an mindestens 6 von 8 möglichen Zeitpunkten
- übliche Tumornachsorge-Untersuchungen durchgeführt

Insgesamt wurden in der Praxis im genannten Zeitraum 430 Patientinnen mit der Diagnose Mammakarzinom behandelt. Davon lagen bei 316 Patientinnen die Messwerte nicht in den für die Anwendungsbeobachtung ausgewählten Abständen vor. Vorbehandelt waren 50, durch die anderen Einschlusskriterien fanden weitere 10 keine Aufnahme. Aufgenommen wurden zuletzt 54 Patientinnen.

Folgende Einflussgrößen wurden festgelegt und aus dem Krankenblatt, ggf. durch Rücksprache mit der Patientin ergänzt, erhoben:

- Alter bei Beginn der Misteltherapie
- Allergianamnese aufgeteilt in 4 Stufen für 1) leere Anamnese, 2) Allergie nur in der Familienanamnese, 3) eigene allergische Episode und 4) atopische Disposition
- Hormonrezeptorstatus des Karzinoms
- Stadieneinteilung des Ausgangsbefundes nach Kriterien des AJCC
- Tumorgroße
- Lymphknotenstatus
- Histologisches Grading
- Monat der Erstdiagnose
- Monat des Behandlungsbeginns mit AM
- Wurde eine Chemotherapie durchgeführt, wenn ja, Monat ihrer Beendigung.
- Wurde eine Radiotherapie durchgeführt, wenn ja, Monat ihrer Beendigung.
- Wurde eine Hormontherapie durchgeführt?
- Kam es im Verlauf bis zum 01.09.2001 zu a) einem Anstieg eines Tumormarkers oder einem Verdacht auf ein Rezidiv oder eine Metastase, b) dem Nachweis eines

Lokalrezidiv oder einer lokoregionalen Lymphknotenmetastase, c) dem Nachweis einer Fernmetastase, d) dem Tod der Patientin aufgrund der Krebserkrankung ?

- Trat ein Zweittumor auf?

2.1.2 Zeitlicher Verlauf

Für die Abstände der Messwerte wurde folgendes Zeitraster angelegt:

Als Zeitpunkt 0 wurde eine Messung direkt vor Beginn der Misteltherapie definiert. Die weiteren Zeitpunkte weisen eine Toleranzbreite auf, da es sich um eine Anwendungsbeobachtung unter üblichen Praxisbedingungen handelt.

- Zeitpunkt 1 4 bis 8 Wochen nach Therapiebeginn
- Zeitpunkt 3 3 Monate +/- 3 Wochen
- Zeitpunkt 6 6 Monate +/- 4 Wochen
- Zeitpunkt 9 9 Monate +/- 6 Wochen
- Zeitpunkt 12 12 Monate +/- 8 Wochen
- Zeitpunkt 24 24 Monate +/- 8 Wochen.

2.1.3 Mistelpräparat und Dosierung

Als Mistelpräparat kam ABNOBAviscum Mali ® (AM) der Firma ABNOBA Heilmittel GmbH, Pforzheim, zur Anwendung. Es handelt sich um einen wässrigen, unfermentierten Preßsaft aus *Viscum album L.* mit definierter Wirtsbaumherkunft (Apfelbaum). Der Mistelgesamtextrakt ist ein Vielstoffgemisch, bei dem die genaue Zusammensetzung hinsichtlich Inhaltsstoffen und deren Konzentrationen nicht exakt bekannt ist. Über eine Prozeßstandardisierung, d.h. über die Festlegung und Einhaltung von standardisierten Bedingungen beim Herstellungsverfahren, wird die pharmazeutische Qualität gesichert [130].

ABNOBAviscum Mali ® (AM), steht in den Verdünnungsstufen 2; 3; 4; 5; 6; 10; 20 und 30 zur Verfügung. In einer 1ml Ampulle der Verdünnungsstufe 2 befinden sich 15 mg wässriger, unfermentierter Preßsaft aus 20 mg Mistel (*Viscum album L.*), in der Verdünnungsstufe 3 dann 1/10 davon, d.h. 1,5 mg Preßsaft aus 2 mg Mistelkraut usw. Der Lektingehalt des Präparates AM wurde vom Hersteller als Gesamtlektingehalt mit 5800 ng/ml für die 20 mg Ampulle (Verdünnungsstufe 2) angegeben [2].

Für die phytotherapeutischen Mistelpräparate, die basierend auf tierexperimentellen Untersuchungen nach dem Mistellektin-1-Gehalt standardisiert werden, wurde ein Dosisoptimum von 0,5 – 1 ng ML-1 pro kg Körpergewicht empfohlen [16]. Bis einschließlich zur Verdünnungsstufe 4 liegt die ML-1 Dosis von 1 ml AM bei Normalgewichtigen somit im bzw. über dem empfohlenen Bereich.

In Anlehnung an die Monographie *Viscum album* der Kommission C [91] wurde in der Einleitungsphase eine geringe Konzentration, also AM Stufe 4 oder 5 subkutan 2-3 x wöchentlich appliziert, meist in die Bauchhaut oder am Oberschenkel. Die Patientinnen wurden, wenn gewünscht, zur Selbstapplikation angeleitet. Die Konzentration wurde unter Beachtung der typischen Begleitreaktionen in Form von lokaler Entzündungsreaktion, Temperaturreaktion und Änderung des subjektiven Befindens, individuell gesteigert, wobei bei allen Patientinnen in den ersten 6 Wochen eine deutliche Lokalreaktion von ca. 5 cm Durchmesser angestrebt wurde. Nachgeordnet wurde die Bluteosinophilie als Kriterium benutzt. Angestrebt wurden Werte zwischen 0,36 und 1,0/nl. Bei überschießender Eosinophilie (> 1,0/nl) erfolgte eine Dosisreduktion.

Mit der so ermittelten individuellen Konzentration wurde die Behandlung in der Erhaltungsphase fortgesetzt. Die große Mehrheit der Patientinnen erhielt in der Erhaltungsphase eine Dosierung von AM Stufe 3 oder 4. Nur eine Patientin erhielt AM Stufe 2 und sechs erhielten AM Stufe 5.

Die Dokumentation der beobachteten Lokalreaktionen oder der Temperaturreaktionen erfolgte, soweit sie sich im üblichen Rahmen bewegten, nicht systematisch, sodass sie in dieser Arbeit nicht als Parameter aufgenommen wurden. Seltene Reaktionen, wie beispielsweise einmalig eine generalisierte Urtikaria, wurden berücksichtigt.

2.2 Labor

Die Laboruntersuchungen erfolgten in einer zertifizierten Laborärzte-Gemeinschaftspraxis. Es wurden die eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blutbild per Durchflusszytometrie bestimmt und in der Dimension Zellen/nl angegeben. Die ML-1-IgG-Subklassen 1 bis 4 wurden aus Patientenserum mittels ELISA nach Standardarbeitsanweisung gemäß der Methode von Stettin et. al bestimmt [143].

Die im Patientenserum nachzuweisenden Mistellektin-Antikörper bilden mit Mistellektin-Antigen, das auf einer Nunc-Immunoplatte fixiert ist, einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch einen Waschprozess entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzymkonjugat, wiederum werden nicht gebundene Immunkomplexe durch Waschen entfernt. Nach Zugabe von Substratlösung (O-Phenylendiamin in Zitratpuffer + H₂O₂) entsteht durch Peroxidase-Enzymaktivität ein gelber Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach orange umschlägt. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 450 nm und wird in OD (optische Dichte) angegeben. Dabei wird vom Mittelwert der Probenmessungen der Mittelwert des Leerwertes abgezogen. Spezielle Störfaktoren sind nicht bekannt, bzw. nicht spezifiziert. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,002 OD. Zur Bestimmung eines Referenzwertes untersuchte das Labor an 50 nicht mistelexponierten Probandensera von einer Blutbank die naiv-Werte für Anti-ML1-IgG1 bis IgG4. Der Mittelwert zuzüglich der doppelten Standardabweichung wurde als Cut-off-Wert definiert. Messwerte unter diesem Wert werden als <Cut-off herausgegeben. Es handelt sich also um sogenannte zensierte Messwerte, da für alle Werte unter dem Cut-off-Wert nur ausgesagt werden kann, dass sie zwischen dem Cut-off-Wert und Null liegen. Diese Cut-off-Werte sind für die einzelnen Subklassen unterschiedlich und können Tabelle 8 entnommen werden.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Cut-off-Wert	0,17 OD	0,01 OD	0,06 OD	0,03 OD

Tabelle 8: Cut-off-Werte für die Anti-ML1-IgG-Subklassen

Um die Trennschärfe weiter zu verbessern, wurde für bestimmte Auswertungen dieser Arbeit eine starke Antikörperbildung davon abweichend nicht durch Addition der doppelten, sondern der vierfachen Standardabweichung definiert und das Ergebnis auf 2 Nachkommastellen gerundet, was in Tabelle 9 dargestellt ist.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
starkes Ansprechen	0,20 OD	0,02 OD	0,10 OD	0,06 OD

Tabelle 9: Schwellenwerte für die Klassifikation als starkes Ansprechen

2.3 Statistik

Für die vorliegende Arbeit wurden deskriptive und analytische Statistiken (logistische Regression, bivariate Korrelation, Wilcoxon-Test) verwendet. Im deskriptiven Teil wurde für jeden Messparameter Mittelwert, Median, Quantile und Streuungsbereich der ermittelten Werte (Minimum-Maximum) beschrieben.

Für die Werte der IgG-Subklassen gilt, dass vom Labor ein Cut-off-Wert vorgegeben ist, der sich aus dem Mittelwert einer nicht exponierten Probandengruppe zuzüglich der doppelten Standardabweichung errechnet. Messwerte unter diesem Wert werden als < Cut-off herausgegeben und erscheinen in unserer Datentabelle als 0,00. Es handelt sich also um zensierte Werte, die strenggenommen eine besondere Behandlung bei der statistischen Auswertung erfordern. In unserer Arbeit wurde darauf verzichtet, da die deskriptive Statistik der IgG-Subklassen sich auf nicht-parametrische Prinzipien stützt, das heißt nicht Absolutwerte sondern Ränge vergleicht.

Statt des Mittelwertes wird der Median bestimmt, dessen Charakteristikum darin besteht, dass jeweils 50% der Beobachtungen einen Wert größer oder gleich bzw. kleiner oder gleich dem Median annehmen. Der Median ist zudem weniger empfindlich gegenüber Ausreißern in der Beobachtungsreihe. In den Auswertungen kann also der Nullwert durch den jeweiligen Cut-off-Wert ersetzt werden, ohne dass sich der Median oder die Quantile ändern würden.

Eine Ausnahme liegt bei der bivariaten Korrelationsanalyse vor (siehe Seite 59). Der hier verwendete Mittelwert, der dem arithmetischen Mittel der gültigen Beobachtungen entspricht, ist aufgrund des zensierten Charakters der IgG-Subklassen-Messwerte strenggenommen eine verfälschte Rechengröße. Zur korrekten Berücksichtigung des zensierten Charakters wäre jedoch eine aufwendige statistische Transformation erforderlich, die zu der lediglich explorativen, d.h. Hinweise auf Zusammenhänge suchenden Absicht für diesen Test in keinem Verhältnis gestanden hätte.

Dahingegen ist bei den Eosinophilen das Datenmaterial (in Zellen/nl) nicht zensiert und steht also auch für eine Auswertung mit parametrischen Verfahren unter Einbeziehung des Mittelwertes zur Verfügung.

Ein graphisches Verfahren zur näheren Charakterisierung einer Verteilung ist der Boxplot. Entlang einer vertikalen Skala, die alle Beobachtungen erfaßt, werden in der Regel Minimum, 25%-Quartil, Median, 75%-Quartil und Maximum abgetragen, wobei die Quartile derart verbunden werden, dass ein rechteckiger Kasten (Box) entsteht. Dieser Kasten enthält 50% der Beobachtungswerte. Das 25% (75%)-Quartil ist dadurch charakterisiert, dass mindestens 25%(75%) der Werte kleiner oder gleich und 25%(75%) der Werte größer oder gleich dem entsprechenden Quartil sind. Mit der Hilfe von Boxplots lassen sich die Strukturen von Beobachtungsreihen leichter vergleichen. Insbesondere kann abgelesen werden, ob es sich um eine eher schiefe oder eine eher symmetrische Verteilung handelt. Je länger die Box ist, desto stärker streuen die Beobachtungswerte. Die von der Box weggehenden Linien (whiskers) reichen jeweils bis zum letzten Wert, der weniger als 1,5 Interquartilbereiche außerhalb der Box liegt. Der Interquartilbereich entspricht der Länge der Box. Über dem Boxplot werden die einzelnen Messwerte leicht „verzittert“ als Punktwolke abgebildet, sodass auch die Ausreißer jeweils dargestellt sind.

Für die Eosinophilen wurde geprüft, ob nach 1 oder 24 Monaten ein signifikanter Unterschied zum Ausgangsniveau besteht. Die Testung erfolgte wegen einer partiellen Klassierung der vorliegenden Daten mit einer nicht-parametrischen Variante des t-Tests für paarweise angeordnete Meßwerte, dem Wilcoxon-Test zum Vergleich zweier verbundener Stichproben quantitativer Merkmale. Aufgrund der mehrfachen Testung (2 Tests) wurde ausgehend von einem geforderten Signifikanzniveau von 95% (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=5%$; $p<0,05$) eine Korrektur für multiples Testen nach der Methode von Bonferroni durchgeführt, indem α durch 2 geteilt wurde. Ein Ergebnis gilt als signifikant, wenn $p<0,025$.

Der Bezug zu einem individuellen Titerverlauf geht bei der Betrachtung von Boxplots zu unterschiedlichen Messzeitpunkten verloren. Um eine Aussage über den

durchschnittlichen individuellen Titerverlauf treffen zu können, wurde ein logarithmisches Regressionsmodell der Titerverläufe berechnet, in welches die einzelnen Titerverläufe als zufällige Faktoren eingingen. Zugrundegelegt wurde eine Eintragung der individuellen Titerverläufe je IgG-Subklasse in ein Diagramm mit der x-Achse als Zeitachse und der y-Achse mit logarithmischer Skalierung der IgG-Subklassentiter in OD. Einbezogen wurden die Messzeitpunkte 3 bis 24, da zum Zeitpunkt 0 und 1 zu viele Messwerte fehlten.

Zu jedem individuellen Titerverlauf wurde eine diesen Verlauf am besten beschreibende Gerade ($y=m_1x + b$) errechnet, wobei m_1 die Steigung dieser Geraden bezeichnet. Die Notwendigkeit zur Logarithmisierung ergab sich aus der zu starken Streuung der Steigungsgeraden ohne Logarithmisierung. Aus diesen 54 Geradensteigungen wurde eine durchschnittliche Geradensteigung m_{all} errechnet und jedem Verlauf die individuelle Steigungskorrektur m_x zugeordnet, sodass $m_{all} + m_x$ die reale Steigung dieses Verlaufes ergibt. Die Steigung m_{all} wurde so errechnet, dass die Summe Σ aller 54 Steigungskorrekturen m_x gleich 0 ist (Mittelwert). Die Steigungen der individuellen Geraden werden als Histogramm im Ergebnisteil dargestellt und tabellarisch eine deskriptive Statistik dieser Steigungen hinzugefügt. Durch delogarithmisieren der mittleren Geradensteigung läßt sich eine durchschnittliche prozentuale Zunahme des Titers pro Monat oder pro Jahr errechnen.

In einer bivariaten Korrelationsanalyse wurden die Wertepaare der Geradensteigung für IgG1 und IgG4 in ein Koordinatensystem abgetragen und als Scatterplots (Streudiagramm) dargestellt. Der Grad des Zusammenhanges zwischen zwei Merkmalen kann durch deren Korrelation ausgedrückt werden und wird in dem Diagramm als Ellipse um die Punktwolke graphisch dargestellt. Je stärker die Ellipse schräg und abgeflacht verläuft, um so höher ist der Grad der Korrelation, je stärker sie sich der Kreisform nähert, um so geringer ist die Korrelation.

Die Abhängigkeit des Verlaufs vom Mittelwert der Eosinophilen über Zeitpunkt 0 bis 24 wurde mittels einer logistischen Regression getestet. In Abbildung x entspricht das Verhältnis einer gedachten senkrechten Strecke oberhalb der geschwungenen Linie zu

einer senkrechten Strecke unterhalb der geschwungenen Linie der Wahrscheinlichkeit, bei einem bestimmten Mittelwert der Eosinophilen in die obere Gruppe ($VS > 1$) zu fallen. Dieses Verhältnis der Wahrscheinlichkeit p , dass ein Ereignis eintritt (oberhalb der geschwungenen Linie), zur Wahrscheinlichkeit $1-p$, dass das Ereignis nicht eintritt (unterhalb der geschwungenen Linie), nennt man Odds. Das Odds Ratio ist das Verhältnis der Odds, das ein Ereignis eintritt, in zwei Gruppen:

$$\frac{p_1 / (1-p_1)}{p_2 / (1-p_2)} = \text{Odds-Ratio}$$

Werden zur Analyse nicht die Mittelwerte der Eosinophilen als quantitatives Merkmal herangezogen, sondern zwei Klassen gebildet, deren eine die Fälle mit maximalen Eosinophilen unter $0,4/nl$ und deren andere die mit maximalen Eosinophilen gleich oder größer $0,4/nl$ enthält, wurde zur Testung auf eine Korrelation mit einem weiteren qualitativen Merkmal (z.B. Verlauf unauffällig oder auffällig) eine Kontingenztafel gewählt, in der die gemeinsame Häufigkeitsverteilung tabellarisch dargestellt wird. Als Diagramm eignet sich hier das Mosaik (Balken)-Diagramm. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit dem Likelihood-ratio-Test.

Unter explorativen Gesichtspunkten wurde die Regression analog zu den oben beschriebenen Mittelwerten der Eosinophilen auch für die Mittelwerte und Maxima der IgG-Subklassen im Verhältnis zum Verlauf durchgeführt, sowie eine Abhängigkeit der Mittelwerte vom Tumorausgangsstadium untersucht.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm JMP von SAS Institute Corp. hinzugezogen. Die verwendeten statistischen Begriffe definieren sich wie folgt:

Konfidenzintervall: Ein Konfidenzintervall ist ein geschätztes Intervall, welches den wahren Wert eines unbekanntem Parameters mit vorgegebener Wahrscheinlichkeit, z.B.

95%, überdeckt.

Korrelation: Die Korrelation mißt den Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Merkmalen. Eine Maßzahl für die Stärke der Korrelation ist der Korrelationskoeffizient.

Korrelationskoeffizient: Der Korrelationskoeffizient ist eine Maßzahl für den linearen Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Merkmalen. Er liegt zwischen -1 und +1 und ist positiv, wenn den hohen (bzw. niedrigen) Werten eines Merkmals jeweils hohe (bzw. niedrige) Werte des anderen Merkmals entsprechen; er ist negativ im umgekehrten Falle. Der Wert liegt um so näher bei ± 1 , je enger die Beziehung ist. Ein Wert bei 0 läßt auf das Fehlen einer linearen Beziehung schließen.

Median: Der Median eines quantitativen Merkmals ist der Wert des mittleren Elementes bei ungeradem Stichprobenumfang bzw. das arithmetische Mittel der beiden mittleren Elemente bei geradem Stichprobenumfang, wenn die Daten der Größe nach geordnet sind.

Mittelwert: Die Summe der Einzelwerte geteilt durch die Anzahl der Werte ergibt den arithmetischen Mittelwert.

Nullhypothese: Die Nullhypothese H_0 beim statistischen Test besagt, dass der in der Stichprobe gefundene Effekt auf die zufallsabhängige Streuung zurückzuführen ist und damit in der Grundgesamtheit nicht vorhanden ist.

Odds: Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit p , dass ein Ereignis eintritt, zur Wahrscheinlichkeit $1-p$, dass das Ereignis nicht eintritt, nennt man Odds.

Odds Ratio: Das Odds Ratio ist das Verhältnis der Odds ,dass ein Ereignis eintritt, in zwei Gruppen zueinander.

p-Wert: Wahrscheinlichkeit, unter Gültigkeit der Nullhypothese Ergebnisse zu erhalten, die mindestens so extrem sind wie das beobachtete Resultat.

Standardabweichung: Die Quadratwurzel aus der Varianz, d.h. der Summe der quadratischen Abweichungen vom arithmetischen Mittelwert nach Division durch deren um eins verminderte Anzahl.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

3.1.1 Alter

In die Untersuchung eingeschlossen wurden 54 Patientinnen mit Mammakarzinom und kurativer Behandlungsaussicht im Alter zwischen 35 und 92 Jahren. Der Altersdurchschnitt (Mittelwert) liegt bei 56,5 Jahren.

3.1.2 Tumorausgangsstadium

Der überwiegende Teil der Patientinnen hat ein frühes Krankheitsstadium (Stadium I und IIa) nach der TNM-basierten Einteilung des American Joint Committee on Cancer (Abb. 1).

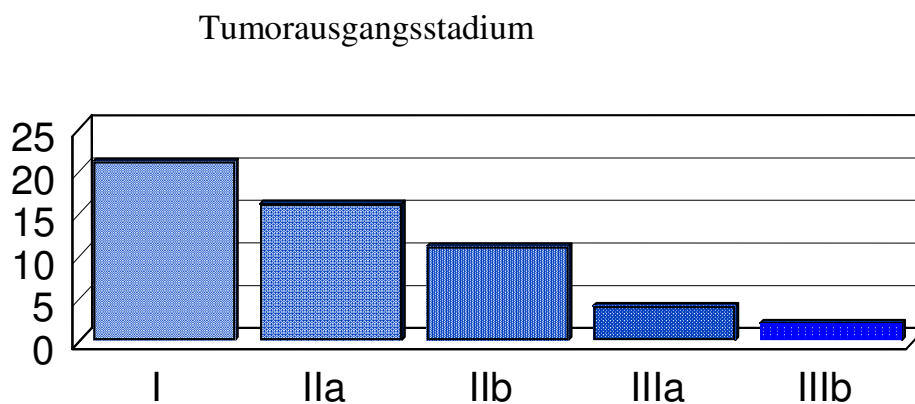


Abbildung 1: Stadieneinteilung nach TNM-Kriterien zu Beginn der Misteltherapie

3.1.3 Allergianamnese

Um Vergleiche mit dem Verlauf der Eosinophilen und ggf. der Anti-ML1-IgG-Antikörper zu ziehen, wurde der Allergiestatus für 52 von 54 Patientinnen erhoben, für 2 Patientinnen waren keine Angaben erhältlich. Es überwiegt deutlich die Anzahl der Patientinnen ohne allergische Disposition in der Anamnese. Für rund 30 % der Fälle

war die Anamnese positiv für eine eigene Allergie, davon bei der Hälfte im Sinne einer atopischen Disposition (Abb. 2).

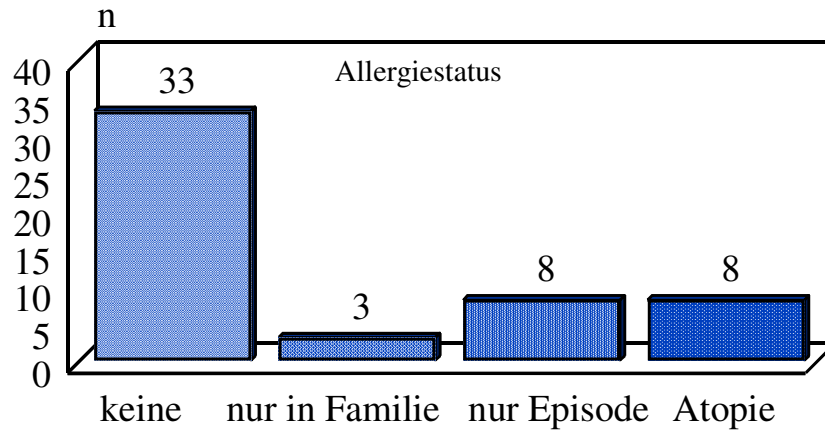


Abbildung 2: Anamnestische Informationen zum Allergiestatus der Patientinnen mit a) leerer Anamnese, b) Allergie nur im familiären Umfeld, c) eigener allergischer Episode oder d) eigener atopischer Disposition

3.1.4 Chemotherapie

Der überwiegende Teil von 61% hat eine adjuvante Chemotherapie im Rahmen der Primärtherapie erhalten. Eine Unterscheidung in Chemotherapien nach dem CMF-Schema, EC-Schema oder anderen wurde nicht getroffen. Bei 20 Patientinnen überschritten sich die Chemotherapie und der Beginn der Misteltherapie. Die übrigen 13 begannen die Misteltherapie erst nach der Chemotherapie, z.T. mit mehrmonatigem Abstand. Oft wurde die onkologische Primärstrategie und adjuvante Weiterbehandlung nicht in der onkologischen Schwerpunktpraxis initiiert (Abb. 3).

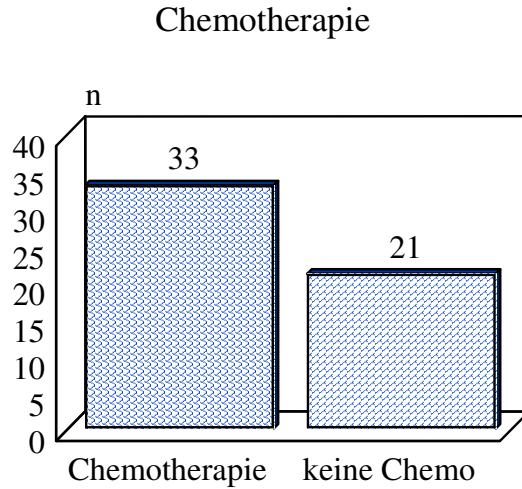


Abbildung 3: Anzahl der Patientinnen mit bzw. ohne Chemotherapie

3.1.5 Radiotherapie

Eine adjuvante Radiotherapie kam bei 72 % der Fälle zum Einsatz (Abb. 4). Die Anzahl der Überschneidungen mit der Misteltherapie wurde nicht erhoben. Von Befürwortern der Misteltherapie wird ein Therapiebeginn parallel zu Radio- oder Chemotherapie wegen der beobachteten günstigen Effekte auf die Nebenwirkungsrate und Lebensqualität empfohlen.

