

II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Prof. Dr. R.M. Schmid)

**Untersuchungen zum optimalen Zeitpunkt künftiger Immuntherapien  
mit monoklonalen Antikörpern bei Patienten mit Pankreaskarzinomen  
und einer Radiochemotherapie mit 5-Fluoruracil**

Heinz Weidenthaler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Lersch
2. Univ.-Prof. Dr. H. Bartels

Die Dissertation wurde am 29.01.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2003 angenommen.

Meiner Frau Elisabeth und meiner Tochter Lea gewidmet

## **Zusammenfassung**

Monoklonale Antikörper werden derzeit für eine Immuntherapie bösartiger Erkrankungen entwickelt. Der optimale Zeitpunkt der Applikation solcher Antikörper bei gleichzeitiger Anwendung etablierter Chemo- und Strahlentherapien muss noch bestimmt werden. Deshalb wurden bei neun Patienten mit Pankreaskarzinomen vor und während Therapie mit 5-Fluoruracil und lokaler Bestrahlung Anzahl und Aktivität verschiedener immunkompetenter Zellen gemessen. Insbesondere die B-Lymphozyten sanken während Radiochemotherapie. Die Phagozytoseaktivität und die antikörpervermittelte Zytotoxizität (ADCC) blieben jedoch weitgehend erhalten. Nach einer dreiwöchigen Therapiepause stiegen die Lymphozytenwerte unwesentlich an. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass monoklonale Antikörper möglichst frühzeitig, am besten vor einer Chemo- oder Strahlentherapie eingesetzt werden sollten, um eine optimale Immunantwort gegenüber antikörperbeladenen Tumorzellen zu erhalten.

## **Abstract**

As monoclonal antibodies are currently being developed for the immunotherapy of different types of cancer, the optimal schedule of their administration before or during conventional chemotherapeutic and radiotherapy regimens has to be evaluated. Therefore, the numbers and function of various immune cells were studied in nine patients suffering from pancreatic adenocarcinoma before and during treatment with a combined regimen of 5-fluorouracil and local radiotherapy. Especially numbers of B-cells decreased. The ADCC did not show significant changes. The decreased total numbers of cells did not recover significantly after a three-week rest.

As a result, there is evidence that immunotherapeutic agents such as monoclonal antibodies for the therapy of cancer should be administered as early as possible in the course of conventional treatment cycles of chemo- and radiotherapy.

# Inhalt

Zusammenfassung / Abstract	1
I Einleitung	
I.1 Häufigkeit und Verlauf von Tumoren des Pankreas	5
I.2 Bisherige Therapieverfahren	6
I.3 Ansätze zu neuen Verfahren	6
I.4 Notwendige Voruntersuchungen für immunologische Ansätze	7
II Material und Methoden	
II.1 Auswahl der Patienten	9
II.2 Blutentnahmen / Studienablauf	9
II.3 Klinisch-chemische und hämatologische Parameter	10
II.4 Lymphozytensubpopulationen / Messmethode / Durchflusszytometrie	10
II.5 Fc-Rezeptor-tragende Leukozyten / Messmethode / verwendete Antikörper	16
II.6 Aktivität der Phagozytose / Messmethode / Phagotest-Assay	20
II.7 Bestimmung der spezifischen Lyse über die antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC)	23
II.8 Erstellung der Diagramme / Statistik	24
III Ergebnisse der einzelnen Bestimmungen	
III.1 Blutbildveränderungen / Hämatologie	26
III.2 Verschiebungen der Lymphozytensubpopulationen	32
III.3 Anteile der Fc-Rezeptor-tragenden Zellen	37

III.4	Veränderungen der Phagozytoseaktivität	47
III.5	Sonstige Parameter (ADCC, NK-Zell-vermittelte Lyse)	50
IV Diskussion		
IV.1	Immunologische Grundlagen	54
IV.1.1	Zugrunde liegende zelluläre und humorale Abwehrmechanismen	54
IV.1.2	Bedeutung der einzelnen Zelltypen	57
IV.1.2.1	B- und T-Lymphozyten	57
IV.1.2.2	NK-Zellen	58
IV.1.2.3	Monozyten	59
IV.1.2.4	Granulozyten	60
IV.2	Vergleich mit früheren Arbeiten	60
IV.2.1	Phagozytierende Zellen, Fc-Rezeptor-tragende Zellen	60
IV.2.2	Gesamtleukozyten	64
IV.2.3	Lymphozyten-Subpopulationen	65
IV.3	Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse	69
Literatur		
Anhang (Tabellen)		
Verzeichnis der Abkürzungen		
Danksagung		

# **I. Einführung**

## **I.1 Häufigkeit und Verlauf von Tumoren des Pankreas**

Gastrointestinale Tumoren nehmen einen verhältnismäßig hohen Prozentsatz aller Todesfälle in den westlichen Ländern ein, die Anzahl der Neuerkrankungen alleine der kolorektalen Karzinome pro Jahr in den USA und Europa zusammen liegt bei etwa 300000<sup>23</sup>. Die einzige bisher auf Dauer wirksame, kurative Therapie besteht in der kompletten operativen Entfernung von Tumoren.<sup>14</sup> In den Fällen, in denen eine restlose Entfernung wegen nicht mehr gegebener Resektabilität nicht möglich ist, oder aber wenn sich aufgrund des chirurgischen oder pathologischen Befunds der Verdacht auf im Körper verbliebene Tumorzellen ergibt, stehen pharmakologische, systemische Therapien zur Verfügung.<sup>18</sup>

Für kolorektale Tumoren bestehen bei frühzeitiger Erkennung und konsequenter chirurgischer und nachfolgender Chemotherapie Langzeitüberlebensraten von bis zu über 70%<sup>30</sup>. Wesentlich ungünstiger stellen sich die Überlebensraten für Gallengangs- und Pankreas-Tumoren dar, hier entspricht die Mortalität annähernd der Inzidenz der Erkrankung<sup>28</sup>. Selbst nach einer möglichen Totalresektion des Tumors liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei unter 5 Prozent.

Darüber hinaus ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung häufig eine chirurgische Therapie wegen des Fortschritts der Erkrankung ohnehin nicht mehr möglich<sup>6</sup>. Die verbleibende Lebenszeit von Patienten mit einem nicht mehr operablen Pankreaskarzinom liegt derzeit bei nur wenigen Monaten.

## **I.2 Bisherige Therapieverfahren**

Aus diesem Grund stützt sich die heutige Therapie bei nicht mehr operablen Pankreastumoren auf eine Kombination aus Zytostatika und Strahlentherapie<sup>15, 19</sup>. Die derzeit am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika sind dabei 5-Fluoruracil, Folinsäure, und zunehmend auch Gemcitabin<sup>20</sup>. An größeren Zentren wird diese systemische Chemotherapie mit der externen, lokalen Bestrahlung der Tumorregion kombiniert. Auch mit den moderneren, derzeit angewandten Verfahren geht der therapeutische Effekt über eine Palliation nicht hinaus. In einigen Studien konnte zumindest eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit nachgewiesen werden, diese beträgt aber regelmäßig nur wenige Monate<sup>3, 6, 7, 36</sup>. Daher besteht die Notwendigkeit, nach alternativen Therapieverfahren zu forschen<sup>17</sup>.

## **I.3 Ansätze zu neuen Verfahren**

Eine Möglichkeit bietet die Anwendung von Immuntherapien. Zu der therapeutischen Verabreichung von monoklonalen Antikörpern, die gegen Oberflächenantigene von Tumorzellen gerichtet sind, wurden in den letzten Jahren mehrere Arbeiten veröffentlicht<sup>5, 31, 32, 33, 35</sup>. Für die Wirksamkeit von Immuntherapien ist ein funktionierendes körpereigenes Abwehrsystem erforderlich<sup>37</sup>.

In einer Vielzahl später zu beschreibender Immunmechanismen versucht der Organismus, fremde Zellen oder eben auch Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören<sup>27</sup>. Auch wenn die genauen Vorgänge bei der Tumorentstehung und -ausbreitung nicht restlos geklärt sind, nimmt man an, dass beim Gesunden entstehende entartete Zellen häufig schon unmittelbar nach ihrer Bildung vom Abwehrsystem erkannt und vernichtet werden; eine Tumorerkrankung entsteht so

erst gar nicht. Ein Hinweis auf diese Hypothese ist unter anderem das gehäufte Auftreten maligner Erkrankungen bei Erkrankungen des Immunsystems<sup>27</sup>. Liegt jedoch erst einmal eine solide Geschwulst vor, so ist das Immunsystem mit der Masse der Zellen überfordert, oder aber es erkennt sie gar nicht als fremd, da die Tumorzellen letztendlich durch maligne Entartung aus ursprünglich körpereigenen Zellen hervorgegangen sind.

Der Gedanke, die körpereigene Abwehr bei der Bekämpfung von Tumorzellen zu unterstützen, ist Grundlage von immuntherapeutischen Verfahren in der Behandlung maligner Erkrankungen. Eine wesentliche Rolle dabei spielen Antikörper, die gegen entartete Zellen gerichtet sind. Diese sollen den Abwehrzellen körperfremde Zellen markieren, die zu zerstören sind<sup>10</sup>. Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Tumortypen wurden bereits entwickelt und teilweise auch eingesetzt, so war beispielsweise für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen im Stadium Dukes C der monoklonale 17-1A-Antikörper (Panorex<sup>®</sup>) als Arzneimittel zugelassen und in klinischer Anwendung<sup>25, 26</sup>. Dabei stellte sich im Verlauf heraus, dass ein ausreichender Wirksamkeitsnachweis nicht gegeben war. Das Präparat ist nicht mehr auf dem Markt. Dennoch richten sich Hoffnungen auf Immuntherapeutika für verbesserte Tumortherapien.

#### **I.4 Notwendige Voruntersuchungen für Immuntherapien**

Für einen eventuellen Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Tumorzellen, stellt sich die Frage, ob diese gleichzeitig zu einer Chemo- und Radiotherapie gegeben werden können, oder aber ob ein gewisser zeitlicher Abstand notwendig ist. Die erhoffte Wirkung eines Antikörpers setzt voraus, dass die Zellen des körpereigenen Immunsystems bereit sind, als

fremd erkannte Zellen effektiv zu zerstören. Bekanntermaßen beeinträchtigt aber eine Chemotherapie jedoch auch das Immunsystem. Deshalb wurden in dieser Arbeit bei Patienten mit der Diagnose eines Pankreaskarzinoms verschiedene Parameter des Immunsystems im zeitlichen Verlauf während einer Radiochemotherapie untersucht.

## **II. Material und Methoden**

### **II.1 Auswahl der Patienten**

Die Untersuchungen fanden an Blutproben von neun Patienten statt, die wegen eines Karzinoms des Pankreas behandelt wurden. Das Alter der Patienten lag zwischen 48 und 67 Jahren, drei der Patienten waren weiblich, sechs männlich. Bei sieben der Patienten lag nach histologischer Sicherung der Diagnose ein inoperabler Befund vor, bei einem Patienten fand zunächst eine Tumoresektion nach Whipple statt, wobei jedoch makroskopisch Tumorreste verblieben waren (R2 entsprechend der UICC-Klassifikation<sup>12</sup>). Bei einem Patienten wurde aufgrund des klinischen und röntgenologischen Bildes auf eine Histologie verzichtet, Operabilität war nicht mehr gegeben.

Nach der Diagnose eines fortgeschrittenen Stadiums der Erkrankung wurden alle neun Patienten mit einer kombinierten Chemotherapie nach dem CLFT-Schema, bestehend aus Cyclophosphamid, Leukovorin, Fluoruracil und Tamoxifen, behandelt. Im Anschluss folgte parallel zu den 5-Fluoruracil-Infusionen eine lokale Bestrahlung der Primärtumorregion, in der Regel mit einer Gesamtdosis von 30 Gray in fraktionierten Einzeldosen über zwei bis drei Wochen (sieben Patienten erhielten 30 Gy, einer erhielt 33 Gy, einer erhielt 45 Gy). Nach dieser Radiochemotherapie wurde nach einer Pause von zwei bis drei Wochen mit dem nächsten Zyklus des CLFT-Schemas fortgefahren.

### **II.2 Blutentnahmen / Studienablauf**

Die Blutentnahmen für die Untersuchungen der Immunparameter fanden am ersten Tag der Radio-Chemotherapie mit 5-Fluoruracil, nach einer Woche sowie nach zwei Wochen statt. Nach Abschluss der Radiochemotherapie folgte eine vierte

Blutentnahme. Da nicht alle Patienten das CLFT-Schema komplett durchlaufen haben, liegt diese vierte Blutentnahme nur von sieben Patienten vor.

### **II.3 Klinisch-chemische und hämatologische Parameter**

Die einzelnen Blutentnahmen fanden im Rahmen der klinischen Routine statt, dabei wurden auch Serum- und Blutbildparameter über das zentrale Hauptlabor der Klinik bestimmt. Zusätzlich wurde ein Röhrchen heparinisiertes Vollblut abgenommen. Dieses Material wurde für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen verwendet.

### **II.4 Lymphozytensubpopulationen / Messmethode / Durchflusszytometrie**

Zunächst wurden pro Ansatz 10 µl fluoreszenzmarkierte Antikörper (Hersteller: Becton Dickinson) und 100 µl Vollblut gemischt und 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert, nach einer ersten Zentrifugation der hämoglobinhaltige Überstand verworfen.

Danach wurde die Zellsuspension erneut mit einer Waschlösung versehen und ein zweites Mal zentrifugiert, um überflüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die verbleibende Zellsuspension wurde mit Hilfe eines FACScan-Durchflusszytometers (Becton Dickinson) analysiert.

Für die Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen waren sechs getrennte Ansätze mit jeweils zwei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern notwendig.

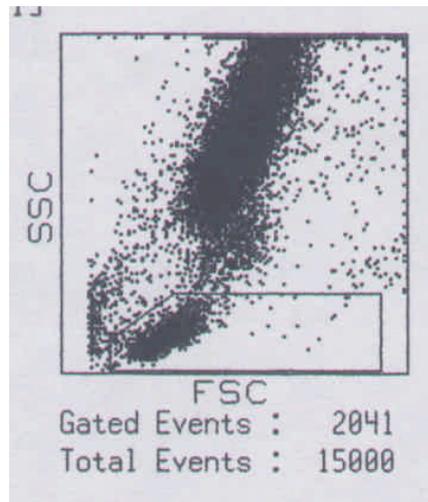
Im ersten Röhrchen wurden die Zellen mit CD45- und CD14-Antikörpern inkubiert, die selektiv an Lymphozyten bzw. Monozyten binden. Mit Hilfe der so

markierten Zellen konnte auf folgende Weise die alleinige Messung von Lymphozyten in den folgenden Röhrchen gewährleistet werden:

Die beiden verwendeten Antikörper (CD45/CD14) sind mit unterschiedlichen, fluoreszierenden Farbstoffen verbunden (FITC/PE). Das Durchflusszytometer kann für jede einzelne Zelle folgende Parameter messen:

- Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC)
- Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC)
- FITC-Fluoreszenz
- PE-Fluoreszenz

Dabei ist das Vorwärtsstreulicht ein Maß für die Größe der Zellen, das Seitwärtsstreulicht (SSC) ein Maß für das Vorhandensein von intrazellulären Granula. Trägt man die Messergebnisse für das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht bei einem normalen Differentialblutbild in ein Koordinatensystem ein, so liegen die Granulozyten als größte und am meisten granulierte Zellen in einer Population am weitesten rechts oben. Die Monozyten als ebenfalls eher große Zellen, aber kaum Granula enthaltend, liegen als Population im Koordinatensystem etwas unterhalb der Granulozyten. Die Lymphozyten als kleinste und am wenigsten granulierte Zellen finden sich im Koordinatensystem als Population nahe dem Achsenkreuz für Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC). Bei einem normalen Differentialblutbild zeigt sich daher bei Betrachtung der Messwerte für Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht im Koordinatensystem etwa folgendes Bild:



(Abb. 1: Durchflusszytometrische Darstellung aller Leukozyten ohne Farbstoffe, aufgetragen in einem Koordinatensystem für Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht)

Der Übergang von den Lymphozyten zu den Monozyten ist in der Darstellung Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC) häufig fließend und daher schwer abzuschätzen. Deshalb ist die FITC/PE-Markierung mit Antikörpern gegen Lymphozyten bzw. Monozyten sehr hilfreich, um festzulegen, in welchem Bereich des Koordinatensystems, in dem FSC gegen SSC aufgetragen sind, sich nun wirklich die Lymphozyten befinden. Außer den Messwerten für Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht kann im Durchflusszytometer für jede einzelne Zelle das Vorhandensein eines Fluoreszenzfarbstoffs bestimmt werden. Die Information, welcher Fluoreszenzfarbstoff auf einer einzelnen Zelle vorliegt, wird vom Durchflusszytometer ebenfalls an das angeschlossene Computersystem übermittelt. Auf diese Art und Weise können auf dem Farbbildschirm des Computersystems die Populationen der Monozyten und der Lymphozyten farblich hervorgehoben werden, eine genaue Abgrenzung wird möglich. Nun kann von Hand ein Fenster im Koordinatensystem FSC gegen SSC eingezeichnet werden, welches genau die Lymphozyten-Population umfasst.

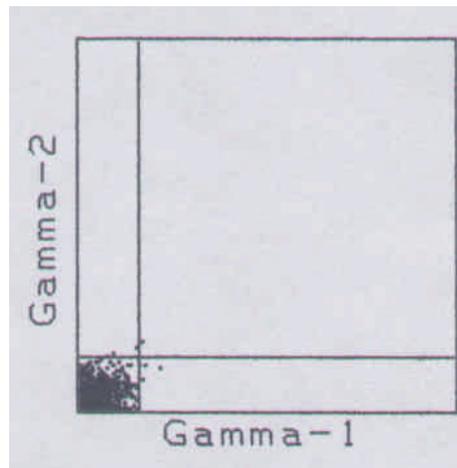
Für die folgenden Messungen mit den weiteren angesetzten Röhrchen werden zur Auswertung der mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern besetzten Lymphozyten

nur diejenigen Zellen berücksichtigt, deren Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht in das oben genannte Fenster fällt.

Auf diese Weise wird sichergestellt, dass tatsächlich nur Aussagen über die zu untersuchenden Lymphozyten getroffen werden.

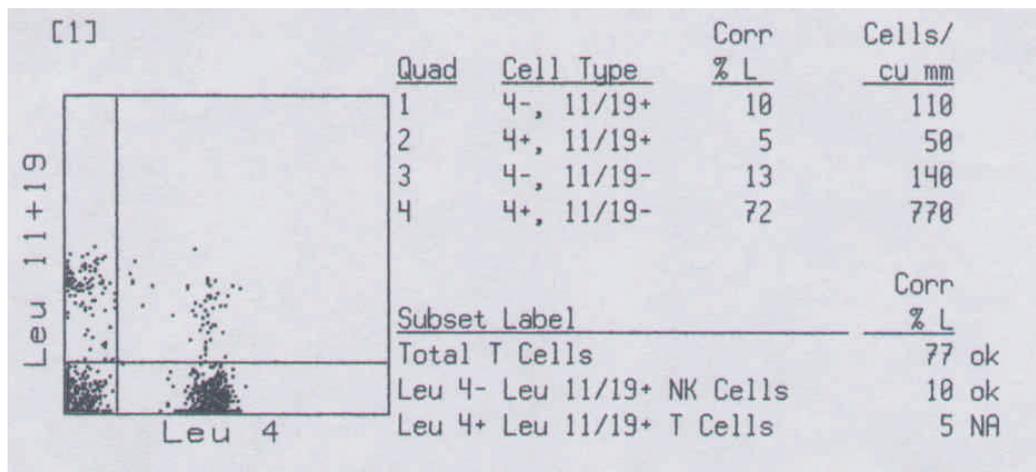
Der hier beschriebene Vorgang des Festlegens eines Fensters im FSC-SSC-Koordinatensystem, das ausschließt, Zellen zu messen, die beim aktuellen Messvorgang nicht von Interesse sind und das Ergebnis verfälschen würden, heißt „gating“. Das entsprechende Fenster nennt man „gate“ (aus dem Englischen: das „Tor“, durch das die einzelnen Zellen passen müssen).

Der Ansatz im zweiten Röhrchen ist noch kein diagnostischer, es handelt sich vielmehr um einen Kontrollansatz. Aufgrund des mit Hilfe des ersten Röhrchens festgelegten Gates werden ausschließlich Lymphozyten beurteilt. Im zweiten Ansatz befinden sich zwar Antikörper mit FITC- bzw. PE-Markierung, diese binden jedoch nicht an Lymphozyten. Trägt man aus der Messung des zweiten Röhrchens die Ergebnisse in das Koordinatensystem FITC gegen PE ein, so finden sich dort die Ergebnisse verhältnismäßig weit unten links. Die Größe des dabei entstehenden Clusters an Zellen entspricht der Größe des linken unteren Quadranten in den nachfolgenden Messungen. Im linken unteren Quadranten befinden sich dabei diejenigen Zellen, die weder den FITC-, noch den PE-Antikörper binden. Mit Hilfe des zweiten Ansatzes erfolgt also die Kalibrierung des Koordinatensystems FITC gegen PE, die in den folgenden Messungen relevanten Quadranten werden festgelegt.



(Abb. 2: Durchflusszytometrische Darstellung der Lymphozyten im Kontrollröhrchen, die weder FITC- noch PE-markiert sind. „Gamma-1“ und „Gamma-2“ werden vom Computersystem als Namen für die Achsen von FITC bzw. PE vergeben, in dieser Darstellung sind also die FITC- und PE-Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen)

In den anschließenden Ansätzen 3 bis 6 finden die tatsächlichen Messungen statt. Die gesamten Blutzellen werden mit jeweils zwei verschiedenen Antikörpern inkubiert, die verschiedenartig fluoreszenzmarkiert sind (FITC/PE). Gemessen werden aufgrund des mit Röhrchen 1 festgelegten Gates nur die Lymphozyten. Im Koordinatensystem FITC gegen PE zeigt sich dann, welche Zellen das durch die jeweiligen Antikörper erkannte Antigen tragen, und zwar im linken oberen oder rechten unteren Quadranten diejenigen Zellen, die jeweils eines der beiden untersuchten Antigene tragen, im rechten oberen Quadranten diejenigen Zellen, die beide Antigene tragen. Von der Software wird also ein Koordinatensystem ausgewertet, in das die aufgrund des Kontrollröhrchens bestimmten Quadranten eingezeichnet sind.