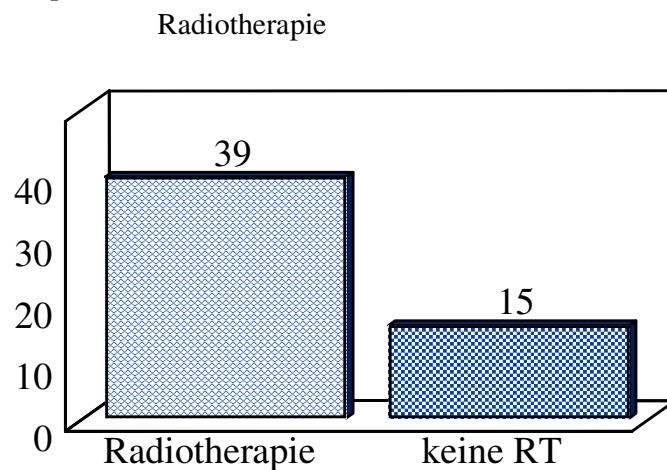


Abbildung 4: Anzahl der Patientinnen mit bzw. ohne Radiotherapie

3.1.6 Hormontherapie

Für die adjuvante Hormontherapie ist Tamoxifen die Substanz mit der am besten belegten Wirksamkeit. Entsprechend findet sich bei 63 % der Patientinnen eine Medikation mit Tamoxifen (Abb. 5). Nur in 3 Fällen kamen andere Methoden der Hormontherapie zum Einsatz (Ovarektomie bzw. GnRH-Analoga).

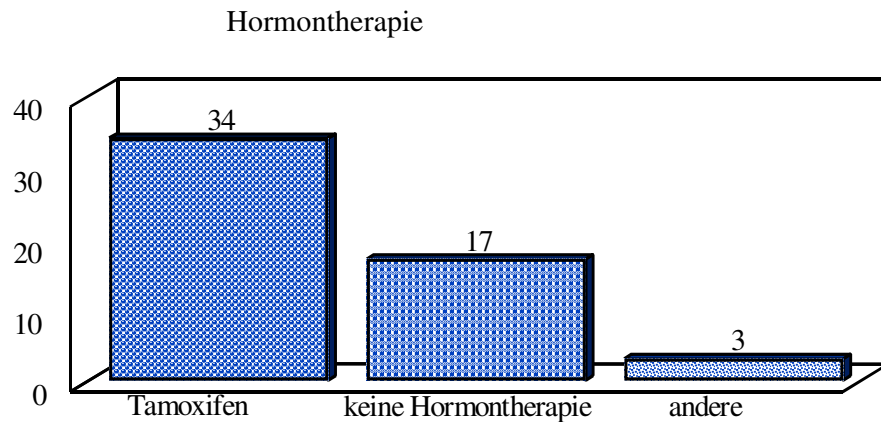


Abbildung 5: Anzahl der Patientinnen mit bzw. ohne Hormontherapie

3.1.7 Risikostratifizierung

Die Etablierung verlässlicher prognostischer Kriterien beim Mammakarzinom ist Gegenstand intensiver Diskussionen. Allgemeine Akzeptanz hat im klinischen Alltag weiterhin die Stadieneinteilung nach TNM-Kriterien, die genaue Beurteilung des Lymphknotenstatus mittels Axilladisektion oder ggf. Sentinel-Biopsie sowie für die nodal negativen Patientinnen die Risikoeinteilung in low risk, intermediate und high risk (Consensus St. Gallen 1998) [51]. 52% der Patientinnen in unserer Untersuchung sind nodal positiv und nur ein sehr geringer Teil der nodal negativen Fälle gehört in die low risk Kategorie (Abb. 6).

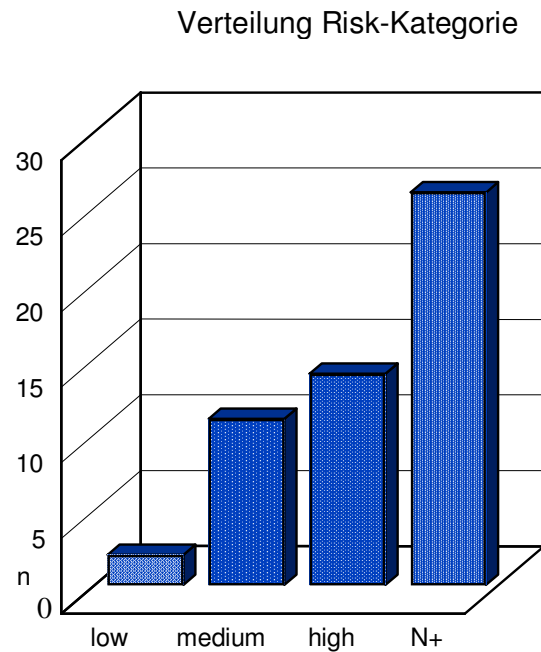


Abbildung 6: Die Risikoeinteilung für nodal negative Patientinnen nach der Consensus Conference St. Gallen 1998, ganz rechts der Anteil der nodal positiven Patientinnen

3.1.8 Verlaufsschlüssel

Die Einteilung erfolgte unter dem Kürzel VS (für Verlaufsschlüssel) in 5 Gruppen. Gruppe VS 1 enthält die Fälle, in denen kein Hinweis auf ein Rezidiv besteht, Gruppe VS 2 die Fälle, wo ein Verdacht auf ein Rezidiv besteht, der bisher nicht erhärtet oder ausgeschlossen werden konnte. Hierzu zählen insbesondere auffällig erhöhte Tumormarker, nicht eindeutige palpatorische Befunde oder ein schwacher Restverdacht auf eine Fernmetastase trotz Abklärung durch bildgebende Verfahren (z.B. CT). Gruppe VS 3 enthält die Fälle mit gesichertem Lokalrezidiv, Gruppe VS 4 enthält die Fälle mit Fernmetastasierung und in Gruppe VS 5 fallen die am Mammakarzinom verstorbenen Patientinnen. Der Anteil der Gruppen 2 bis 5 ist mit zusammen 20% recht gering. Für die weitere statistische Auswertung wurden daher diese heterogenen Gruppen in die Gruppe VS > 1 zusammengefaßt (Abb. 7).

Aufteilung des Verlaufsschlüssels

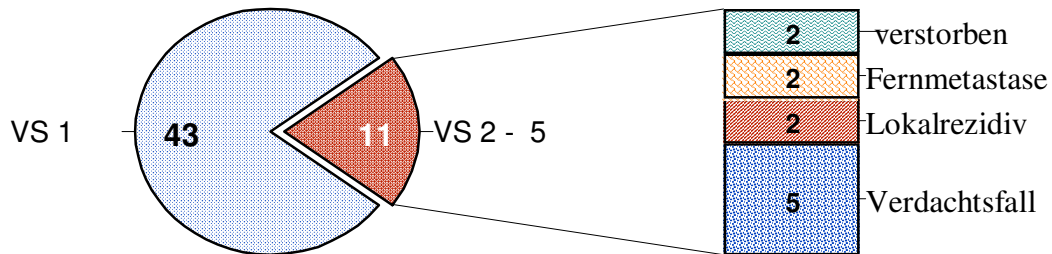


Abbildung 7: 11 von 54 Patientinnen wiesen einen auffälligen Verlauf auf, der sich in 4 Untergruppen aufschlüsselt

3.1.9 Nebenwirkungen

Zu stärkeren Lokalreaktionen zwischen 5 und 10 cm Durchmesser, die eine Dosisreduktion nötig machten, kam es in der Anfangsphase bei 8 Patientinnen. Bei einer Patientin trat nach der 2. Injektion eine kurzfristige generalisierte Urtikaria auf, die zeitlich in engem Zusammenhang mit der Mistelinjektion stand. Bei dieser Patientin waren multiple Allergien bekannt. Die Behandlung wurde daraufhin mit einer höheren Verdünnungsstufe (AM 6, später AM 5) ohne weitere allergische Reaktionen fortgeführt.

3.2 Serokonversion für Anti-ML-1-Antigen

3.2.1 Prävalenzen für Anti-ML1-IgG-Antikörper

Einen Überblick über die Häufigkeit, mit der zu den einzelnen Messzeitpunkten ein Schwellenwert für die Anti-ML1-IgG-Subklassen überschritten wird, kann man durch prozentuale Kurven der Prävalenz erhalten. Das folgende Diagramm (Abb. 8) übernimmt als Schwellenwerte die vom Labor zugrundegelegten, die sich aus den Mittelwerten nicht exponierter Probanden zuzüglich der doppelten Standardabweichung errechnen (Werte siehe Abschnitt 2.2). Serokonversion wurde definiert als das Erreichen des Schwellenwertes für mindestens eine Subklasse. Die Prävalenz erreicht nach 12 Monaten ihr Maximum mit 98 %. Nach 18 Monaten sind 6 % wieder seronegativ. Die letzten 2 Prozent zeigen eine Serokonversion erstmals nach 24 Monaten. Für den Zeitpunkt 0 (vor Misteltherapie) liegen wegen fehlender klinischer Relevanz keine Messungen vor.

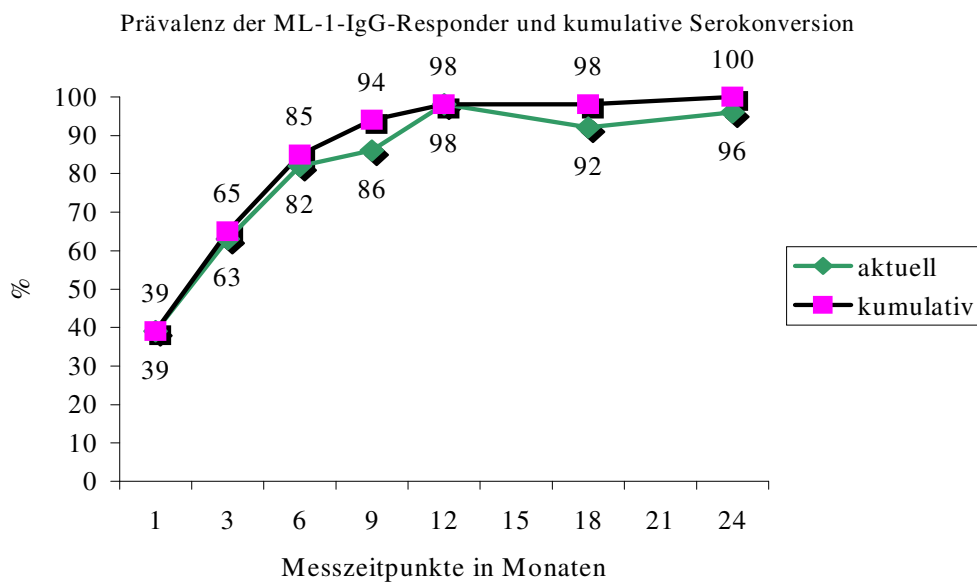


Abbildung 8: Prävalenz einer Serokonversion für ML-1 für mindestens eine IgG-Subklasse sowie die kumulative Serokonversion

3.2.2 Prävalenzen für einzelne Anti-ML-1-IgG-Subklassen

Schlüsselt man nun die Prävalenz nach den einzelnen Subklassen auf, ergibt sich das Bild von Abbildung 9. Für die Verläufe der Subklassen wurde als Schwellenwert für einen hohen Titer der Mittelwert der Labor-Probandengruppe zuzüglich der 4-fachen Standardabweichung definiert und auf 2 Nachkommastellen gerundet.

IgG1 ist durchgängig die Subklasse mit der höchsten Prävalenz, IgG2 die mit der niedrigsten. IgG3 ist nach raschem Anstieg ab dem Monat 9 in der Prävalenz rückläufig und wird von IgG4 ab Monat 12 übertroffen. Eine Prävalenz von 50% wird von IgG4 gegenüber IgG1 mit 9-monatiger Verzögerung überschritten. Entgegen der immunologischen Zuordnung von IgG1 und 3 zu Typ1- und IgG4 zu Typ 2- Reaktivität, zeigt die Abbildung 9 ein gleichsinniges Verhalten von IgG1 und 4 einerseits und IgG2 und 3 andererseits.

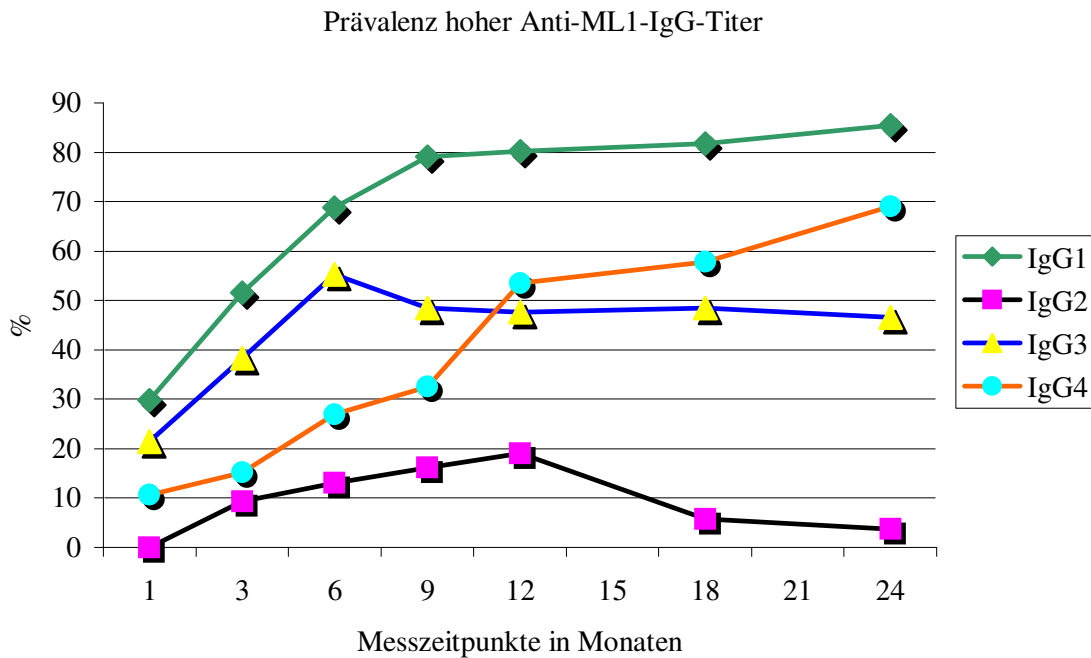


Abbildung 9: Prävalenz stark positiver ML1-Antikörper nach den einzelnen Subklassen (n=54)

Im Folgenden kommen verschiedene Untergruppen nach dem gleichen Schema zu Darstellung.

3.2.3 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe mit auffälligem Verlauf

Für die kleine Gruppe von 11 Fällen mit einem Verlaufsschlüssel von > 1 ergibt sich im Prinzip ein ähnliches Bild, wenngleich die geringe Anzahl zu stärkeren Schwankungen führt (Abb. 10). Der Zeitpunkt 1 wurde für diese Gruppe ausgeschlossen, da zu viele fehlende Messwerte vorlagen.

Der Trend einer Zunahme, bzw. Stabilisierung auf hohem Niveau für IgG1 und 4 bestätigt sich auch in dieser kleinen Subgruppe.

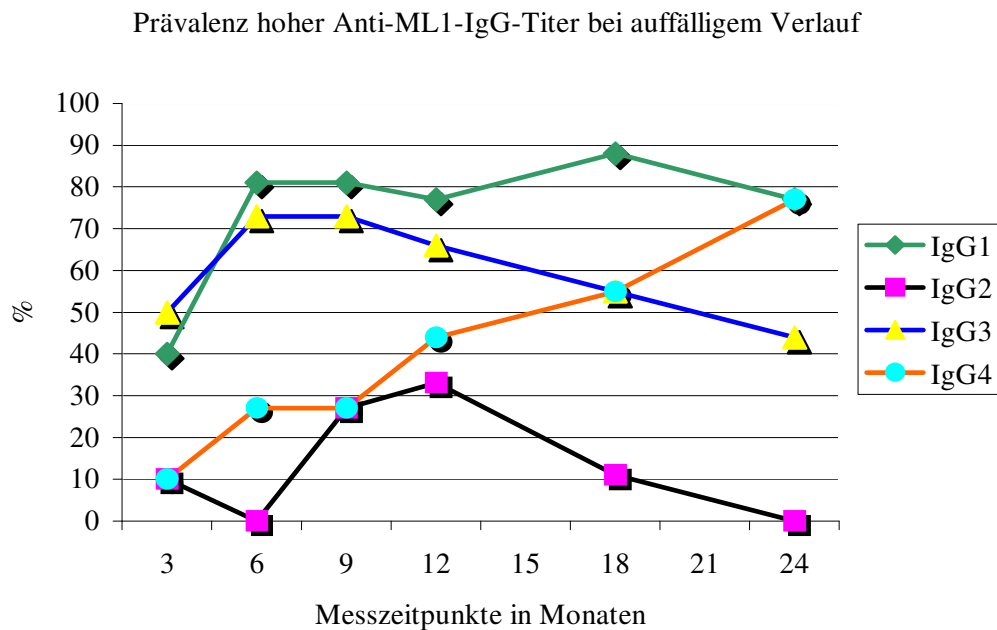


Abbildung 10: Prävalenz stark positiver ML1-Antikörper in Untergruppe mit auffälligem Verlauf (n=11).

3.2.4 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe mit unauffälligem Verlauf

In der folgenden Subgruppe mit unauffälligem Verlauf läßt sich auch IgG3 in diesen Trend einer Stabilisierung einfügen (Abb. 11). Die Prävalenzen für IgG2 bleiben unter 20%.

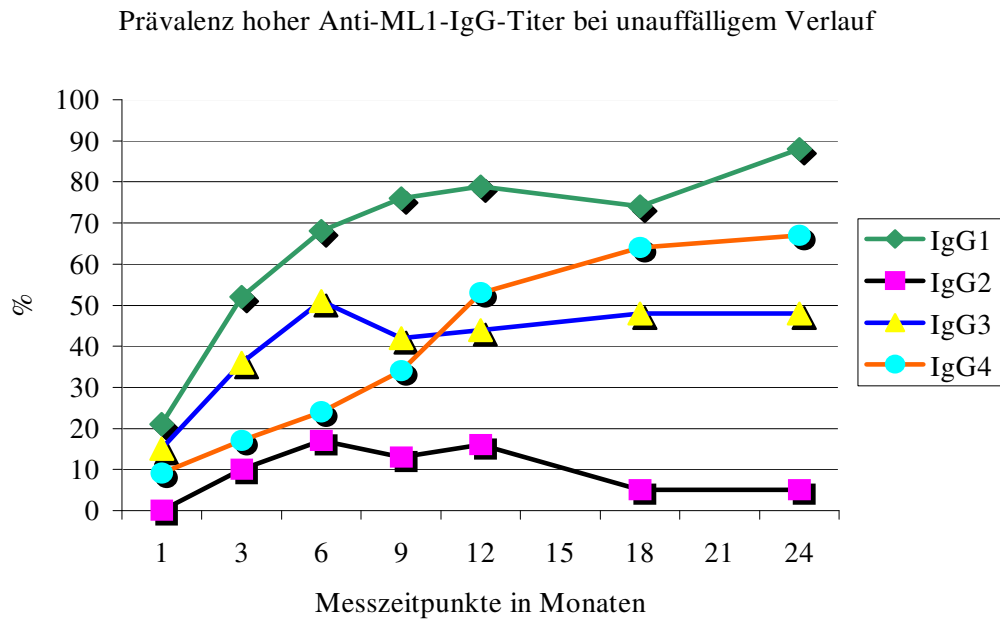


Abbildung 11: Prävalenz stark positiver ML1-Antikörper in der Untergruppe mit unauffälligem Verlauf (n=43).

3.2.5 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe mit ausgeprägter Eosinophilie

Eine weitere Unterteilungsmöglichkeit liegt in der Aufteilung in eine Untergruppe mit ausgeprägter Eosinophilie (mindestens zu einem Zeitpunkt gleich oder größer 0,4 Eos /nl) und eine ohne diese. Der Verlauf in der Gruppe mit Eosinophilie gleicht in hohem Maße dem der Gesamtgruppe (Abb. 12). IgG2 ist jedoch besonders gering ausgeprägt. IgG4 steigt in den ersten Monaten nur zögernd an.

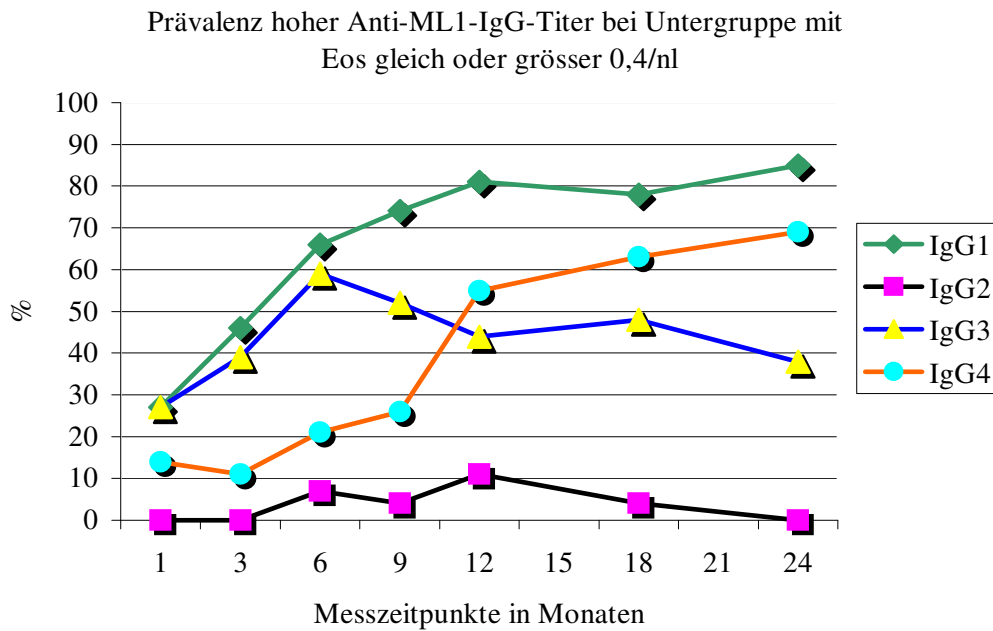


Abbildung 12: Prävalenz stark positiver ML1-Antikörper in Untergruppe mit maximalen Eosinophilenwerten gleich oder größer als 0,4 /nl (n=29)

3.2.6 Prävalenzen nach Subklassen für Untergruppe ohne ausgeprägte Eosinophilie

Die Untergruppe ohne ausgeprägte Eosinophilie zeigt ein zögerliches Ansprechen des IgG3, einen kontinuierlichen IgG4-Anstieg und relativ hohe Prävalenz für IgG2 (Abb. 13).

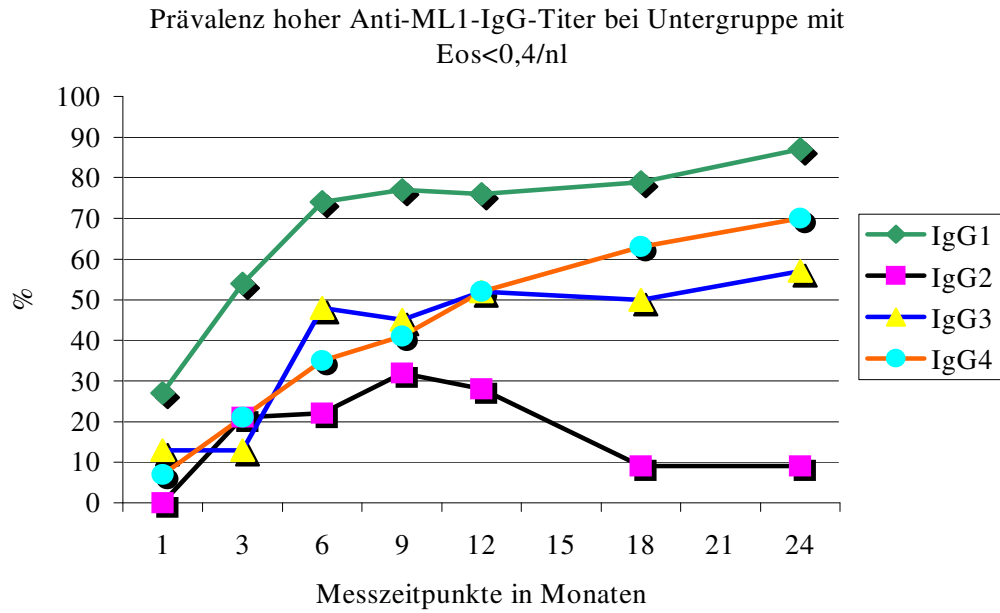


Abbildung 13: Prävalenz stark positiver ML1-Antikörper in Untergruppe mit maximalen Eosinophilenwerten unter 0,4 /nl (n=25)

3.3 Deskriptive Statistik der Messwerte für ML1-IgG-Subklassen und Eosinophile

Die Darstellung der Messergebnisse für die einzelnen Parameter erfolgt in einer Kombination aus Boxplot und Punktwolke, indem zu den verschiedenen Messzeitpunkten auf der x-Achse die Messwerte als Quadrate verzerrt über den Boxplot gelegt werden. Die Messwerte, die unter dem jeweiligen Referenzwert (Cut-off-Wert des Labors) liegen, werden als Nullwert dargestellt. Die Referenzwerte sind für die verschiedenen Subklassen nicht einheitlich. Sie betragen für IgG1 0,17 OD, für IgG2 0,01 OD, für IgG3 0,06 OD und für IgG4 0,03 OD. Die maximalen Werte treten für alle IgG-Subklassen im Monat 12 auf.