(Abb. 3: Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung der markierten Lymphozyten. In den jeweiligen Quadranten befinden sich einfach oder doppelt fluoreszenz-markierte Zellen, FITC bzw. PE)

Das Computersystem gibt den prozentualen Anteil der im jeweiligen Quadranten vorliegenden Zellen im Verhältnis zu den in der entsprechenden Messung insgesamt gezählten Zellen aus. Da ausschließlich die Fluoreszenzeigenschaften von Lymphozyten bestimmt werden, geben diese Prozentzahlen den Anteil derjenigen Lymphozyten in Bezug auf die Gesamtzahl der Lymphozyten an, die das entsprechende Antigen tragen. Die Gesamtzahl der Lymphozyten kann das Computersystem anhand von Rörchen 1 als Prozentanteil an der Gesamtleukozytenzahl berechnen. Um über die Prozentwerte hinaus auch die absoluten Zellzahlen, beispielsweise pro Mikroliter Vollblut, angeben zu können, ist als einzige zusätzliche Information die Gesamtleukozytenzahl erforderlich. Diese wird jeweils aus der gleichen Blutentnahme im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie bestimmt. Wird sie vor der durchflusszytometrischen Messung in das computerisierte Auswertungssystem eingegeben, so erhält man zusätzlich zu allen prozentualen Angaben auch die absoluten Zellzahlen pro Mikroliter Vollblut. Im einzelnen werden mit den Rörchen 3 bis 6 folgende Oberflächenantigene und damit Lymphozyten-Subtypen erfasst:

3. Ansatz: CD4 / CD8

entsprechen T-Helfer-Zellen und T-Killer- bzw. T-Suppressorzellen.

4. Ansatz: CD3 / CD19

entsprechen Gesamt-T-Lymphozyten und Gesamt-B-Lymphozyten

5. Ansatz: CD3 / HLA-DR

entsprechen Gesamt-T-Lymphozyten und aktivierte T-Lymphozyten

6. Ansatz: CD3 / CD16 und CD56

entsprechen Gesamt-T-Lymphozyten und NK-Zellen

Die Anteile der genannten Subtypen werden wie beschrieben als prozentualer Anteil der Gesamt-Lymphozyten sowie als absolute Zellzahlen bestimmt. Die Bestimmung der CD3-positiven Zellen, d.h. der Gesamt-T-Lymphozyten, findet dabei mehrfach statt. Das Ergebnis sollte aber bei ideal verlaufenden, zuverlässigen Messungen in allen Ansätzen das gleiche sein.

## **II.5 Fc-Rezeptor-tragende Leukozyten / Messmethode / verwendete**

### **Antikörper**

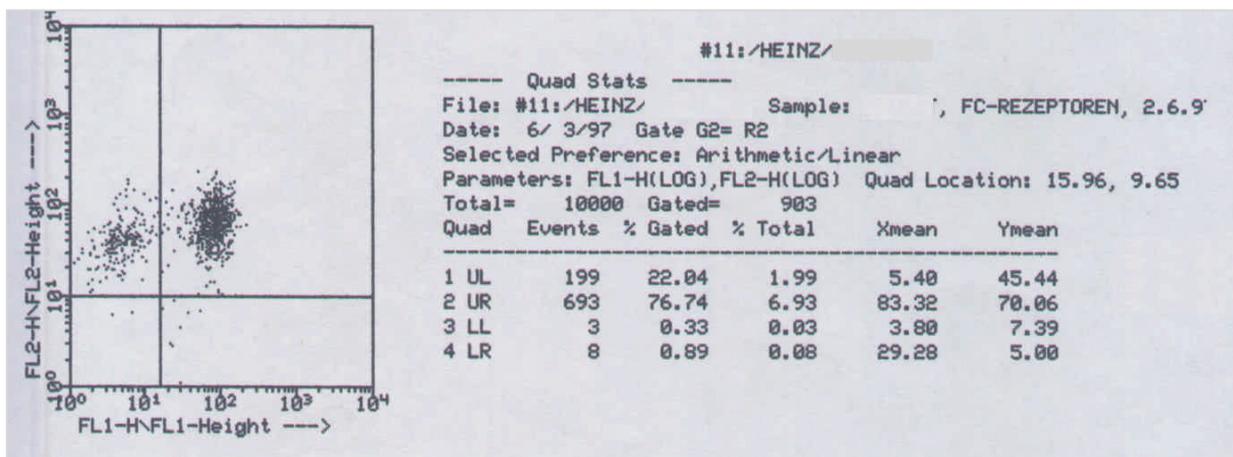
Für die Erkennung antikörper-markierter Zellen durch phagozytierende Zellen des Immunsystems ist der Fc-Teil der Antikörper von Bedeutung. Dieser Teil wird von Rezeptoren auf der Oberfläche der Phagozyten erkannt. Von Relevanz sind dabei die drei bisher bekannten Fc-Rezeptoren Fc-I $\gamma$ , Fc-II $\gamma$  und Fc-III $\gamma$ , deren Vorhandensein auf Leukozyten bestimmt wurde.

Auch für diese Bestimmung werden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern versehen und mittels Durchflusszytometrie vermessen und ausgezählt. Zunächst werden, entsprechend der Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen, 100  $\mu$ l Vollblut pro Ansatz mit einem Antikörpergemisch versehen. Zum Ermitteln des Anteils der Fc-III $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Zellen (CD16+) werden die Antikörper aus dem 6. Ansatz der Lymphozytensubpopulationen verwendet. Für die Rezeptortypen

Fc- $\text{II}\gamma$  und Fc- $\text{I}\gamma$ , entsprechend den Oberflächenantigenen CD32 und CD64, eine Mischung aus verschiedenen fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen diese beiden Antigene. Wie unter II.4 beschreiben, werden nach der 20-minütigen Inkubationszeit wieder zunächst die Erythrozyten lysiert, anschließend wird mit einer Waschlösung die Zellsuspension von Erythrozytenresten gesäubert. Die im Ansatz verbliebenen Zellen werden mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Zunächst wird auch hierfür mit Hilfe des Ansatzes 1 aus der Bestimmung der Lymphozytensubpopulation ein Gate festgelegt. Dieser Vorgang findet hier jedoch insgesamt drei mal statt. Einmal für die Lymphozyten, einmal für die Monozyten und einmal für die Granulozyten. Anschließend wird jeweils mit Hilfe des Ansatzes 2 der Lymphozytensubpopulationen der linke untere Quadrant des für die Auswertung relevanten Koordinatensystems FITC gegen PE festgelegt. Es handelt sich erneut um das Kontrollröhrchen, demnach werden hiermit die jeweils „negativen“, nicht fluoreszenz-markierten Zellen definiert. Danach wird die Messung am Röhrchen 6 der vorhergehenden Untersuchung vorgenommen, dieses enthält die CD16-Antikörper. Diese Antikörper sind PE-markiert, die entsprechenden Zellen befinden sich demnach in den beiden oberen Quadranten. Mit Hilfe des Koordinatensystems FITC gegen PE lässt sich somit zunächst der prozentuale Anteil der CD16-positiven Zellen an der jeweils mittels Gate festgelegten Zellpopulation bestimmen. Dieser Prozentanteil multipliziert mit dem Prozentanteil der jeweiligen Zellart (Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten) an den Gesamtleukozyten, multipliziert mit der Anzahl der Gesamtleukozyten, ergibt die absolute Zellzahl der jeweils zu bestimmenden CD16-positiven Monozyten, Lymphozyten oder Granulozyten. Entsprechend wird mit den CD32- und CD64-positiven Zellen verfahren. Hierbei sind die CD32-positiven Zellen wieder PE-markiert, und befinden sich folglich in den beiden oberen Quadranten. Die CD64-

positiven Zellen sind FITC-markiert und befinden sich in den beiden rechten Quadranten des FITC-gegen-PE-Koordinatensystems.

Die Zellen im rechten oberen Quadranten tragen sowohl den Fc- $\text{II}\gamma$ - als auch den Fc- $\text{I}\gamma$ -Rezeptor, sie sind also CD32- und CD64-positiv. Auch der Anteil dieser Zellen an der jeweiligen Population lässt sich aus dem Koordinatensystem ablesen, die absolute Zellzahl entsprechend dem unten beschriebenen Berechnungsverfahren bestimmen (siehe Illustration)



(Abb. 4: Darstellung einer durchflusszytometrischen Messung, in den jeweiligen Quadranten befinden sich Zellen, die mit Hilfe verschiedener farbstoff-tragender Antikörper unterschiedlich fluoreszieren)

Bekannt/Gegeben:

- Gesamt-Leukozyten (Leu)

Differentialblutbild aus der Bestimmung der Lymphozyten-Subpopulationen:

- Granulozyten in % (Gr)

- Monozyten in % (Mo)

- Lymphozyten in % (Ly)

- Anteil der im linken oberen Quadranten liegenden Zellen in % (x)

- Anteil der im rechten oberen Quadranten liegenden Zellen in % (y)

- Anteil der im rechten unteren Quadranten liegenden Zellen in % (z)

Bekannt sind sowohl die Gesamtleukozytenzahl als auch die prozentualen Anteile der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Diese Prozentanteile multipliziert mit der Leukozytenzahl ergeben zunächst die Absolutzahl der jeweiligen Zellen. Diese Absolutzahl wird nun wiederum mit dem Prozentanteil multipliziert, dessen Fc-Rezeptor-tragende Eigenschaft in der Durchflusszytometrie erfasst wurde. Die Fc-Rezeptor-tragenden Zellen befinden sich je nach Fluoreszenzmarkierung in den beiden oberen Quadranten für PE (CD 32), diese Prozentanteile sind in den u.g. Formeln mit x und y bezeichnet. Die CD64-positiven Zellen (FITC-markiert) befinden sich in den beiden rechten Quadranten, ihre prozentualen Anteile sind in den u.g. Formeln mit y und z bezeichnet. Für Zellen, die sowohl CD32 als auch CD64-positiv sind, gilt die dritte Formel, die nur die Zellen des oberen rechten Quadranten (FITC und PE-positiv, unten mit y bezeichnet) erfasst. Beispielhaft folgen die Formeln zur Berechnung der Fc-Rezeptor-tragenden Granulozyten (der Prozentanteil der Granulozyten aus dem Differentialblutbild wird mit Gr bezeichnet).

Berechnung der absoluten Zellzahlen für CD32+ bzw. CD64+ Granulozyten:

$$\text{CD32+}: \quad (x+y)/100 \text{ Gr}/100 \text{ Leu}$$

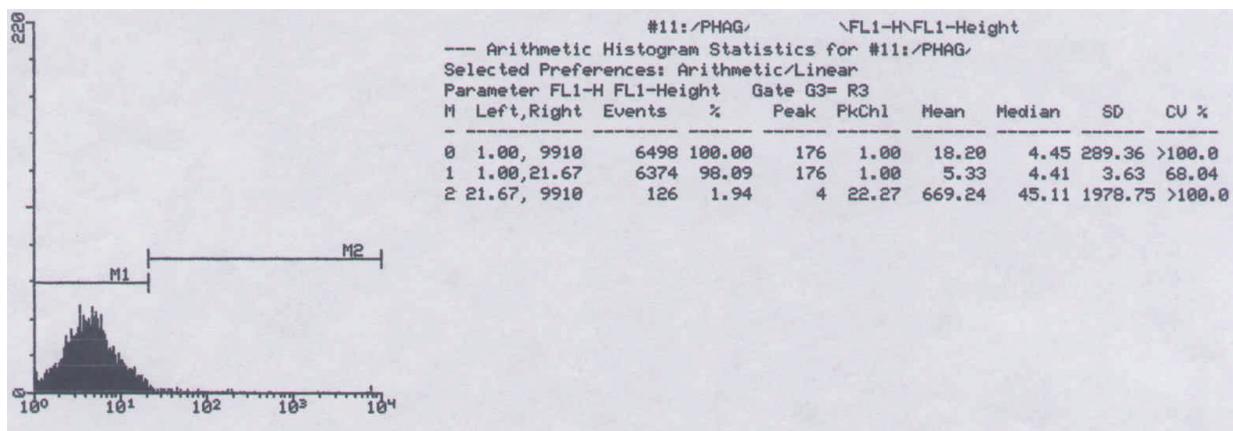
$$\text{CD64+}: \quad (y+z)/100 \text{ Gr}/100 \text{ Leu}$$

$$\text{CD32+}/\text{CD64+}: \quad y/100 \text{ Gr}/100 \text{ Leu}$$

Entsprechend lassen sich die absoluten Zellzahlen der Fc-Rezeptor-tragenden Monozyten und Lymphozyten für die einzelnen Fc-Rezeptor-Subtypen (CD16, CD32 und CD64) berechnen.

## **II.6 Aktivität der Phagozytose / Messmethode / Phagotest-Assay**

Zur Bestimmung der Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose wird frisches, heparinisiertes Vollblut benötigt. Zunächst werden 2 Ansätze zu je 100 µl Vollblut bereitgestellt, einer davon als Negativkontrolle. Beide Ansätze werden zunächst auf Eis gekühlt. Beiden Ansätzen werden 20 µl einer standardisierten Bakteriensuspension zugegeben. Darin sind nicht mehr vermehrungsfähige Bakterien der Gattung E.coli enthalten, deren Oberfläche mit einem FITC-markierten Antikörper versehen ist (System „Phagotest“, Hersteller: Orpegen, Heidelberg). Der Testansatz wird nun für 10 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben, der Kontrollansatz bleibt auf Eis. Anschließend werden beide Ansätze mit 2-3 ml eisgekühlter Waschlösung versehen, die nach Zentrifugation das Entfernen nicht phagozytierter Bakterien ermöglicht. Ebenso werden analog zu den vorgenannten Bestimmungen die Erythrozyten lysiert und ausgewaschen, auch diese werden mittels Zentrifuge entfernt. Es verbleibt eine Zellsuspension von Leukozyten, die je nach Fähigkeit zur Phagozytose eine mehr oder minder große Anzahl FITC-markierter Bakterien phagozytiert, also in sich eingeschlossen haben. Die Auswertung findet erneut mit Hilfe der Durchflusszytometrie statt. Zunächst wird anhand des Koordinatensystems FSC gegen SSC festgelegt, in welchem Bereich sich die Monozyten bzw. Granulozyten befinden. Dies wird von der Auswertungssoftware als Gate gespeichert (siehe vorhergehende Abschnitte). Dann wird für das Monozyten-Gate zunächst das Kontrollröhrchen gemessen. Das Durchflusszytometer bestimmt dabei für jeden einzelnen Monozyten die Intensität der FITC-Fluoreszenz. Diese korreliert mit der Anzahl der aufgenommenen Bakterien. Das Ergebnis dieser Bestimmung wird als Histogramm dargestellt. Auf der x-Achse ist die Intensität der FITC-Fluoreszenz angegeben, zu jedem x-Wert wird die Anzahl der Zellen mit dieser Fluoreszenzintensität als Balken aufgetragen. Es ergibt sich für das Kontrollröhrchen ein Bild wie das folgende:



(Abb. 5: Kontrollröhrchen des Phagozytose-Assays, dargestellt sind die Intensitäten der intrazellulären Fluoreszenz als Balkendiagramm. Für Zellen mit geringer Fluoreszenz werden je nach Häufigkeit Balken nahe der y-Achse gezeichnet, im Kontrollröhrchen sind wenig oder keine intensiv fluoreszierenden Zellen vorhanden.)

Anhand der Darstellung zeigt sich, dass die Zellen zwar auch im Kontrollröhrchen eine gewisse FITC-Fluoreszenz aufweisen, also zumindest teilweise mit den FITC-markierten Bakterien verbunden sind. Die Intensität der FITC-Fluoreszenz ist aber überwiegend niedrig, der höchste Punkt des Histogramms liegt in der Nähe der y-Achse. Die in der Nähe der y-Achse vorhandene, niedrig intensive FITC-Fluoreszenz ist somit entweder als Verunreinigung, oder aber als Grundaktivität der Zellen, auch bei optimaler Verarbeitung nahe 0°C aufzufassen, eigentlich von Interesse und gemessen werden soll aber die darüber hinausgehende Phagozytoseaktivität.

Mit Hilfe des Ergebnisses aus dem Kontrollröhrchen wird nun ein Punkt auf der x-Achse festgelegt, dessen Intensität an FITC-Fluoreszenz übertroffen werden muss, soll eine Zelle als phagozytierend bewertet werden. Der Bereich links von diesem Punkt heißt in der gezeigten Grafik „M1“ und beinhaltet die weit überwiegende Anzahl der Zellen aus dem Kontrollansatz. Der Bereich rechts von diesem Punkt heißt „M2“, darin liegen im Testansatz die phagozytierenden Zellen. Die



## **II.7 Bestimmung der spezifischen Lyse über die antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC)**

Diese Untersuchungen wurden im Immunologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität vorgenommen. Es wurden dafür der erstmals von Poplack et.al beschriebene Ansatz zur Bestimmung der ADCC-Aktivität benutzt<sup>22</sup>. Dabei werden zu lysierende Zielzellen mit radioaktivem Cr51 markiert. Diese Zellen werden mehrfach von eventuellem Überstand gewaschen. Anschließend werden drei verschiedene Ansätze der Freisetzung von Cr51 gemessen. Zum einen wird in einem Kontrollansatz die Freisetzung von Cr51 ohne Zugabe einer zelllyisierenden Substanz gemessen, dieser Wert wird als spontane Lyse bezeichnet. Zum anderen wird eine zelllyisierende Chemikalie zugegeben (z.B. 5%-Triton-X, Merck, Darmstadt), die dadurch erreichte Cr51-Freisetzung wird als maximale Lyse bezeichnet. Der eigentliche Testansatz wird mit den Effektorzellen aus dem frisch entnommenen Blut der o.g. Patienten versetzt, zugegeben wird jeweils noch ein die Lyse evtl. verstärkender Antikörper: einerseits der bei kolorektalen Karzinomen bereits erprobte monoklonale 17-1A-Antikörper (Panorex<sup>®</sup>), andererseits ein weiterer, chimärer Antikörper (C46). Chimäre Antikörper sind im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern nicht aus einer ursprünglichen Zelle hervorgegangen, sondern können aus Fragmenten unterschiedlicher Herkunft bestehen. Daher ist es auch möglich, dass ein solcher Antikörper gegen verschiedene Zielstrukturen wirksam ist (sog. „bi-spezifischer Antikörper“). In einem weiteren Ansatz findet die Bestimmung der Lyse ohne Zugabe eines Antikörpers statt. Gemessen wird jeweils die Freisetzung der radioaktiven Markersubstanz, des Cr51. Für diese ergeben sich nun drei unterschiedliche Ergebnisse: die spontane Lyse (ohne Effektorzellen), die maximale Lyse (mit einem zelllyisierenden Agens), und die zu untersuchende ADCC-vermittelte Lyse im eigentlichen Testansatz (Test-Lyse). Die

in Prozent zu errechnende spezifische Lyse ergibt sich entsprechend der folgenden Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{(\text{Test-Lyse} - \text{spontane Lyse})}{(\text{maximale Lyse} - \text{spontane Lyse})} \cdot 100$$

Der so errechnete Prozentwert gibt an, welcher Anteil der in-vitro zur Lyse bereitgestellten Zielzellen unter den jeweiligen Voraussetzungen effektiv über den Mechanismus der antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) zerstört werden kann, und ist demzufolge ein Maß für die zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegende Fähigkeit der Immunzellen des Patienten, ADCC-vermittelte Zytolyse zu ermöglichen.

## **II.8 Erstellung der Diagramme / Statistik**

Für die im folgenden dargestellten Diagramme wurden sämtliche Daten tabellarisch mit Hilfe der Software Microsoft Excel erfasst. Zunächst wurden für jeden einzelnen Patienten und jede einzelne Blutentnahme entsprechend dem Entnahmeschema (vor Therapie, nach einer Woche Therapie, nach zwei Wochen Therapie und nach Therapiepause) die Anzahl der einzelnen Zellen mit ihren jeweiligen Eigenschaften erfasst. Für diese (absoluten) Zahlen, meist Zellen pro Mikroliter (entspricht Kubikmillimeter, abgekürzt cu mm), wurden ursprüngliche Messergebnisse in Prozent einer Zellpopulation mit den jeweiligen Gesamtzahlen der entsprechenden Population multipliziert.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Ergebnisse aller Patienten für jede Bestimmung passend zur jeweiligen Blutentnahme angeordnet. Für die einzelnen

Blutentnahmezeitpunkte wurden mit Hilfe der Tabellenkalkulationssoftware Mittelwerte und Standardabweichungen über die einzelnen Parameter aller Patienten berechnet. Zur weiteren statistischen Auswertung wurden die Werte der einzelnen Entnahmezeitpunkte gegeneinander verglichen.

Der Student-t-Test für zweiseitige Stichproben gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Die Ergebnisse werden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn diese Wahrscheinlichkeit unter 0,05 lag.