3.3.1 Anti-ML-1-IgG1

Der Median steigt für IgG1 zu jedem Messzeitpunkt an (Tab. 10). Die Streuung der Werte im Interquartilabstand (die Länge der Box) ist im Monat 18 am größten (Abb.14). Bereits zum Monat 3 liegt als „Ausreißer“ aus der Box mit ihren Whiskern ein Wert von 1,96 OD vor. Das Maximum wird im Monat 12 mit 2,2 OD erreicht. Die Werte sind zu den späteren Zeitpunkten so gestreut, dass z.B. im Monat 18 alle Werte von der Box mit ihren Whiskern umfasst werden.

Anti-ML-1-IgG1-Antikörper

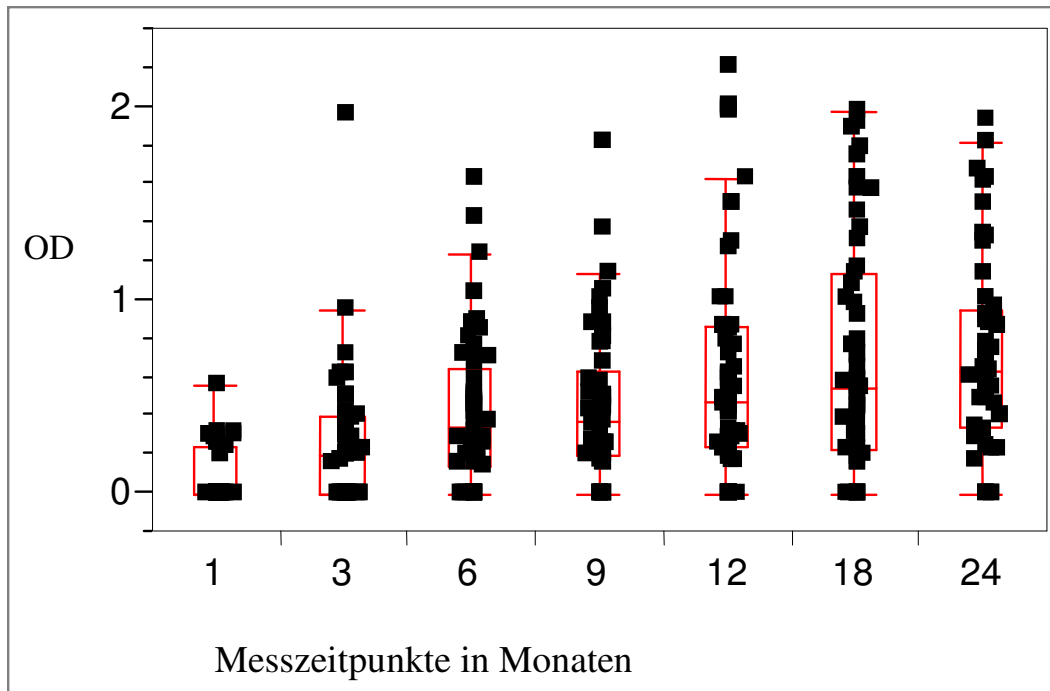


Abbildung 14: Verteilung der Messwerte für Anti-ML-1-IgG1 in OD (optischer Dichte) zu den einzelnen Messzeitpunkten während 24 Monaten. Der Referenzwert liegt bei 0,17 OD, darunterliegende Werte werden als 0 angegeben.

Monate	n	Min.	10%	25%	Median	75%	90%	Max.
1	37	0	0	0	0	0.245	0.302	0.56
3	52	0	0	0	0.195	0.4	0.62	1.96
6	52	0	0	0.17	0.34	0.65	0.887	1.63
9	49	0	0	0.195	0.37	0.63	1	1.82
12	52	0	0	0.235	0.47	0.8575	1.584	2.2
18	51	0	0	0.23	0.55	1.14	1.718	1.98
24	49	0	0	0.335	0.63	0.95	1.61	1.93

Tabelle 10: Deskriptive Statistik zu Abbildung 14 für IgG1

3.3.2 Anti-ML-1-IgG2

Wie schon von den Prävalenzkurven her zu erwarten, ist die Zahl der Nullwerte so groß, dass der Median und selbst noch das 75% Quartil stets bei Null liegt (Tab 11). Daher haben die Boxplots auch keine whisker und sind unter den Nullwerten praktisch nicht zu erkennen (Abb. 15).

Anti-ML-1-IgG2-Antikörper

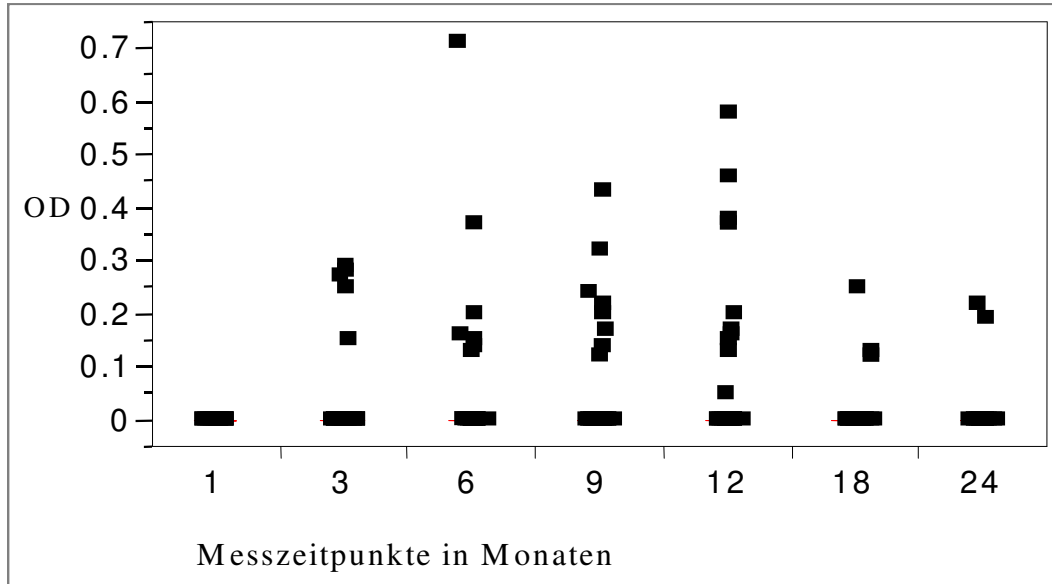


Abbildung 15: Verteilung der Messwerte für Anti-ML-1-IgG2 in OD (optischer Dichte) zu den einzelnen Messzeitpunkten während 24 Monaten. Der Referenzwert liegt bei 0,01 OD, darunterliegende Werte werden als 0 angegeben

Monate	n	Min.	10%	25%	Median	75%	90%	Max.
1	37	0	0	0	0	0	0	0
3	52	0	0	0	0	0	0.105	0.29
6	52	0	0	0	0	0	0.147	0.71
9	49	0	0	0	0	0	0.2	0.43
12	52	0	0	0	0	0	0.191	0.58
18	51	0	0	0	0	0	0	0.25
24	49	0	0	0	0	0	0	0.22

Tabelle 11: Deskriptive Statistik zu Abbildung 15 für IgG2

3.3.3 Anti-ML-1-IgG3

Wenngleich der Median für IgG3 nur einmal, nämlich im Monat 6 über Null ansteigt, bietet IgG3 doch im Monat 1 einmal den höchsten absoluten Wert innerhalb der Subklassen (Tab. 12). Auch das 90% Quantil liegt noch über dem von IgG1. Die absoluten Werte steigen noch bis zum Monat 12 an, während die Prävalenz von Werten über Null schon wieder seit Monat 6 abnimmt. Zum Monat 24 liegt dann nur noch ein Extremwert hoch über dem whisker (Abb. 16).

Anti-ML-1-IgG3-Antikörper

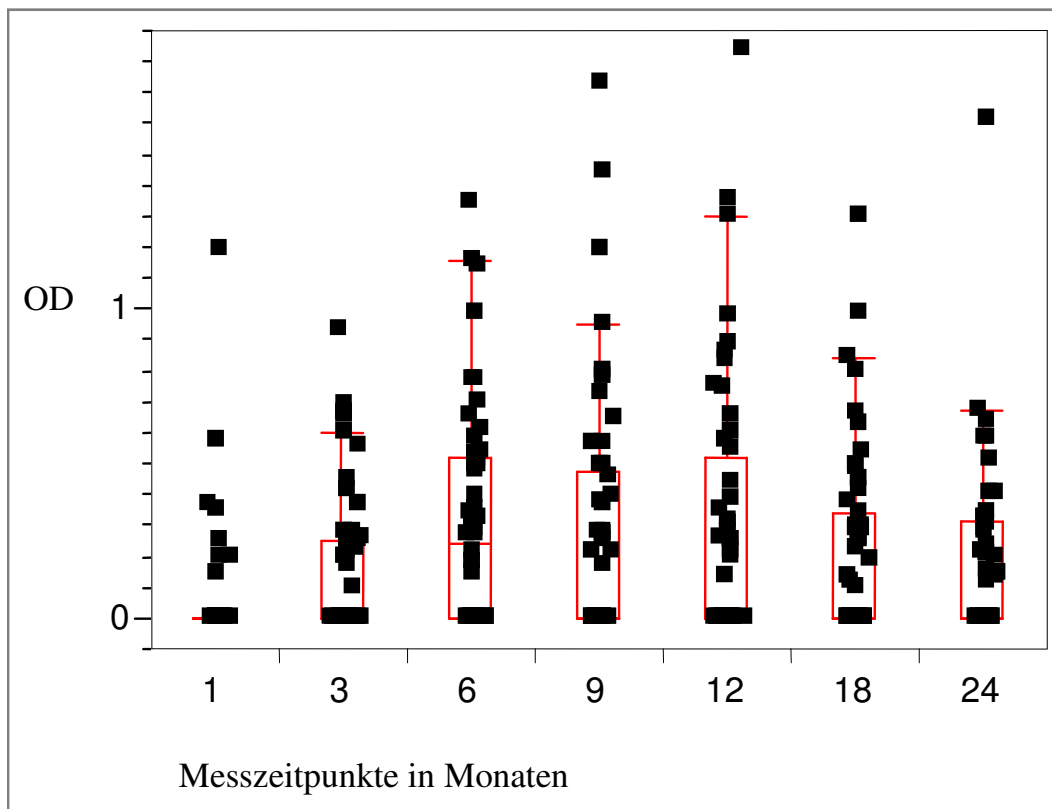


Abbildung 16: Verteilung der Messwerte für Anti-ML-1-IgG3 in OD (optischer Dichte) zu den einzelnen Messzeitpunkten während 24 Monaten. Der Referenzwert liegt bei 0,06 OD, darunterliegende Werte werden als 0 angegeben

Monate	n	Min.	10%	25%	Median	75%	90%	Max.
1	37	0	0	0	0	0	0.354	1.2
3	52	0	0	0	0	0.25	0.588	0.94
6	52	0	0	0	0.245	0.525	0.77	1.35
9	49	0	0	0	0	0.48	0.8	1.73
12	52	0	0	0	0	0.5225	0.881	1.84
18	51	0	0	0	0	0.34	0.662	1.3
24	49	0	0	0	0	0.315	0.59	1.62

Tabelle 12: Deskriptive Statistik zu Abbildung 16 für IgG3

3.3.4 Anti-ML-1-IgG4

Für IgG4 steigt Median ab Monat 12 und das 75% Quantil ab Monat 6 kontinuierlich an (Tab. 13). Die Boxplots sind deutlich nach oben verzerrt (Abb. 17). Wie bei IgG1 findet sich die längste Ausdehnung der Box mit Whiskern im Monat 18 und das absolute Maximum mit 2,2 OD im Monat 12. Das für IgG2 beschriebene weitgehende Fehlen von Werten knapp über dem Schwellenwert ist hier nicht so deutlich.

Anti-ML-1-IgG4-Antikörper

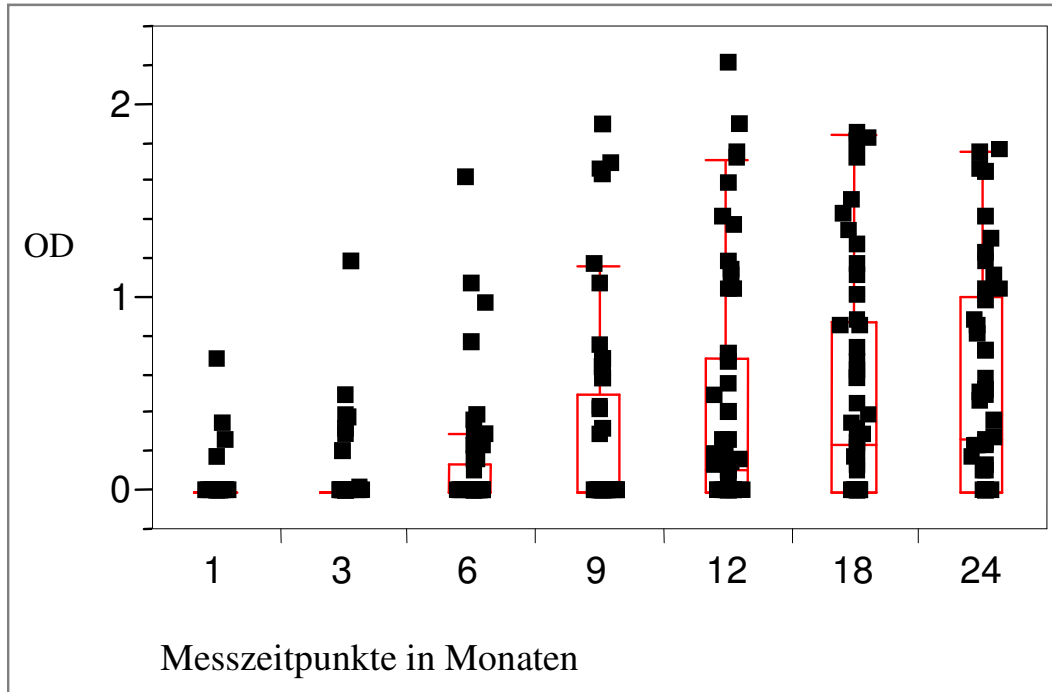


Abbildung 17: Verteilung der Messwerte für Anti-ML-1-IgG4 in OD (optischer Dichte) zu den einzelnen Messzeitpunkten während 24 Monaten. Der Referenzwert liegt bei 0,03 OD, darunterliegende Werte werden als 0 angegeben

Monate	n	Min.	10%	25%	Median	75%	90%	Max.
1	37	0	0	0	0	0	0.186	0.67
3	52	0	0	0	0	0	0.308	1.18
6	52	0	0	0	0	0.135	0.371	1.61
9	49	0	0	0	0	0.5	1.16	1.88
12	52	0	0	0	0.11	0.69	1.529	2.2
18	51	0	0	0	0.24	0.87	1.484	1.84
24	49	0	0	0	0.27	1.005	1.64	1.75

Tabelle 13: Deskriptive Statistik zu Abbildung 17 für IgG4

3.3.5 Eosinophile

Für die Eosinophilen gibt es im Unterschied zu den IgG-Subklassen keinen Schwellenwert, d.h. ein Wert mit Null entspricht einem Messwert Null. Außerdem liegen für die Eosinophilen auch zum Zeitpunkt 0 viele Messwerte vor (Tab. 14). Der Median ist zum Zeitpunkt 0 mit 0,1 /nl am niedrigsten und erreicht zum ersten Zeitpunkt nach Beginn der Misteltherapie seinen höchsten Wert von 0,3 /nl. Das Maximum liegt ebenfalls zum Zeitpunkt 1 bei 1,0 /nl. Eine nicht ganz durchgängige Gruppierung der Messwerte fällt auf, die im Folgenden Anlass gibt, nicht-parametrischen Verfahren zur statistischen Analyse den Vorzug zu geben (Abb. 18).

Eosinophile

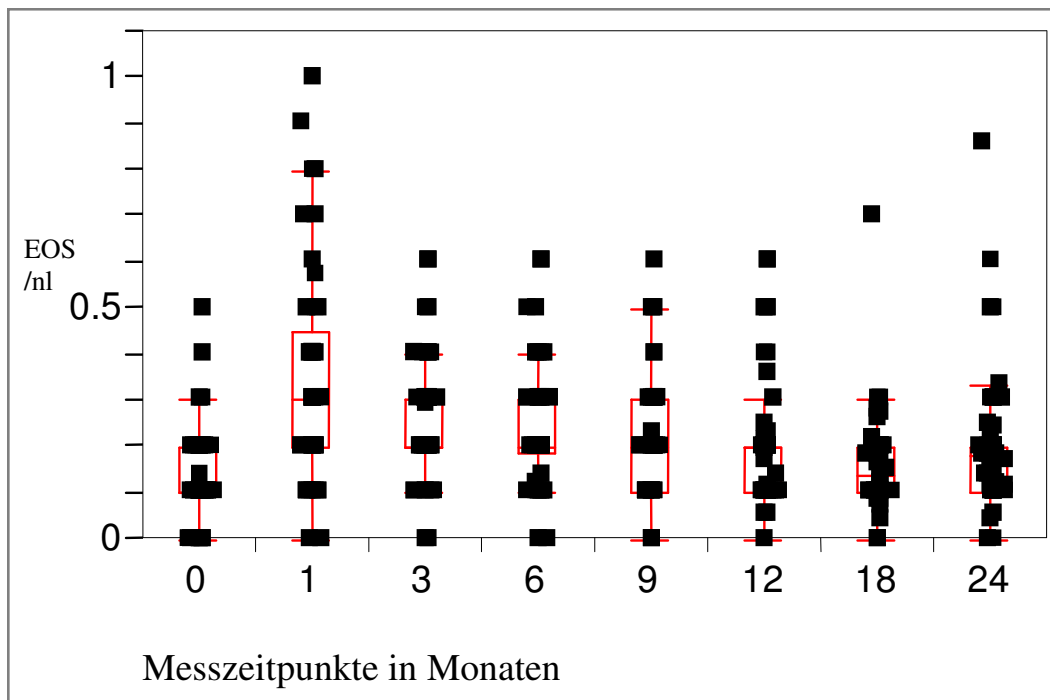


Abbildung 18: Verteilung der Messwerte für Eosinophile in Zellen/ nl zu den einzelnen Messzeitpunkten während 24 Monaten.

Monate	n	Min.	10%	25%	Median	75%	90%	Max.
0	50	0	0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5
1	45	0	0.1	0.2	0.3	0.45	0.74	1
3	49	0	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4	0.6
6	54	0	0.1	0.185	0.2	0.3	0.4	0.6
9	45	0	0.1	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6
12	52	0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.47	0.6
18	52	0	0.08	0.1	0.135	0.2	0.267	0.7
24	52	0	0.1	0.1025	0.18	0.2	0.321	0.86

Tabelle 14: Deskriptive Statistik zu Abbildung 18 für Eosinophile

3.4 Analytische Statistik

3.4.1 Eosinophile

3.4.1.1 Vergleich Eosinophile Zeitpunkt 0 und 1

Der Anstieg der Eosinophilen in den ersten Wochen einer Misteltherapie wurde auch in Voruntersuchungen beschrieben [67] und bestätigt sich in unserer Untersuchung (Abb. 19). Wir führten daher einen Wilcoxon-Test zur Prüfung auf statistische Signifikanz durch, der nicht die Absolutwerte, sondern die Ränge vergleicht. Der Unterschied ist hoch signifikant ($p < 0,0001$)

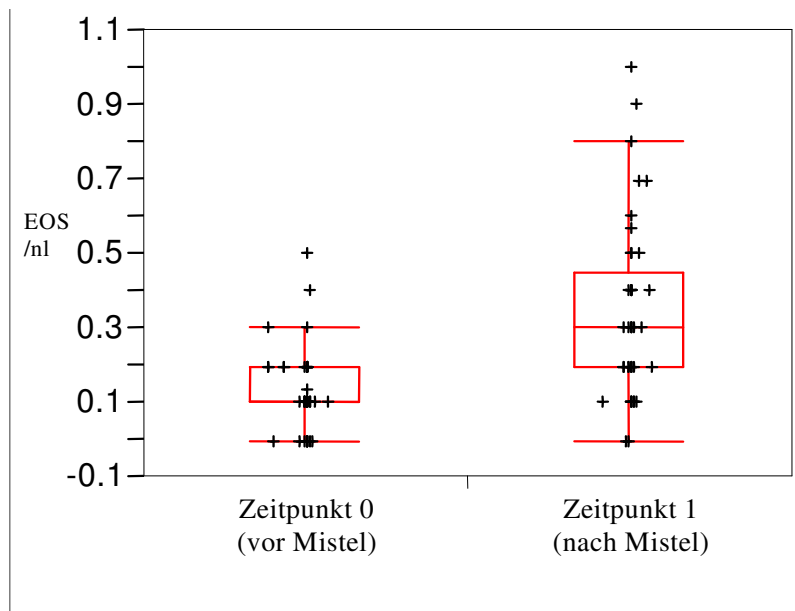


Abbildung 19: statistisch signifikanter Anstieg der Eosinophilen zu Beginn der Behandlung mit AM ($p < 0,0001$) im Wilcoxon- Test (Rangsummen)

3.4.1.2 Vergleich Eosinophile Zeitpunkt 0 und 24

Auch die nach 24 Monaten unter Misteltherapie vorliegenden Eosinophilenzahlen unterscheiden sich von der Ausgangssituation so deutlich (Abb. 20), dass auch nach einer Korrektur für multiples Testen (gefordertes Signifikanzniveau p statt 0,05 jetzt 0,025) noch eine Signifikanz vorliegt ($p = 0,0068$).

Vergleich Eosinophile Zeitpunkt 0 und 24

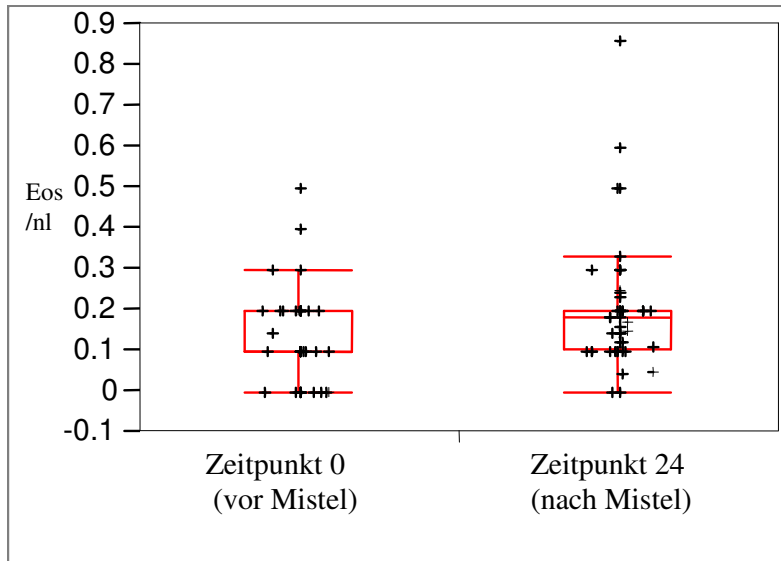


Abbildung 20: geringerer, jedoch statistisch noch signifikanter Anstieg der Eosinophilen nach 24 Monaten Behandlung mit AM ($p < 0,007$ im Wilcoxon Rank Sums Test)

3.4.2 Beschreibung der individuellen Anti-ML1-IgG-Verläufe durch Geradensteigungen

Die Eigenart der individuellen Verläufe der Anti-ML1-IgG-Subklassen wird durch die bisherigen Auswertungen nicht abgebildet. Bei einer Betrachtung der Einzelverläufe fällt eine große individuelle Variationsbreite in Bezug auf die Titerhöhe auf, nicht selten kommt es auch zwischen zwei deutlich positiven Titern wieder zu einem Wert unter dem Schwellenwert. Legt man bei einer nicht logarithmischen Skala Näherungsgeraden durch die einzelnen Verläufe, zeigen die Steigungen dieser Geraden eine solche Streuung, dass die Annahme einer Normalverteilung dieser Steigungen nicht in Frage kommt.

Eine gewisse Vergleichbarkeit der Einzelverläufe für IgG-Subklassen zwischen den Zeiträumen 3 und 24 wird erreicht, wenn man die Verläufe mit logarithmischer Skala für die IgG-Subklassen-Werte aufträgt und die Steigung der den Einzelverlauf am besten beschreibenden Geraden berechnet. Die Steigung m dieser Geraden in einem logarithmisch skalierten Verlaufsdiagramm ist in der Abbildung auf der x-Achse abzulesen. Die Höhe der Säulen entspricht der Anzahl Fälle, die dieser Geradensteigung entsprechen. Da zum Zeitpunkt 1 relativ die meisten fehlenden Werte vorliegen (17 von 54 fehlen), musste dieser Zeitpunkt für diesen Test ausgeschlossen werden. Die Steigung bezieht sich also nur auf den Zeitraum 3 bis 24.