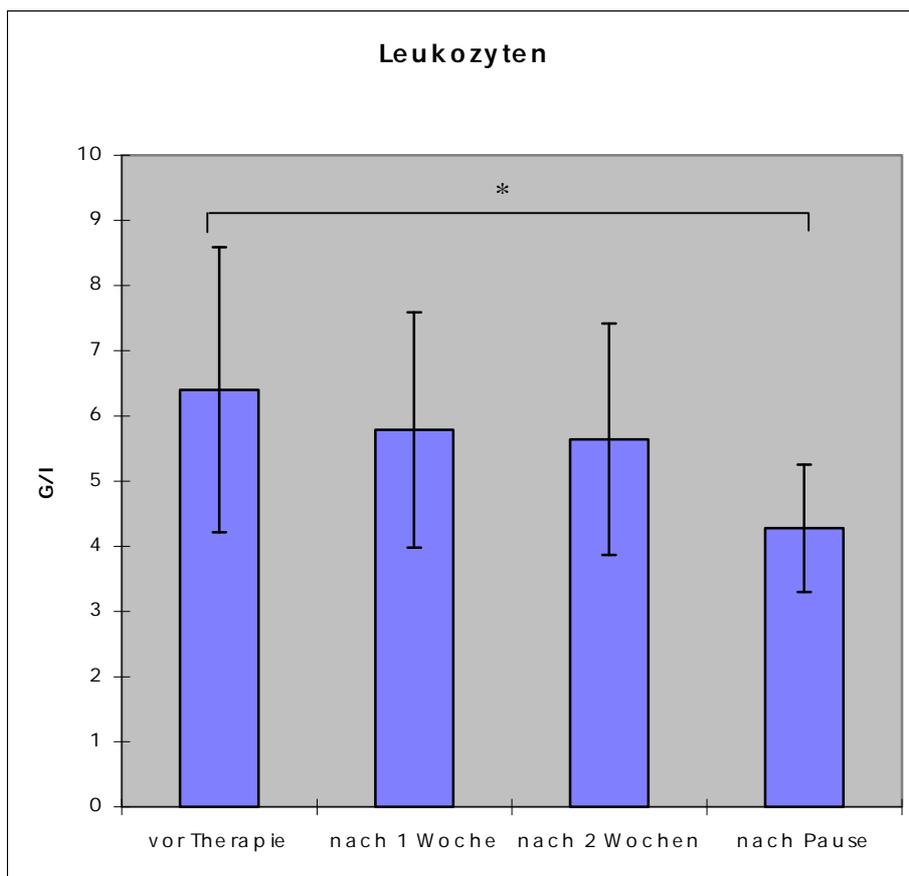
Schließlich wurden für jeden gemessenen Parameter Diagramme erstellt, die darstellen, wie sich die jeweilige Messgröße im Verlauf der Therapie ändert. Für jeden einzelnen Entnahmezeitpunkt beschreibt eine Säule den Mittelwert der Messergebnisse aller Patienten, von diesem Mittelwert aus verdeutlicht die nach oben wie unten aufgetragenen einfache Standardabweichung (die komplette Spanne entspricht also der doppelten Standardabweichung) die Streubreite der Ergebnisse. Sich signifikant voneinander unterscheidende Ergebnisse sind als solche gekennzeichnet unter Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  ( $<0,05$ ). Die als Zahlenwerte angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden einzelnen Parameter sowie die statistischen Maße zur Signifikanzberechnung sind im Anhang tabellarisch aufgelistet.

### III. Ergebnisse

Im folgenden wird kurz auf die jeweiligen Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Therapie eingegangen.

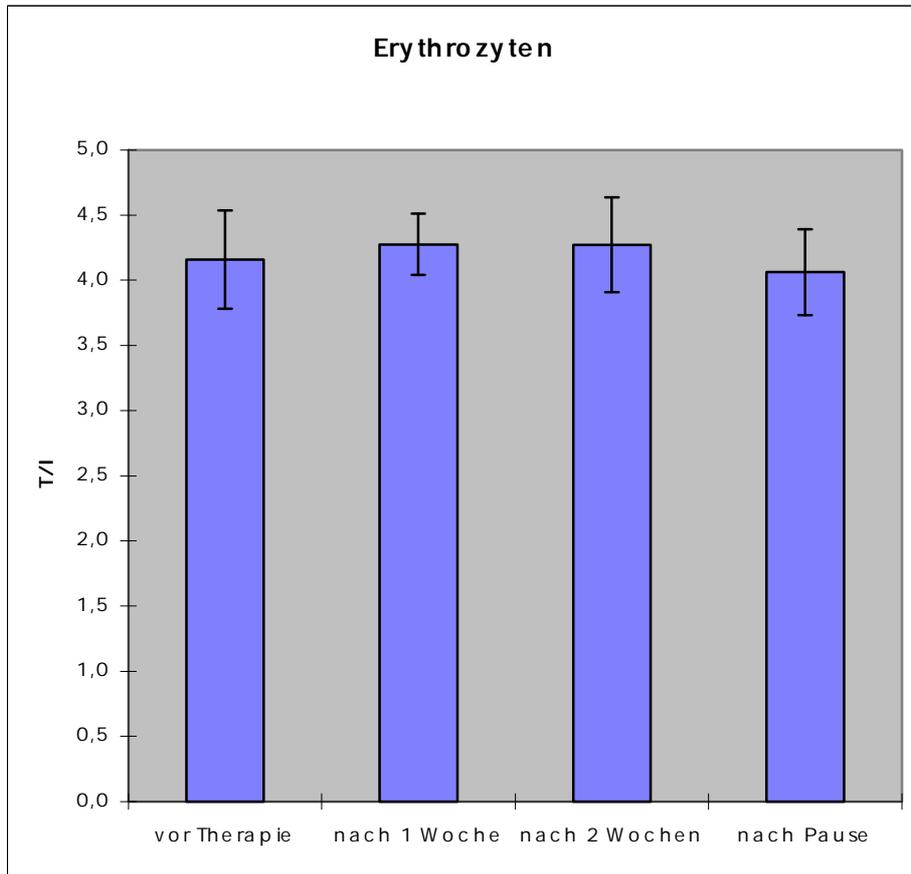
#### III.1 Blutbildveränderungen / Hämatologie

Die Gesamtzahl der Leukozyten nimmt unter Radiochemotherapie kontinuierlich ab, eine im Vergleich zum Ausgangsbefund signifikante Reduktion findet sich jedoch erst nach der Therapiepause, eine Erholung innerhalb dieser zwei Wochen findet nicht statt.



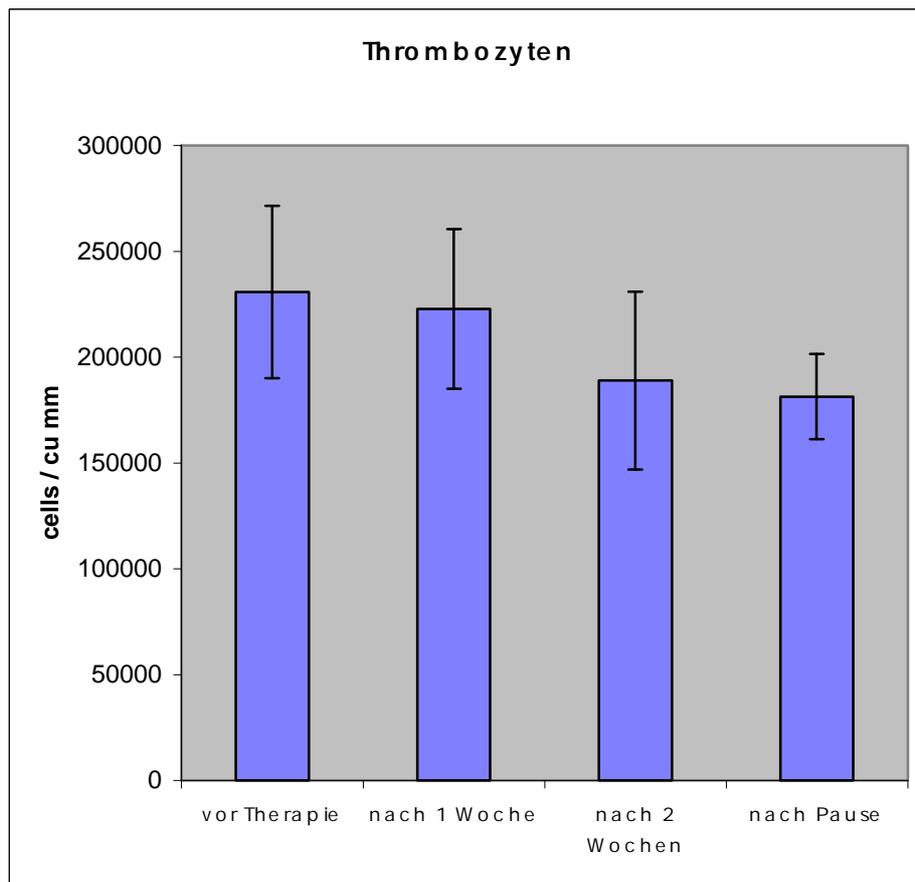
(Abb. 7: Änderungen der Gesamtleukozytenzahlen in G/l vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung. \*  $p < 0.05$ )

Die Erythrozytenzahlen blieben überwiegend auf dem Ausgangsniveau.



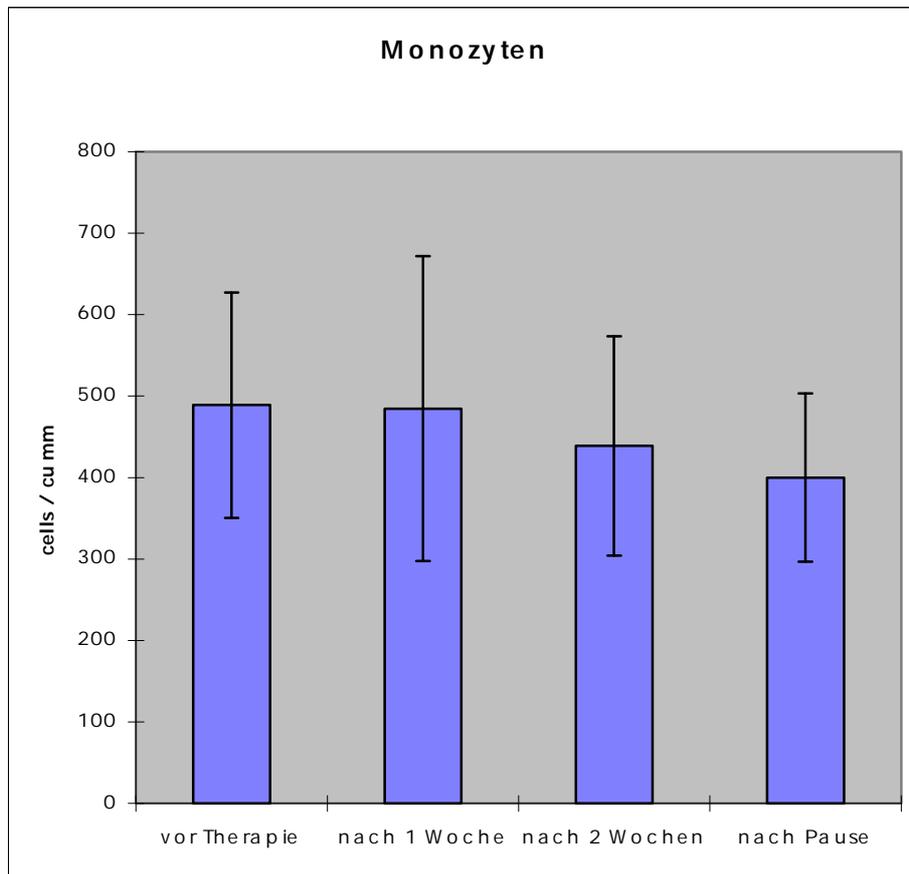
(Abb. 8: Änderungen der Erythrozytenzahlen in  $10^6$  Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Die Thrombozytenzahlen nehmen zwar im Verlauf der Therapie bei Betrachtung der Mittelwerte leicht ab, dieses Ergebnis ist jedoch statistisch nicht signifikant. Auch der Wert nach Therapiepause weicht nicht wesentlich von den vorhergehenden Werten ab.



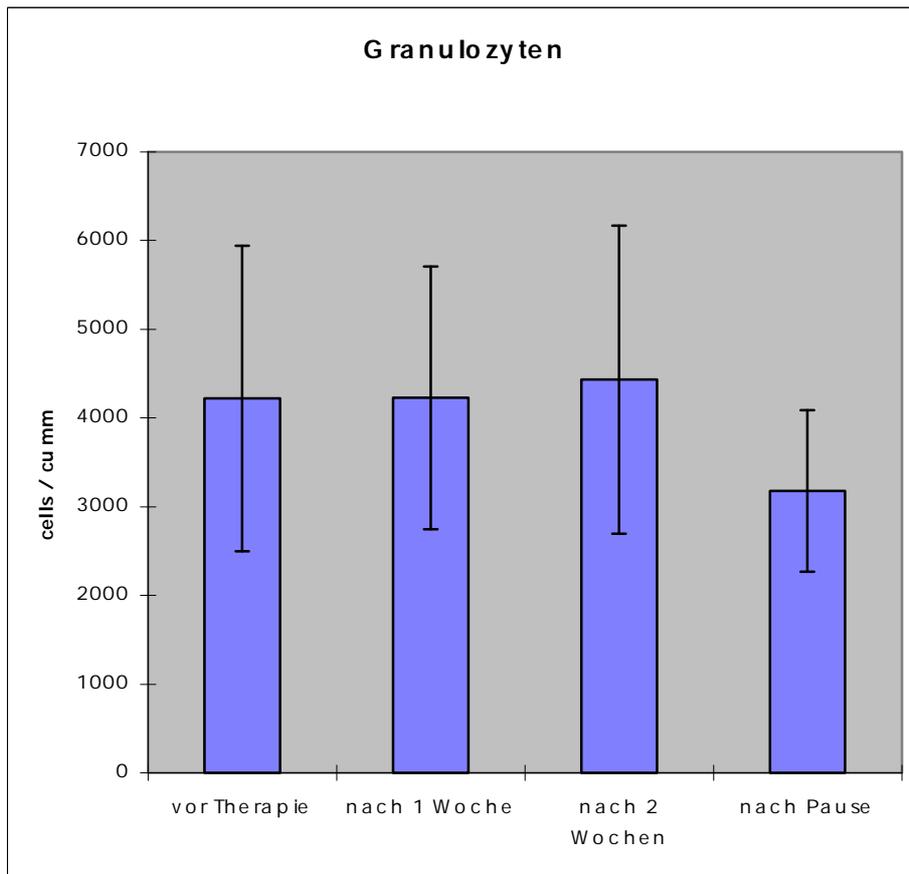
(Abb. 9: Änderungen der Thrombozytenzahlen in  $10^6$  Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Bei den Monozyten zeigte sich zwar eine leichte Verminderung der Zellzahlen, jedoch war diese nicht statistisch signifikant.



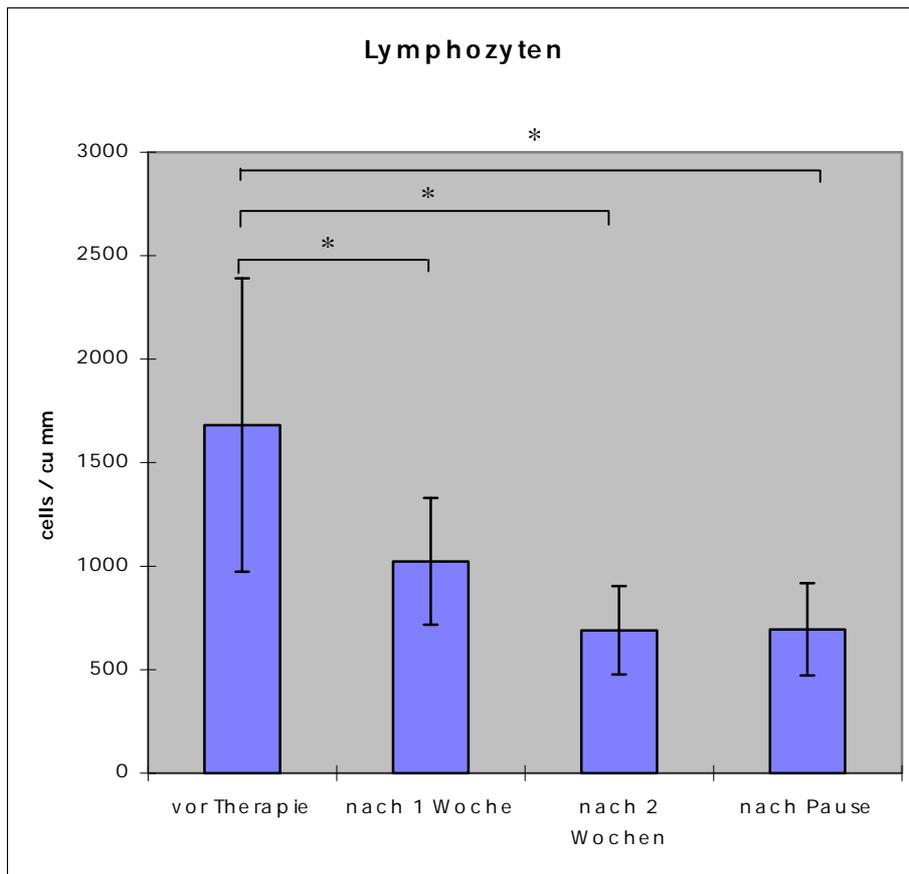
(Abb. 10: Änderungen der Monozytenzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Eine geringe Abnahme der Granulozytenzahl ergab sich erst nach der Therapiepause, jedoch erreichte auch diese keine Signifikanz. Während der tatsächlichen Zytostatika- und Radiotherapie-Exposition zeigte sich keine Veränderung bei den Granulozyten.



(Abb. 11: Änderungen der Granulozytenzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

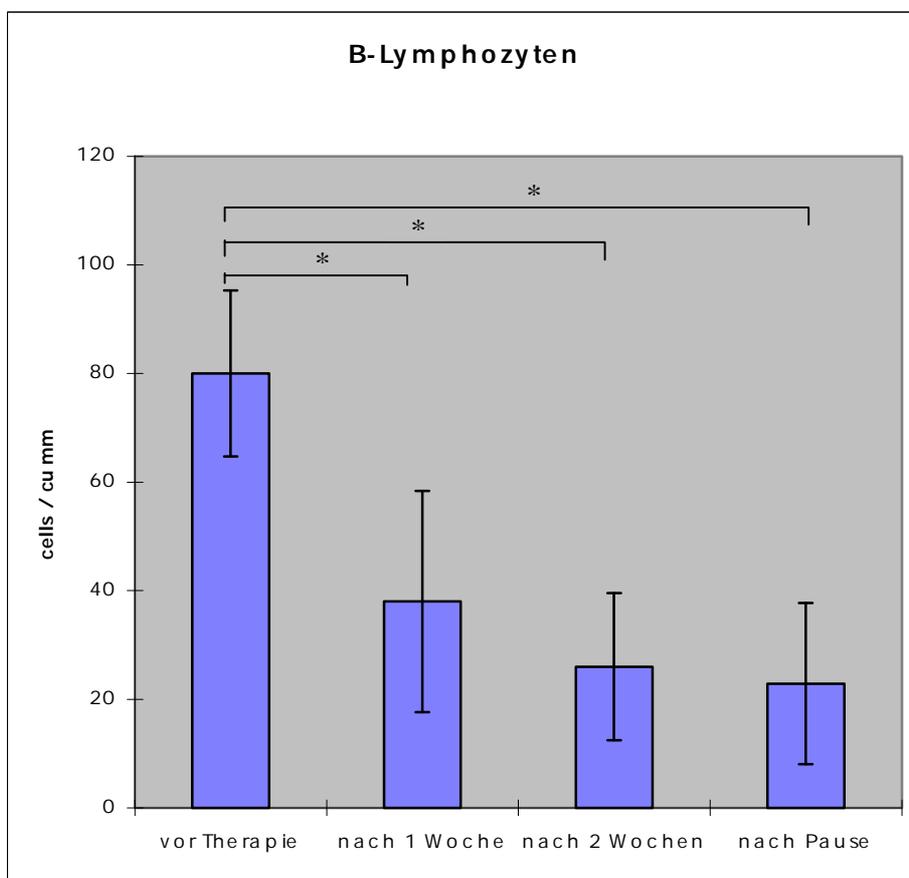
Eine deutliche Verminderung der Zellzahlen ergab sich allerdings bei den Lymphozyten. Bereits unmittelbar nach Therapiebeginn fielen die Werte deutlich und signifikant unter das Ausgangsniveau, auch nach der Therapiepause zeigte sich keine Erholung hinsichtlich der Anzahl der Gesamt-Lymphozyten.



(Abb.12: Änderungen der Lymphozytenzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung. \* p<0.05)

### III.2 Verschiebungen der Lymphozytensubpopulationen

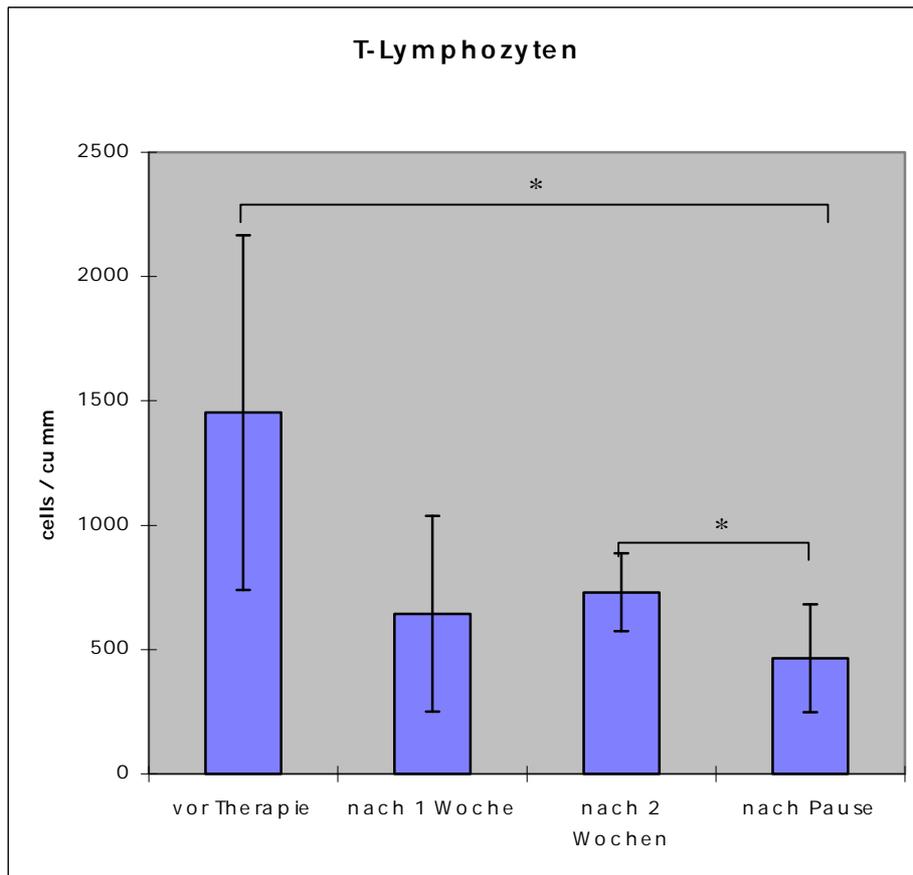
Bei den B-Lymphozyten ergibt sich ein den Gesamtlmphozyten ähnliches Bild. Sowohl bereits nach der ersten Therapiewoche, als auch im weiteren Verlauf liegen diese signifikant unter dem Ausgangswert. Sie erholen sich auch nicht nach der Unterbrechung der Therapie.



(Abb.13: Änderungen der B-Lymphozytenzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung. \* p<0.05)

Die Gesamtzahl der T-Lymphozyten zeigt zwar im Mittelwert einen Rückgang während der ersten beiden Therapiewochen, aufgrund einer eher hohen Streubreite fällt dieser Rückgang aber noch nicht signifikant aus. Erst der Wert nach

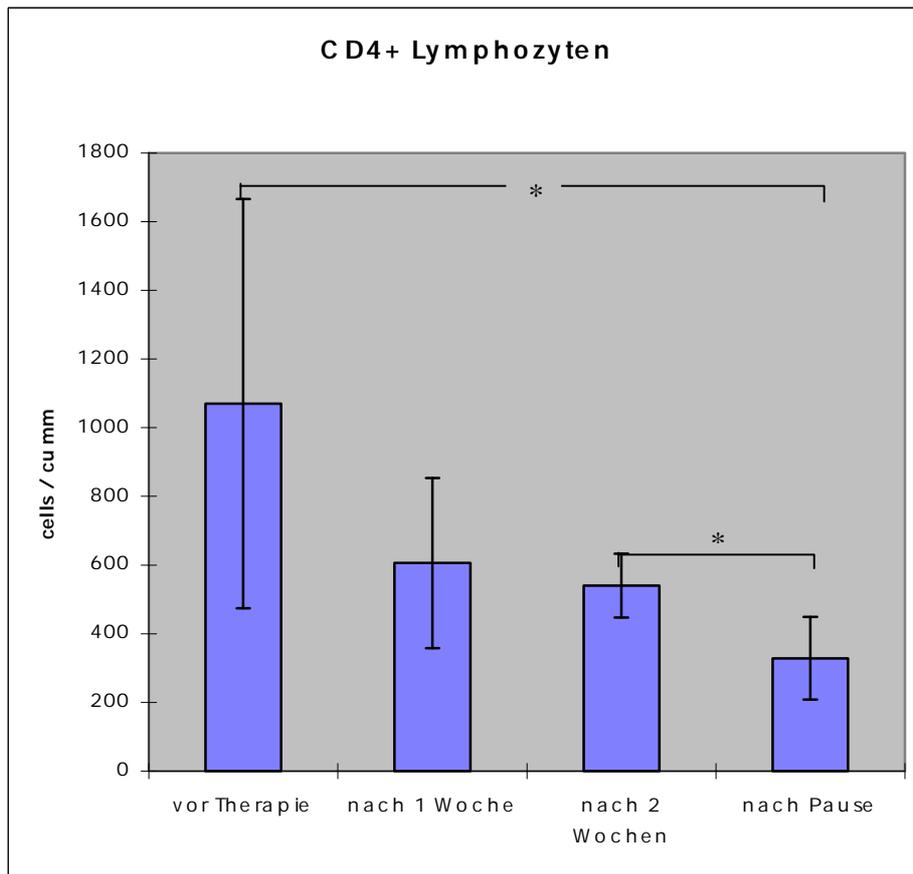
Therapiepause geht deutlich zurück und liegt signifikant unterhalb des Wertes nach zwei Wochen Therapie wie auch signifikant unterhalb des Ausgangswerts. Es zeigt sich also keine Erholung im therapiefreien Intervall.



(Abb.14: Änderungen der T-Lymphozytenzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung. \* p<0.05)

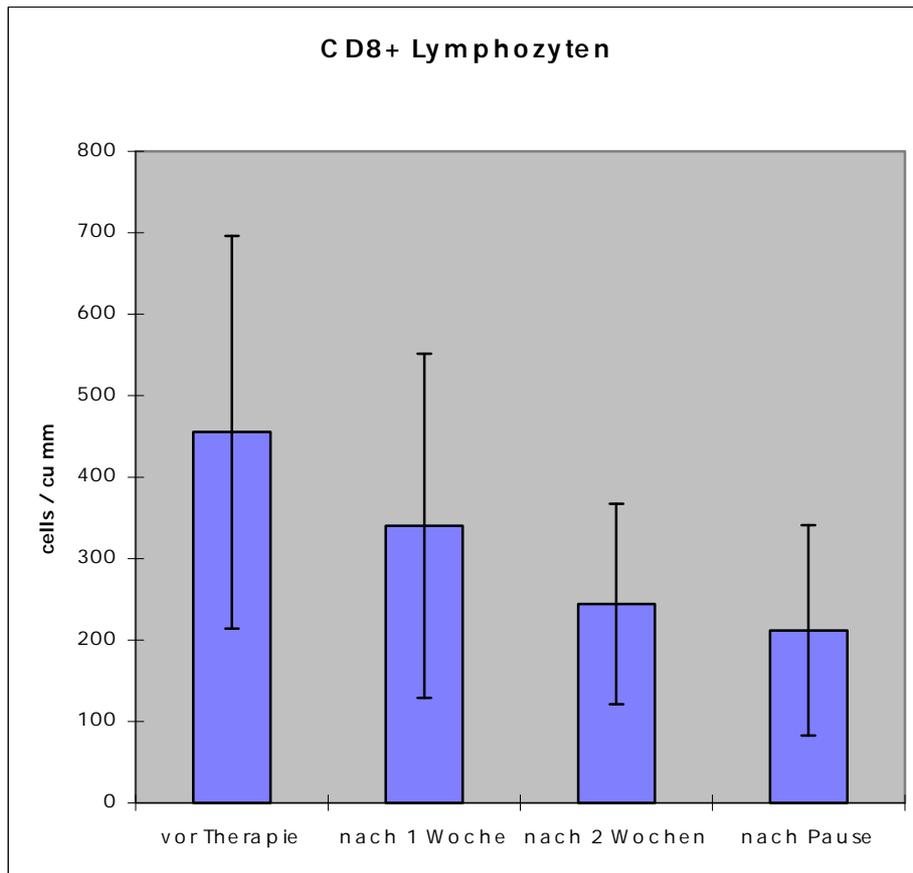
Das Ergebnis für die T-Helfer-Zellen (CD4+) ähnelt dem der Gesamt-T-Lymphozyten. Auch bei den CD4-Zellen liegt beim Ausgangswert eine große Streubreite vor. Die Werte nach einer bzw. zwei Therapiewochen fallen zwar ab, jedoch nicht signifikant. Erst nach Therapiepause liegen sowohl verglichen mit dem Ausgangswert als auch verglichen mit dem Wert nach zwei Wochen Therapie

signifikant verminderte Zellzahlen vor. Eine Erholung im therapiefreien Intervall findet demnach auch hier nicht statt.



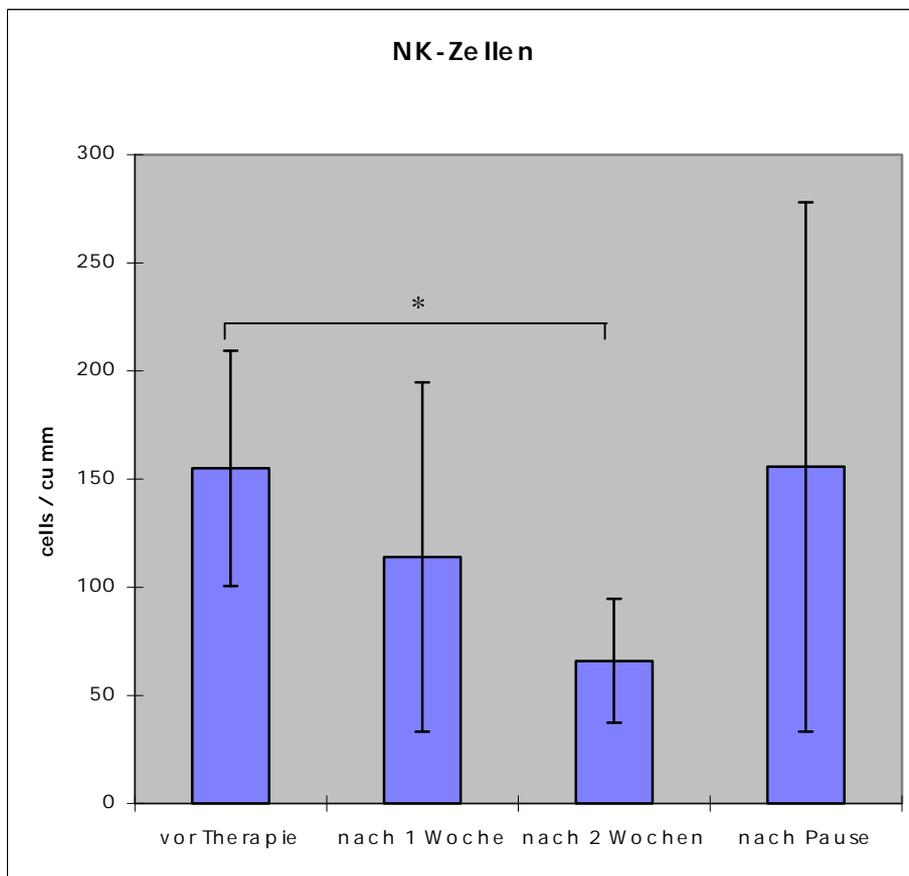
(Abb.15: Änderungen der CD4+-Lymphozytenzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung. \* p<0.05)

Die Anzahl der CD8-positiven Lymphozyten fällt zwar vom Ausgangswert ausgehend kontinuierlich ab. Die Streubreite ist jedoch so hoch, dass keine Signifikanz erreicht wird.



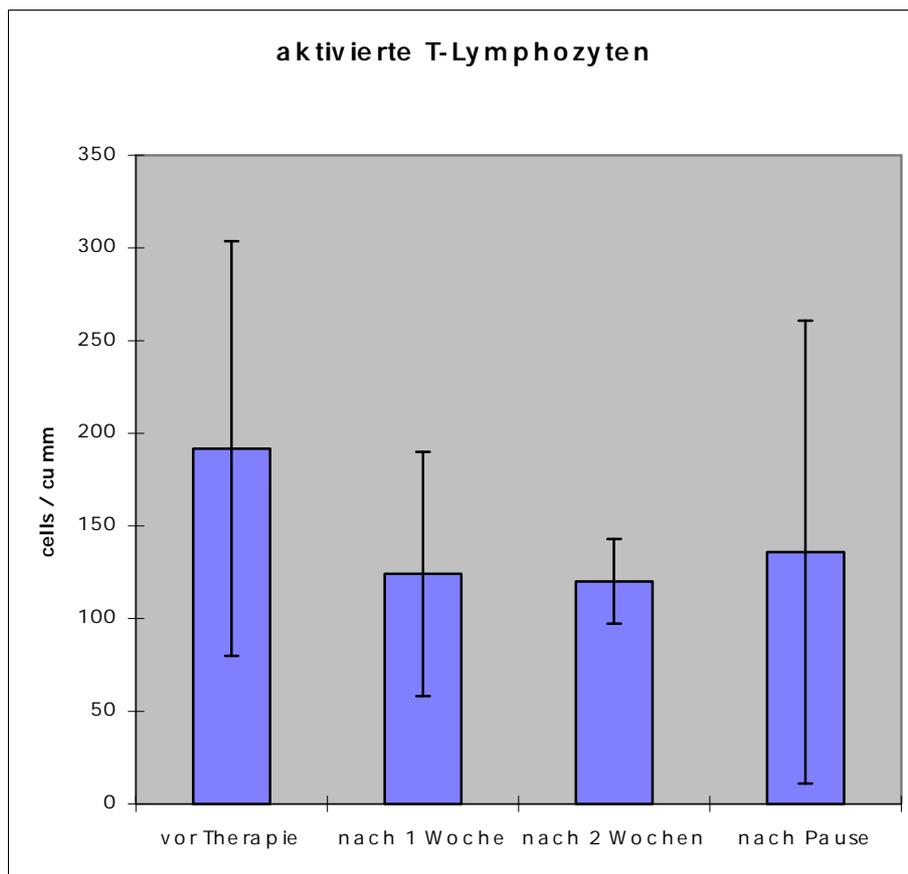
(Abb.16: Änderungen der CD8+-Lymphozytenzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Bei den NK-Zellen beobachtet man zunächst einen signifikanten Rückgang der Zellzahl nach zwei Therapiewochen. Nach der Therapiepause liegt im Mittelwert wieder das Niveau des Ausgangswertes vor, allerdings mit einer hohen Streubreite, so dass weder im Vergleich zum Ausgangswert noch im Vergleich zum Wert nach zwei Therapiewochen eine signifikante Veränderung vorliegt.



(Abb.17: Änderungen der NK-Zellzahlen in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung. \* p<0.05)

Die Anzahl der aktivierten T-Lymphozyten geht zwar bei ausschließlicher Betrachtung der Mittelwerte im Therapieverlauf zurück. Jedoch ist die Streubreite zu groß, um signifikante Aussagen treffen zu können.

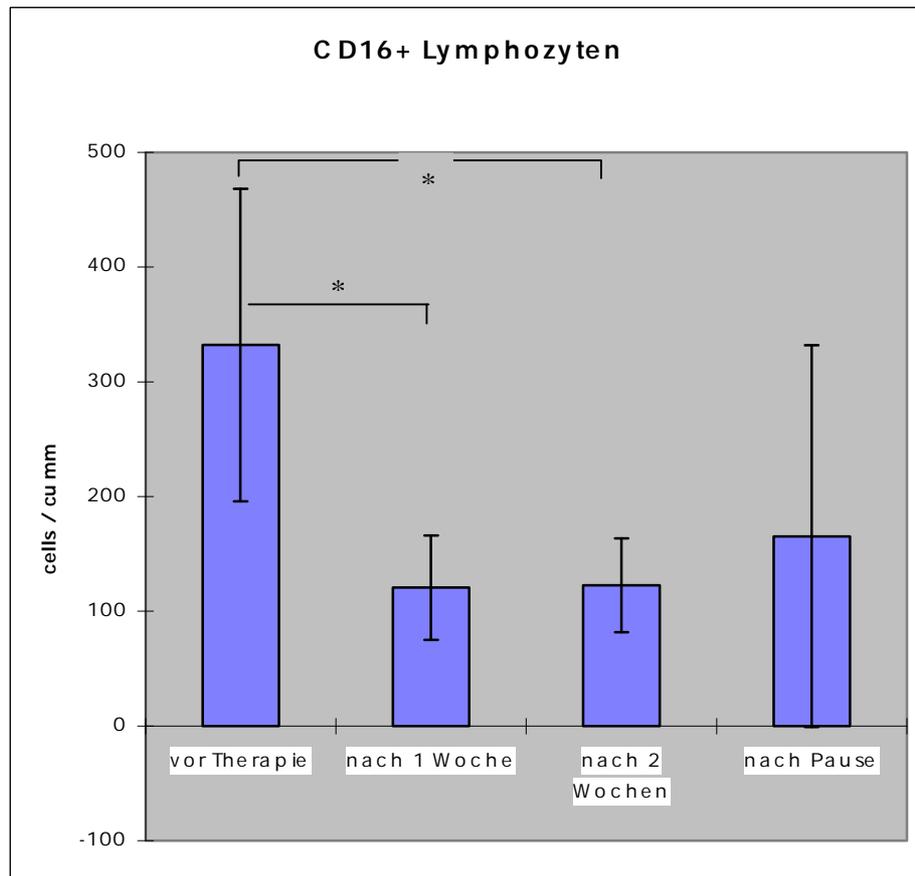


(Abb. 18: Änderungen der Anzahl der aktivierten T-Lymphozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

### III.3 Anteile der Fc-Rezeptor-tragenden Zellen

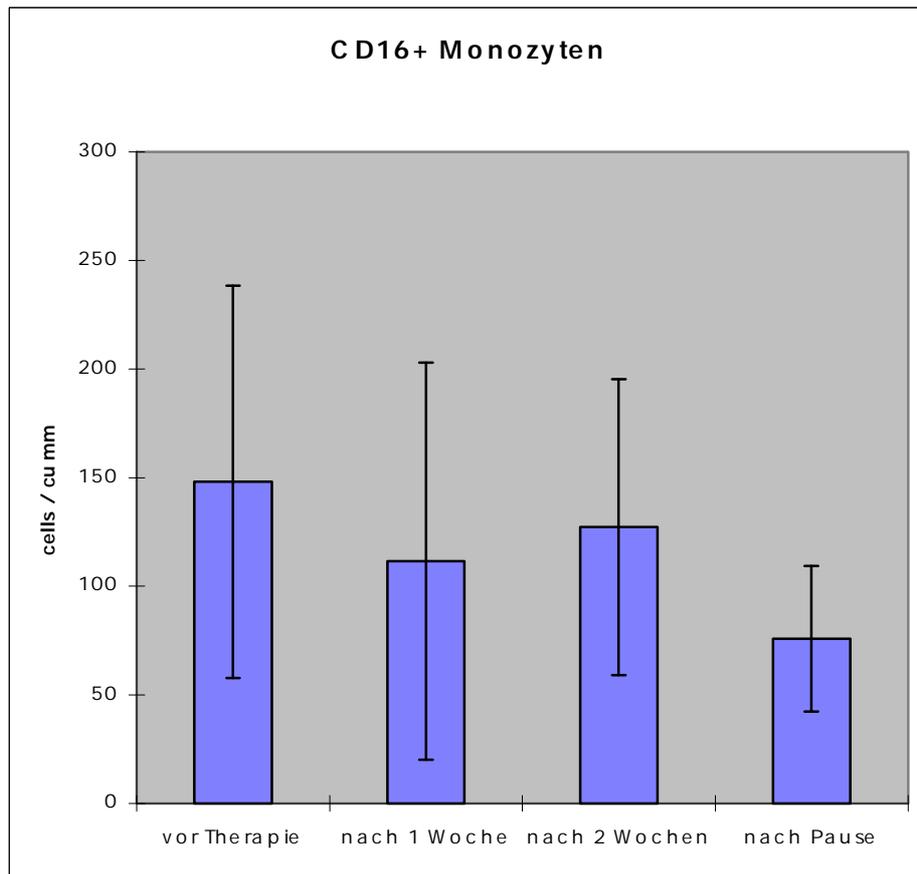
Die Fc-III $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Lymphozyten (CD16+) nehmen bereits unmittelbar nach Therapiebeginn signifikant ab, auch nach zwei Therapiewochen liegt ihre Anzahl deutlich unter dem Ausgangswert. Hinsichtlich der Erholung nach der Therapiepause ist das Ergebnis wegen der großen Streubreite schwer beurteilbar.

Einerseits ergibt sich zwar keine signifikante Erhöhung der Zellzahl verglichen mit dem Wert nach zwei Wochen Therapie. Andererseits liegt der Wert auch nicht signifikant niedriger als der Ausgangswert vor Therapie.



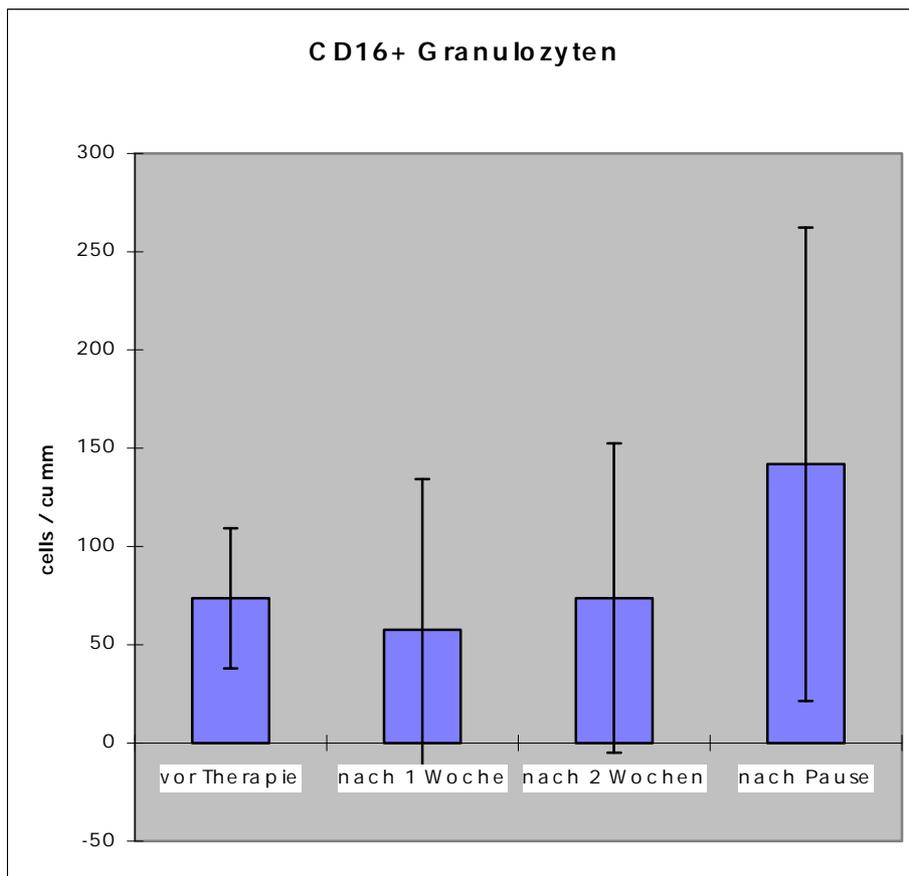
(Abb.19: Änderungen der CD16+-Lymphozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung. \* p<0.05)

Die Anzahl der Fc-III $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Monozyten ändert sich im Verlauf der Therapie bzw. nach Therapiepause nicht signifikant.