3.4.2.1 IgG1

Für IgG1 zeigt das Histogramm eine annähernde Normalverteilung der Patientengeraden in logarithmischer Skalierung (Abb. 21). Das Ansteigen der Antikörpertiter zwischen Zeitpunkt 3 und 24 ist hochsignifikant ($p < 0,0001$). Der Mittelwert aller Geradensteigungen ist 0,015 (Tab. 15). Delogarithmisiert entspricht dies einem Wert von 1,035 oder einem mittleren Anstieg von 3,5% pro Monat oder 51% pro Jahr. Auf den beiden Skalen rechts im Diagramm wird erst die Anzahl der Beobachtungen und dann die relative Häufigkeit der Beobachtungen angegeben (Abb. 21).

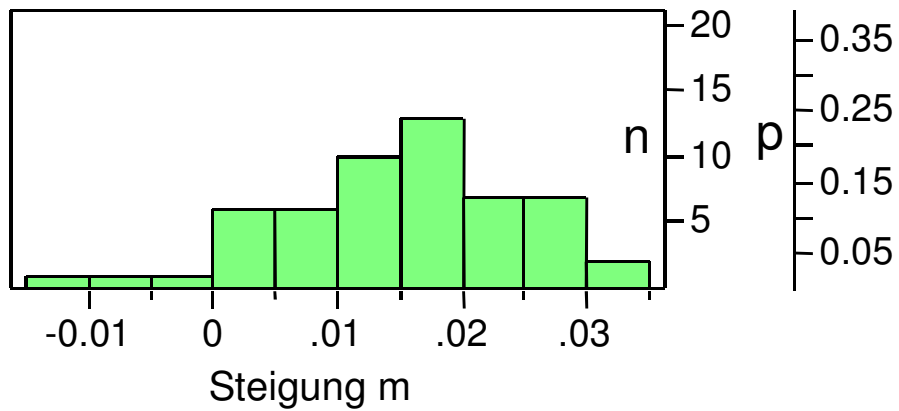


Abbildung 21: Histogramm der logarithmischen Anti-ML1-IgG1-Geradensteigungen m für jeden Patienten (n = Anzahl Beobachtungen; p = Wahrscheinlichkeit der Beobachtung)

Quantil			Verteilungsmaße	
100.0%	Maximum	0.0310	Mittelwert	0.0150027
99.5%		0.0310	Standardabweichung	0.0096835
97.5%		0.0308	mittl. Standardfehler	0.0013178
90.0%		0.0273	oberes 95%	0.0176458
			Konfidenzintervall des Mittelwertes	
75.0%	Quartil	0.0224	unteres 95%	0.0123596
			Konfidenzintervall des Mittelwertes	
50.0%	Median	0.0166	N	54
25.0%	Quartil	0.0083		
10.0%		0.0020		
2.5%		-0.0112		
0.5%		-0.0147		
0.0%	Minimum	-0.0147		

Tabelle 15: Quantile und Verteilungsmaße für IgG1-Verläufe als Geradensteigungen

IgG2 und IgG3

IgG2 und IgG3 zeigen in dem beobachteten Zeitfenster (3 bis 24) keine einheitliche Tendenz in ihren Steigungen, sodass die Ergebnisse für die Berechnung eines Mittelwertes statistisch nicht signifikant sind. Der p-Wert liegt für IgG2 bei 0,06 und für IgG3 bei 0,5.

3.4.2.2 IgG4

Für IgG4 ist der Anstieg zwischen Zeitpunkt 3 und 24 hochsignifikant ($p < 0,0001$). Die mittlere Geradensteigung beträgt 0,0378 (Tab. 16) und delogarithmisiert 1,091. Hierin drückt sich aus, dass IgG4 den größeren Teil seines Anstieges zum Zeitpunkt 3 erst beginnt, während IgG1 schon einen guten Teil zwischen Zeitpunkt 0 und 3 vollbracht hat. Entsprechend ist die mittlere prozentuale Erhöhung je Monat höher. Sie liegt bei 9,1% im Monat oder 184% im Jahr. Für IgG4 zeigt das Histogramm in logarithmischer Skalierung jedoch keine Normalverteilung der Patientengeraden (Abb. 22).

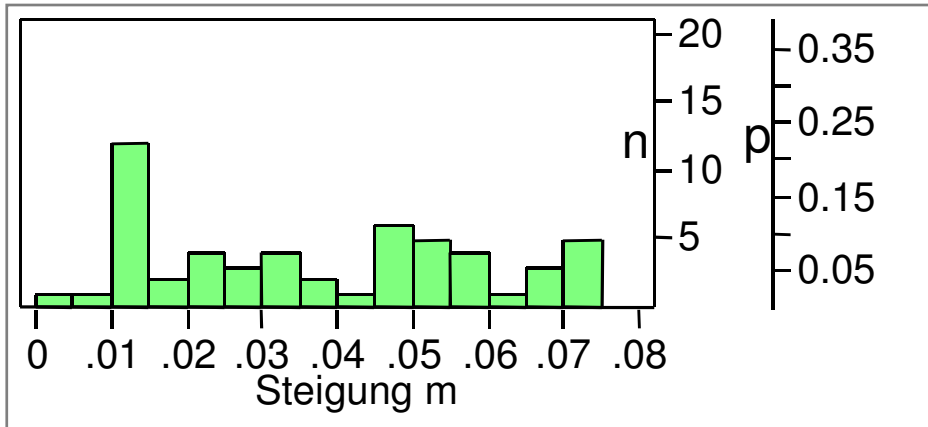


Abbildung 22: Histogramm der logarithmischen Anti-ML1-IgG4-Geradensteigungen m für jeden Patienten (n = Anzahl Beobachtungen; p = Wahrscheinlichkeit der Beobachtung)

Quantil			Verteilungsmaße	
100.0%	Maximum	0.07300	Mittelwert	0.0377778
99.5%		0.07300	Standardabweichung	0.0215104
97.5%		0.07269	mittl. Standardfehler	0.0029272
90.0%		0.07024	oberes 95%	0.043649
			Konfidenzintervall des Mittelwertes	
75.0%	Quartil	0.05446	unteres 95%	0.0319065
			Konfidenzintervall des Mittelwertes	
50.0%	Median	0.03620	N	54
25.0%	Quartil	0.01313		
10.0%		0.01295		
2.5%		0.00310		
0.5%		0.00168		
0.0%	Minimum	0.00168		

Tabelle 16 :Quantile und Verteilungsmaße für IgG4-Verläufe als Geradensteigungen

3.4.2.3 Scatterplot Matrix für die Korrelation der Geradensteigungen

Da IgG1 und IgG4 mit jeweils einer anderen Polarisierung des Immunsystems auf der TH-Ebene korrelieren, stellte sich die Frage, ob ein gegensinniger oder gleichsinniger Zusammenhang zwischen den Verläufen beider Parameter bei einzelnen Individuen dominiert. Zu diesem Zweck wurden die logarithmischen Steigungen in einem Scatterplot aufgezeichnet und multivariat eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Es ergab sich eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation, der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,2996. Dies zeigt sich an der breit gestreuten Punktwolke mit wenig gestreckter Ellipse (Abb. 23).

Scatterplot der Korrelation der individuellen Geradensteigungen für IgG1 und IgG4

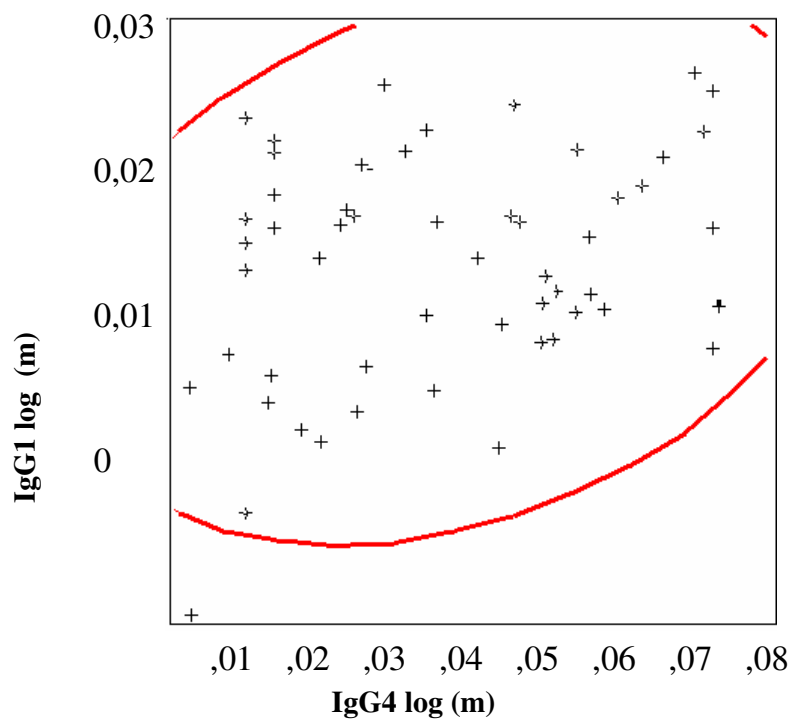


Abbildung 23: Scatterdiagramm der logarithmischen Geradensteigungen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,2996

3.4.3 Bivariate Korrelationen der Mittelwerte (Monate 3 bis 24)

Aus dem Wunsch, einen ersten Überblick über mögliche Korrelationen der bestimmten Parameter zu haben, wurde eine bivariate Korrelationsanalyse mit den Mittelwerten der einzelnen Patienten durchgeführt. Für die Berechnung der Mittelwerte der IgG-Subklassen wurden die Messzeitpunkte 0 und 1 wegen vermehrt fehlender Werte (s.o.) nicht herangezogen. Eine hochsignifikante positive Korrelation mit einem Koeffizienten von 0,4993 wurde zwischen IgG1 und IgG4 gefunden. Ebenfalls signifikant positiv waren die Beziehungen zwischen IgG2 und IgG3 sowie zwischen IgG2 und IgG4 (Tab. 17). Die Beziehung zwischen Eosinophilen und IgG erreichte bei keiner Subklasse einen erheblichen Grad.

Mittelwert (Zeitpunkte 3-24)		Korrelations- koeffizient	n	p-Wert	Stärke der Korrelation
Variable 1	Variable 2				
IgG1	EOS	-0.0961	54	0.4894	--
IgG2	EOS	-0.1060	54	0.4455	----
IgG2	IgG1	0.2010	54	0.1450	+++++++
IgG3	EOS	0.0473	54	0.7342	
IgG3	IgG1	0.1120	54	0.4199	++++
IgG3	IgG2	0.4059	54	0.0023	+++++
IgG4	EOS	-0.0041	54	0.9763	
IgG4	IgG1	0.4993	54	0.0001	+++++
IgG4	IgG2	0.3577	54	0.0079	+++++
IgG4	IgG3	0.1408	54	0.3099	++++

Tabelle 17: Korrelationsanalyse auf einer nicht-logarithmischen Skala (als Variablen die Anti-ML-1-IgG-Subklassen und die Eosinophilen Granulozyten)

3.4.4 Beziehung der Eosinophilen zum Verlauf

3.4.4.1 Regressionsanalyse

Aus Gründen der statistischen Auswertbarkeit mußten für die vorhandene Fallzahl die gebildeten Verlaufskategorien für die nicht auffälligen Verläufe zusammengefaßt werden. Die Mittelwerte der einzelnen Patienten wurden als unabhängige Variablen für das Risiko, einen auffälligen Verlauf zu haben, einer logistischen Regression unterworfen. Dabei ergab sich für die Eosinophilen ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,0056$). In Abbildung 24 entspricht das Verhältnis einer gedachten senkrechten Strecke oberhalb der geschwungenen Linie zu einer senkrechten Strecke unterhalb der

geschwungenen Linie der Wahrscheinlichkeit, bei einem bestimmten Mittelwert der Eosinophilen in die obere Gruppe ($VS>1$) zu fallen (= Odds). Deutlich ist, dass dieses Risiko für einen auffälligen Verlauf mit steigenden Eosinophilen zunimmt (Abb. 24). Vergleicht man das oben genannte Verhältnis für unterschiedliche Eosinophilenmittelwerte, was mathematisch der Bestimmung der Odds-Ratio (siehe auch S. 30) entspricht, so ergibt sich eine Verdreifachung des Risikos mit jeder Zunahme des Mittelwertes um 0,1 /nl.

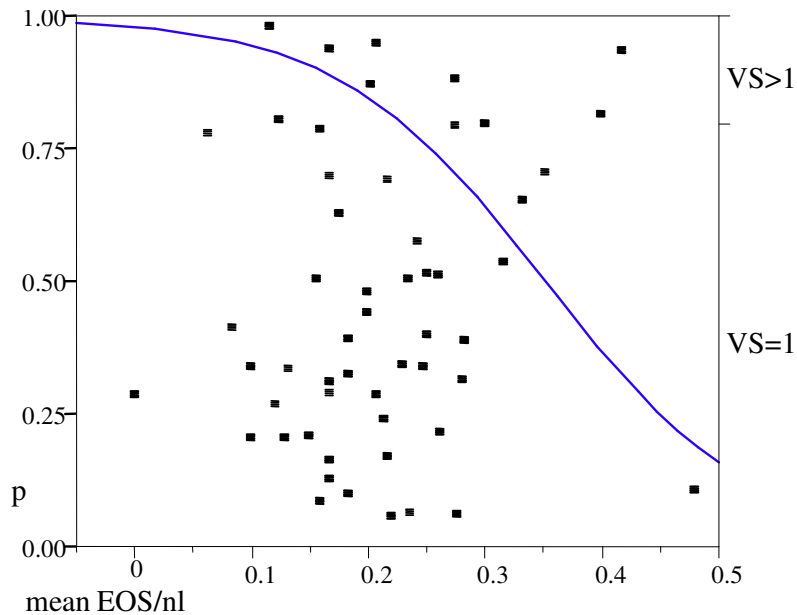


Abbildung 24: Regressionsanalyse der mittleren Eosinophilenwerte mit dem Verlauf. Die Datenpunkte sind vertikal verzerrt zur Darstellung gebracht. Die Wahrscheinlichkeit p , ein Rezidiv oder einen Verdacht auf ein Rezidiv zu erleiden, steigt mit höheren mittleren Eosinophilenwerten signifikant ($p<0,006$).

3.4.4.2 Kontingenzanalyse

Werden zur Analyse nicht die Mittelwerte der Eosinophilen als quantitatives Merkmal herangezogen, sondern zwei Klassen gebildet, deren eine die Fälle mit maximalen Eosinophilenzahlen gleich oder kleiner 0,4/nl und deren andere die mit maximalen Eosinophilenzahlen größer 0,4/nl enthält, kann man zur Testung auf eine Korrelation mit einem weiteren qualitativen Merkmal (hier: Verlauf unauffällig oder auffällig) eine Kontingenztafel wählen, in der die gemeinsame Häufigkeitsverteilung tabellarisch dargestellt wird. In dem folgenden Diagramm (Abb.25), das die Kontingenztafel

abbildet (Tab. 18), findet sich entsprechend dem obigen Ergebnis ein höherer Anteil von Patienten mit $VS > 1$ in der Gruppe mit Eosinophilen $> 0,4/nl$. Der Unterschied ist in diesem Fall jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,3001$ im Likelihood-ratio-Test). Die Beziehung zwischen Eosinophilen und Verlauf ergibt, von zwei ähnlichen Standpunkten aus angeschaut, also einmal ein Ergebnis mit und einmal eines ohne statistische Signifikanz.

Mosaik-Diagramm der Kontingenztabelle

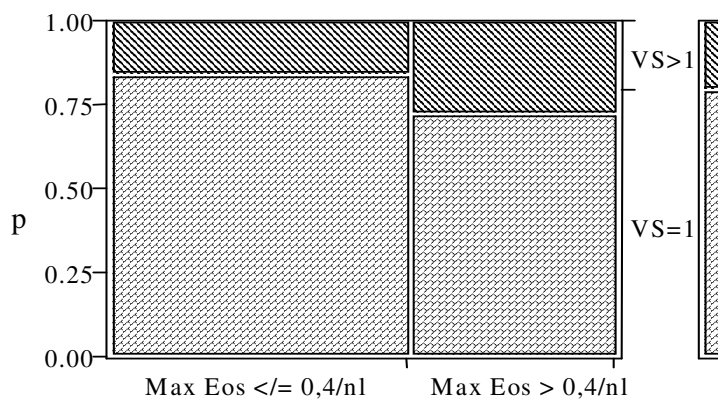


Abbildung 25: Kontingenztabelle zur Prüfung, ob eine Zugehörigkeit zur Gruppe mit maximalen Eosinophilenwerten $> 0,4/nl$ die Wahrscheinlichkeit verringert, einen unauffälligen Verlauf ($VS=1$) durchzumachen.

Kontingenztabelle

	VS = 1	VS > 1	N
Max. Eos. $\leq 0,4/nl$ (N)	27	5	32
in %	84.38	15.63	100
Max. Eos. $> 0,4/nl$ (N)	16	6	22
in %	72.73	27.27	100
N	43	11	54

Tabelle 18: Kontingenztabelle für unauffälligen ($VS=1$) oder auffälligen ($VS>1$) Verlauf versus Erreichen oder Nichterreichen eines Schwellenwertes von $0,4 Eos/nl$.

3.5 Weitere, nicht signifikante Ergebnisse

- Die logistische Regressionsanalyse auf einen Zusammenhang zwischen Mittelwerten oder Maximalwerten der IgG-Subklassen mit dem dichotomisierten Verlauf ($VS = 1$ oder $VS > 1$) ergab keine signifikanten Ergebnisse.
- In der explorativen statistischen Analyse konnte keine Korrelation der Mittelwerte von Eosinophilen oder IgG-Subklassen mit dem Alter gefunden werden.
- Eine Unterteilung der Patientinnen in solche, die teilweise überlappend mit der Misteltherapie eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben und solche, die keine Chemotherapie erhalten haben, ergab keine signifikanten Unterschiede für Eosinophile oder IgG-Subklassen.
- Es fand sich jedoch eine einheitliche leichte Tendenz zu niedrigeren Werten für Eosinophile oder IgG-Subklassen in der Gruppe ohne Chemotherapie.
- Es fehlte ein signifikanter Effekt einer Radiotherapie oder Hormontherapie auf die Maxima von Anti-ML1-IgG1 oder IgG4. Tendenziell waren die Maxima für IgG1 und IgG4 in der Gruppe mit Hormontherapie höher als in der ohne Hormontherapie.
- Auch der erhobene Status in der Allergianamnese war nicht signifikant korreliert mit der Höhe der mittleren Eosinophilen oder den Maxima der IgG-Subklassen.

3.6 Stammdatentabelle

Patientin	Alter	Allergie	risk	Stadium	T	N	Grad	ED	AM	CT	RT	HT	VS
1	48	1		I	1	1	1	Dez 95	Jan 96	2	1	3	1
2	40	1	4	IIb	2	2	3	Aug 95	Nov 95	1	2	2	1
3	76	3	4	IIa	1	2	3	Feb 96	Apr 96	1	1	1	1
4	63	1	4	IIa	1	2	3	Dez 95	Okt 96	1	1	1	1
5	47	3	3	IIa	2	1	3	Jun 96	Jul 96	1	2	2	5
6	60	1	4	IIb	2	2	2	Aug 96	Sep 96	1	1	2	1
7	54	1	4	IIa	1	2	2	Dez 95	Nov 96	1	1	2	1
8	59	1	2	I	1	1	1	Aug 96	Okt 96	2	1	1	1
9	43	1	2	I	1	1	2	Sep 96	Okt 96	2	2	2	1
10	76	4	3	IIb	3	1	2	Jul 96	Nov 96	2	1	1	2
11	43	3	4	IIa	1	2	2	Jun 97	Aug 97	1	1	1	1
12	48	4	4	IIb	2	2	2	Sep 96	Feb 97	1	2	2	1
13	66	3	3	IIa	2	1	2	Nov 96	Feb 97	2	2	1	4
14	50	4	3	IIa	2	1	3	Jan 96	Feb 97	1	1	1	1
15	46	1	4	IIb	2	2	2	Feb 97	Apr 97	1	1	3	1
16	48	1	3	I	1	1	3	Mrz 97	Mai 97	1	2	2	1
17	72	1	3	I	1	1	3	Mai 97	Jun 97	2	1	2	1
18	61	2	4	IIb	2	2	2	Apr 97	Aug 97	1	1	1	5
19	52	1	2	I	1	1	2	Aug 97	Sep 97	2	2	2	3
20	62	4	4	IIa	1	2	2	Apr 97	Okt 97	2	1	2	1
21	59	1	4	IIa	1	2	2	Sep 97	Okt 97	1	1	1	1
22	61		4	IIIa	3	2	2	Okt 95	Jan 98	1	1	1	4
23	53	1	4	IIa	1	2	1	Dez 97	Dez 97	1	1	1	1
24	78	1	2	I	1	1	2	Sep 96	Jan 98	2	2	1	1
25	55	3	2	I	1	1	2	Dez 97	Dez 97	2	2	2	1
26	51	1	3	IIIb	4	1	2	Feb 97	Feb 98	1	1	1	1
27	71	1	4	IIb	2	2	3	Nov 97	Jan 98	1	1	1	1

Stammdatentabelle Fortsetzung

Patient	Alter	Allergie	risk	Stadium	T	N	Grad	ED	AM	CT	RT	HT	VS
28	41		3	I	1	1	3	Okt 97	Feb 98	1	2	2	1
29	50	1	2	I	1	1	2	Mai 97	Feb 98	2	1	1	1
30	92	1	4	IIa	1	2	3	Aug 96	Feb 98	1	2	1	1
31	62	1	4	IIa	1	2	2	Dez 97	Feb 98	1	2	1	1
32	64	1	2	I	1	1	2	Mrz 98	Feb 98	2	1	1	1
33	43	1	4	IIIa	3	2	2	Apr 97	Mrz 98	1	1	2	2
34	44	1	4	IIb	2	2	2	Mrz 96	Mrz 98	1	1	3	1
35	50	1	1	I	1	1	1	Mrz 98	Mrz 98	2	1	2	1
36	60	4	1	I	1	1	1	Mrz 97	Mai 98	2	1	1	1
37	70	1	4	IIIb	4	2	2	Apr 98	Mai 98	2	1	1	1
38	51	1	4	IIa	1	2	2	Mai 98	Jul 98	1	1	1	1
39	52	1	2	I	1	1	2	Jul 98	Aug 98	2	1	1	2
40	47	1	4	IIb	2	2	2	Jan 98	Sep 98	1	1	1	3
41	51	4	4	IIIa	3	2		Jul 97	Sep 98	1	1	2	1
42	60	3	2	I	1	1	1	Jun 98	Sep 98	2	1	1	1
43	74	1	3	I	1	1	2	Aug 98	Sep 98	2	2	1	1
44	47	1	3	IIa	1	1	1	Jul 98	Okt 98	1	1	2	1
45	51	1	4	IIIa	2	2	3	Feb 98	Dez 98	1	1	1	2
46	71	3	2	I	1	1	1	Okt 98	Nov 98	2	2	1	1
47	58	2	4	IIb	2	2	2	Jun 98	Dez 98	1	1	1	1
48	63	4	3	IIa	2	1	2	Sep 98	Dez 98	2	1	1	1
49	59	2	3	I	1	1	2	Dez 98	Dez 98	1	1	1	1
50	62	3	4	IIb	2	2	2	Aug 98	Jan 99	1	1	1	1
51	41	1	2	I	1	1	1	Jul 98	Jan 99	2	1	1	1
52	69	1	3	I	1	1	3	Dez 98	Feb 99	1	2	1	2
53	41	4	4	IIa	1	2	3	Jan 99	Feb 99	1	1	2	1
54	35	1	3	IIa	2	1	2	Jul 98	Feb 99	1	1	1	1

Tabelle

19:

Stammdatenblatt.

Dokumentation zur Stammdatentabelle:

Patient	Nummerierung
Alter	in Jahren, zum Stichtag 1.9.2001
Allergie	1 für leere Anamnese; 2 für Allergie nur in Familienanamnese; 3 für allergische Episode in eigener Anamnese; 4 für atopische Disposition in eigener Anamnese
risk	1 bis 3 für nodal negative Patientinnen, 1=low, 2=medium, 3=high 4 für nodal positive Patientinnen
Stadium	Stadieneinteilung nach TNM-Kriterien
T	Tumorgöße (TNM analog)
N	Lymphknotenbefall (TNM analog)
Grad	Histologisches Grading von 1 bis 3
ED	Monat der Erstdiagnose
AM	Monat des Behandlungsbeginnes mit ABNOBAviscum Mali ®
CT	1 für adjuvante Chemotherapie, 2 für keine Chemotherapie
RT	1 für Radiotherapie, 2 für keine Radiotherapie
HT	Hormontherapie: 1 für Tamoxifen, 2 für keine Hormontherapie, 3 für Ovariectomie oder GnRH-Analoga
VS	Verlaufsschlüssel: 1 für ohne Anhalt für Rezidiv; 2 für angestiegene Tumormarker oder Verdacht auf Metastase; 3 für Lokalrezidiv; 4 für Fernmetastase; 5 für verstorben an Mammakarzinom

4 *Diskussion*

4.1 **Diskussion der Methoden**

4.1.1 Patientengruppe

Bisherige Untersuchungen über Anti-ML-1-IgG-Subklassen im Verlauf einer Misteltherapie beziehen sich auf kürzere Zeiträume und kleinere Patientengruppen als in der vorliegenden Untersuchung [40, 94, 140]. 73% aller im Beobachtungszeitraum behandelten Patientinnen mit der Diagnose Mammakarzinom konnten nicht in die Untersuchung aufgenommen werden, da aus unterschiedlichen Gründen nicht in den geforderten Intervallen Laboruntersuchungen vorlagen. Wenngleich nichts auf einen systematischen Faktor hinweist, sind die Gründe für diese Andersbehandlung nicht im einzelnen erfasst, sodass strenggenommen von unserer Untersuchung nicht auf eine Grundgesamtheit geschlossen werden kann.