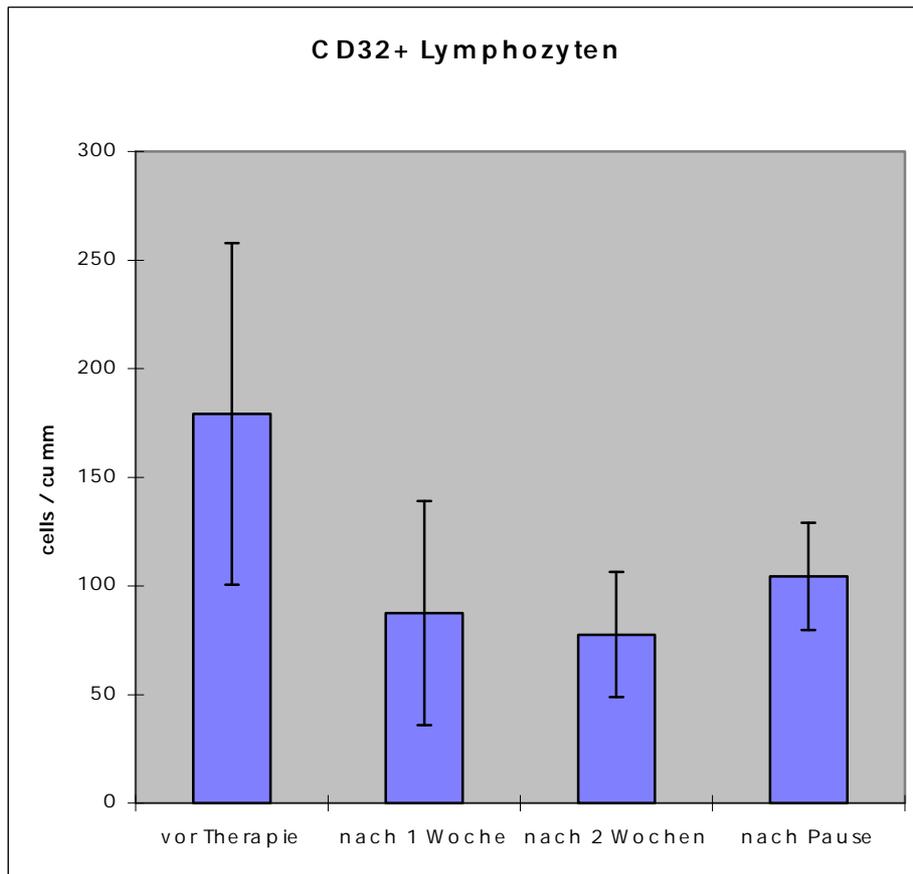
(Abb. 20: Änderungen der Anzahl der CD16+-Monozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Auch bei den Fc-III $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Granulozyten, die in verhältnismäßig geringen Gesamtzahlen vorliegen, ergeben sich aufgrund der hohen Streubreite keine signifikanten Veränderungen im Therapieverlauf.



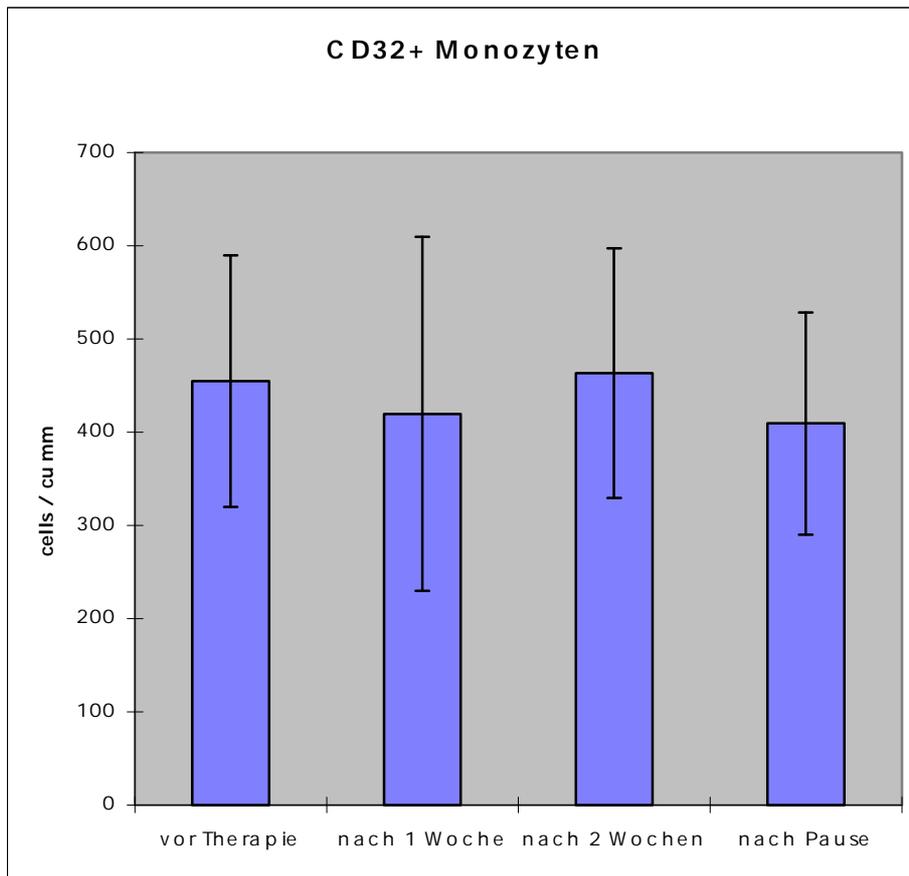
(Abb.21: Änderungen der Anzahl der CD16+-Granulozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Der Mittelwert der Fc- $\text{II}\gamma$ -Rezeptor-tragenden Lymphozyten (CD32+) nimmt zwar im Therapieverlauf ab, jedoch wird aufgrund der Streubreite keine Signifikanz erreicht.



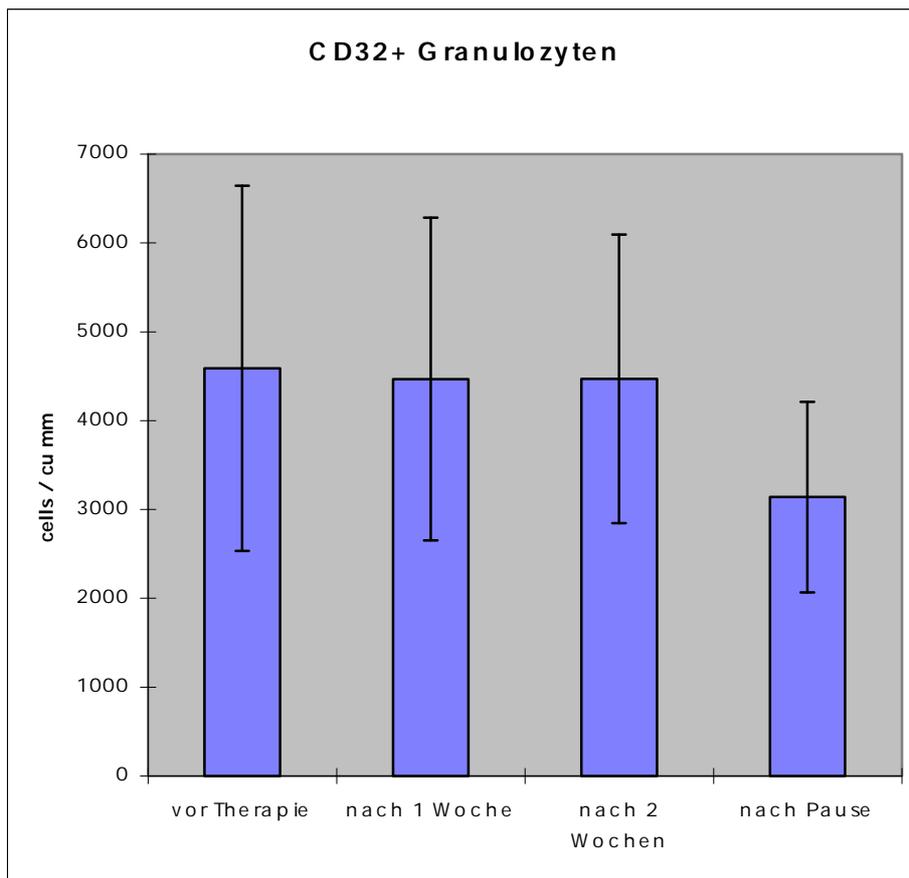
(Abb.22: Änderungen der Anzahl der CD32+-Lymphozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Die Zellzahlen der Fc-II $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Monozyten sind im Verlauf der Therapie ebenso nicht wesentlich verändert.



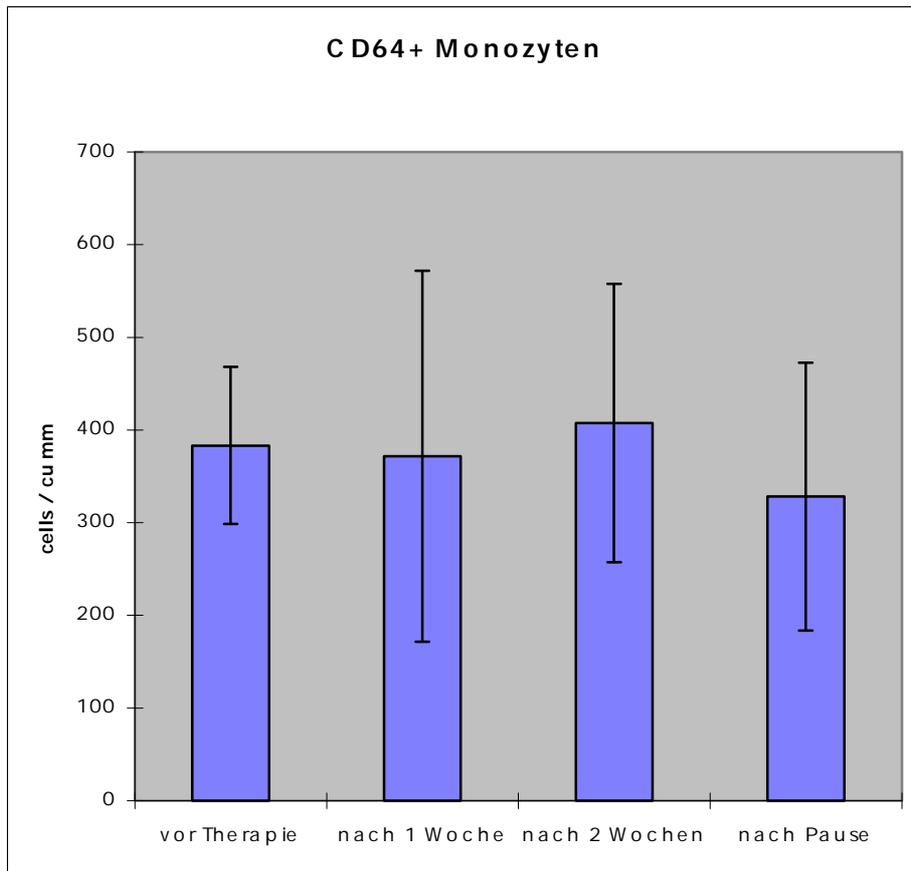
(Abb.23: Änderungen der Anzahl der CD32+-Monozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Bei den Fc- $\text{II}\gamma$ -Rezeptor-tragenden Granulozyten ist während des Therapieverlaufs keine Änderung der Zellzahl ersichtlich. Nach Therapiepause sinkt zwar der Mittelwert eher ab, ein signifikanter Unterschied ergibt sich jedoch nicht.



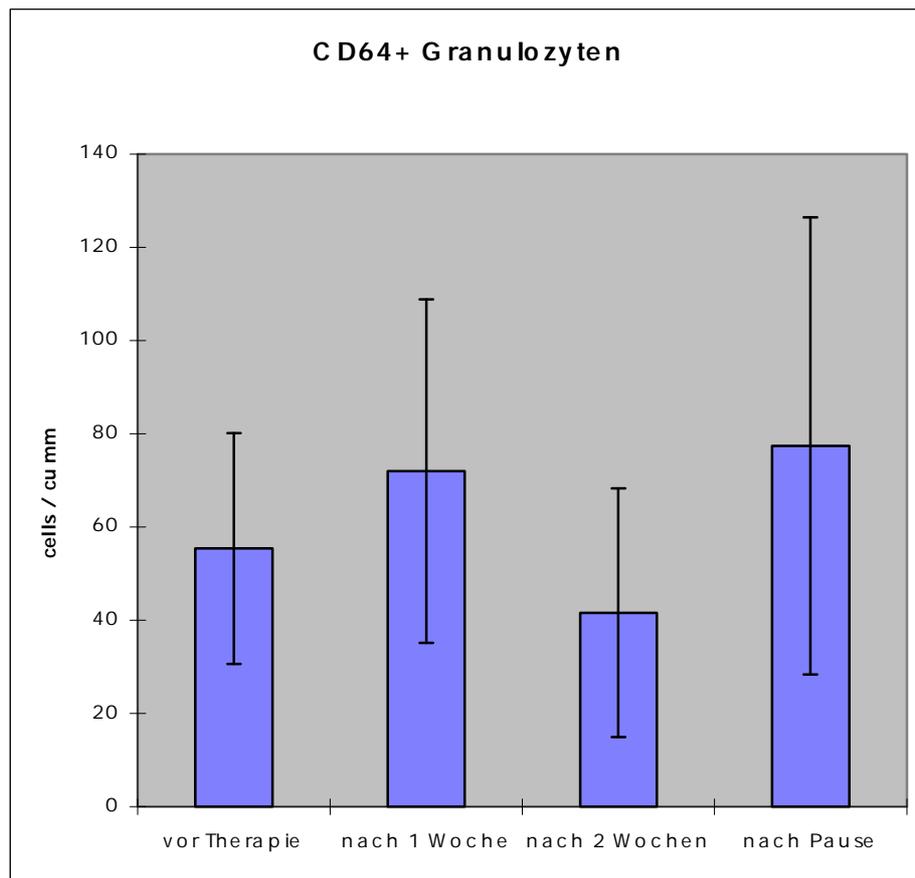
(Abb.24: Änderungen der Anzahl der CD32+-Granulozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Die Fc- $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Monozyten (CD64+) erfahren weder im Therapieverlauf noch nach Therapiepause eine wesentliche Veränderung ihrer Zellzahl.



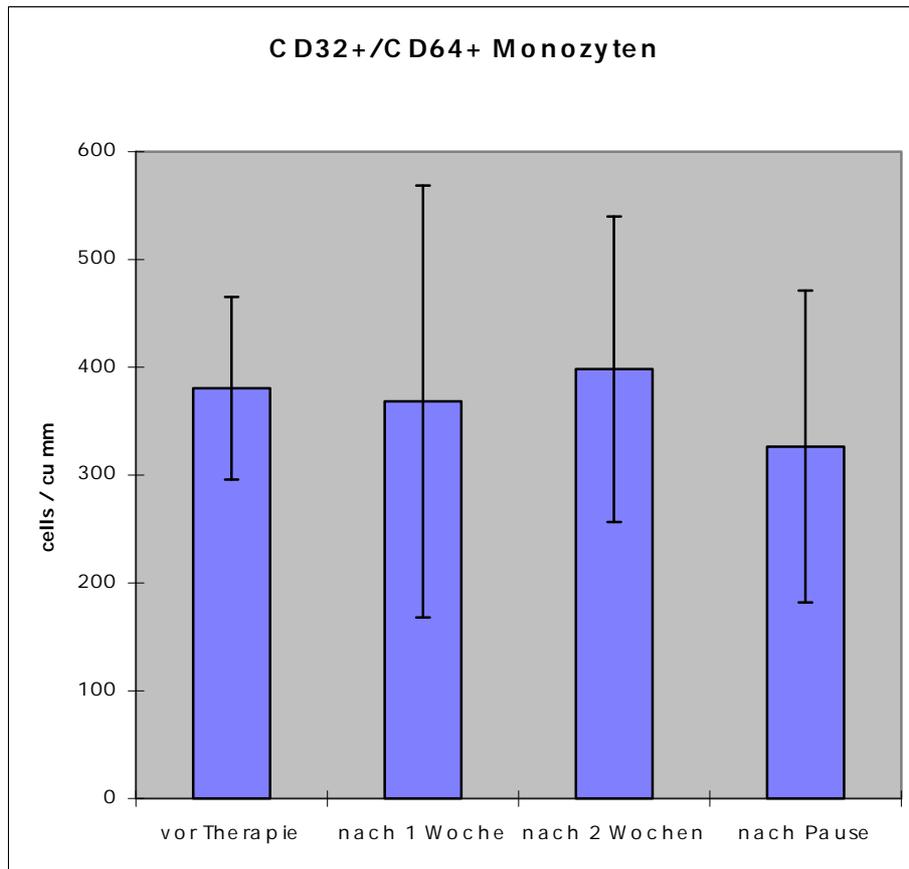
(Abb.25: Änderungen der Anzahl der CD64+-Monozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Auch bei den Fc-I $\gamma$ -Rezeptor-tragenden Granulozyten ergibt sich im zeitlichen Verlauf kein einheitliches Bild einer Veränderung, signifikante Abweichungen vom Ausgangswert zeigen sich nicht.

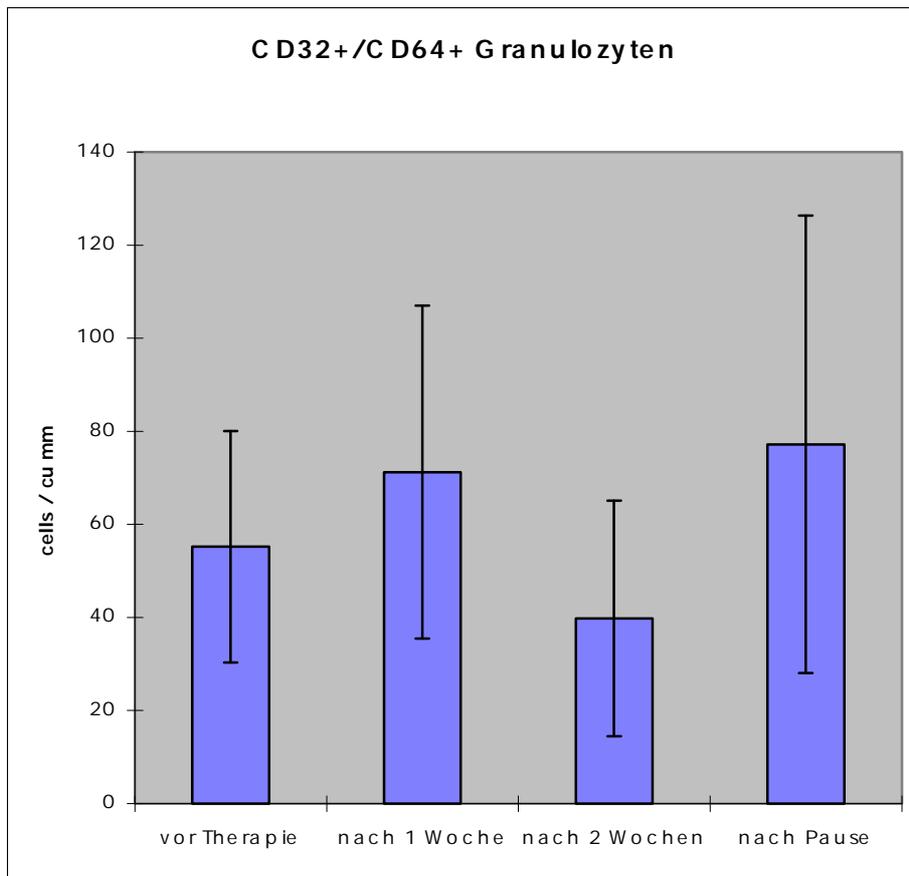


(Abb.26: Änderungen der Anzahl der CD64+-Granulozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei den Monozyten und Granulozyten, die sowohl den Fc- $\text{I}\gamma$ -Rezeptor als auch den Fc- $\text{II}\gamma$ -Rezeptor tragen (CD32+ und CD64+). Weder im Verlauf der Therapie noch nach Therapiepause zeigen sich signifikante Abweichungen vom Ausgangswert.



(Abb.27: Änderungen der Anzahl der CD32+/CD64+-Monozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

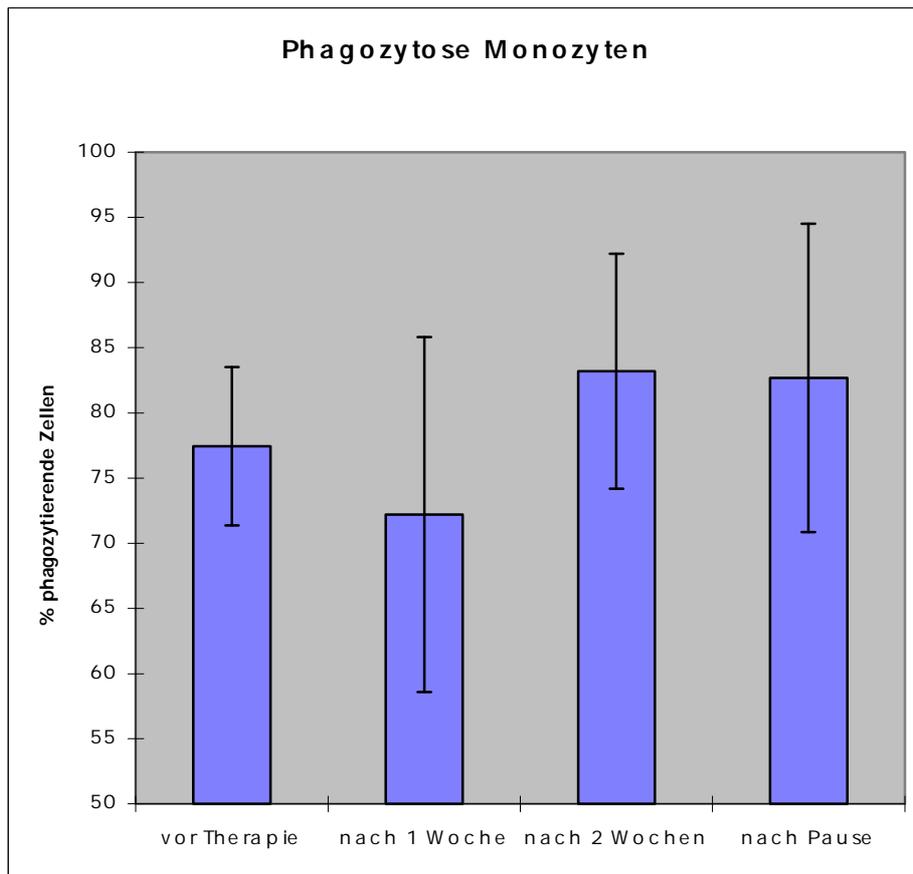


(Abb.28: Änderungen der Anzahl der CD32+/CD64+-Granulozyten in Zellen/mm<sup>3</sup> vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

### III.4 Veränderungen der Phagozytoseaktivität

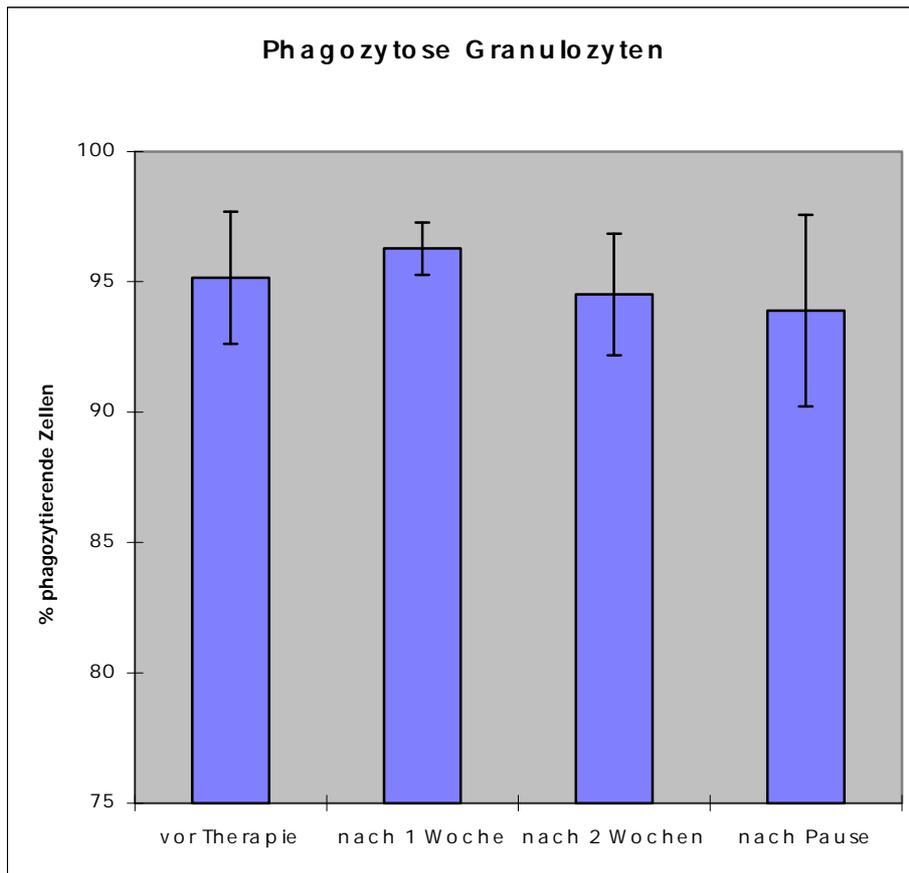
Die Phagozytoseaktivität der Monozyten bzw. Granulozyten wird gemessen als Prozentangabe der innerhalb der jeweiligen Zellpopulation zur Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Partikeln fähigen Zellen.

Bei den Monozyten ändert sich diese Prozentzahl im Therapieverlauf nicht signifikant. Die Mittelwerte, die sich aus den Messungen bei den einzelnen Patienten ergeben, nehmen eher geringgradig zu, auch nach Therapiepause ergibt sich keine signifikante Veränderung zum Ausgangsniveau.



(Abb.29: Änderungen des prozentualen Anteils der phagozytierenden Monozyten in % der Gesamt-Monozyten vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

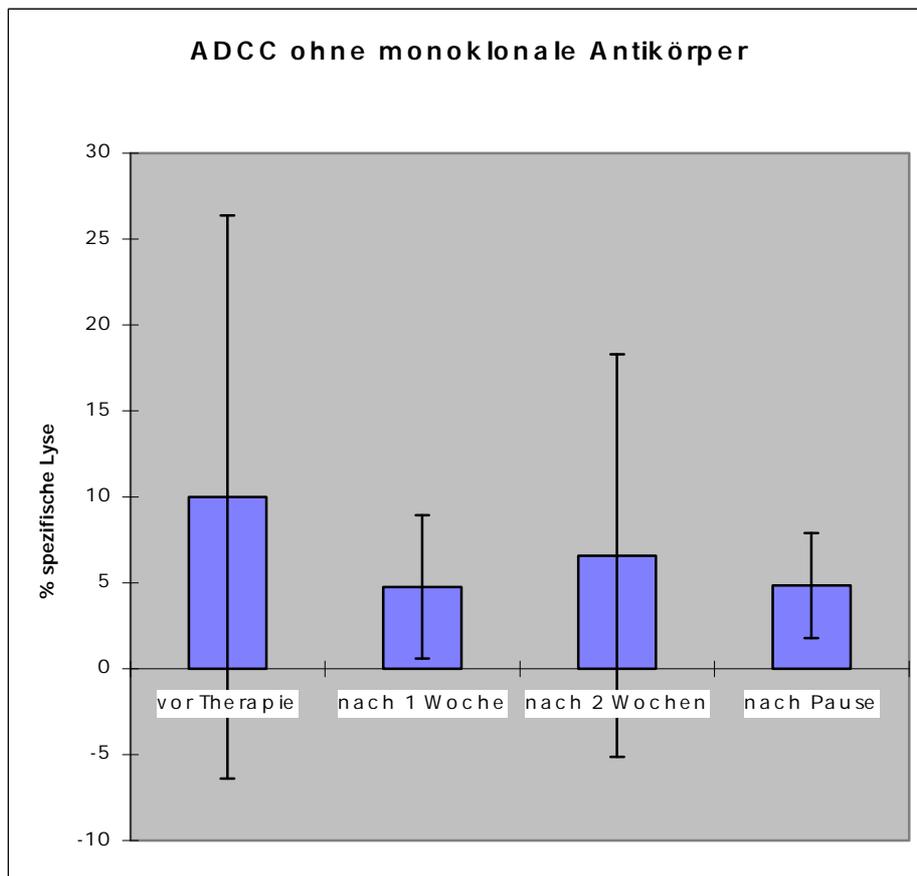
Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich bei den Granulozyten. Auch hier liegen weder im Verlauf der Therapie noch nach Therapiepause signifikante Veränderungen zum Ausgangswert vor, d.h. der Anteil der phagozytose-aktiven Granulozyten an den Gesamtgranulozyten bleibt in etwa konstant.



(Abb.30: Änderungen des prozentualen Anteils der phagozytierenden Granulozyten in % der Gesamt-Granulozyten vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

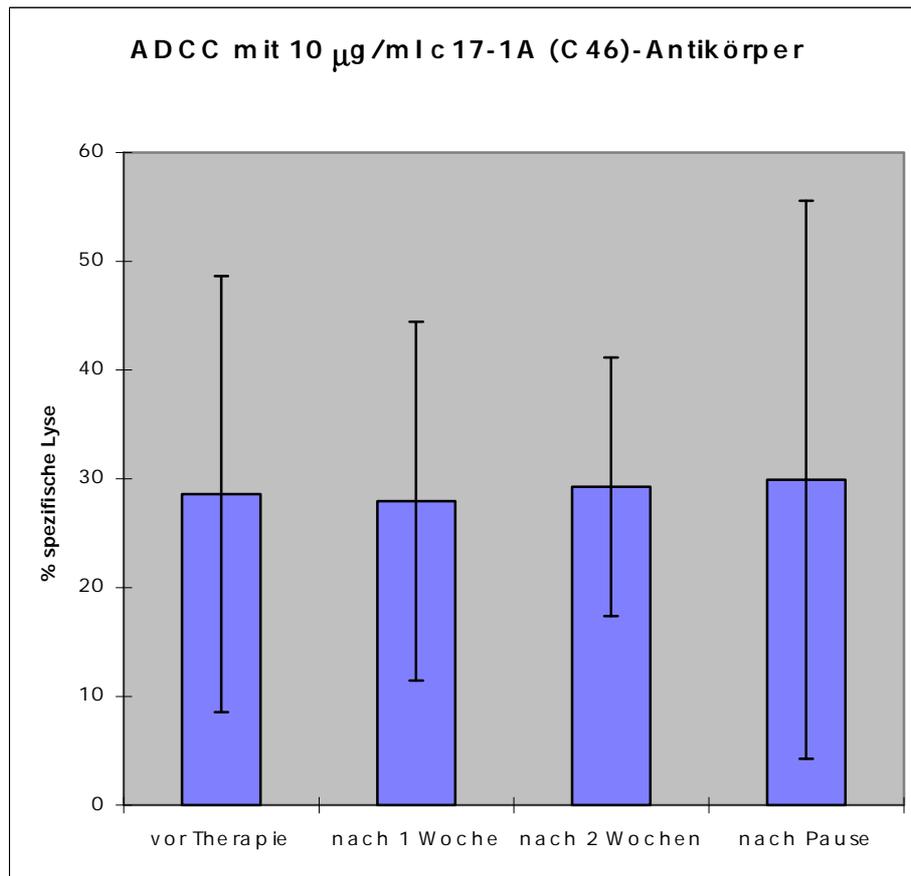
### III.5 Sonstige Parameter (ADCC, NK-Zell-vermittelte Lyse)

Die ADCC, die in „Prozent spezifischer Lyse“, das heißt in Prozent der maximal möglichen zu lysierenden Tumorzellen, gemessen wird, ändert sich ohne zum Testansatz dazugegebener monoklonaler Antikörper nicht signifikant im Therapieverlauf. Die Mittelwerte aus den Messungen der einzelnen Patienten schwanken zwar im zeitlichen Verlauf, jedoch ergeben sich aufgrund der eher hohen Streubreiten keine signifikanten Veränderungen.



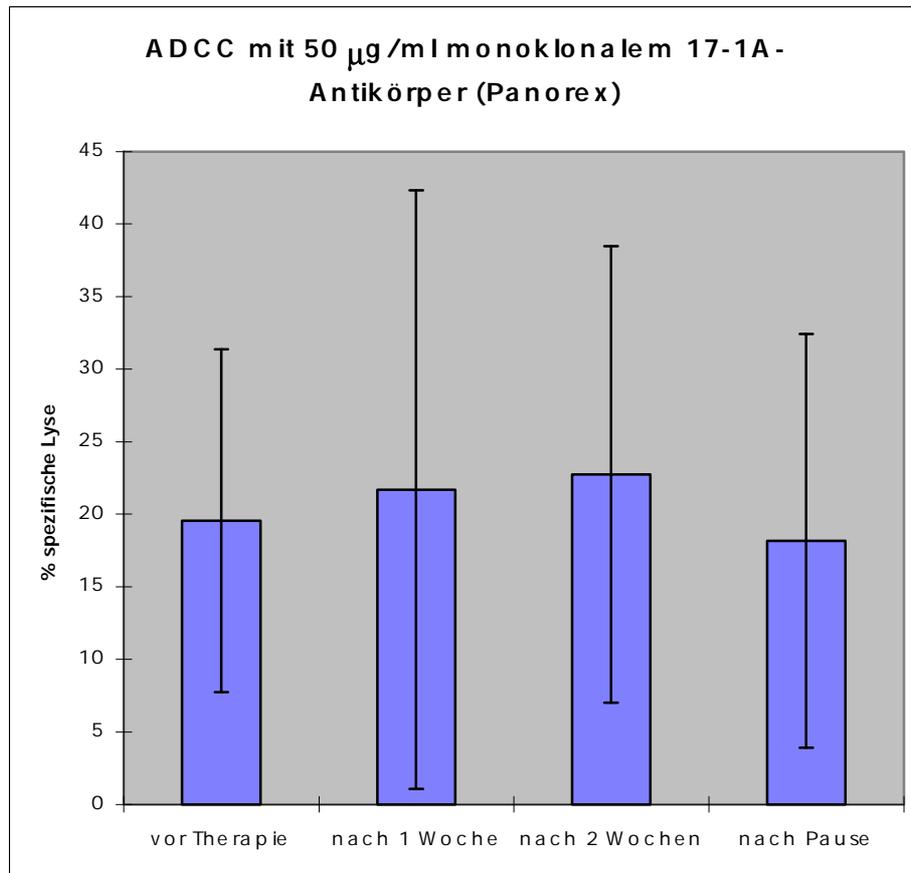
(Abb.31: Änderungen der ADCC-Aktivität ohne zugegebenem monoklonalen Antikörper in % spezifischer Lyse vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Wird zum Testansatz ein chimärer C46-Antikörper dazugegeben, ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen zum Ausgangswert. In diesem Fall bleiben auch die Mittelwerte konstant im Verlauf der Therapie und nach Therapiepause.



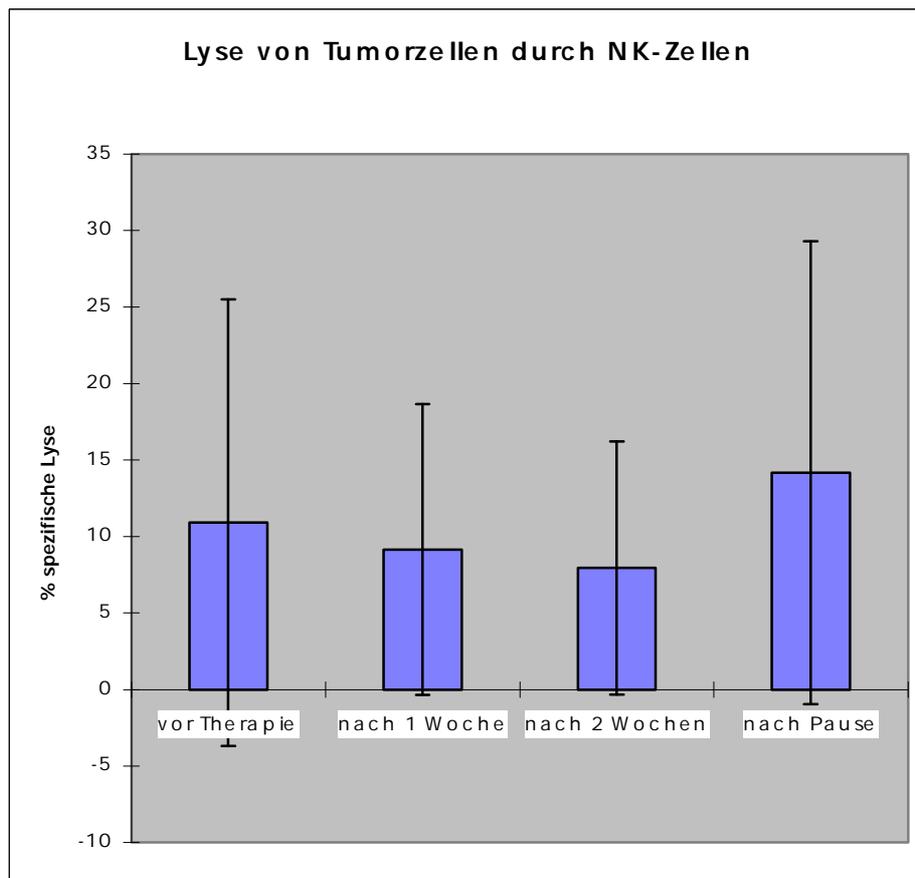
(Abb.32: Änderungen der ADCC-Aktivität mit 10 µg/ml chimärem C46-Antikörper in % spezifischer Lyse vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Hinsichtlich der ADCC mit zum Testansatz zugegebenem monoklonalem 17-1A-Antikörper (Panorex<sup>®</sup>) zeigt sich ebenfalls im Therapieverlauf keine signifikante Veränderung der spezifischen Lyse, auch nach der Therapiepause weichen die Werte nicht signifikant von denen während der Therapie ab.



(Abb. 33: Änderungen der ADCC-Aktivität mit 50 µg/ml monoklonalem 17-1A-Antikörper in % spezifischer Lyse vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

Im gesamten zeitlichen Verlauf ergeben sich für die Lyse mit chimären Antikörpern höhere Raten, als für diejenige mit monoklonalen Antikörpern. Dabei ist aber die hohe Streubreite aller gemessenen Parameter zu berücksichtigen. Die allein durch die NK-Zellen vermittelte Zytolyse weicht ebenfalls im Verlauf der Therapie und nach Therapiepause nicht wesentlich vom Ausgangswert ab.



(Abb. 34: Änderungen der NK-Zell-Aktivität in % spezifischer Lyse vor, während und nach Behandlung mit 5-Fluorouracil und Bestrahlung)

## **IV. Diskussion**

### **IV.1 Immunologische Grundlagen<sup>27</sup>**

#### **IV.1.1 Zugrunde liegende zelluläre und humorale Abwehrmechanismen**

- Zellulär vermittelte Tumormunität

Die Immunreaktion auf maligne Zellen ist bei einem Patienten mit einer Tumorerkrankung nur schwer einzuschätzen. Ein erster zuverlässiger Befund ergibt sich erst nach einer Tumoresektion und anschließender histopathologischer Begutachtung des Tumors. Dabei zeigt sich in vielen Fällen eine Infiltration des Tumors durch Zellen des Abwehrsystems. Häufig finden sich mononukleäre oder lymphozytäre Zellen zwischen Tumorzellen. Es ist also von einer gewissen selbständigen Immunantwort auszugehen, ermöglicht durch die Erkennung von Oberflächenantigenen auf den Tumorzellen, oder zumindest auf Teilen davon.<sup>24</sup>

Eine große Rolle spielen dabei die Antigene des MHC-Komplexes. Zytotoxische T-Zellen (CD8+) sind in der Lage, fremde MHC-Klasse-I-Antigene zu erkennen und die entsprechenden Zellen anzugreifen. Die Mechanismen sind dabei ähnlich der Immunantwort auf Transplantationsantigene. Die auf Aktivierung der zytotoxischen CD8+-Zellen ansprechenden T-Helfer-Zellen (CD4+) sind in der Lage, durch Ausschüttung von Lymphokinen weitere Abwehrzellen anzulocken und zu aktivieren. Eine größere Rolle spielen dabei Makrophagen, NK-Zellen und lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK-Zellen).

Zu den wichtigsten von den T-Helfer-Zellen ausgeschütteten Lymphokinen gehört das Interleukin-2. Es stimuliert die Teilung von T-Zellen und die Weiterentwicklung von B-Zellen zu Plasmazellen. Außerdem wirkt es stimulatorisch auf die Vermehrung von NK-Zellen und die Aktivierung von LAK-

Zellen. Die beiden letztgenannten Zelltypen sind in der Lage, nach Aktivierung Tumorzellen zu zerstören. Dabei geht man derzeit davon aus, dass LAK-Zellen potenter gegenüber einem breiten Spektrum von Tumorzellen wirksam sind. NK-Zellen sind darüber hinaus auch in der Lage, virusbeladene Zellen, die Virusantigene an der Oberfläche exprimieren, zu zerstören. Dies kann eine Rolle spielen bei Tumoren, deren Entstehung mit vorausgegangenen Virusinfektionen assoziiert ist. Das von den T-Helferzellen neben dem Interleukin-2 freigesetzte Interferon  $\gamma$  ist in der Lage, Makrophagen zu aktivieren. Diese können dadurch vermehrt tumorizid wirken. Interferone stimulieren außerdem die zytotoxischen Eigenschaften von NK-Zellen; des weiteren fördern sie die Expansion von MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Molekülen in benachbarten Zellen. Dies bewirkt im Sinne einer positiven Rückkopplung eine weitere Aktivierung der oben beschriebenen Mechanismen.

Selbst wenn diese genannten Immunmechanismen bei einem Tumor effizient wirken können, so ist doch in der Regel davon auszugehen, dass nicht jede einzelne Tumorzelle über das MHC-System als fremd erkannt wird und somit ohne Abhängigkeit von vorhandenen Antikörpern zerstört werden kann. Vielmehr geht man davon aus, dass nach der Reaktion auf die erkennbaren und zerstörbaren Zellen diejenigen Tumorzellen weiterwachsen können, die eben nicht unmittelbar als fremd erkannt werden. Nach Ablauf der zellulär vermittelten Immunität bleiben also resistente Tumorzellen übrig, die sozusagen als Klon eher ungehindert weiterwachsen können.

#### - Humoral vermittelte Immunantwort

Deshalb kommt der humoralen, also der antikörpervermittelten Immunität eine besondere Bedeutung in der Tumorabwehr zu. Es wurden für eine Vielzahl von Tumoren bereits tumorassoziierte Antigene nachgewiesen, also

Oberflächenstrukturen, die insbesondere auf den malignen Zellen, aber deutlich seltener oder gar nicht auf gesunden Zellen vorhanden sind. Oft handelt es sich dabei um Strukturen, denen in der Embryonalphase eine Bedeutung zukam, die aber im Verlauf der Entwicklung nicht mehr benötigt und daher nicht weiter exprimiert werden. Im Rahmen der malignen Transformation einer Zelle kann die Expression solcher Strukturen reaktiviert werden, die Zellen sind im Vergleich zu gesunden erwachsenen Zellen entdifferenziert.

Um nun zusätzlich zur bereits beschriebenen zellulär vermittelten Immunität auch eine humoral vermittelte Immunreaktion gegen maligne Zellen hervorzurufen, ist es notwendig, dass die Tumorzellen, also die Zielzellen (Targets) mit Antikörpern reagieren, um so von den entsprechenden Effektorzellen erkannt zu werden.