Der Beobachtungszeitraum, über welchen Anhaltsmomente für ein Rezidiv registriert wurden, ist bei den Patientinnen unterschiedlich lang und variiert zwischen 31 und 69 Monaten ab Beginn der Misteltherapie. Der mögliche Wunsch, Laborparameter auch über einen längeren Zeitraum als 24 Monate zu vergleichen, wird dadurch erschwert, dass nach dieser Zeit in der Praxis das weitere Vorgehen hinsichtlich der Misteltherapie weniger schematisch und nach Gewichtung unterschiedlicher Gesichtspunkte erfolgt, wobei oft Therapiepausen von mehreren Monaten Dauer oder länger eingeschaltet werden. Möglicherweise könnte hier durch den Einbezug der kumulativen Mistellektin-Dosis in weiteren Untersuchungen eine Vergleichbarkeit ermöglicht werden.

Das Mammakarzinom ist das häufigste Karzinom der Frau und stellt einen hohen Anteil der onkologischen Patienten einer Praxis, sodass innerhalb weniger Jahre eine ausreichende Fallzahl erreicht werden kann. Im Sinne einer retrospektiven Anwendungsbeobachtung wurden zum Stichtag der Untersuchung gewisse einschränkende Einschlussbedingungen definiert, um das sehr heterogene Patientengut zu vereinheitlichen. Es sollte neben einer deskriptiven Auswertung der Laborparameter unter Erstbehandlung mit VAE innerhalb der ersten 2 Jahre auch im Rahmen des Möglichen ein Bezug der Laborwerte auf den weiteren klinischen Verlauf hergestellt

werden, wenn auch in dem Bewusstsein, dass die vorliegenden Fallzahlen bei einer typischerweise niedrigen Rezidivrate des Mammakarzinoms im Beobachtungszeitraum noch keinen Einbezug einer statistisch zuverlässigen Anzahl von Rezidivfällen erlauben würden.

In Anlehnung an die Empfehlungen der Kommission C zur Therapie mit *Viscum album* ist eine individuelle Dosisfindung, die sich an beobachtbaren Parametern orientiert, erforderlich [91]. Dadurch ist jedoch eine im üblichen Sinne vereinheitlichte Behandlung nicht praktikabel. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionslage des Immunsystems auf die Inhaltsstoffe von VAE orientiert sich die Behandlung nicht primär an einer möglichst identischen Applikationsdosis und Applikationsfrequenz, sondern lässt einen Variationsrahmen zu mit dem Ziel, eine vergleichbare, mäßig starke Immunreaktion zu erhalten. Unter den Bedingungen einer Praxis ist eine vollständige Einhaltung der beabsichtigten Untersuchungs- und Behandlungsschemata kaum praktikabel. Von einem systematischen Fehler bei der Datenerhebung ist insofern aber nicht auszugehen, als versucht wurde, prinzipiell bei allen Patientinnen mit Mammakarzinom in gleicher Weise vorzugehen.

4.1.2 Studienpräparat

Das verwendete Mistelpräparat ABNOBAviscum Mali gehört zu den lektinreichen Präparaten und steht in einer prozessstandardisierten Form zur Verfügung. Im Unterschied zu anderen Präparaten ist die Fertigungsweise der ABNOBA in besonderer Weise dazu geeignet, Zellmembranbestandteile in kolloidaler Form als Mikrovesikel (Liposomen) in die Presssaft-Präparation mit einzubringen, wodurch bei subkutaner Injektion möglicherweise die Interaktion der vesikelgebundenen immunogenen Inhaltsstoffe mit den Zellen des Immunsystems beeinflusst wird. Eine vermehrte Bildung von Anti-ML-1-IgE bei ABNOBAviscum Mali ist beschrieben [138]. Da es sich um eine Anwendungsbeobachtung über mehrere Jahre handelt, wurde nicht eine bestimmte Charge, sondern die handelsüblichen Chargen des Präparats in den Jahren von 1995 bis 2000 verwendet, die aufgrund einer sorgfältigen Prozessstandardisierung der Herstellung ein hohes Maß an Chargenkonstanz hinsichtlich des Gesamtlektingehaltes besitzen [130].

4.1.3 Laboruntersuchungen

Die Laboruntersuchungen zu den Anti-ML-1-IgG-Subklassen finden seit 1995 routinemäßig in einer Laborärztepraxis statt und unterliegen einer zertifizierten Qualitätskontrolle. Der ELISA-Test wird in diesem Kontext als zuverlässige Messmethode angesehen. Ein möglicher Störfaktor könnte sich geltend machen, wenn bei Patienten fälschlich eine Erstexposition mit Mistel angenommen wird. Liegt bereits eine frühere, nicht erinnerliche Exposition vor, könnte ein Titeranstieg schneller als bei Erstexposition erfolgen. Da aus ökonomischen Gründen eine Bestätigung der anzunehmenden Seronegativität für Anti-ML-1 vor Behandlungsbeginn nicht erfolgte, ist eine Überschätzung der Serokonversionsrate zum Monat 1 nicht sicher auszuschließen.

Wie für Antikörpertiter üblich, sind auch die Messwerte der Anti-ML-1-IgG-Subklassen nicht normalverteilt. Daher sollte bei der Festlegung von Antikörper-Referenzwerten nicht auf Standardabweichungen zurückgegriffen werden, sondern auf Perzentilen, z.B. bei Gesamt-IgG-Subklassen auf die 2,5. und die 97,5. Perzentile [47], bei spezifischen Subklassen ggf. strenger. Dies wurde von dem auswertenden Labor in unserer Arbeit anders gehandhabt, indem in einer Untersuchung an nicht exponierten Probanden als Cut-off Wert der Mittelwert plus die doppelte Standardabweichung definiert wurde und darunterliegende Werte als zensierte Werte mit „kleiner/gleich Cut-off“ herausgegeben wurden. In der Festlegung von starken Respondern verwendeten wir dann dasselbe Prinzip und definierten als starken Responder die Patientinnen mit einem Wert oberhalb des Mittelwertes plus der 4-fachen Standardabweichung des nicht exponierten Kontrollkollektives. Stettin, Schultze et al. wählten 1990 in ihrer Publikation über Anti-ML-AK den 3fachen Wert des Medians als Cut-off-Wert [143].

Die Weiterleitung der Laborergebnisse an die Gemeinschaftspraxis hat sich aus technischen Gründen im Verlauf der Untersuchung geändert. In diesem Zuge ist es auch zu einer Umstellung der Datenform für die Eosinophilen Leukozyten von anfangs klassierten Werten in Abständen von 0,1/nl zu später diskreten Werten gekommen, die sich in der Untersuchung mischen. Da es sich hierbei um eine mathematische Rundung handelt, ist nicht von einer systematischen Beeinflussung der Mittelwerte auszugehen.

4.1.4 Statistische Auswertung

Für eine aussagekräftige statistische Auswertung ist die Patientenzahl von 54 genügend groß, jedoch entsteht bei der vergleichenden Betrachtung von Subgruppen rasch eine zu geringe Gruppengröße. Aus diesem Grund mussten die differenziert erhobenen Daten der Einflussgrößen nachträglich teilweise wieder zusammengefasst werden, so etwa beim Bezug der Tumorstadien auf die Messgrößen (IgG-Subklassen, Eosinophile und Verlauf) und beim Bezug des Verlaufes auf die Laborwerte. Hier war eine Zusammenfassung aller Abstufungen von Verdachtsmomenten auf ein Rezidiv (z.B. Anstieg der Tumormarker) bis hin zu tumorbedingtem Tod in eine Gruppe unumgänglich, um überhaupt eine Untergruppe von 11 Patientinnen aufzustellen, die gegen die Gruppe der unauffälligen (rezidivfreien) Verläufe verglichen wurde. Die auf dieser Gruppenbildung fußenden statistischen Aussagen müssen naturgemäß kritisch hinterfragt werden und können im Grunde nur als Denkanstöße für weitere Untersuchungen verwendet werden. Diese müssten für das nicht fortgeschrittene Mammakarzinom eine deutlich größere Zahl an Patienten umfassen oder sich auf eine Karzinomerkrankung mit schlechterer Prognose innerhalb der ersten Jahre beziehen, um eine statistisch genügende Zahl von gesicherten Rezidivfällen einzuschließen. In diesem Sinne kann mit der vorliegenden Arbeit zwar die bisher breiteste Datengrundlage über den Verlauf der Anti-ML-1-IgG-Subklassen und der Eosinophilen in den ersten zwei Jahren einer Misteltherapie vorgelegt werden; eine Einordnung der Messwerte nach ihrer klinischen Wertigkeit, die Bestimmung ihrer therapeutischen Implikationen oder gar ihrer prognostischen Brauchbarkeit oder Unbrauchbarkeit bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Charakterisierung der Patientengruppe

4.2.1.1 *Alter*

Aufgrund der relativ kurzen Beobachtungszeit fällt die prognostische Bedeutung des Parameters ALTER nicht ins Gewicht. Beim Mammakarzinom stellt ein Lebensalter über 70 zwar einen günstigen prognostischen Faktor dar [103]. Es wurde auf eine Gewichtung der Beeinflussung der Überlebenswahrscheinlichkeit durch das erhöhte

Rezidivrisiko im sehr jungen Alter einerseits [51] und die geringere Lebenserwartung im hohen Alter andererseits verzichtet. Eine retrospektive Studie stellte für eine ältere Gruppe (>65 J.) gegenüber einer jüngeren Gruppe - bei gleicher TNM-Verteilung - eine weniger konsequente Therapiedurchführung hinsichtlich Exzision, gründlicher Axillarevision, Chemotherapie und Radiotherapie und dabei dennoch annähernd gleiche Raten für Überleben und Rezidivfreiheit nach 10 Jahren fest [104].

4.2.1.2 Tumorausgangsstadium

Auch in frühen klinischen Stadien des Mammakarzinoms konnten Verschiebungen der Gesamt-IgG-Subklassen von erheblichem Ausmaß und mit prognostischer Bedeutung gefunden werden [129]. Das Verteilungsmuster von wiederholt stimulierten, spezifischen IgG-Subklassen kann jedoch nicht ohne weiteres mit diesen Beobachtungen an globalen Subklassen in Verbindung gebracht werden. Durch den Ausschluss von Patientinnen mit fortgeschrittenen inoperablen oder metastasierten Krankheitsstadien ist eine grobe Alteration des Immunsystems, wie sie für diese Stadien beschrieben ist [132], bei unserer Patientengruppe nicht anzunehmen. Für spätere Untersuchungen wäre es aber von Interesse, das Verhältnis zwischen der Verteilung mistelspezifischer IgG-Subklassen und globaler IgG-Subklassen darzustellen.

4.2.1.3 Allergieanamnese

Da nur 8 Patientinnen anamnestisch Hinweise auf eine atopische Disposition bieten, war die statistische Auswertbarkeit wegen der geringen Gruppengröße stark eingeschränkt. Die 3 Gruppen mit Hinweisen auf Allergien in Anamnese oder Familienanamnese mussten zusammengefasst werden. Eine Prüfung auf Korrelation von Allergiestatus und Eosinophilen bzw. IgG-Subklassen ergab kein signifikantes Ergebnis (nicht dargestellt). Eine Bestimmung der Anti-ML-1-IgE ist nicht systematisch erfolgt; diese wäre für weitere Untersuchungen aber durchaus wünschenswert, zumal auch über ein häufigeres Auftreten von Anti-ML-1-IgE unter Therapie mit dem vesikelhaltigen Präparat AM berichtet wurde [138]. Die Bedeutung der Anti-ML-1-IgE ist noch nicht klar. Während eine Untersuchung an Patienten mit Nebenwirkungen unter Misteltherapie ein häufigeres Auftreten dieser Antikörper zeigten, als bei Patienten ohne Nebenwirkungen, konnte ein klinischer Zusammenhang mit Ausnahme zweier anaphylaktischer Reaktionen nicht festgestellt werden [137]. In einer Probandenstudie

stand das Auftreten von IgE nicht in Zusammenhang mit berichteten Nebenwirkungen [89]. Bei allergischer Disposition werden vermehrt IgE Antikörper und Antikörper der Subklasse IgG 4 gebildet [155]. Bei allergischen Personen besteht in der allergenspezifischen AK-Bildung eine Betonung von IgG1 und IgG4, während die Bildung von IgG2 und IgG3 gering ist. Bei Atopikern mit multiplen Allergien besteht oft eine Prädominanz der spezifischen IgG4 mit zunehmender Tendenz unter Immuntherapie [1].

4.2.1.4 Chemotherapie und Radiotherapie

Die onkologische Nachbehandlung der Patientinnen mittels Chemotherapie, Radiotherapie und Hormontherapie wurde nicht durch den Beginn der Misteltherapie beeinflusst. Zum Teil waren entsprechende Behandlungen bereits abgeschlossen, z.T. erfolgten sie in den ersten Monaten der Behandlung mit VAE. Auswirkungen auf die immunologische Reaktionslage sind zumindest für Chemotherapie und Bestrahlung bekannt und können sich u.a. in einer Immunsuppression mit verminderter Antikörperbildung sowie einer Leukopenie zeigen [65]. Infolgedessen wäre auch mit verminderter Anti-ML-1-AK-Bildung und geringerer Eosinophilie zu rechnen. Nach Radiotherapie oder myeloablativer Chemotherapie sind anhaltend niedrige Spiegel von Gesamt-IgG2 und -IgG4 typisch [6,7]. Die zeitliche Beziehung einer jeweiligen Radiotherapie oder Chemotherapie zum Intervall der Laborwerterhebung ist in unserer Untersuchung heterogen, wodurch mögliche Einflüsse verschleiert werden können. Die Unterteilung in Patienten mit oder ohne zur Misteltherapie überlappender Chemotherapie ergab keine signifikante Auswirkung auf die Anti-ML1-IgG-Subklassen oder Eosinophilen. Eine additive Misteltherapie kann zumindest bei einer palliativen Chemotherapie des fortgeschrittenem Mammakarzinoms die Leukopenie verbessern [65]. Für unseren Untersuchungskontext wäre die Einbeziehung einer Kontrollgruppe von Patientinnen ohne Misteltherapie und der Vergleich mit den relativen Eosinophilenzahlen von Interesse, um zu bestimmen, ob sich hinter dem fehlenden Effekt auf die absoluten Eosinophilenzahlen eine Abmilderung der Chemotherapie-induzierten Leukopenie oder eine relative Eosinophilie bei Leukopenie verbergen könnte. Der durch die Chemotherapie unbeeinflusste Anti-ML1-AK-Anstieg spricht gegen eine über 2 Jahre anhaltende Immunsuppression. Eine zeitliche Dynamik mit einem möglichen Anstieg supprimierter Titer nach Ende der Chemotherapie wurde bei

der Auswertung jedoch nicht erfasst. Die Beziehung der jeweiligen adjuvanten Nachbehandlung zu den Maximaltitern für Anti-ML1-IgG1 und -IgG4 und den Eosinophilen wurde mittels Wilcoxon-Test geprüft und zeigte keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

4.2.1.5 Hormontherapie

In der Schwangerschaft kommt es gegenüber dem embryonalen Gewebe zu einer Toleranz, die mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes zu einer TH-2-Reaktionslage einhergeht [93]. Diese Veränderung wird zumindest teilweise auf eine vermehrte IL-10 Produktion und auf den Progesteroneinfluss zurückgeführt [72]. Ein direkter und indirekter inhibierender Einfluß von Progesteron und Glucocorticoiden auf die TH-1-Entwicklung konnte kürzlich gezeigt werden [108]. Man könnte also hypothetisch unter der Behandlung mit Tamoxifen (oder nach chirurgischer oder medikamentöser Ovarablation) einen gegenläufigen Effekt mit Depression der TH-2 abhängigen IgG-Subklassen 2 und 4 und relativem Überwiegen der Subklassen 1 und 3 postulieren. Es wurden keine Daten über die Verteilung der Gesamt-IgG-Subklassen erhoben, sodass sich nicht einschätzen lässt, ob der Verlauf der lektinspezifischen Antikörper konform oder gegenläufig zu dem der Gesamtfraktion ist. Der Vergleich der Patientengruppe mit Hormontherapie versus ohne ergab im Wilcoxon-Test kein signifikantes Ergebnis. Tendenziell fanden sich in der mit Tamoxifen behandelten Gruppe etwas höhere Maxima sowohl für IgG1 wie für IgG4 (nicht dargestellt).

4.2.1.6 Risikostratifizierung

Die Aufteilung der Patientinnen in 4 Risikogruppen, die sich aus den 3 Gruppen der Sankt Galler Einteilung für nodal negativen Brustkrebs (1998) [51] und der Gruppe der nodal positiven zusammensetzt, ist als grobe Vereinfachung des Problems einer Risikostratifizierung beim Mammakarzinom aufzufassen. Die Zahlenwerte 1 bis 4 sind ordinal aufzufassen, da das Verhältnis der Risikosteigerung von Gruppe zu Gruppe nicht mit dem Verhältnis der Zahlenwerte übereinstimmt. Die Angabe eines Durchschnittswertes ist daher nicht zulässig. Aus zwei Gründen ist es nicht überraschend, dass die Gruppe mit auffälligem Verlauf nicht ein deutlich schlechteres Risikoprofil trägt. Erstens ist die Gruppe, wie oben diskutiert, aus statistischen Gründen stark heterogen und enthält auch möglicherweise blande Verdachtsfälle, zum anderen

unterliegt das Auftreten von Rezidiven beim Mammakarzinoms großen zeitlichen Streuungen, die in den ersten Jahren aber noch nicht so ausgeprägt sind. Betrachtet man nur die beiden verstorbenen Patientinnen - bzw. die zwei mit Fernmetastasen- befinden sich jeweils eine in der Risikogruppe 3 und eine in Gruppe 4.

Genauere prognostische Kriterien für das Mammakarzinom zu definieren, hat sich als sehr schwierig erwiesen. Von zentraler Bedeutung ist der axilläre Lymphknotenstatus [44]. Eine aktuelle Metaanalyse der prognostischen Faktoren bei nodal negativem Brustkrebs (Einschlusskriterien für Studien: u.a. eine Mindestanzahl von 200 Patientinnen und eine mittlere Nachbeobachtungszeit von mindestens 60 Monaten) nennt als nützliche Marker neben Tumorgröße und histologischem Grading den mitotischen Index, Gefäßinvasion, Kathepsin D, Ki-67 und S-phase-fraction. Die Bedeutung des Östrogenrezeptorenstatus ist uneinheitlich. Die Autoren kommen zu der Aussage, das aufgrund von technischen Schwierigkeiten und Variationen bei der Messung vieler Faktoren im Grunde Tumorgröße und Grading die einzigen Marker mit breitem klinischem Nutzen für frühen, nodal negativen Brustkrebs sind [107].

4.2.1.7 Verlaufsschlüssel

Für die Verlaufsbeurteilung ist zu bedenken, dass beim Mammakarzinom wegen seines oft langsamen Verlaufes lange Zeiträume, möglichst 5- oder sogar 10-Jahresabschnitte zu betrachten sind [41]. Da unser Hauptaugenmerk auf dem Verlauf der ML-1-Antikörper und der Eosinophilen unter Misteltherapie liegt, nahmen wir auch Patientinnen in unsere Untersuchung auf, deren Erstdiagnose erst wenig länger als 2 Jahre zurücklag. Für andere Patientinnen lag die Erstdiagnose über 6 Jahre zurück (siehe Datentabelle am Ende des Ergebnisteiles). Der Verlauf wurde aus der Datenlage der Krankenakten zum September 2001 beurteilt. Eine Untergruppe wurde für Verdachtsfälle gebildet, wozu bloße Erhöhungen der Tumormarker oder etwa ein mit bildgebenden Verfahren, z.B. per CT nicht auszuräumender Restverdacht einer kleinen Lungenmetastase gehörte. Bei größeren Patientenzahlen bzw. einer deutlich längeren Nachbeobachtungszeit wäre es sinnvoll, auf die Einbeziehung solcher „weichen“ Anhaltspunkte für einen ungünstigen Verlauf zu verzichten. Die Notwendigkeit zur Zusammenfassung der Verlaufsgruppen ist an anderer Stelle diskutiert (siehe 4.1.4).

Eine Untersuchung und Befragung der Patientinnen zu einem Stichtag erfolgte nicht, da diese bei einer sowieso stark divergierenden Dauer der Nachbeobachtung sehr arbeitsaufwendig und eine zusätzlich Belastung für die Patientinnen gewesen wäre.

4.2.1.8 Nebenwirkungen

Das retrospektive Design erlaubt keinen sicheren Rückschluss auf die Häufigkeit und Schwere von Nebenwirkungen oder die Anzahl von Therapieabbrüchen unter einer additiven Misteltherapie beim Mammakarzinom. Für eine genauere Charakteristik der aufgetretenen Nebenwirkungen fehlen entsprechende Messwerte (z.B. Lymphozytenstimulationstest oder Anti-ML-1-IgE). Die typischen Lokalreaktionen am Injektionsort wurden nicht als Nebenwirkung, sondern als Parameter der individuellen Reaktionsbereitschaft für die Dosisfindung gewertet. Die bei 8 Patientinnen beobachteten stärkeren Lokalreaktionen, die zum Teil mit Fieber verbunden waren, klangen folgenlos ab. Auch die einmalig beobachtete generalisierte Urtikaria bei einer vorbekannt atopisch veranlagten Patientin war durch eine Therapiepause und nachfolgende Dosisreduktion gut beherrschbar. Interessanterweise kam es bei dieser Patientin unter der weiteren Therapie mit AM 6 weder zu einem Ansprechen der eosinophilen Leukozyten, die auf dem Wert von 0,1/nl wie vor Behandlungsbeginn verblieben, noch zur Bildung von Anti-ML-1-IgG vor dem 9. Monat. Erst unter Dosiserhöhung auf AM 5 drei mal wöchentlich trat eine IgG3-betonte AK-Bildung mit Eosinophilen bis 0,4/nl auf.

Insgesamt bestätigt sich an dem Patientengut die Einschätzung einer guten Verträglichkeit der additiven Misteltherapie [65].

4.2.2 Prävalenzen für Anti-ML-1-IgG

Nach 12 Monaten findet sich eine 98% Prävalenz von Anti-ML-1-IgG, sodass sich die hohe spezifische Antigenität für AM bestätigt [143]. In den folgenden 12 Monaten schwankt die Prävalenz und liegt nach 2 Jahren nur noch bei 96 %. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass einzelne Patientinnen, die zur Selbstapplikation angeleitet wurden, nach dem ersten Jahr eine abnehmende Compliance entwickeln und die Injektionsfrequenz reduzieren. Bemerkenswerterweise findet bei 2 % der Patientinnen eine Serokonversion erst zwischen dem 18. und dem 24. Therapiemonat statt, sodass kumulativ nach 2 Jahren eine 100% Serokonversion erreicht ist. Ein

Vergleich mit zwei relevanten Voruntersuchungen zu Anti-ML-1-IgG findet in Abschnitt 4.2.8 und 4.2.9 statt.

IFN- γ begünstigt eine IgG-Isotypumschaltung nach IgG1 und IgG3, während IL-4 eine Umschaltung nach IgG4 und IgG2 begünstigt [119]. Die Aufschlüsselung nach den einzelnen Subklassen ergibt das interessante Bild, dass die Prävalenz der hinsichtlich ihrer Einordnung in das Typ 1/Typ 2-Schema des Immunsystems antagonistischen Subklassen 1 und 4 über die 2 Jahre gleichsinnig in einer ständigen Zunahme verläuft, wobei der Anstieg der Subklasse 1 früher und mit höherer Dynamik erfolgt. Während Stettin et al. unter einem anderen Mistelextrakt (Helixor M®) vornehmlich Anti-ML-1-IgG der Subklassen 1,2 und 4 fanden und nur selten die Subklasse 3 gebildet wurde [143], zeigen unserer Patientinnen die Subklasse 2 mit Abstand am seltensten: die maximale Prävalenz von unter 20 % sinkt im 2. Jahr wieder auf Werte unter 5 % ab. IgG3 hingegen steigt anfangs mit gleicher Dynamik wie IgG1 an, erreicht dann aber bereits ab dem 6 Monat bei einer Prävalenz um 50% ein Plateau mit leicht abfallender Tendenz. Auf der Ebene der Anti-ML-1-IgG-Subklassen ist die Polarisierung der Immunantwort während der ersten 6 bis 9 Monate der Behandlung klar Typ 1 dominiert, im Verlauf ist aber von einer Kostimulation beider Linien zu sprechen.

Wenn man die Mittels ELISA bestimmten Aktivitäten der Anti-ML1-IgG Subklassen über längere Zeiträume oder zwischen verschiedenen Studien vergleicht, muss man jedoch berücksichtigen, dass die Aktivität der kommerziellen erhältlichen Antikörper nicht ohne Schwankungen ist, sowohl zeitlich wie auch von Firma zu Firma, was die Vergleichbarkeit erschwert.

Die Darstellung der Prävalenzkurven gruppiert nach Verlauf unterliegt dem unter Abschnitt 4.1.4 diskutierten Vorbehalt hinsichtlich der geringen Gruppengröße von n=11 einerseits und der zusätzlichen Heterogenität innerhalb dieser relativ kleinen Gruppe. Das grundlegende Muster der Subklassenverteilung lässt sich in der Gruppe mit auffälligem Verlauf durchaus wiederfinden, wobei auffällig ist, dass sowohl für IgG3 (>70%) wie für IgG2 (> 30%) relativ höhere Prävalenzen erreicht werden, die anschließend deutlich abfallen. IgG3 ist dadurch zum Zeitpunkt 3 sogar am stärksten

vertreten. Die größere Gruppe mit unauffälligem Verlauf weist keinen nennenswerten Unterschied in der Subklassenverteilung auf.. Schlussfolgerungen lassen sich aus diesen Beobachtungen nicht ziehen.