Zum einen sind hier die aus den Monozyten hervorgegangenen Makrophagen zu nennen. Diese können antikörper-markierte Strukturen effizienter phagozytieren. Im Sinne einer positiven Rückkoppelung können sie dabei Fremdproteine auf ihrer eigenen Zelloberfläche präsentieren (MHC-II-Komplex). Diese wiederum werden von T-Helfer-Zellen erkannt, die ihrerseits lymphokine Substanzen ausschütten können und somit zu einer Potenzierung des immunologischen Geschehens beitragen können.

Ein weiterer antikörper-abhängiger Mechanismus ist die antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC). Dabei wird der Fc-Teil des Antikörpers von den Effektorzellen erkannt, zu denen man neben Lymphozyten auch Monozyten/Makrophagen rechnet.

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass für eine antikörper-vermittelte Immunantwort u.a. folgende Zellen benötigt werden:

- Lymphozyten der CD4+-Population, die durch ihre Lymphokinausschüttung verschiedene weitere Zellen stimulieren können.

- Lymphozyten der CD8+-Population und NK-Zellen in Zusammenhang mit zytotoxischen Wirkungen auf Zielzellen.
- Monozyten/Makrophagen durch zielgerichtete Phagozytose bzw. Mitwirkung bei der ADCC.

Die erwähnten Zellreihen sind in dieser Arbeit bei den später genannten Patienten mehrfach untersucht worden; es sollen im folgenden die Charakteristika der einzelnen Zelltypen noch einmal vorgestellt werden.

## **IV.1.2 Bedeutung der einzelnen Zelltypen**

### **IV.1.2.1 B- und T-Lymphozyten**

- B-Lymphozyten (CD19+)

Sie sind im wesentlichen für die Herstellung von Antikörpern zuständig. Durch das genetische Re-Arrangement vieler einzeln codierter Teilstücke der Antikörper-Proteine ist die gewaltige Vielfalt bzw. Diversifikation des Antikörper-Pools zu erklären. Theoretisch wäre vorstellbar, dass eine B-Zelle eines Tumorpatienten einmal zufällig einen Antikörper gegen ein Tumorantigen herstellt, und infolge dessen stimuliert und vielfach geklont wird. Allerdings wird diese Vervielfältigung über noch nicht geklärte Mechanismen inhibiert, wenn der Antikörper gegen körpereigene Strukturen gerichtet ist. Dies spräche gegen eine in der Theorie vorstellbare, natürliche Tumormunität. Die in-vivo-Funktionen von B-Zellen in der Tumoralabwehr sind bis heute nicht hinlänglich erforscht. Das eigentliche Ziel dieser Arbeit ist es, die günstigsten Umstände für einen von außen zugeführten monoklonalen, ex-vivo synthetisierten Antikörper zu klären. Aufgrund dieser Fragestellung sprechen die B-Lymphozyten hierbei eine eher untergeordnete Rolle.

- T-Lymphozyten (CD3+)

Im wesentlichen werden hierbei T-Helferzellen (CD4+) von zytotoxischen Killerzellen (CD8+) unterschieden. Eine regulatorische Rolle spielen die T-Suppressorzellen. Entscheidend für die Effizienz einer Immunantwort sind die CD4+-T-Helferzellen. Diese können über den MHC-II-Komplex erkennen, wenn Makrophagen körperfremdes Material phagozytiert haben. Mit Hilfe der dann folgenden Lymphokinausschüttung werden die weiteren beteiligten Immunzellen stimuliert, sich entweder zu teilen und zu vermehren, oder aber in der Aktivität zuzunehmen. Insbesondere nennenswert ist in diesem Zusammenhang das Interleukin-2, das die Vermehrung von NK-Zellen vermittelt. Außerdem sind chemotaktische Faktoren von Bedeutung, die ihrerseits weitere Makrophagen an den Ort des Geschehens locken können. Die CD8+-Killerzellen haben die Fähigkeit, über den MHC-I-Komplex körperfremde Zellen zu erkennen und in der Folge zu zerstören. Dies spielt insbesondere eine Rolle bei Transplantatabstoßungsreaktionen, aber möglicherweise auch im Frühstadium einer Tumorerkrankung im Rahmen einer unspezifischen Abwehrreaktion. Des Weiteren wird eine Beteiligung an der ADCC diskutiert.

#### **IV.1.2.2 NK-Zellen**

Einen weiteren Subtyp der Lymphozyten, der weder den B- noch den T-Zellen zugerechnet werden kann, stellen die NK-Zellen dar. Früher wurden sie oft als Non-B/Non-T-Zellen oder als LGL (Large granular lymphocytes) bezeichnet. Als Oberflächenantigene zeigen sie regelmäßig CD56 und CD16. Das Antigen CD16 entspricht dem Fc-III $\gamma$ -Rezeptor. Dementsprechend sind sie in der Lage, antikörpermarkierte Targetzellen einerseits im Rahmen der ADCC zu lysieren. Darüber hinaus greifen sie über noch ungeklärte Mechanismen auch weitere Zellen an, sogar ohne bisher nachgewiesene Beteiligung von Antikörpern oder MHC-

Komplexen. Für die Tumorabwehr kommt ihnen in zweierlei Hinsicht Bedeutung zu. Zum einen sind sie in der Lage, fremde Zellen selbst ohne Hilfe von Antikörpern oder MHC-Komplexen anzugreifen; die detaillierten Mechanismen der Auswahl der Targetzellen sind hierbei jedoch noch nicht erforscht. In der Theorie vorstellbar wäre aber eine unspezifische Reaktion früheren Stadien von Tumorzellen gegenüber. Der andere Mechanismus, der sich auf die auf der Oberfläche der NK-Zellen vorhandenen Fc-Rezeptoren stützt, vermittelt eine antikörperabhängige Zytotoxizität. Insbesondere nach Stimulation durch von CD4<sup>+</sup>-Zellen ausgeschüttetes IL-2 erscheinen NK-Zellen als gut wirksame und potente Effektoren gegen mit Antikörpern zu markierende Tumorzellen.

#### **IV.1.2.3 Monozyten**

Makrophagen sind Bestandteil des sogenannten Retikulo-endothelialen Systems (RES). Am besten erforscht sind die im Blut zirkulierenden Monozyten. Sie üben im wesentlichen zwei Funktionen aus. Zum einen phagozytieren und verdauen sie eher unspezifisch bestimmte Zellen oder Zellteile, im Anschluss daran präsentieren sie über den an ihrer Oberfläche vorhandenen MHC-II-Komplex kurze Aminosäureketten der verdauten Zielzellen und können somit eine T-Zell-Antwort auslösen.

Zum anderen erkennen sie bereits antikörper-markierte Ziele mit Hilfe von Rezeptoren, die spezifisch auf die Fc-Teile der Antikörper reagieren. Diese Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten werden nach heutigem Kenntnisstand in drei verschiedene Klassen eingeteilt. Bekannt sind derzeit Fc-I $\gamma$ -Rezeptoren (CD64), Fc-II $\gamma$ -Rezeptoren (CD32) und Fc-III $\gamma$ -Rezeptoren (CD16).

Im Hinblick auf die Tumorimmunität kann demnach das Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl funktionierender, aktiver Monozyten bedeutend sein für die Elimination antikörper-markierter Tumorzellen durch Phagozytose.

#### **IV.1.2.4 Granulozyten**

Die Granulozyten stellen innerhalb der Leukozyten im Regelfall die größte Gruppe dar, beim Gesunden sind Werte von 60 bis 70 % der Normalfall. Unter den Granulozyten wiederum bilden mit gut 90 % der Gesamt-Granulozyten die Neutrophilen die größte Population. Sie sind einerseits in der Lage, ihre Targets, normalerweise Bakterien oder andere Mikroorganismen, zu phagozytieren und anschließend in Phagolysosomen enzymatisch abzubauen. Andererseits können sie ebenso, sollten sie über Fc-Rezeptoren durch IgG stimuliert werden, den Inhalt ihrer Granula in den Extrazellulärraum entleeren. Die dabei ausgeschütteten lysosomalen Enzyme können dann ihrerseits das den Neutrophilen benachbarte Target angreifen.

### **IV.2 Vergleich mit früheren Arbeiten**

Bisherige Arbeiten über Immunfunktionen unter Tumorthérapien behandeln überwiegend einzelne Zellpopulationen, die meisten Arbeiten befassen sich mit anderen Tumorlokalisationen als dem Pankreas. Insbesondere zu Tumoren des blutbildenden Systems liegen bereits viele Untersuchungen vor.

#### **IV.2.1 Phagozytierende Zellen, Fc-Rezeptor tragende Zellen**

Athlin und Domellof <sup>2</sup> untersuchten an neun Patienten mit Magenkarzinom die Phagozytoseaktivität der Monozyten nach Verabreichung einer Kombination aus 5-Fluoruracil, Adriamycin und Mitomycin. Die Messungen fanden eine Stunde, 24 Stunden und eine Woche nach der einmaligen Verabreichung der Chemotherapie statt. In der ersten Messung eine Stunde nach Therapie zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Phagozytoseaktivität um knapp 20%, die absoluten Zahlen, d.h. die

Ausgangs- und Zielwerte wurden jedoch nicht veröffentlicht. Nach 24 Stunden und nach einer Woche wurde eine Erholung der Monozyten-Phagozytose beobachtet, so dass ein nur noch leichter Rückgang der Aktivität verglichen mit dem Ausgangswert nicht mehr signifikant war. Gleichzeitig konnten sie einen signifikanten Rückgang der Gesamtzahl der Leukozyten erfassen, von im Mittel 6,9 G/l zu 4,6 G/l nach einer Woche. Zum Vergleich dazu wurde in der hier vorliegenden Arbeit innerhalb der ersten Woche lediglich ein nicht-signifikanter Rückgang von 6,4 G/l auf 5,8 G/l gemessen (Mittelwerte), allerdings kam es schließlich nach der Therapiepause ebenfalls zu einem signifikanten Abfall der Leukozytenzahl, auf im Mittel 4,3 G/l. Athlin und Domellof erwähnten, dass unter ihren Patienten keine Zeichen einer erhöhten Infektanfälligkeit beobachtet werden konnten.

Lukac et al.<sup>16</sup> untersuchten die Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten von Patienten mit Kolorektal-Karzinomen unter Therapie mit Fluoruracil. Sie fanden bereits zum Diagnosezeitpunkt erniedrigte Phagozytoseparameter vor, die nach chirurgischer Therapie weiter absanken, jedoch sich während der in sechs Zyklen verabreichten Chemotherapie wieder erholten. Sie fanden also keine suppressive Wirkung von Fluoruracil auf die Phagozytoseaktivität. Die Untersuchung umfasste 51 Patienten, denen jeweils vor und nach dem chirurgischen Eingriff sowie vor jedem der sechs Zyklen der Chemotherapie mit 5-Fluoruracil Blutproben entnommen wurden. Untersucht wurden unter anderem die Raten der phagozytierenden Zellen unter den Monozyten und Granulozyten. Die Ergebnisse (in % phagozytierender Zellen) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt, zum Vergleich sind die Ergebnisse aus der hier vorliegenden Arbeit gegenübergestellt.

Phagozytoseraten in % der jeweiligen Zellpopulation	<u>Lukac et.al (1995):</u> Patienten mit Kolorektalen Tumoren und 5-FU-Therapie		<u>eigene Arbeit:</u> Patienten mit Pankreastumoren, 5-FU- und Strahlentherapie	
	Granulozyten	Monozyten	Granulozyten	Monozyten
Zeitpunkt vor 1. Zyklus / vor Therapie	86	67	95,2	77,4
vor 2. Zyklus / nach 1 Woche	90	66	96,3	72,2
vor 3. Zyklus / nach 2 Wochen	90	63	94,5	83,2
vor 4. Zyklus / n.a.	88	67	n.a.	n.a.
vor 5. Zyklus / n.a.	91	64	n.a.	n.a.
vor 6. Zyklus / nach Pause	89	63	93,9	82,7

(Tab. 1: Gegenüberstellung der Phagozytoseraten der Granulozyten und Monozyten in % der jeweiligen Zellpopulation, einerseits unter Behandlung mit 5-Fluoruracil bei Kolorektalen Tumoren, andererseits unter Behandlung mit 5-Fluoruracil und Bestrahlung bei Pankreastumoren, n.a. = nicht angegeben)

Aus der Gegenüberstellung wird ersichtlich, dass sowohl in der Arbeit von Lukac et.al als auch in der hier vorliegenden Arbeit innerhalb der einzelnen Zellpopulationen keine wesentlichen oder dramatischen Veränderungen der Anteile der phagozytose-aktiven Zellen auftreten. In beiden Arbeiten zeigte sich übereinstimmend, dass relativ zur jeweiligen Gesamtzahl mehr Granulozyten als Monozyten zur Phagozytose befähigt sind.

Plate und Harris <sup>21</sup> beschreiben spezifisch für Patienten mit Pankreastumoren den Verdacht auf einen immunsuppressiven Mechanismus, der direkt durch die Tumorzellen ausgelöst werden könnte. Aus diesem Grund stellen sie die Entwicklung immuntherapeutischer Verfahren in Frage, bis die genauen Mechanismen, durch die Tumorzellen in der Lage sind, ihre Umgebung vor Immunangriffen zu schützen, geklärt und verstanden sind.

In der hier durchgeführten Studie ergeben die im peripheren Blut gemessenen Phagozytose-Parameter keinen Anhalt für eine verminderte Funktion der Monozyten oder Granulozyten. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass lediglich in-vitro-Messungen durchgeführt wurden. Eine direkte Messung an Tumorzellen fand hierbei nicht statt. Insbesondere eine mögliche Hemmung von Immunmechanismen durch vom Tumor exprimierte, noch nicht näher bekannte Faktoren, ist bei der ex-vivo-Messung im peripheren Blut nicht berücksichtigt.

Die bisher standardmäßig durchgeführten Therapieverfahren, Gabe von 5-Fluoruracil und Strahlentherapie schränkten beim untersuchten Patientenkollektiv die Phagozytoseaktivität nicht wesentlich ein.

Die Zellzahlen der phagozytierenden Zellen, Monozyten und Granulozyten, sind beide im Therapieverlauf nicht signifikant vermindert. Auch wenn zu bedenken ist, dass aufgrund der relativ niedrigen Patientenzahl eine verlässliche Aussage nicht möglich ist, so kann doch in Anbetracht der geringen Abnahme der Gesamtzahlen dieser Zellpopulationen davon ausgegangen werden, dass keine wesentliche Verminderung der Zellzahlen im Therapieverlauf auftritt. Nicht nur die Gesamtzahl, auch die Phagozytoserate dieser beiden Zellpopulationen erfährt im untersuchten Zeitraum keine signifikante Änderung. Die Phagozytoseaktivität der Monozyten nimmt, betrachtet man die Mittelwerte der einzelnen Zeitpunkte, sogar etwas zu, diese Erhöhung der Phagozytoserate fällt jedoch bei der eher geringen Patientenzahl nicht statistisch signifikant aus. Dennoch muss in Anbetracht dieser Ergebnisse auch nicht von einer Abnahme bzw. wesentlichen Veränderung der Phagozytoseaktivität ausgegangen werden, weder bei den Monozyten, noch bei den Granulozyten.

Die Fc-Rezeptor-tragenden Zellen unter den Monozyten bzw. Granulozyten verhalten sich uneinheitlich unter den verschiedenen Typen von Fc-Rezeptoren. Während die CD32-positiven Granulozyten entsprechend der

Gesamtgranulozytenzahl leicht abnehmen, nimmt die absolute Zahl der CD16-positiven Granulozyten eher zu, auch die CD64-positiven Granulozyten ändern sich im Therapieverlauf nicht signifikant. Insgesamt kommt es relativ zur Gesamtzahl der Granulozyten eher zu einer Zunahme der Fc-Rezeptor-tragenden Zellen. Dies kann auch als Erklärung dazu beitragen, warum die Phagozytoseaktivität der Granulozyten unter Therapie nicht abnimmt, denn auch die Phagozytoseaktivität wird als Prozentzahl der aktiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl bestimmt. Ein nur geringfügig verschiedenes Bild zeigt sich bei den Monozyten. Lediglich bei den CD16-tragenden Zellen lässt sich ein Rückgang erahnen, selbst dieser fällt nicht signifikant aus. Die Werte für die CD32-positiven und CD64-positiven Monozyten bleiben dagegen im Therapieverlauf weitgehend unverändert. Auch hier ähnelt der Befund der Fc-Rezeptor-tragenden Zellen dem Ergebnis aus der Bestimmung der Phagozytoseaktivität, in der sich ebenfalls keine signifikante Änderung im Therapiezeitraum zeigt.

Da die Fc-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Erkennung zu phagozytischer Zellen spielen, sind die sich ähnelnden Ergebnisse der Fc-Rezeptor-tragenden Zellen und der tatsächlichen Phagozytoseraten im untersuchten Therapieverlauf nicht weiter verwunderlich.

#### **IV.2.2 Gesamtleukozyten**

Bezüglich der Gesamtzahl der im Verlauf einer Chemo- und Strahlentherapie vorliegenden Leukozyten wurde in bisherigen Arbeiten eine Abnahme der Zellzahlen beschrieben.<sup>8</sup> Damit verbunden kann eine erhöhte Anfälligkeit von Karzinompatienten für Infektionskrankheiten bestehen.<sup>9</sup> Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine bereits unmittelbar nach Therapiebeginn einsetzende Reduzierung der Gesamtleukozytenzahlen. Vor allem, wenn man berücksichtigt, dass die reduzierten Zellzahlen überwiegend auch nach

der Therapiepause noch konstant niedrig bleiben, ergibt sich demzufolge ein erster Hinweis darauf, dass das Immunsystem zu Beginn des kombinierten Therapieschemas aus Radio- und Chemotherapie noch am leistungsfähigsten sein könnte. Ein eventuell zur Verfügung stehender, therapeutisch nutzbarer monoklonaler Antikörper gegen Zellen eines Pankreaskarzinoms sollte bereits möglichst vor oder zu Beginn einer Chemotherapie verabreicht werden.

Die Gesamtleukozytenzahl vermindert sich über den gesamten Therapieverlauf. Signifikant niedriger als zu Beginn der Therapie sind jedoch nur die Werte nach der Therapiepause.

#### **IV.2.3 Lymphozyten-Subpopulationen**

Von Bernstorff et.al.<sup>37</sup> beschrieben einen Mechanismus, der Pankreastumorzellen in die Lage versetzt, die Funktion der T-Lymphozyten einzuschränken. In pathologischen Präparaten beobachteten sie, dass tumorinfiltrierende T-Lymphozyten gar nicht bis an die Tumorzellen selbst herankommen konnten. Darüberhinaus fiel bei den tumornahen T-Lymphozyten ein Verlust eines Teils des CD3-Oberflächenantigens auf. Daher äußerten die Autoren den Verdacht eines aktiven immunsuppressiven Mechanismus durch die Pankreas-Tumorzellen.

In einer bereits älteren Arbeit von Fortner et.al.<sup>8</sup> zeigten sich verminderte Zahlen sowohl der B- als auch der T-Lymphozyten bei Pankreaskarzinompatienten.

Sewell et.al.<sup>29</sup> untersuchten ähnlich wie in der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Immunparameter, jedoch bei Brustkrebspatientinnen unter Therapie mit Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluoruracil. In dieser Arbeit wurden die Therapiezyklen mehrfach wiederholt. Innerhalb der einzelnen Zyklen fiel bei den NK-Zellen jeweils ein deutlicher Rückgang der Zellzahlen auf, jedoch waren bis zum Beginn des nächsten Zyklus wieder normal hohe Zellzahlen erreicht. Bei den B-Lymphozyten zeigte sich der deutlichste Rückgang der Zellzahlen, auch bei den

Gesamt-T-Lymphozyten fiel ein Rückgang auf, dieser betraf aber überwiegend die CD4-positiven Zellen, in geringerem Umfang auch die CD8-positiven Zellen.

Ito et.al.<sup>13</sup> untersuchten in ihrer Arbeit mögliche Zielstrukturen auf pankreatischen Tumorzellen, die von T-Zell-Rezeptoren erkannt werden können. Den T-Lymphozyten kommt bei immuntherapeutischen Ansätzen eine entscheidende Bedeutung zu, da sie sowohl als regulatorische Elemente mittels Zytokin-Freisetzung andere Immunzellen steuern sollen, als auch direkt als zytotoxische Zellen in Erscheinung treten können.

Braun und Harris<sup>4</sup> untersuchten in ihrer Arbeit die Auswirkungen von Chemotherapeutika auf die Funktion der NK-Zellen. Von den 20 untersuchten Patienten lag bei 18 die Diagnose eines Bronchialkarzinoms (14 nicht-kleinzellig, 4 kleinzellig) vor. Aufgrund der verschiedenen Grunderkrankungen lagen auch unterschiedliche Behandlungsschemata mit verschiedenen Zytostatika-Kombinationen vor. Die Blutentnahmen fanden wöchentlich während des ersten Chemotherapiezyklus statt. Die separierten mononukleären Zellen wurden mit radioaktiv markierten Zielzellen inkubiert, der freigesetzte radioaktive Überstand gab das Maß für die Lyse-Aktivität an. Mit Hilfe der Werte für spontane Lyse ohne Zugabe von Effektorzellen und für maximale Lyse durch Zugabe eines chemischen Lösungsmittels wurde entsprechend der Formel in der hier vorliegenden Arbeit (siehe Material und Methoden, II.7) pro Ansatz ein Ergebnis in „Prozent spezifischer Lyse“ angegeben. Bei einem Verhältnis von 12,5 Effektorzellen zu 1 Zielzelle ergaben sich vor und nach Therapie die in der folgenden Tabelle dargestellten Lyse-Raten, die zur genaueren Beurteilung noch unterteilt sind in Patienten mit hohem oder niedrigem Ausgangsniveau vor Beginn der Therapie. Gegenübergestellt sind die eigenen Ergebnisse aus der Bestimmung der NK-Zell-vermittelten Zell-Lyse.