Die Gruppe der Patienten, die zu mindestens einem Zeitpunkt eine Eosinophilie von $\geq 0,4/\text{nl}$ aufweisen, zeigt gegenüber denen mit Eosinophilen $<0,4/\text{nl}$ einen unveränderten IgG1-Verlauf, jedoch eine auffällig geringere Ausprägung von IgG2 und eine verspätete Ausprägung von IgG4. Dies spricht dafür, dass eine Neigung zu ausgeprägteren humoralen Antworten auf VAE, die sich in einer Eosinophilie äußert, nicht mit einer Neigung zu einer Typ 2-dominierten spezifischen Immunantwort gegen ML-1 einhergeht, sondern sogar eine gegenteilige Tendenz vorliegt. Der Befund ist insofern auffällig, als die Aktivierung von Eosinophilen klassisch über Typ 2-Zytokine (z.B. IL-5) erfolgt, und kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die Eosinophilie unter Misteltherapie mehr im Zusammenhang mit Aktivierungskaskaden des unspezifischen Immunsystems (z.B. NK-Zellen [148]) als des spezifischen Immunsystems auf T-Zell-Ebene entsteht.

4.2.3 Deskriptive Statistik der IgG-Subklassen und der Eosinophilen

In Hinblick auf die jeweilige Stärke der Antikörperbildung, zeigt sich, dass abgesehen von einigen frühen Ausreißern die Streuung der Messwerte für IgG1 und IgG4 im Verlauf zunimmt. Für IgG2 und IgG3 imponiert hingegen ein Rückgang der Streuung im Verlauf. Für IgG2 tritt der mit 0,71 OD höchste gemessene Wert schon zum Monat 6 auf. Die maximalen Titer für IgG2 betragen somit nur etwa ein Drittel von denen für IgG1 oder IgG4 und nehmen an Höhe im Verlauf wieder ab. Obwohl der Schwellenwert für IgG2 mit 0,01 OD sehr niedrig liegt, ist das Band zwischen 0,01 und 0,1 bis auf eine Ausnahme leer, d.h. in der Regel erreicht eine Antikörperbildung nach Exposition eine Größenordnung deutlich über dem Cut-off-Wert, bzw. fällt nach erstmaliger Serokonversion mitunter auch wieder unter den Cut-off-Wert zurück, folgt also einem „on-off“-Prinzip. Bemerkenswerterweise kommt es mehrfach vor, dass deutlich positive Werte für eine Subklasse bei der folgenden Messung unter die Nachweisgrenze fallen und z.T. dann bei weiteren Messungen wieder deutlich positiv sind. In allen Subklassen liegen zu jedem Zeitpunkt mindestens 10 % der Messwerte unter dem Cut-off-Wert. Die Durchsicht der individuellen Subklassenverläufe, die aus Platzgründen nicht abgebildet

werden, zeigt ein hohes Maß an Variabilität im Auftreten der Subklassenmuster, das keiner Gesetzmäßigkeit zu unterliegen scheint. Nur sehr unwahrscheinliche Kombinationen, z.B. ein gemeinsames Auftreten von lediglich Antikörpern der Subklassen 1 und 2 oder der Subklassen 2 und 3 sind nicht zu beobachten. Immundefekte als Ursache für bestimmte Kombinationen von Subklassen sind sehr unwahrscheinlich, da Erkrankungen mit selektivem Mangel einer oder mehrerer IgG-Subklassen selten sind [5]. Diese äußern sich in rezidivierenden bakteriellen Infekten, insbesondere der oberen Luftwege.

Im Unterschied zu den IgG-Subklassen liegen für die Eosinophilen auch zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn viele Messungen vor (n=50). Ein Einfluss auf die Zahl der Eosinophilen ist für alle Zeitpunkte erkennbar. Der Normwert für eosinophile Granulozyten im Differentialblutbild beträgt ohne Berücksichtigung der Leukozytenzahlen bis maximal 0,36 /nl, bzw. 2-4% der Leukozyten [96]. Ein Bezug auf eine gleichzeitig gemessene Gesamtleukozytenzahl war aufgrund der Datenstruktur nicht durchgehend möglich, sodass wir uns nur auf absolute Eosinophilenzahlen beziehen. Der im vorigen Abschnitt gewählte Wert von 0,4/nl als Definition für Eosinophilie deckt sich mit den Erfahrungen aus einer Studie an Mammakarzinompatientinnen unter Therapie mit AM und ist für unsere Patientengruppe realistisch [67]. Während der Median zu keinem Zeitpunkt 0,4/nl erreicht, ja selbst das 75%-Quartil nur einmal über 0,3/nl liegt, erreichen doch 29 von 54 oder 54% der Patientinnen zu mindestens einem Zeitpunkt der Untersuchung Eosinophilenwerte von mindestens 0,4/nl (siehe Abschnitt 3.2.5). Die individuell maximale Eosinophilie unter Misteltherapie tritt also nicht einheitlich etwa zu Beginn der Behandlung auf sondern verteilt sich – mit deutlicher Betonung des ersten Messzeitpunktes – über den gesamten Beobachtungszeitraum.

4.2.4 Wilcoxon-Test für eosinophile Leukozyten

Der Anstieg der Eosinophilenzahlen 1 Monat nach Behandlungsbeginn gegenüber dem Ausgangswert erweist sich in einer nicht-parametrischen Variante des Wilcoxon-Tests als hochsignifikant. Dies deckt sich mit den Befunden von Henn, der an einer Gruppe von 10 Patientinnen mit Mammakarzinom nach 3, 10 und 16 Wochen jeweils signifikante Erhöhungen der Eosinophilenzahlen gegenüber dem Ausgangswert

feststellte, welche deutlich das Ausmaß einer nur relativen Zunahme bei leicht steigenden Leukozytenzahlen übertrafen [67]. Die Tagesmittelwerte der Eosinophilen lagen bei Henn an Tag 1 und 2 bei 0,15/nl und nach 3 Wochen bei 0,25. Die Leukozyten-Tagesmittelwerte lagen jeweils zwischen 5 und 6/nl. In unserer Patientengruppe liegt auch nach 24 Monaten noch eine signifikante Erhöhung der Eosinophilenzahlen vor.

4.2.5 Modell der Anti-ML-1-IgG-Geradensteigungen

In den vorangehenden Abschnitten wurden die Abfolge der Messwerte bei einzelnen Individuen noch nicht näher berücksichtigt. Die Berechnung des Modells der Anti-ML-1-IgG-Geradensteigungen ist als Versuch aufzufassen, eine allgemeine Aussage zu Mustern in den Einzelverläufen zu treffen. Da die Geradensteigungen für IgG1 eher normalverteilt sind, können wir anhand des Steigungsmittelwertes für IgG1 mit höherer Wahrscheinlichkeit den Verlauf zwischen Monat 3 und Monat 24 einer Behandlung mit AM vorhersagen als für IgG4. Für beide Subklassen ist eine hochsignifikante Veränderung im Sinne eines Anstiegs nachgewiesen. Aus dem Mittelwert der logarithmischen Geradensteigungen lässt sich ein durchschnittlicher Anstieg der Messwerte pro Monat errechnen, der für IgG4 mit 9,1% mehr als doppelt so hoch ist, wie für IgG1 (3,5%). Es ist wichtig zu beachten, dass wegen fehlender Werte der Zeitpunkt 1 nicht in die Berechnung des Modells eingegangen ist. Dadurch werden die zum Zeitpunkt 3 zum Teil schon erheblich angestiegenen Werte als Ausgangspunkt für die Geradenberechnung genommen, was die Dynamik des Anstiegs verschleiert und sich bei den früh ansteigenden Subklassen 1 und 3 stärker auswirkt als bei Subklasse 4.

Für die Subklassen 2 und 3 konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden, d.h. die berechneten Geradensteigungen könnten auch auf zufälligen Einflüssen beruhen und wurden nicht abgebildet. Die Subklassen 2 und 3, die beide in der deskriptiven Statistik fallende Quantilwerte während des zweiten Jahres aufweisen, erreichen daher in diesem Modell kein signifikantes Ergebnis, obwohl bei Einbezug des Ausgangswertes vor Behandlungsbeginn sicher von einem signifikanten Anstieg auszugehen wäre.

Die Ergebnisse der Modellrechnung ermöglichen uns, zu prüfen, wie ein ausgeprägter Anstieg der Subklasse 1 mit dem Verlauf der Subklasse 4 korreliert und umgekehrt. Es zeigt sich aus der breit gestreuten Punktwolke in Abbildung 23, dass das Ansteigen der einen Subklasse weitgehend unabhängig von der anderen erfolgt. Die gleichsinnige Entwicklung der Prävalenzen für IgG1 und IgG4 in Abbildung 9 darf also nicht so verstanden werden, dass der Verlauf der absoluten Werte entsprechend wäre. Der Korrelationskoeffizient von 0,3 ist nicht signifikant, tendenziell besteht aber eine positive Korrelation.

Seit mehreren Jahren wird das Auftreten der IgG-Subklassen im Zusammenhang mit Typ-1- oder Typ-2-Zytokinen untersucht und eine Zuordnung der Subklassen zu einer Polarisierung des Immunsystems nach dem Typ1/Typ2-Modell diskutiert [115]. Aufgrund der wachsenden Kenntnisse über typische Polarisierungen des Immunsystems bei unterschiedlichen Krankheiten wird versucht, die IgG-Subklassenprofile als Surrogatmarker einzusetzen. Dabei werden beim Menschen allgemein die Subklassen 1 und 3 der Typ-1-Immunität und die Subklassen 2 und 4 der Typ-2-Immunität zugeordnet [56, 84]. Diese Zuordnung stellt jedoch eine Vereinfachung dar und kann nicht zuverlässig über die zugrundeliegende Immunaktivierung Aussagen treffen. Das Gesamt IgG-Subklassenmuster ist nicht ohne weiteres auf die spezifischen IgG-Ak übertragbar. Zum Teil bestätigen sich im Subklassenmuster nicht die Erwartungen oder es werden Mischbilder angetroffen, die zur Annahme einer parallelen Typ-1 und Typ-2 Aktivierung führen [68, 151].

So kann mit Vorbehalt konstatiert werden, dass wir auf Ebene der Anti-ML-1-IgG-Subklassen eine TH-Stimulation sowohl vom Typ 1 (IgG1) wie vom Typ 2 (IgG4) beobachten. Die Hypothese, dass im Verlauf der zweijährigen Misteltherapie sich eine dominante Typ 2 Antwort auf das Mistellektinantigen durchsetzt, lässt sich auf Ebene der IgG-Subklassen als Surrogatmarker nicht bestätigen. Es bleibt weiteren Studien überlassen, die IgG-Subklassendynamik über längere Zeiträume als zwei Jahre zu untersuchen.

4.2.6 Bivariate Korrelationen

Die bivariate Korrelationsanalyse stützt sich auf die Mittelwerte, d.h. es werden stetige, normalverteilte Daten vorausgesetzt. Diese Voraussetzung ist jedoch nicht erfüllt, indem die Daten der Anti-ML-1-IgG-Subklassen zensiert sind (alle Werte unter dem Cut-off-Wert sind mit Null angegeben). Wegen fehlender Werte mussten die Zeitpunkte 0 und 1 für die Berechnung des Mittelwertes ausgeschlossen werden. Wenn die bivariate Korrelationsanalyse dennoch in diese Untersuchung aufgenommen wurde, so geschah dies unter dem Gesichtspunkt, eine explorative Analyse im Sinne einer Pilotstudie vorzunehmen, die hinsichtlich ihrer Interpretationsmöglichkeit durchaus vorläufigen Charakter haben muss.

Als Problem stellte sich, die starken Schwankungen der Anti-ML-1-IgG-Subklassen einerseits nicht durch einen Bezug auf die jeweiligen Maximalwerte überzubewerten, andererseits sie nicht durch einen Bezug auf den Median zu stark auszublenken. Gegenüber der Alternative, die Messwerte einer aufwendigen statistischen Transformation zu unterwerfen, die den zensierten Charakter korrekt berücksichtigt, entschieden wir uns für die Verwendung des Mittelwertes, was auch angesichts der eher niedrigen Cut-off-Werte vertretbar erscheint.

Die engste Korrelation fand sich zwischen den Mittelwerten der Subklassen 1 und 4. Der Hypothese, dass sich hinter einer Korrelation der Mittelwerte möglicherweise eine frühe, im Verlauf abnehmende IgG1-Bildung, der regelmäßig ein späterer Anstieg der IgG4 folgt, verbirgt, widerspricht Abschnitt 4.2.5, in welchem die individuellen Geradensteigungen für IgG1 und IgG4 untersucht werden. Die zu konstatierende Korrelation des Auftretens von Typ 1 Antikörpern mit Typ 2 Antikörpern lässt sich auch für die Subklassen 2 und 3 bestätigen. In bereits deutlich geringerem Ausmaß sind die Subklassen 2 und 4 miteinander korreliert.

Unter Hinzuziehung des unter 4.2.5. vorgebrachten, kann die enge Korrelation zwischen den Mittelwerten der Subklassen 1 und 4 in unserer Untersuchung ebenfalls als Hinweis auf eine gemischte Typ-1/Typ-2-Immunantwort gesehen werden.

Interessanterweise ist keine Subklasse mit den Eosinophilen korreliert. Es findet sich also weder eine positive Korrelation der Eosinophilen als Typ 2 Effektorzellen mit Anti-ML-1-IgG4 als Typ2 Subklasse, noch spiegelt sich die in Abschnitt 4.2.2 besprochene eher niedrige Prävalenz von Anti-ML-1-IgG2 und -IgG4 in der Untergruppe mit maximalen Eosinophilenwerten von $< 0,4/\text{nl}$ hier in einer signifikant negativen Korrelation.

4.2.7 Logistische Regression und Kontingenzanalyse

Vor einer Wertung unseres Ergebnisses, das eine stärkere Eosinophilie mit einem ungünstigen Verlauf in Verbindung bringt, ist die mit 11 Patientinnen relativ kleine Gruppengröße hervorzuheben. In dieser können sich zufällige Faktoren stark geltend machen. Schon vor dem Beginn der Behandlung mit VAE und unter der allgemeinen Annahme von Rezidivfreiheit sind in der späteren Gruppe mit $\text{VS} > 1$ höhere Eosinophilenzahlen zu beobachten, während nach Beginn der Behandlung eine Annäherung beider Gruppen erfolgt: Der Durchschnittswert der Eosinophilen steigt in $\text{VS} > 1$ von vor Behandlungsbeginn $0,2/\text{nl}$ auf $0,4/\text{nl}$ nach einem Monat, in $\text{VS} = 1$ von $0,116/\text{nl}$ auf $0,32/\text{nl}$.

Eine denkbare Ursache für höhere Eosinophilenzahlen in der Untergruppe mit einem schlechteren Verlauf könnte eine Dosiserhöhung des Mistelpräparates als Reaktion auf einen ungünstigen Verlauf sein. Bei einer Durchsicht der 11 Fälle lag eine solche Konstellation in einem Fall vor, in allen anderen Fällen fiel das Merkmal des ungünstigen Verlaufs nicht in den Zeitraum der Laborbestimmungen, sondern den der Nachbeobachtung oder es fand keine Dosisänderung mit Erhöhung der Eosinophilen statt. Da keine Beziehung zwischen Eosinophilen und der Allergianamnese gefunden wurde, spielt der Allergiestatus in den Untergruppen keine Rolle. Hervorzuheben ist insbesondere aber die Heterogenität der Gruppe von 11 Patientinnen mit einem Verlaufsschlüssel $\text{VS} > 1$: allein 5 von 11 weisen lediglich Verdachtsmomente für ein Rezidiv auf, welches klinisch (noch) nicht nachgewiesen konnte. Der in der Regressionsanalyse gefundene signifikante Zusammenhang eignet sich zudem wenig, um darauf Schlussfolgerungen aufzubauen, da die angeschlossene Kontingenzanalyse ihrerseits unter einem sehr ähnlichen Blickwinkel kein ausreichendes Signifikanzniveau erreicht.

Die Rolle der Eosinophilen als Verlaufsparemeter einer Misteltherapie wird zunehmend beachtet und könnte vor dem Hintergrund einer sich erweiternden Kenntnis der tumorimmunologischen Funktion der Eosinophilen wachsende Bedeutung erlangen [25, 52, 134, 152]. Bisherigen unkontrollierten klinischen Beobachtungen zufolge spricht ein Anstieg der Eosinophilen unter Misteltherapie eher für einen günstigen Verlauf [66, 96]. Weitere Studien zur Frage der prognostischen Bedeutung der Bluteosinophilen sind erforderlich, deren Ergebnis möglicherweise von erheblicher Relevanz für die Steuerung einer Misteltherapie sein wird, da die Eosinophilie einfach bestimmt und häufig dosisabhängig beeinflusst werden kann [96].

Ein prädiktiver Wert der Verläufe der Anti-ML-1-IgG-Subklassen hinsichtlich des Verlaufes der Erkrankung konnte in unserer Arbeit nicht gefunden werden. In explorativer Absicht wurde eine logistische Regression der Maxima und der Mittelwerte der einzelnen Subklassen in Bezug auf den dichotomisierten Verlaufsschlüssel durchgeführt, die keine signifikanten Ergebnisse ergab (nicht dargestellt). Die Verwendung des Mittelwertes für die Berechnung unterliegt den gleichen einschränkenden Bemerkungen zur Methodik wie unter Abschnitt 4.2.6 ausgeführt. Die Frage, welche Aussagekraft das Anti-ML-1-IgG-Subklassenmuster für Orientierung des gesamten Immunsystems im Rahmen der Tumorabwehr hat, ist weiterhin ungeklärt und bedarf einer Verbreiterung der Datenbasis sowohl hinsichtlich der immunologischen Phänomene unter einer Misteltherapie als auch hinsichtlich der immunologischen Grundlagenforschung zum Zusammenhang von Tumoren und Typ 1/Typ2-Reaktionen [94].

4.2.8 Vergleich mit Probandenstudie

Da die übliche Applikationsform der VAE als wiederholte subkutane Injektion einer antigenen Substanz in ansteigender Dosierung einem typischen Desensibilisierungsschema ähnelt, sind regelmäßig spezifische Immunantworten bei nicht immunsupprimierten Individuen zu erwarten. Dies konnte in einer Studie an 47 gesunden Probanden belegt werden, in der die Reaktivität des humoralen Immunsystems auf wiederholte subkutane Gaben eines lektin- und viskotoxinreichen

sowie eines lektinarmen, aber viskotoxinreichen VAE im Vergleich zu Placebo untersucht wurde [89].

Diese Ergebnisse können für einen Vergleich der Antikörperbildung bei Tumorpatienten, die potentiell ein verändertes Immunsystem haben, herangezogen werden. Die Probanden der Verum-Gruppen erhielten entweder ein ML-reiches , auf Gesamt-ML standardisiertes Präparat (Iscador Quercus special ®; IQ) oder ein viskotoxinreiches, aber ML-armes Präparat (Iscador Pini ®; IP) in ansteigender Dosierung über 12 Wochen in Abständen von 3 bis 4 Tagen (Tab. 20). Der Gesamtlektingehalt der IQ-Präparate entsprach größenordnungsmäßig in der zweiten Woche etwa dem von AM6, in der 3 und 4. Woche dem von AM5, in der 5. und 6. Woche dem von AM4, danach dem von AM3 (Tab. 21). Dies entspricht ab Woche 3 größenordnungsmäßig den gängigen ML-Dosen, die in unserer Untersuchung zur Anwendung kamen.

Iscador Q	Woche 1	Woche 2	Woche3- 4	Woche 5- 6	Woche 8- 12
ML in ng je Dosis	0,82	8,2	82	205	411

Tabelle 20: Dosierungsschema der Probandenstudie im IQ-Arm [89]

Abnobaviscum Mali ®		Stufe 6	Stufe 5	Stufe 4	Stufe 3
ML (ng/ml)		0,58	5,8	58	580

Tabelle 21: ML-Gehalt von 1ml Ampullen für ABNOBAviscum Mali ® [2]

Alle 16 Probanden der IQ-Gruppe entwickelten IgG-AK auf ML-1. Drei Monate nach der letzten Injektion waren noch 15 Anti-ML-1-positiv. Die Antikörper waren vorzugsweise vom IgG1-Typ (100%) und vom IgG3-Typ (69%). Antikörper vom IgG2-Typ wurden in 19 % und solche vom IgG4-Typ in 13% gefunden. Es liegt nahe, aus diesen Ergebnissen zu schließen, dass ein normales Immunsystem auf die gegebenen Dosen von ML regelmäßig mit einer spezifischen AK-Bildung reagiert. Die signifikant höheren Antikörpertiter in der Gruppe mit lektinreichem Quercus-VAE (Eiche)

gegenüber der Gruppe mit lektinarmem Pini-VAE (Kiefer) unterstützen sehr die Annahme einer dosisabhängigen Ausprägung der Antikörper [143].

In unserer Untersuchung wurde nicht bei allen Patientinnen die Stufe AM 3 erreicht, die am ehesten der Mistellektin-Dosierung im Quercus-Arm der Probandenstudie entspricht. Wir können also aus den vorliegenden Daten nicht sicher sagen, ob das deutlich spätere Erreichen einer vollständigen Serokonversion für Anti-ML1-IgG in unserem Kollektiv (siehe Abbildung 8) auf einer niedrigeren Dosierung oder auf einer anderen, möglicherweise krankheitsbedingten, Prädisposition des Immunsystems gegenüber den gesunden Probanden beruht. Das gewählte Dosierungsprinzip ist aber geeignet, bei Mammakarzinompatientinnen mit hoher Wahrscheinlichkeit Anti-ML1-IgG auszubilden.

Eine Bestimmung der Anti-ML1-IgG vor Beginn der Behandlung mit AM liegt für unsere Untersuchung nicht vor, jedoch zeigt die Probandenstudie, dass ML1-AK hochspezifisch für einen Kontakt mit ML1 sind und vor Therapie mit VAE eine Seronegativität angenommen werden darf.

4.2.9 Vergleich mit Mammakarzinom - Studie

Stein et al. haben 1998 die zellulären und humoralen Immunantworten auf ABNOBAviscum Mali ® (AM) bei 8 Brustkrebspatientinnen untersucht [140]. Zum Einsatz kam eine Dosierung in Höhe von 0,2 mg/30kg KG zwei mal pro Woche. Dies entspricht bei einer 60 kg schweren Person jeweils einer Injektion von 2ml AM4. Messungen fanden vor Therapiebeginn sowie nach 3, 10 und 16 Wochen statt. Gemessen wurden die Anti-ML-1 Antikörper der Klassen IgG, IgA, IgM und IgE, außerdem die Zytokinproduktion von PBMC (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-6) spontan und nach AM-Stimulation in vitro. Schließlich wurde auch noch die Proliferation von PBMC unter Stimulation mit AM untersucht. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Analog zu der unter Abschnitt 4.2.8 beschriebenen Untersuchung bei gesunden Probanden fanden sich nach 3 bis 8 Wochen bei allen 8 Patientinnen Anti-ML-1-IgG-Antikörper. Bei 4 Patientinnen traten auch IgE-Antikörper auf, was jedoch nicht mit erhöhter IL-4 Expression korrelierte. IgM gegen

ML-1 trat nicht auf. Bei allen Patientinnen kam es zu einer starken Proliferation der PBMC, die bei 6 von 8 Patientinnen im Verlauf wieder abnahm. Die Induktion von IFN- γ und IL-4 als Marker einer Typ 1 oder Typ 2 Reaktion zeigte kein einheitliches Bild und blieb meist niedrig. TNF- α und IL-6 wurden hingegen fast bei allen induziert, ihre Konzentration nahm aber im Verlauf ab. Zeigten vor Therapiebeginn noch 2 von 8 Patientinnen IL-4 Werte oberhalb des Schwellenwertes, war es nach 16 Woche keine mehr. Eine Korrelation zwischen der Proliferation, der AK-Bildung und der Zytokinexpression konnte bei dieser kleinen Gruppe nicht gefunden werden. Die Autoren schließen u.a. dass

- bei AM neben stimulierenden Epitopen auch inhibitorische Mechanismen sich auswirken können.
- die Zytokinexpression sehr stark individuellen Faktoren zu unterliegen scheint.
- nach 16 Wochen im Zytokinprofil eine schwache Typ 1 Antwort überwiegt, eine Typ 2 Antwort bei den 4 Patientinnen mit IgE-Bildung eine Rolle spielt, sich jedoch nicht zugleich im Zytokinprofil spiegelt.

Im Vergleich zu der vollständigen Serokonversion der 8 Patientinnen nach der 16. Woche findet sich in unserem größeren Kollektiv nach 3 Monaten eine Serokonversion von 65 %, die sich nach weiteren 3 Monaten auf 85 % erhöht. Dies kann - neben der unterschiedlichen Gruppengröße - an einer tendenziell höheren Dosierung bei diesen 8 Patienten liegen, da bei unseren Patientinnen in mehreren Fällen eine Lokalreaktion von 2-5 cm Durchmesser schon mit einer geringeren Dosis als 2 ml AM 4 erreicht wurde. Das Überwiegen einer Typ 1 Antwort in den ersten Monaten einer Therapie mit AM wird durch unsere Daten bestätigt, indem wir einen deutlich früheren Anstieg der Subklassen 1 und 3 konstatieren. In dieser Studie liegen keine Angaben zum Verlauf der Eosinophilen vor, während in unserer Untersuchung die IgE-AK nicht berücksichtigt wurden.

4.3 Allgemeine Diskussion

4.3.1 Das TH-1/TH-2 Paradigma

Ob vornehmlich TH-1 oder TH-2-Zellen, die einer wechselseitigen asymmetrischen Kreuzsuppression unterliegen, aktiviert werden, hängt von mehreren möglichen Faktoren ab, deren Interaktion ein hohes Maß an Komplexität aufweist. IFN- γ aus TH-

1-Zellen unterdrückt die Proliferation von TH-2 Zellen, während das TH-2-Zytokin IL-10 die Zytokinproduktion und Proliferation der TH-1-Zellen vermindert. Neben dem Zytokinmilieu und kostimulatorischen Signalen wird auch die Dichte und Art des präsentierten Antigens und die Rolle der APC diskutiert [79]. Zytokine, mit Hilfe derer Zellen des Immunsystems Befehle oder Information über den Zustand und die Dynamik des Systems austauschen, werden von TH-Zellen und anderen Komponenten des Immunsystems produziert. Die Zytokine stellen dabei ein multifunktionales Signalnetzwerk dar, dessen sich die unterschiedlichen Teilnehmer der Kommunikation bedienen [14].

Wird das adaptive Immunsystem mit einem unbekanntem Antigen konfrontiert, kommt es zu einer Antigenpräsentation an noch undifferenzierte TH-0-Zellen, die ihrerseits –in Abhängigkeit von den durchlaufenen Zellzyklen- Zytokine produzieren (IL-2, IL-4, IFN- γ) und so die Differenzierung mit lenken [17].

Welche Rolle die Antigenexposition experimentell für die Wahl des Reaktionsmodus spielt, stellt sich noch uneinheitlich dar. Während mehrere Untersuchungen bei niedrigen Antigen Dosen TH-1-Antworten mit IFN- γ -Produktion (TH-1), bei zunehmenden Antigen Dosen aber ein Verschwinden der TH-1-Zellen und Zunahme von TH-2-Zellen mit IL-4-Produktion gefunden haben [18, 8], deuten andere Experimente auch darauf hin, dass eine sehr niedrige Antigenexposition zunächst auch eine TH-2-Reaktion hervorruft [70, 118].

Als Arbeitshypothese wird zur Zeit etwa ein Modell diskutiert, das keine dominante externe Kontrolle der TH-Differenzierung, sondern eine Selbstregulation vorsieht. Dabei wird im frühen Reaktionsprozess eine TH-1-Bevorzugung mit TH-1-lastiger Immunantwort angenommen, die im Falle steigender Antigen-Dosen (als möglichen Hinweis auf eine insuffiziente Immunantwort) von einer TH-2-dominierten Antwort abgelöst wird, indem die TH-2-Population einen Selektionsvorteil durch verminderte Empfänglichkeit für AICD hat [12, 14].

Andererseits ist die dichotome Modellvorstellung nicht ganz unumstritten, denn es liegen Hinweise vor, die für das unspezifische Immunsystem eine lineare Differenzierung von frühen Zellstufen mit Typ 2 Zytokinmuster über eine neutrale Zwischenstufe hin zu reifen Zellen mit irreversiblen Typ 1 Zytokinmuster nahelegen und sogar eine Parallelität für die T-Helfer-Zell-Differenzierung denkbar erscheinen lassen [99].

4.3.2 Tumoren im immunologischen Kontext

Intensive Forschungsanstrengungen beschäftigen sich mit der Frage, welches immunologische Milieu im Rahmen der Tumor-Surveillance vorteilhaft und welches nachteilig ist. Ebenso ist von Interesse, inwieweit durch Tumorerkrankungen Einflüsse auf dieses Milieu entstehen, die sekundäre Veränderungen in der Verteilung der IgG-Subklassen nach sich ziehen, sei es im Rahmen einer allgemeinen Immunschwäche bei fortgeschrittener Erkrankung oder als Frühindikator z.B. bei Brustkrebs. So konnte gezeigt werden, dass das Auftreten bestimmter maligner Tumoren, unter ihnen das Mammakarzinom, signifikant gekoppelt ist an eine selektive Verringerung des IgG1 bzw. Erhöhung des IgG2 in der IgG-Gesamtfraktion [38]. Während das Verteilungsmuster der Gesamtfraktion IgG-Subklassen bei gesunden Erwachsenen nur geringe Variationen zeigt, kommt es schon in frühen Tumorstadien zu so ausgeprägten Veränderungen im Verhältnis von IgG1 und IgG2 zur Gesamtfraktion, dass der prädiktive Wert eines postoperativen Monitorings dieser Parameter als indirekte Tumormarker dem einer Verfolgung des etablierten Tumormarkers CA-125 mindestens entspricht und auch ein Einsatz zur Früherkennung von Brustkrebs in Erwägung gezogen werden kann [129]. Die spontane Sekretion von TH-1-assoziierten Zytokinen und Zytokinen der Monozyten/Makrophagen-Linie ist bei Tumorpatienten oft erniedrigt [141]. Es gibt weitere Indizien für einen günstigen Einfluss einer Typ 1 Polarität. Der Übergang einer seborrhoischen Keratose in ein Basalzellkarzinom ist mit einem Wechsel des lokalen Zytokinmusters von Typ 1 zu Typ 2 Zytokinen verbunden [153]. Eine Behandlung von Basalzellkarzinomen mit intraläsionaler IFN- α - Injektion führte zu einer Verschiebung des Zytokinmusters von IL-10 zu IL-2 und einer partiellen Remission des Tumors [86]. Tiermodelle für Tumorerkrankungen zeigten eine starke

Wirksamkeit von IL-12 gegen verschiedene Lymphome und Karzinome, die zumindest teilweise IFN- γ -abhängig erscheint [11].

Diesen Ergebnissen stehen Studien gegenüber, die auf einen Vorteil einer Typ 2 dominierten Immunreaktion deuten. Eine Studie, die 68 Patienten mit Adenokarzinom der Lunge umfasst, zeigt ein signifikant längeres krankheitsfreies Intervall für Patienten mit TH-2-betonter Zytokinexpression im Serum, gleichzeitig war jedoch die Wahrscheinlichkeit von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei Patienten mit TH-1-Dominanz stark erniedrigt. [154]. Andererseits konnte bei Mäusen aber auch für das Typ 2-Zytokin IL-4 ein Antitumor-Effekt gefunden werden- vermutlich vermittelt durch Eosinophile [25, 69]. Weitere Forschungen sind nötig, um therapeutische Strategien für eine gezielte Immunmodulation zu entwickeln, die aller Wahrscheinlichkeit nach immunologische Besonderheiten der einzelnen Tumorarten und möglicherweise auch der jeweiligen Tumorstadien berücksichtigen müssen.

4.3.3 Diskussion der Mistel im Verhältnis zur immunologischen Hypothesenbildung

Inwieweit durch VAE bevorzugt eine TH-1- oder eine TH-2-Reaktion stimuliert wird, ist bisher wenig erforscht [71, 138, 140, 141]. Eine Prozessierung der Mistel-Antigene durch Antigen präsentierende Zellen wird angenommen, konnte jedoch noch nicht detailliert belegt werden [23]. Jedenfalls entspricht das bei behandelten Patienten beobachtete Auftreten einer Immunreaktion von T-Helfer-Zellen und B-Zellen diesem Weg. In vitro Experimente zeigten, dass eine subklassenspezifische IgG1-Produktion von einem direkten Kontakt der B-Zelle mit einer aktivierten TH-1-Zell-Linie abhängt und nicht allein durch Kontakt mit den Th-1 typischen Zytokinen auftritt [28].

Aus unserer Arbeit geht hervor, dass auf das Auftreten von Antikörpern der Subklasse 1 häufig solche der Subklasse 4 folgen. Die Prävalenz von stark positiven IgG1-AK erreicht ab dem 9. Behandlungsmonat Werte von ca. 80%. Zu diesem Zeitpunkt liegt die Prävalenz für IgG4 knapp über 50% um in den restlichen Monaten auf 67% anzusteigen. Die Schwelle von 50% Prävalenz wird von IgG4 mit etwa 9 Monaten Verspätung auf IgG1 überschritten. Aus den oben geschilderten Modellvorstellungen heraus ist ein Wechsel der Reaktionslage von TH-1-betont auf TH-2-betont

anzunehmen, wenn das Antigen persistiert. Die Assoziation von IgG4-selektiven Antworten auf oft wiederholte Impfungen ist bekannt [1]. Ähnlich ist die Situation im Prinzip bei einer Misteltherapie; es erfolgt die Antigenfreisetzung anders als bei Infektionen hier stoßweise und rhythmisch 1-3 mal /Woche. Dies entspricht im Prinzip einer Hyposensibilisierung, wo -bei Erfolg- nach etwa 2 Jahren eine IgG4-Dominanz gegenüber IgG1 erreicht wird [100]. Dennoch ist zumindest über den Beobachtungszeitraum von zwei Jahren ein Ablösen der TH-1-Reaktion von einer TH-2-Reaktion aus den ML1-IgG-Subklassen als Surrogatmarker nicht abzulesen. Vielmehr kommt es zu einer „Sättigung“ der IgG1-Prävalenz knapp über 80%, die zeitlich verzögert von einer steigenden IgG4-Prävalenz begleitet ist, sodass an eine Kostimulation beider Wege zu denken ist.

Man nimmt an, dass je nach Art der enthaltenen Epitope verschiedene Zellpopulationen aktiviert werden können und eine konkurrierende Stimulation beider Wege möglich ist, wofür das gemeinsame Auftreten von ML-1-AK des IgG1 und des IgG2/4-Typs spricht [13, 143].

Da das ML1 auf A- und B-Kette mindestens 2 Epitope besitzt, ist auch bei weitgehender Neutralisierung des einen Epitops durch Anti-ML1-AK eine immunmodulierende Wirkung denkbar, bzw. anzunehmen. Unsere Arbeit spricht also auf der Ebene der IgG-Subklassen für eine anfänglich TH-1 dominierte Antwort, die im Verlauf zunehmend durch eine parallele TH-2 Antwort ergänzt wird. Leider fehlen uns die Werte für Anti-ML-1-IgE. Dieser TH-2-typische Antikörper tritt nicht selten in den ersten Monaten einer Behandlung mit VAE begleitet von IgG1-AK auf, sodass bereits in der Frühphase der Mistelexposition eine Stimulierung beider Wege zu konstatieren ist [40].

Neben einer Aktivierung des spezifischen Immunsystems können VAE auch das unspezifische Immunsystem beeinflussen und NK-Zellen aktivieren [61]. Diese Zellen haben als Produzenten zahlreicher Zytokine eine direkte zytotoxischer Aktivität, dienen darüber hinaus aber auch als Modulatoren der adaptiven Immunantwort. Kelly et al. konnten im Tierversuch zeigen, dass die Abwehr MHC-defizienter CD70+ Tumoren durch NK-Zellen nachfolgend eine spezifische Immunantwort mit Memory-Funktion triggert, die diese Tiere auch erfolgreich MHC-suffiziente Tumoren der gleichen Linie

abwehren lässt und zwar über CTL und TH-1-Antworten. Dieser Vorgang ist IFN- γ abhängig. Es wird angenommen, dass IFN- γ sowohl zu einer NK-Proliferation als auch APC dazu anregt, Fragmente der durch NK-Aktivität zerstörten Tumorzellen naiven T-Zellen zu präsentieren [83].

4.3.4 Eosinophile und Tumorgeschehen

Eosinophile stellen unter den zirkulierenden Leukozyten nur eine kleine Gruppe dar, sind jedoch wichtige Mediatoren bei Krankheiten wie Asthma bronchiale, Atopische Dermatitis oder Wurminfektionen. In vitro konnten Eosinophile die zytotoxische Wirkung von Makrophagen auf Tumorzellen verstärken [135]. Auch ihre Rolle bei manchen humanen Tumoren findet zunehmend Beachtung und wurde sowohl bei hämatologischen wie z.B. Hodgkin-Lymphom als auch bei soliden Tumoren bestätigt [53, 124]. Die Ablagerung von granulären eosinophilen Eiweißen wurde bei Mamma-, Ovarial- und Uteruskarzinomen gefunden [98, 125]. Es konnten Adhäsions- und Aktivierungsmoleküle auf Brustkrebszellen definiert werden, die die Tumordinvasion verständlich machen, die Rolle der Eosinophilen am Ort des Tumors bleibt jedoch noch unklar und z.T. widersprüchlich [3]. Hemmerich beobachtete eine peritumorale Eosinophilie beim Mammakarzinom durch präoperative subkutane Gaben von VAE [66]. Während einige Studien mit eosinophiler Tumordinfiltration eine verbesserte Prognose assoziieren [15, 53, 76, 98, 116], finden andere keine solche Assoziation oder eine mit schlechterer Prognose [31, 43, 97].

Dennoch liegen experimentelle Befunde vor, die stark für eine wichtige Rolle der infiltrierenden Eosinophilen als TH-2-Effektorzellen in der Tumoralabwehr sprechen: Hung et al. zeigten in einem Mausmodell zur Tumorkvakzination ein Zusammenwirken von TH-1- und TH-2-Effektormechanismen, indem abhängig von IL-4 und IFN- γ eine vornehmlich eosinophile Tumordinfiltration zur kompletten Tumoralabwehr führte [73]. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass Eosinophile sowohl Typ 1 wie Typ 2 Zytokine exprimieren können [152]. Auch für die Transplantatabstoßung kann eine TH-2 dominierte Infiltration mit Eosinophilen in Frage kommen [52]. Es wird außerdem spekuliert, dass die Eosinophilen in die Tumorbologie mehr über eine Modulation der

Mikroumgebung des Tumors durch Gewebs-Remodeling und Angiogenesebeeinflussung eingreifen können als über eine Zytotoxizität [78].

Für die Bluteosinophilie fanden Ownby et al. an über 500 Patienten eine höhere Rezidivrate assoziiert mit sehr niedrigen Eosinophilen ($< 0,055/\text{nl}$), bzw. Lymphozyten ($< 1,5/\text{nl}$) [112]. Dieses Ergebnis könnte auf eine insgesamt hypoerge Reaktionslage des Immunsystems mit relativer Leukopenie und konsekutiv verminderter Tumorabwehr hindeuten. Demgegenüber weist unsere Arbeit eine gewisse Korrelation von Rezidivwahrscheinlichkeit mit erhöhten Eosinophilenzahlen auf, die unter Abschnitt 4.2.7 diskutiert wird. Die Ergebnisse von Ownby konnte Gutstein an einer kleineren Gruppe mit 83 Patienten allerdings nicht bestätigen [121]. Sbalzarini et al. konnten bei Brustkrebserkrankungen in ihrem Krankengut keine Korrelation von Hypereosinophilie und Progress finden, wie sie für andere solide Karzinome beschrieben wurde [127].

Die häufig beobachtete, leicht verzögert auftretende, entzündliche Lokalreaktion an der Injektionsstelle von Mistelextrakten darf nicht mit einer hochakuten allergischen Infiltration verwechselt werden, an der häufig dann auch Eosinophile beteiligt sein können. Vielmehr handelt es sich eher um eine DTH, was auch durch histologische Untersuchungen bestätigt werden konnte. Es findet sich eine dichte perivaskuläre Infiltration mit Lymphozyten und Monozyten. Nicht in erhöhter Anzahl fanden sich hingegen Eosinophile, Mastzellen, Neutrophile oder Granulozyten [55].

Bei Tumorpatienten, die mit pharmazeutischen Gaben von IL-4 behandelt wurden, zeigte sich an allen Studienteilnehmern eine mäßige Eosinophilie [134]. Bemerkenswert ist in jüngerer Zeit die Bestätigung eines indirekten Pfades der antigeninduzierten IL-4 Produktion durch Zellen des unspezifischen Immunsystems (meist Mastzellen) unter einer Typ 1 dominanten Reaktionslage des Immunsystems [80]. Unter diesem Blickwinkel muss auch die frühe Eosinophilie unter Therapie mit VAE nicht unbedingt durch eine eigentliche Typ 2-Stimulation erklärt werden. Möglicherweise ist die Eosinophilie unter Mistel am ehesten über die Zytokinsekretion von Zellen des unspezifischen Immunsystems hervorgerufen. Auch von einer Aktivierung der NK-Zellen als Teil des unspezifischen Immunsystems kann eine Eosinophilie getriggert

werden, da diese zur Produktion des Typ 2-Zytokins IL-5 fähig sind. Die IL-5 Bildung tritt verzögert auf, da die NK-Zellen eine Reifung nach erstmaliger Stimulation durchlaufen [148]. Das verzögerte Auftreten fand auch Henn 1995 an einer Gruppe von 10 Patientinnen mit Mammakarzinom, wo in der Anfangsphase einer Misteltherapie mit AM es mittelfristig innerhalb von ca. 3 Wochen einsetzend zu einem signifikanten Anstieg der Eosinophilenwerte kam [67]. Die Eosinophilen-Tagesmittelwerte lagen an Tag 1 und 2 bei 0,15/nl und nach 3 Wochen bei 0,25. Die Leukozyten-Tagesmittelwerte lagen jeweils zwischen 5 und 6/nl. Ein weiteres Ergebnis, das die bisher vielleicht unterschätzte Komplexität der Typ1/Typ2-Steuerung unterstreicht, erzielten Karulin et al, die eine dissoziierte Expression einzelner Zytokine durch Memory-Zellen beobachteten, welche bei wiederholtem Antigenkontakt eine Feinabstimmung der folgenden Zytokinsekretion auch im Sinne einer Typ1/Typ2-gemischten Antwort ermöglicht [81].

Während das gültige Model der klassischen Typ 1/Typ 2-Differenzierung früher oder später ein vorherrschendes Reaktionsprinzip auf einen bekannten Antigenstimulus erwarten lassen würde, stellen die oben genannten Ansätze dies in Frage und öffnen Perspektiven, in die sich die sonst widersprüchlichen Reaktionen des Immunsystems auf VAE besser eingliedern lassen.

4.4 Schlußfolgerungen und Ausblick

Über den Zeitraum von 24 Monaten einer adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms mit dem Mistelpräparat ABNOBAviscum Mali® kommt es bei 100% der Patientinnen zum Auftreten von Anti-ML-1-Antikörpern des IgG-Typs sowie zu einem signifikanten Anstieg der eosinophilen Granulozyten sowohl nach 1 wie nach 24 Monaten. Die Anti-ML-1-IgG und die eosinophilen Granulozyten werden durch zusätzliche adjuvante Chemotherapie, Radiotherapie oder Hormontherapie, aber auch durch andere Faktoren wie Lebensalter und Allergieanamnese wenig beeinflusst. Auf der Ebene der Anti-ML-1-IgG-Subklassen dominieren in den ersten Monaten der Misteltherapie die Subklassen 1 und 3, im weiteren Verlauf tritt mit zunehmender Häufigkeit die Subklasse 4 neben die Subklasse 1, die ebenfalls weiter zunimmt, während die Häufigkeit der Subklasse 3 abnimmt. Die Befunde deuten sowohl auf eine Typ TH-1- wie auf eine Typ TH-2-Stimulierung der Immunantwort auf das Vielstoffgemisch des Mistelextraktes. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um im Rahmen einer Therapie mit VAE den

Stellenwert der induzierten Eosinophilie sowie den der Bildung von Anti-ML-1-IgG und des jeweiligen Subklassenmusters zu klären. Die Zuverlässigkeit der Verwendung von Anti-ML-1-IgG-Subklassen als Surrogatmarker für eine Typ-1- oder Typ-2-Aktivierung des Immunsystems sollte durch simultane Bestimmung von Zytokinmustern, beispielsweise mittels Multiarray [145] oder mittels durchflusszytometrischer intrazellulärer Zytokinbestimmung [10] erprobt werden. Für eine bessere Einordnung der Phänomene in das Geflecht immunologischer Beziehungen wäre ausserdem die parallele Bestimmung der Gesamt-IgG-Subklassen und die Erfassung der relativen Eosinophilenzahlen wünschenswert.

5 Zusammenfassung

Der Verlauf von Eosinophilen Leukozyten im Blut und Anti-ML-1-IgG-Subklassen über 24 Monate wurde im Sinne einer retrospektiven Anwendungsbeobachtung bei Mammakarzinom-Patientinnen einer onkologischen Schwerpunktpraxis untersucht, die sich erstmals einer Behandlung mit dem Mistelpräparat ABNOBAviscum Mali ® unterzogen.

Zielsetzung der Untersuchung ist die Bereitstellung eines größeren Datenmaterials dieser Verlaufsparameter und eine Auswertung unter explorativen Gesichtspunkten.

Im Verlauf der 24-monatigen Behandlung bildeten alle Patientinnen IgG-Antikörper gegen ML-1. Der individuelle Verlauf der IgG-Subklassenmuster erwies sich als ausgesprochen vielgestaltig und korrelierte nicht mit anderen Patienten- oder Verlaufscharakteristika. Die Bildung von Antikörpern der Subklassen 1 und 3 ging zeitlich der Subklasse 4 voran, die Subklasse 2 wurde nur bei 18 % der Patientinnen gebildet und nahm im Verlauf der Behandlung wieder ab. In einer logarithmischen Modellrechnung nahm sowohl der Titer für IgG1 wie für die IgG4 vom 3. zum 24. Monat signifikant zu. Auch die (nicht logarithmischen) Titer-Mittelwerte der Subklassen 1 und 4 sowie der Subklassen 2 und 4 sowie 2 und 3 waren signifikant positiv korreliert ($p < 0,01$). Keine signifikante Korrelation bestand zu den Eosinophilen. Die Eosinophilenzahlen waren sowohl 1 Monat wie auch 24 Monate nach Behandlungsbeginn signifikant erhöht.

Trotz der hohen Immunogenität des verwendeten Mistelextraktes zeigt sich eine gute Verträglichkeit ohne schwerwiegende Nebenwirkungen. Die Untersuchung bestätigt die vorbeschriebene hohe Penetranz einer frühen Eosinophilie und einer Anti-ML1-IgG-Bildung unter Behandlung mit VAE. Das zur Zeit der höchsten Eosinophilie noch seltene Auftreten lektinspezifischen IgG und das im Verlauf der Antikörperbildung eher späte Auftreten von solchen der Subklasse 2 und 4 unterstützt die Annahme, dass die Eosinophilie durch das Vielstoffgemisch des VAE über das unspezifische Immunsystem getriggert wird. Verwendet man die Subklassenverteilung als Surrogatmarker für die Typ1/Typ2-Polarisierung des Immunsystems so entwickelt sich während einer 24monatigen Behandlung mit VAE eine parallele Stimulation beider Wege. Weitere

Untersuchungen sind erforderlich, um den Stellenwert von Eosinophilie und Anti-ML1-IgG-Bildung in der Behandlung mit VAE zu erhellen.

6 Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AM	ABNOBAviscum Mali ®
Anti-ML1-IgG	Anti-Mistel-Lektin-1-Immunglobulin G
APC	Antigen Präsentierende Zellen
BRM	Biological Response Modifier
CD	Cluster of Differentiation
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zelle
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
FasL	Fas-Ligand
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MHC	Major Histocompatibility Complex
ML	Mistel-Lektin
NK	Natural Killer
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
TH-1	T-Helfer Zelle vom Typ 1
TH-2	T-Helfer Zelle vom Typ 2
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VAE	Viscum album extracts
VAL	Viscum album L.

7 Literaturverzeichnis

1. Aalberse RC, Gaag R van der, Leeuwen J van: Serological aspects of IgG4 antibodies: Prolonged immunisation results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 1983;130:722-729
2. ABNOBA-Heilmittel GmbH Pforzheim. (Firmenmitteilung), 2001
3. Ali S, Kaur J, Pate KD: ICAM-1 and VCAM-1 are expressed by human breast carcinoma cells and support eosinophil adhesion and activation. *Am J Pathol* 2000;157:313-321
4. American Joint Committee on Cancer: *AJCC Cancer Staging Manual*. Philadelphia, Pa. Lippincott-Raven Publishers, 5. Aufl., 1997:171-180
5. Amman AJ: Antibody immunodeficiency disorders. in: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (ed.): *Basic and Clinical Immunology*. 8. Aufl., Prentice-Hall Int., London, 1994:266-278
6. Aucouturier P, Barra A: Long lasting IgG subclass and anti-bacterial polysaccharide antibody deficiency after bone marrow transplantation. *Blood* 1987;70:779-784
7. Bakemeier RF, Hildreth NG, Ryan DH: Lymphocyte subclasses and immunoglobulin in adults receiving radiation treatment in infancy for thymic enlargement. *Radiat Res* 1986;107:367-372
8. Bancroft AJ, Else KJ, Grecis RK: Low level infection with *Trichuris muris* significantly affects the polarization of the CD4 response. *Eur J Immunol* 1994;24:3313-3318
9. Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S: Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and potentiates anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer res* 1999;59:2038-2050
10. Barth H: Evaluierung der TH-1/TH-2-Balance bei autoimmunen und viralen Erkrankungen und ihre Beeinflussung durch immunmodulatorische Substanzen. Nat. Dissertation, Tübingen 2000
11. Beck JT, Hsu SM, Wijdenes J, Bataille R, Klein B, Vesole D, Brunda K, Luistro L, Warriar RR: Antitumor and anti-metastatic activity of interleukin-12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993;178:1223-1226
12. Behn U, Dambeck H, Metzner G: Modeling TH-1-TH-2 regulation, allergy and hyposensitization. In: Bagnoli F, Ruffo S, Lio P. (Hrsg.): *Dynamical Modeling in Biotechnology: Ecology, DNA and the Immune System*. World Scientific, Singapore, 2000
13. Berg PA, Stein GM: Beeinflusst die Misteltherapie die Abwehr epithelialer Tumoren? Eine kritische immunologische Analyse. *Dtsch Med Wschr* 2001;126:339-345
14. Bergmann C, Hemmen JL van, Segel SA: TH-1 or TH-2: How an appropriate T helper response can be made. *Bulletin Math Biol* 2001;63:405-

430

15. Bethwaite PB, Holloway LJ, Yeong ML, Thornton A: Effect of tumor associated tissue eosinophilia on survival of women with stage IB carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1993;46:1016-1020
16. Beuth J, Ko HL, Pulverer G: Immunmodulation durch das galaktosidspezifische Mistellektin: Experimentelle und klinische Evaluation. In : Scheer R, Becker H, Berg A. (Hrsg.): *Grundlagen der Misteltherapie*. Hippokrates Verlag Stuttgart 1996;243-250
17. Bird JJ, Brown RJ, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wand CR, Reiner SL: Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998;9:229-237
18. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bilefeldt-Ohmann H: Establishment of stable cell-mediated immunity that makes susceptible mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 1992;257:539-542
19. Burger AM, Mengs U, Schuler JB, Fiebig HH: Antiproliferative activity of an aqueous mistletoe extract in human tumor cell lines and xenografts in vitro. *Arzneimittelforschung* 2001;51:748-759
20. Burton DR, Gregory L, Jefferis L: Aspects of the Molecular Structure of the IgG subclasses. *Monograph Allergy* 1986;19: 7-13
21. Büssing A, Wagner M, Wagner B, Stein GM, Schietzel M, Schaller G, Pfüller U: Induction of mitochondrial Apo2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates in cultured lymphocytes by the toxic proteins from *Viscum album L.* *Cancer Lett* 1999;139:79-88
22. Büssing A: Induction of apoptosis by the mistletoe lectins. A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album L.* *Apoptosis* 1996;1:25-32
23. Büssing A: Mistletoe therapy and immunological research. *Anti-Cancer Drugs* 1997;8(suppl. 1)65
24. Chabner E, Nixon A, Gelman R: Family history and treatment outcome in young women after breast-conserving surgery and radiation therapy for early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:2045-2051
25. Coffman RL, Leder P: An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992; 257: 548-551.
26. Cosmi L, Annunziato F, Galli M, Maggi R, Nagata K, Romagnani S: CRTH-2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 TH and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur J Immunol* 2000;30:2972-2979
27. Daems, WF: *Ita Wegman. Zürcher Zeit 1906-1920. Erste ärztliche Krebsbehandlung mit der Mistel*. Philosophisch-Anthroposophischer Verlag am Goetheanum, Dornach 1986.
28. Dembech C, Quinti I, Cimignoli E, Albi N, Terenzi A, Gerli R, Galandrini R, Grignani F, Velardi A: Human T-helper clones induce IgG production in

- a subclass-specific fashion. *Cell Immunol* 1992;139:306-317
29. Dierbach JH: Die Arzneimittel des Hippokrates. Versuch einer systematischen Aufzählung der Medikamente. Neue Akademische Buchhandlung von Karl Groos, Heidelberg 1824;71
 30. Dietl J: Das Lymphknotenproblem in der Frauenheilkunde. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 1999;59:589-599
 31. Driel WJ van, Hogendoorn PC, Jansen FW, Zwinderman AH, Trimbos JB, Fleuren GJ: Tumor-associated eosinophilic infiltrate of cervical cancer is indicative for a less effective immune response. *Hum Pathol* 1996;27:904-911
 32. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451-1467
 33. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative group: Ovarian ablation in early breast cancer: overview of the randomised trials. *Lancet* 1996;348:1189-1196
 34. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992;339:1-15
 35. Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim SSJ, Gery I: Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in TH-1 and TH-2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 2002;168:3181-3187
 36. Elsässer-Beile U, von Kleist S, Sauther W, Gallati H, Schulte MJ: Impaired cytokine production in whole blood cell cultures of patients with gynecological carcinomas in different clinical stages. *Br J Cancer* 1993;68:32-36
 37. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM: T helper subset development: roles of instruction, selection and transcription. *J Clin Invest* 2002;109:431-435
 38. Felsner P, Steinschiffer W, Schauenstein K: The tumor-associated shift in immunoglobulin G1/G2 is expressed at the messenger RNA level of peripheral blood B lymphocytes in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 2000;88:461-67
 39. Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG: IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9:16-23
 40. Fischer S, Classen K, Klein R, von Laue HB, Scheer R, Stein GM, Berg PA: Immunologische Reaktion von Tumor-Patienten innerhalb der ersten 6 Monate einer Mistelbehandlung. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Berg PA, Fintelmann V (Hrsg.): *Die Mistel in der Tumorthherapie-Grundlagenforschung und Klinik*. KVC Verlag Essen 2001. 459-471
 41. Fisher B, Anderson S, Redmond CK: Reanalysis and results after 12 years

- of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1995;333:1456-1461
42. Fisher B, Dignam J, Bryant J: Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 1996;88:1529-1542
 43. Fisher ER, Paik SM, Rockette H, Jones H, Caplan R, Fisher B: Prognostic significance of eosinophils and mast cells in rectal cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *Hum Pathol* 1989;20:159-163
 44. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ: Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000 Jul;124:966-978.
 45. Fornander T, Cedermark B, Mattsson A.: Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet* 1989;333:117-120
 46. Franz H, Ziska P, Kindt A: Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem J* 1981;195:481-484
 47. French MAH, Harrison G: Serum IgG subclass concentrations in healthy adults: a study using monoclonal sera. *Clin Exp Immunol* 1984;56:473-479
 48. Gabius HJ: Probing the cons and pros of lectin induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimie* 2001;83:659-666
 49. Gergely J: Structural studies of Igs. *Immunochemistry* 1967;4: 101-107
 50. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ: Meeting Highlights: International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817-3827
 51. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ: Meeting highlights:International Consensus Panel on the treatment of primary breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1601-1608
 52. Goldman M, Moine A Le, Braun M, Flamnad V, Abramowicz D: A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends Immunol* 2001;22:247-251
 53. Goldsmith MM, Belchis DA, Cresson DH, Merritt WD, Askin FB: The importance of the eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;106:27-33
 54. Goldstein IJ, Poretz RD: Isolation, physiochemical characteristics and carbohydrate binding specificity of lectins. In: Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ (Hrsg.): *The lectins: Properties, function and application in biology and medicine*. Academic Press, London 1986;33-247

55. Gorter RW, Wely M van, Stoss M Wollina U: Subcutaneous infiltrates induced by injection of mistletoe extracts. *Am J Ther* 1998;5:181-187
56. Greve B, Magnusson CG, Melms A, Weissert R: Immunoglobulin isotypes reveal a predominant role of type 1 immunity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;121:120-125
57. Haas H.: *Parabeln der Kräutermedizin. Geschichte der Heilpflanzenkunde.* Innovationsverlag-GmbH 1989
58. Hager ED: Die prognostische Relevanz immunologischer Parameter in der Onkologie. In :Scheer R, Becker H, Berg PA (Hrsg.): *Grundlagen der Misteltherapie.* Hippokrates Verlag Stuttgart 1996;419-436
59. Hager ED: The prognostic value of immune function testing in cancer patients and its implication on immunotherapy. In: Zoch E, Neumeyer G : *Thymic factors and their influence on BRM/CSF.* International Symposium European Academy Nonnweiler/Trier. Mack, Schöneich 1990
60. Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ: Increased secretion of TNF- α , IL-1 and IL-6 by human mononuclear cells exposed to β -galaktoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res* 1990;50:3322-3326
61. Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ: Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res* 1989 Sep 1;49(17):4803-4808.
62. Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ: Zytokine als Lektin-induzierte Mediatoren in der Misteltherapie. *Therapeutikon* 1990; 4:136-145
63. Hajto T, Lanzrein C: Natural killer and antibody dependent cell mediated cytotoxicity activities and large granular lymphocyte frequency in *Viscum album* treated breast cancer patients. *Oncology* 1986;43:93-97
64. Häusel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G (Hrsg.): *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis.* 5. Aufl., Bd.6. Springer Verlag, Heidelberg 1994;1160-1183
65. Heiny BM: Additive Therapie mit standardisiertem Mistelextrakt reduziert die Leukopenie und verbessert die Lebensqualität von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom unter palliativer Chemotherapie (VEC-Schema). *Krebsmedizin* 1991;12:3-14
66. Hemmerich FH: Zur Anwendung der Mistel bei benignen und malignen Erkrankungen in der Frauenheilkunde. In: Scheer R, Becker H, Berg A. (Hrsg.): *Grundlagen der Misteltherapie.* Hippokrates Verlag Stuttgart 1996;444-452
67. Henn W: Verlauf der Körperkerntemperatur und der Zahl peripherer Blutzellen unter Berücksichtigung ihrer Zirkadianrhythmik bei Mammakarzinom-Patientinnen vor und während der Therapie mit einem Mistelpräparat. Eine explorative Studie. *Med Dissertation FU Berlin* 1995.

68. Hernandez-Becerril N, Aza A, Reyes PA, Monteon VM: IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch Cardiol Mex* 2001;71:199-205
69. Hillman GG, Younes E, Visscher D, Ali E, Lam JS, Montecillo E, Pontes E, Haas GP, Puri RK: Systemic treatment with interleukin-4 induces regression of pulmonary metastases in a murine renal cell carcinoma model. *Cell Immunol* 1995;160:257-263.
70. Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra : The effect of antigen dose on CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor-alpha-beta-transgenic model. *J Exp Med* 1995; 182:1579-1584
71. Hostanska K, Hajto T, Spagnoli GC, Fischer J, Lentzen H, Herrmann R: A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Immun* 1995;14:295-304
72. Huizinga TW, van der Linden MW, Deneys-Laporte V, Breedveld FC: Interleukin-10 as an explanation for pregnancy-induced flare in systemic lupus erythematosus and remission in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999 Jun;38:496-498
73. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoli D, Levitsky H: The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 1998;188: 2357-2368
74. Hutchins L, Green S, Ravdin P: CMF versus CAF +/-tamoxifen in high-risk node-negative breast cancer patients and a natural history follow-up study in low-risk node-negative patients: update of tamoxifen results. *Breast Cancer Research and Treatment* 1999;57:25-26
75. International Breast Cancer Study Group: Effectiveness of adjuvant chemotherapy in combination with tamoxifen for node-positive postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1997;15:1385-1394
76. Iwasaki K, Torisu M, Fujimura T: Malignant tumor and eosinophils. Its prognostic significance in gastric cancer. *Cancer* 1986;58:1321-1327
77. Jurin M, Zarkovic N, Hrzenjak M, Ilic Z: Antitumorous and immunomodulatory effects of the *Viscum album* L. preparation Isorel. *Oncology* 1993;50:393-398
78. Kadin M, Butmarc J, Elovic A, Wong D: Eosinophils are the major source of transforming growth factor-beta 1 in nodular sclerosing Hodgkins disease. *Am J Pathol* 1993;142:11-16
79. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML: T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561-567
80. Karulin AY, Hesse MD, Yip HC, Lehmann PV: Indirect IL-4 pathway in type 1 immunity. *J Immunol* 2002;168:545-553
81. Karulin YK, Hesse MD, Tary-Lehmann M, Lehmann PV: Single-cytokine-

- producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity. *J Immunol* 2000;164:1862-1872
82. Kawano Y, Noma T, Yata J: Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol* 1994;153:4948-4958
 83. Kelly JM, Darcy PK, Markby, JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H, Smyth M: Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol* 2002;3:83-90
 84. Kiely PD, Helbert MR, Miles J, Oliveira DB: Immunosuppressant effect of gold on IgG subclasses and IgE; evidence for sparing of Th2 responses. *Clin Exp Immunol* 2000;120:369-374
 85. Kiene H: Klinische Studien zur Misteltherapie karzinomatöser Erkrankungen- eine Übersicht. *Therapeutikon* 1989;33:347-353
 86. Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, Uyemura K: IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *J Immunol* 1995 155:2240-2247
 87. Kitani A, Strober W: Regulation of C γ subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol* 1993;151:3478-88
 88. Kleijnen J, Knipschild P: Mistletoe treatment for cancer-review of controlled trials in humans. *Phytomedicine* 1994;1:255-260
 89. Klein R, Claßen K, Berg PA, Lüdtkke R, Werner M, Huber R: In vivo-induction of antibodies to mistletoe lectin-1 and viscotoxin by exposure to aqueous mistletoe extracts: a randomised double-blinded placebo controlled phase I study in healthy individuals. *Eur J Med Res* 2002;7:155-163
 90. Klein R, Claßen K, Fischer S, Errenst M, Scheffler A, Stein FM, Scheer R, Laue, HB von: Induction of antibodies to viscotoxins A1, A2, A3 and B in tumour patients during therapy with an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res* 2002;7:359-367
 91. Kommission C im Bundesgesundheitsamt: Monographie *Viscum album*. *Bundesanzeiger* 1986;38:99A
 92. Krag D, Weaver D, Ashikaga T: The sentinel node in breast cancer: a multicenter validation study. *N Engl J Med* 1998;339:941-946
 93. Krishnan L, Guilbert L, Russell A, Wegmann T, Mosmann T: Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN- γ response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol* 1996;156:644-652
 94. Laue HB von, Fischer S: Anti-Mistlektin-1-Antikörper während der *Viscum*therapie. *Erfahrungsheilkunde* 1998;6:373-380
 95. Laue HB von, Henn W: Zeitphänomene der Krebskrankheit. *Dtsch Zschr Onkol* 1991;23:64-73
 96. Laue HB von: Kontrollparameter während der *Viscum*therapie. In: Scheer

- R, Becker H, Berg A. (Hrsg.): Grundlagen der Misteltherapie. Hippokrates Verlag Stuttgart 1996;399-418
97. Leighton SE, Teo JG, Leung SF, Cheung AY, Lee JC, Hasselt CA van: Prevalence and prognostic significance of tumor-associated tissue eosinophilia in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1996;77:436-440
 98. Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS: Tumour-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol* 1981;34:1343-1348
 99. Loza M, Perussia B: Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1/type 2 differentiation? *Nat Immunol* 2001;2:917-924
 100. Lucas AH: IgG subclass restricted immune responses to allergens. *Springer Semin Immunopathol* 1990;12:385-396
 101. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM: Type 1 and Type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:532-562
 102. Maran R, Dueymes M, Le Corre R, Renaudineau Y, Shoenfeld Y, Youinou P: IgG subclasses of human autoantibodies. *Ann Med Interne* 1997;148:29-38
 103. Masetti R, Antinori A, Terribile D, Marra A: Breast cancer in women 70 years of age or older. *J Am Geriatr Soc* 1996;44:390-393
 104. Merchant TE, Mc Cormick B, Yahalom J, Borgen P: The influence of older age on breast cancer treatment decisions and outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;24:753-754
 105. Meulenbroek AJ, Zeijlemaker WP: Human IgG Subclasses: useful diagnostic markers for immunocompetence. CLP, Amsterdam 1996.
 106. Mirtl B: Mistel-Präparat in der Therapie maligner Erkrankungen. Langzeiterfahrungen – vorgestellt am Beispiel von vier Fällen. *Natura Med* 1992;7:466-472
 107. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE: Prognostic factors in node-negative breast cancer. *Ann Surg* 2002;235:10-26
 108. Miyoura H, Iwata M: Direct and indirect inhibition of TH-1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol* 2002;168:1087-1094
 109. Möckel B, Schwarz T, Zinke H, Eck J, Langer M, Lentzen H: Effects of ML-1 on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1997;47:1145-1151
 110. Mongini PKA, Paul WE, Metcalf ES: T cell regulation of immunoglobulin class expression in the antibody response to trinitrophenyl-ficoll. *J Exp Med* 1982;155:884-890
 111. Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: TH-1, TH-2 and more. *Immunology Today* 1996;17:138-146
 112. Ownby HE, Roi LD, Isenberg RR, Brennan MJ: Peripheral lymphocyte and

- eosinophil counts as indicators of prognosis in primary breast cancer. *Cancer* 1983;52:126-130
113. Oxelius VA: IgG subclasses in primary immunodeficiency disorder. *Monogr Allergy* 1986;19:156-169
 114. Peumans WJ, Verhaert P, Pfüller U, Van Damme EJ: Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe. *FEBS Lett* 1996;396:261-265
 115. Powrie, F, Coffman LR: Cytokine regulation of T-cell-function: potential for therapeutic intervention. *Immunology Today* 1993;14:14-27
 116. Pretlow TP, Keith EF, Cryar AK, Bartolucci AA, Pitts AM Pretlow TG, Kimball PM, Boohaker EA: Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. *Cancer Res* 1983;43:2997-3000
 117. Recht A, Come SE, Henderson IC: The sequencing of chemotherapy and radiation therapy after conservative surgery for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 1996;334:1356-1361
 118. Rogers PR, Croft M: Peptide dose, affinity and time of differentiation can contribute to the TH-1/TH-2 cytokine balance. *J Immunol* 1999;163:1205-1213
 119. Romagnani S: The TH-1/TH-2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263-266
 120. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE: Pathological prognostic factors in stage I (T1 N0 M0) and stage II (T1 N1 M0) breast carcinoma: A study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989;7:1239-1251
 121. Rotstein S, Blomgren H, Nilsson B, Petrini B, Wasserman J, Brarl E: Prognostic value of various immunological tests in breast cancer patients treated with adjuvant postoperative chemotherapy. *Chemiotherapia* 1984;3:227-231
 122. Rüdiger H, Gabius HJ: Lectinologie. Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung. *Dtsch Apoth Zeitung* 1993;133:15-25
 123. Saluk PH, Clem LW: Unique molecular weight of the heavy chain of human IgG3 proteins. *J Immunol* 1971;107-112
 124. Samoszuk M: Eosinophils and human cancer. *Histo Histopathol* 1997;12:807-812
 125. Samoszuk MK, Nguyen V, Gluzman I, Pham JH: Occult deposition of eosinophil peroxidase in a subset of human breast carcinomas. *Am J Pathol* 1996;148:701-706
 126. Samtleben R, Kiefer M, Luther P: Characterization of the different lectins from *Viscum album* (mistletoe) and their structural relationships with the agglutinins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *Lectins: Biol, Biochem, Clin Biochem* 1985;4:617-626
 127. Sbalzarini G, Mercantini F, Pandolfi C, Labadini A: Prognostic significance of hypereosinophilia in surgically treated breast carcinoma. Our experience. *Minerva Med* 1991;82:807-809

128. Schäffler MM: Die verschiedenen Formen der Misteltherapie- früher und heute - Studien und verschiedene Ansätze zur Misteltherapie. Med. Dissertation 2001. Universität Tübingen.39-44
129. Schauenstein E, Lahousen M, Schauenstein K: Selective decrease in serum immunoglobulin. *Cancer* 1996;78:511-16
130. Scheer R: Prozeß-Standardisierung: Grundlage einer sachgemäßen Qualitätssicherung von Mistelpräparaten. *Erfahrungsheilkunde* 1994;43:305-310
131. Scheffler A, Musielski H, Scheer R: Synergismus zwischen Lektinen und Versikeln von *Viscum album* L. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie* 1995;27:72-75
132. Shibata M, Takeshi N, Kanou H, Abe H, Takekawa M, Fukuzawa M: Decreased production of IL-12 and type 2 immune responses are marked in cachectic patients with colorectal and gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:416-420
133. Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC: Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med* 1990;303:178-184
134. Sosman JA, Bartemes K, Offord KP, Kita H, Fisher SG, Kefer C, Ellis TA, Fischer RI, Higgins TJ, Gleich GJ: Evidence for eosinophil activation in cancer patients receiving recombinant IL-4: effects of IL-4 alone and following IL-2 administration. *Clin Cancer Res* 1995;1:805-812
135. Spessotto P, Dri P, Bulla R, Zabucchi G, Patriarca P: Human eosinophil peroxidase enhances tumor necrosis factor and hydrogen peroxide release by human monocyte-derived macrophages. *Eur J Immunol* 1995;25:1366-1373
136. Stein GM, Berg PA: Evaluation of the stimulatory activity of a fermented mistletoe lectin-1 free mistletoe extract on T-helper cells and monocytes in healthy individuals in vitro. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 1996;46:635-639
137. Stein GM, Berg PA: Characterisation of immunological reactivity of patients with adverse effects during therapy with an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res* 1999;4:169-177
138. Stein GM, Berg PA: Modulation of cellular and humoral responses during exposure of healthy individuals to an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res* 1998;3:307-314
139. Stein GM, Berg PA: Non-lectin component in a fermented extract from *Viscum album* L. grown on pines induces proliferation of lymphocytes from healthy and allergic individuals in vitro. *Eur J Clin Pharmacol* 1994;47:33-38
140. Stein GM, Henn W, von Laue HB, Berg PA: Modulation of the cellular and humoral immune responses of tumor patients by mistletoe therapy. *Eur J Med Res* 1998;3:194-202

141. Stein GM, Meink J, Durst J, Berg PA: Release of cytokines by a fermented lectin-1 (ML-1) free mistletoe extract reflects differences in the reactivity of PBMC in healthy and allergic individuals and tumor patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;151:247-252
142. Steiner R: *Geisteswissenschaft und Medizin*. 13. Vortrag. Rudolf Steiner Nachlassverwaltung. Dornach 1920
143. Stettin A, Schultze JL, Stechemesser E, Berg PA: Anti-mistletoe lectin antibodies are produced in patients during therapy with aqueous mistletoe extract derived from *viscum album L* and neutralize lectin-induced cytotoxicity in vitro. *Klin Wschr* 1990;68:896-900
144. Taghian A, de Vathaire F, Terrier P: Long-term risk of sarcoma following radiation treatment for breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1991;21:361-367
145. Tam SW, Wiese R, Lee S, Gilmore J, Kumble KD: Simultaneous analysis of eight human TH-1/TH-2 cytokines using microarrays. *J Immunol Methods* 2002;261:157-165
146. Tweel JG van den (Hrsg.): *Immunologie: das menschliche Abwehrsystem*. Heidelberg 1999; Spektrum, Akad Verlag. 41-56
147. Voelter T, Aier T, Wacker R, Franz M, Stoeva S: Mistellektin I - Neuere Aspekte zur Glycosylierung, Primär- und Sekundärstruktur. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Berg PA, Fintelmann V (Hrsg.): *Die Mistel in der Tumorthherapie-Grundlagenforschung und Klinik*. KVC Verlag Essen 2001; 15-34
148. Warren HS, Kinnear BF, Phillips JH, Laner LL: Production of IL-5 by human NK-cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10 and IL-12. *J Immunol* 1995;154: 5144-5152
149. Wegman I: Die ersten Krebsbehandlungen mit *Viscum album*. *Beiträge zu einer Erweiterung der Heilkunst* 1987;40:233-238
150. Weiss MC, Fowble BL, Solin LJ: Outcome of conservative therapy for invasive breast cancer by histologic subtype. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1992;23:941-947
151. Weissman DN, Hubbs AF, Huang SH, Stanley CF, Rojanasakul Y, Ma JK: IgG subclass responses in experimental silicosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001;20 Suppl 1:67-74
152. Woerly G, Roger N, Loiseau S, Capron M: Expression of TH-1 and TH-2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:95-97
153. Yamamura M, Modlin RL, Ohmen JD, Moy RL: Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest* 1993;91:1005-1010.
154. Yamazaki K, Yano T, Kameyama T, Suemitsu R, Yoshino I, Sugio K: Clinical significance of serum TH-1/TH-2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Surgery* 2002;131:236-241

155. Yong LC, Estelle F, Simon R, Peng Z: A mouse model of mosquito allergy for study of antigen-specific IgE and IgG subclass responses, lymphocyte proliferation, and IL-4 and IFN- γ production. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:269-277
156. Yoshida T, Zhang M, Chen C, Franz H, Wu HC: Enhancement of the cytotoxicity of mistletoe lectin-1 by high pH or perturbation in Golgi functions. *Pharmazie* 1991;46:349-351
157. Zielinski CC, Mueller C, Tyl E, Tichatschek E, Kubista E, Spona J: Impaired production of tumor necrosis factor in breast cancer. *Cancer* 1990;66:1944-1948

8 Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. med. R. Klein für die fruchtbaren Diskussionen und die sorgfältige Betreuung der vor und während der Arbeit entstandenen Fragen.

Der onkologischen Schwerpunktpraxis Öschelbronn und insbesondere Herrn Dr. med. H.B. von Laue danke ich für die Überlassung der zugrundeliegenden Daten, aber auch für die anregende Begleitung und das wache Interesse an allen Stadien dieser Arbeit.

Die Geduld und Aufmerksamkeit meiner Frau Bettina hat diese Arbeit erst ermöglicht.

9 Lebenslauf

Name	Schleyerbach
Vornamen	Peer Walter
Geburtsdatum	4. Juli 1968
Geburtsort	Bremen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
	Schulische Ausbildung
1974-1978	Grundschule Heist
1978-1987	Ludwig-Meyn-Gymnasium Uetersen
Mai 1987	Abitur
1987-1988	Soziales Praktikum in Bolivien
1988-1990	Zivildienst
	Hochschulausbildung
1990-1996	Studium der Humanmedizin an der Universität Witten/Herdecke
3. Staatsexamen	22.10.1996
	Berufsweg
1997-1998	AiP an der Klinik Öschelbronn (Innere)
1.12.1998	Approbation als Arzt
1999-2000	Assistenzarzt in Psychiatrie am Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke
2000	Assistenzarzt in Chirurgie an der Klinik Blankenstein, Hattingen
2000-2001	Assistenzarzt an der Praxis Dr. A. Scheld, Pforzheim
Januar 2002	Weiterbildungsanerkennung als Arzt für Allgemeinmedizin
Juli 2002-März 2003	Assistenzarzt in Neurologischer Frührehabilitation am REHAB Basel
seit April 2003	Oberarzt am REHAB Basel