NK-Lyse	<u>Braun, Harris (1986):</u> Patienten mit verschiedenen Tumoren, unterschiedliche Therapien		<u>eigene Arbeit:</u> Patienten mit Pankreastumoren, 5- FU- und Radiatio
(% spezifischer Lyse)	hoher Ausgangswert	niedriger Ausgangswert	alle Patienten
vor Therapie	31,4	8,5	10,9
nach 1 Wo. Therapie	n.a.	n.a.	9,2
nach (2 Wo.) Therapie	5,6	17,8	7,9
nach Therapiepause	n.a.	n.a.	14,2

(Tab. 2: Gegenüberstellung der NK-Zell-vermittelten Zell-Lyse in % spezifischer Lyse, einerseits unter Behandlung mit verschiedenen Zytostatika und unterschiedlichen Tumoren, andererseits unter Behandlung mit 5-Fluoruracil und Bestrahlung bei Pankreastumoren, n.a. = nicht angegeben)

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass in der Arbeit von Braun und Harris die Veränderung der NK-vermittelten Lyse im Therapieverlauf entscheidend vom Ausgangsniveau vor Therapiebeginn abhängt. Während bei normalen Ausgangswerten eine Depression der NK-Lyse auftritt, kommt es bei erniedrigten Ausgangswerten eher zu einer Erholung der NK-Zell-Funktion. In der hier vorliegenden eigenen Arbeit wurde eine Trennung nach ursprünglicher NK-Zell-Funktion vor Therapiebeginn nicht vorgenommen. In der Gesamtheit der untersuchten Patienten zeigt sich ein leichter, nicht signifikanter Rückgang der NK-Funktion im Therapieverlauf, wobei es bereits nach zwei bis drei Wochen Pause zu einer beginnenden Erholung der NK-Zell-Funktion kommt.

Weiner et.al. <sup>39</sup> untersuchten Anfang der neunziger Jahre in einer Studie bei Patienten mit fortgeschrittenen Kolorektalkarzinomen unter Therapie mit 5-Fluoruracil die in-vitro-Lyse von Kolorektalkarzinom-Zellen durch antikörpervermittelte Monozyten-Lyse und NK-Zell-Lyse. Die Bestimmungen fanden vor Therapiebeginn sowie nach mehreren Therapiezyklen zwei Monate später statt. Dabei stellte sich heraus, dass bei keinem der gemessenen Parameter ein signifikanter Rückgang der Lyse-Aktivität im zeitlichen Verlauf nachzuweisen

war. Im Gegensatz zu den Non-Respondern fand sich unter den auf die Therapie ansprechenden Patienten sogar eine deutliche Zunahme der lytischen Aktivität, auch wenn aufgrund großer interindividueller Unterschiede keine Signifikanz im Ergebnis erreicht wurde.

NK-Lyse (in % spezifischer Lyse)	Weiner et al. (1993): Patienten mit Kolorektalkarzinomen unter 5-FU- und PALA-Therapie			eigene Arbeit: Patienten mit Pankreastumoren, 5-FU- und Radiatio
	alle Patienten	nur Responder	nur non-Responder	alle Patienten
vor Therapie	12,5	16,9	7,6	10,9
nach 2 Wochen	n.a.	n.a.	n.a.	7,9
nach 2 Monaten	40,9	56,1	14,3	n.a.

(Tab. 3: Gegenüberstellung der NK-Zell-vermittelten Zell-Lyse in % spezifischer Lyse, einerseits unter Behandlung mit 5-Fluoruracil und PALA bei Kolorektalen Tumoren, andererseits unter Behandlung mit 5-Fluoruracil und Bestrahlung bei Pankreastumoren, n.a. = nicht angegeben)

Zusammenfassend stellen die Autoren fest, dass unter der Therapie mit 5-Fluoruracil keine Suppression der NK-Zell-vermittelten Lyse stattfindet, was sie für bedeutsam im Hinblick auf mögliche Kombinationen von herkömmlichen Chemotherapien und künftigen Anti-Tumor-Vakzinen halten.

Abdullah et.al.<sup>1</sup> untersuchten die ADCC-vermittelte Lyse von Kolorektalkarzinom-Zellen unter Beigabe verschiedener Antikörper, allerdings mit Effektorzellen von noch nicht behandelten Tumorpatienten und von gesunden Probanden. Dabei zeigte die Zugabe von chimären 17-1A-Antikörpern höhere Lyse-Raten als diejenige von murinen 17-1A-Antikörpern. Eine Beeinflussung durch begleitend verabreichte bisherige Standardtherapien wurde jedoch nicht untersucht.

Bei den hier untersuchten Pankreas-Karzinom-Patienten zeigt sich keine signifikante Suppression der ADCC-vermittelten Lyse im Verlauf der hier vorliegenden kombinierten Radio-Chemotherapie. Allerdings sind auch hier die

hohen interindividuellen Unterschiede zu bedenken, die in der großen Streubreite der einzelnen Ergebnisse sichtbar werden.

Entsprechend der vorbeschriebenen Unterschiede aus der Arbeit von Abdullah et.al. zeigt sich auch in dieser Arbeit eine möglicherweise effizientere Lyse unter Zugabe chimärer Antikörper verglichen mit murinen Antikörpern. Allerdings sind hier ebenso die hohen Streubreiten der Ergebnisse zu bedenken.

Zusammenfassend muss jedoch zumindest nicht von einer Funktionsminderung der Immuneffektorzellen hinsichtlich der antikörpervermittelten Tumorzelllyse ausgegangen werden, dies ist mit Sicherheit die wichtigste Feststellung hinsichtlich der möglichen Kombination bisher eingesetzter Tumorthérapien mit künftig denkbaren, therapeutisch zu nutzenden Antikörpern. Eine Verringerung der Zellzahlen, sowohl der Gesamtleukozyten als auch einiger Lymphozytensubpopulationen, weist aber auf die Notwendigkeit eines möglichst frühzeitigen Einsatzes von Immuntherapien hin.

### **IV.3 Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse**

Ob eine entsprechende Immunantwort auch in vivo zu erreichen ist, die derjenigen von gesunden Vergleichspersonen gleichwertig ist, kann diese Arbeit jedoch nicht endgültig klären. Einerseits ist aufgrund der eher niedrigen untersuchten Patientenzahl bei den hier nicht signifikanten Ergebnissen noch von einer gewissen Unsicherheit auszugehen, andererseits handelt es sich hier ausschließlich um ex-vivo-Untersuchungen.

Insbesondere die bei einzelnen Parametern sichtbaren hohen Streubreiten der Ergebnisse verdeutlichen, dass für eine letztlich zuverlässige Aussage ähnliche Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven erforderlich sind.

Darüberhinaus wurde in früheren Arbeiten wiederholt eine lokale immunsuppressive Wirkung von Tumorzellen diskutiert. Die tatsächlich in diesem Zusammenhang vorhandenen Mechanismen der Tumorzellen, mittels lokaler Faktoren einer Erkennung durch Abwehrzellen zu entgehen, sogenannte Tumor-Escape-Mechanismen, sind nicht sicher bis auf molekulare Ebene geklärt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Fähigkeiten der Abwehrzellen im peripheren Blut untersucht. Das alleinige Vorhandensein bestimmter Zelltypen, bzw. die Fähigkeit, im Reagenzglas ein standardisiertes Bakteriengemisch zu phagozytieren, gibt zwar Hinweise auf ein funktionierendes Immunsystem, die tatsächliche Wirkung auf im Körper selbst vorliegende Tumorzellen ist damit jedoch nicht sicher erwiesen, insbesondere nicht quantifizierbar.

Zusammenfassend kann man unter den genannten Vorbehalten jedoch von folgenden Schlussfolgerungen ausgehen:

- Die Fähigkeit der phagozytierenden Zellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten scheint auch unter Chemotherapie mit 5-Fluoruracil und Radiotherapie *in vitro* nicht beeinträchtigt zu sein.
- Die Gesamtzahl der Leukozyten nimmt zwar unter der gegebenen onkologischen Therapie ab, allerdings nicht unter Werte, die wesentlich unter den klinisch gängigen Normwerten liegen.
- Unter den Lymphozyten-Subpopulationen sind die B-Lymphozyten am deutlichsten rückläufig. Diese sind zwar für die körpereigene Antikörper-Produktion zuständig, ihre Verminderung beeinflusst jedoch nicht die Zugabe eines von extern gegebenen, therapeutischen Antikörpers.

- Die Fähigkeit des Abwehrsystems zur antikörper-vermittelten zytotoxischen Zellyse nimmt in den in vitro-Untersuchungen im bisherigen Therapieverlauf nicht wesentlich ab.

Aufgrund dieser Ergebnisse spricht mit Sicherheit nichts dagegen, den Versuch zu unternehmen, bisherige Chemo- und Radiotherapieschemata zur Behandlung von Pankreaskarzinomen durch künftig einsetzbare, gegen Tumorzellen gerichtete Antikörper zu unterstützen, denn die nötige Immunkompetenz ist zumindest aufgrund der ex-vivo-Ergebnisse ausreichend erhalten.

## Literatur

<sup>1</sup> Abdullah, N., Greenman, J., Pimenidou, A., Topping, K.P., Monson, J.R.T.  
The role of monocytes and natural killer cells in mediating antibody-dependent  
lysis of colorectal tumour cells  
Cancer Immunol Immunother, 48 (1999) 517-524

<sup>2</sup> Athlin, L., Domellof, L.  
Response of human monocyte phagocytosis to FAM (fluorouracil, adriamycin,  
mitomycin)  
Acta Chir Scand, 153 (1987) 279-281

<sup>3</sup> Bokemeyer, C., Kollmannsberger, C., Oettle, H., Kanz, L.  
Current aspects of chemotherapy of metastatic pancreatic and biliary tract  
carcinomas  
Schweiz Rundsch Med Prax, 89 (2000) 1545-1552

<sup>4</sup> Braun, D.P., Harris, J.E.  
Effect of chemotherapy on NK function in the peripheral blood of cancer patients  
Cancer Immunol Immunother, 21 (1986) 240-245

<sup>5</sup> Büchler, M., Friess, H., Schultheiss, K.-H., Gebhardt, C., Kübel, R., Muhrer, K.-H., Winkelmann, M., Wagener, T., Klapdor, R., Kaul, M., Müller, G., Schulz, G., Beger, H.G.

A randomized controlled trial of adjuvant immunotherapy (murine monoclonal antibody 494/32) in resectable pancreatic cancer

Cancer, 68 (1991) 1507-1512

<sup>6</sup> Carter, S.K., Comis, R.L.

The integration of chemotherapy into a combined modality approach for cancer treatment. VI. Pancreatic adenocarcinoma

Cancer Treat Rev, 2 (1975) 193-214

<sup>7</sup> Cullinan, S.A., Moertel, C.G., Fleming, T.R., Rubin, J.R., Krook, J.E., Everson, L.K., Windschitl, H.E., Twito, D.I., Marschke, R.F., Foley, J.F., Pfeifle, D.M., Barlow, J.F.

A comparison of chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma

JAMA, 253 (1985) 2061-2067

<sup>8</sup> Fortner, J.G., Kim, D.K., Hopkins, L., Barrett, M.K., Pinsky, C.M., Day, N.K.

Immunologic function in patients with carcinoma of the pancreas

Surg Gynecol Obstet, 150 (1980) 215-218

<sup>9</sup> Garelli, S., Valbonesi, M., Schiepatti, G., Banfi, L.  
Defective function of granulocytes in patients with cancer  
Tumori, 67 (1981) 415-423

<sup>10</sup> Goel, A., Batra, S.K.  
Antibody constructs for radioimmunodiagnosis and treatment of human pancreatic cancer  
Teratog Carcinog Mutagen, 21 (2001) 45-57

<sup>11</sup> Gurney, H., Anderson, H., Radford, J., Potter, M.R., Swindell, R., Steward, W., Kamthan, A., Chang, J., Weiner, J., Thatcher, N.  
Infection risk in patients with small cell lung cancer receiving intensive chemotherapy and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.  
Eur J Cancer, 28 (1992) 105-112

<sup>12</sup> Hermanek, P. (Hrsg.)  
TNM-Klassifikation maligner Tumoren / UICC, Internat. Union against Cancer  
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1987, 4. Auflage

<sup>13</sup> Ito, M., Shichijo, S., Tsuda, N., Ochi, M., Harashima, N., Saito, N., Itoh, K.  
Molecular Basis of T-Cell-mediated Recognition of Pancreatic Cancer Cells.  
Cancer Res, 61 (2001) 2038-2046

<sup>14</sup> Janes, R.H., Niederhuber, J.E., Chmiel, J.S., Winchester, D.P., Ocwieja, K.C., Karnell, J.H., Clive, R.E., Menck, H.R.

Pattern of care for pancreatic cancer: results of a survey by the commission of cancer

Ann Surg, 223 (1996) 261-272

<sup>15</sup> Klinkenbijn, J.H., Jeekel, J., Sahmoud, T. van Pel, R., Couvreur, M.L., Veenhof, C.H., Arnaud, J.P., Gonzalez, D.G., de Wit, L.T., Hennipman, A., Wils, J.

Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group

Ann Surg, 230 (1999) 776-782

<sup>16</sup> Lukac, J., Kusic, Z., Kovacevic, D., Soldic, Z., Troskot, B.

Neutrophil and monocyte phagocytic functions in patients with colorectal adenocarcinoma during fluorouracil therapy

Anticancer Res, 15 (1995) 2805-2809

<sup>17</sup> Lygidakis, N.J.

Pancreatic cancer: current factors and options to determine future research

Hepatogastroenterology, 47 (2000) 1170-1175

<sup>18</sup> Macdonald, J.S., Astrow, A.B.

Adjuvant therapy of colon cancer

Semin Oncol, 28 (2001) 30-40

<sup>19</sup> Moertel, C.G., Frytak, S., Hahn, R.G.

Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads) + 5-fluoruracil and high dose radiation + 5-fluoruracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group

Cancer, 48 (1981) 105-1710

<sup>20</sup> Moore, M.J., Andersen, J., Burris, H., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., Von Hoff, D.D.

Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial

J Clin Oncol, 15 (1997) 2403-2413

<sup>21</sup> Plate, J.M., Harris, J.E.

Immune cell functions in pancreatic cancer

Crit Rev Immunol, 20 (2000) 375-392

<sup>22</sup> Poplack, D.G., Bonnard, G.D., Holiman, B.J., Blaese, R.M.

Monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity: a clinical test of monocyte function.

Blood, 48 (1976) 809-816

<sup>23</sup> Punt, C.J.A.

New Drugs in the Treatment of Colorectal Cancer

Cancer, 83 (1998) 679-689

<sup>24</sup> Riede, U.N., Schaefer, H.E. (Hrsg.)

Allgemeine und spezielle Pathologie

Thieme, Stuttgart, New York, 1999, 4. Auflage, aktual. Nachdruck

<sup>25</sup> Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K.,

Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J.,

Pichlmayr, R.

Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial.

J Clin Oncol, 16 (1998) 1788-1794

<sup>26</sup> Riethmüller, G., Schneider-Gädicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R.,

Höffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R., Buggisch, P.,

Witte, J. and the German Cancer Aid 17-1A Study Group

Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma.

Lancet, 343 (1994) 1177-1183

<sup>27</sup> Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K.

Kurzes Lehrbuch der Immunologie

Thieme, Stuttgart, New York, 1991, 2. Auflage

<sup>28</sup> Rosemurgy, A.S., Serafini, F.M.

New Directions in Systemic Therapy of Pancreatic Cancer

Cancer Control, 7 (2000) 437-444

<sup>29</sup> Sewell, H.F., Halbert, C.F., Robins, R.A., Galvin, A., Chan, S., Blamey, R.W.

Chemotherapy-induced differential changes in lymphocyte subsets and natural-killer-cell function in patients with advanced breast cancer

Int J Cancer, 55 (1993) 735-738

<sup>30</sup> Siewert, J.R. (Hrsg.)

“Chirurgie”

Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1998, 6. Auflage

<sup>31</sup> Sindelar, W.F., Maher, M.M., Herlyn, D.

Trial of therapy with monoclonal antibody 17-1A in pancreatic carcinoma:  
preliminary results

Hybridoma, 5(Suppl. 1): (1986) 125-132

<sup>32</sup> Staib, L., Braumüller, H., Leiser, C., Beger, H.G., Somasundaram, R., Li, W.,  
Birebent, B., Herlyn, D.

First report of active specific immunization in colorectal and pancreatic cancer  
patients with CO17-1A vaccine

Langenbecks Arch Chir Suppl, (Forumband 1998): 53-58

<sup>33</sup> Staib, L., Link, K.H., Beger, H.G.

Immunotherapy in pancreatic cancer - current status and future

Langenbeck's Arch Surg, 384 (1999) 396-404

<sup>34</sup> Tempero, M.A., Haga, Y., Sivinski, C., Steplewski, Z., Kay, H.D., Pour, P.

Immunotherapy with monoclonal antibody (Mab) in pancreatic adenocarcinoma.

Int J Pancreatol, 9 (1991) 125-134

<sup>35</sup> Tempero, M.A., Pour, P.M., Uchida, E.

Monoclonal antibody CO17-1A and leukapheresis in immunotherapy of pancreatic  
cancer

Hybridoma, 5(Suppl. 1) (1986) 133-138

<sup>36</sup> Trede, M., Schwall, G., Saeger, H.

Survival after pancreaticoduodenectomy

Ann Surg, 211 (1990) 447-458

<sup>37</sup> von Bernstorff, W., Voss, M., Freichel, S., Schmid, A., Vogle, I., Johnk, C.,  
Henne-Bruns, D., Kremer, B., Kalthoff, H.

Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients

Clin Cancer Res, 7(3. Suppl.) (2001) 925s-932s

<sup>38</sup> Weiner, L.M., Harvey, E., Padavic-Shaller, K., Willson, J.K., Walsh, C., LaCreta  
F., Khazaeli, M.B., Kirkwood, J.M., Haller, D.G.

Phase II multicenter evaluation of prolonged murine monoclonal antibody 17-1A  
therapy in pancreatic carcinoma.

J Immunother, 13 (1993) 110-116

<sup>39</sup> Weiner, L.M., Hudes, G.R., Kitson, J., Walczak, J., Watts, P., Litwin, S.,  
O'Dwyer, P.J.

Preservation of immune effector cell function following administration of a dose-  
intense 5-fluorouracil-chemotherapy regimen

Cancer Immunol Immunother, 36 (1993) 185-190

## Anhang

(Tabellarische Darstellung der Ergebnisse jeder untersuchten Zellpopulation)

### Leukozyten

G/l	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	6,401	2,186
nach 1 Woche Therapie	5,786	1,805
nach 2 Wochen Therapie	5,644	1,778
nach Therapiepause	4,276	0,978

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,575
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,489
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,043</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,107

### Erythrozyten

T/l	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	4,158	0,376
nach 1 Woche Therapie	4,276	0,236
nach 2 Wochen Therapie	4,272	0,365
nach Therapiepause	4,062	0,330

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,612
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,675
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,711
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,418

**Thrombozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	230800	40701
nach 1 Woche Therapie	222800	37632
nach 2 Wochen Therapie	189000	41976
nach Therapiepause	181400	20185

## Signifikanzniveau

p

nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,780
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,191
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,074
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,756

**Monozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	488,950	138,266
nach 1 Woche Therapie	484,625	187,129
nach 2 Wochen Therapie	438,988	134,490
nach Therapiepause	400,000	103,294

## Signifikanzniveau

p

nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,962
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,504
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,209
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,565

### **Lymphozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	1681,638	708,335
nach 1 Woche Therapie	1023,250	306,095
nach 2 Wochen Therapie	689,863	213,984
nach Therapiepause	693,971	222,919

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,049</b>
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,007</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,007</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,974

### **Granulozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	4220,663	1722,074
nach 1 Woche Therapie	4228,375	1480,371
nach 2 Wochen Therapie	4432,400	1738,639
nach Therapiepause	3178,743	911,258

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,993
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,822
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,192
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,125

### **T-Lymphozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	1453,333	713,645
nach 1 Woche Therapie	644,000	393,273
nach 2 Wochen Therapie	730,000	157,099
nach Therapiepause	464,286	217,378

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,063
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,073
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,026</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	<b>0,049</b>

### **B-Lymphozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	80,000	15,275
nach 1 Woche Therapie	38,000	20,396
nach 2 Wochen Therapie	26,000	13,565
nach Therapiepause	22,857	14,846

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,011</b>
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,000</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,000</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,738

### CD4+ Lymphozyten

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	1070,000	595,651
nach 1 Woche Therapie	606,000	247,273
nach 2 Wochen Therapie	540,000	93,167
nach Therapiepause	328,571	120,170

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,158
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,104
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,038</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	<b>0,011</b>

### CD8+ Lymphozyten

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	455,000	240,953
nach 1 Woche Therapie	340,000	211,187
nach 2 Wochen Therapie	244,000	122,898
nach Therapiepause	211,429	129,110

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,466
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,129
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,080
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,697

### **NK-Zellen**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	155,000	54,391
nach 1 Woche Therapie	114,000	80,647
nach 2 Wochen Therapie	66,000	28,705
nach Therapiepause	155,714	122,341

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,414
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,014</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,990
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,128

### **aktivierte T-Lymphozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	191,667	111,865
nach 1 Woche Therapie	124,000	65,909
nach 2 Wochen Therapie	120,000	22,804
nach Therapiepause	135,714	124,884

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,290
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,216
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,450
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,773

### **CD16+ Lymphozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	332,234	136,184
nach 1 Woche Therapie	120,750	45,527
nach 2 Wochen Therapie	122,600	40,927
nach Therapiepause	165,400	166,327

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,033</b>
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	<b>0,034</b>
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,161
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,641

### **CD16+ Monozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	148,000	90,392
nach 1 Woche Therapie	111,500	91,445
nach 2 Wochen Therapie	127,200	68,145
nach Therapiepause	75,800	33,534

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,617
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,723
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,194
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,226

### **CD16+ Granulozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	73,600	35,691
nach 1 Woche Therapie	57,500	76,735
nach 2 Wochen Therapie	73,75	78,754
nach Therapiepause	141,800	120,515

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,753
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,998
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,330
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,398

### **CD32+ Lymphozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	179,200	78,589
nach 1 Woche Therapie	87,500	51,621
nach 2 Wochen Therapie	77,600	28,849
nach Therapiepause	104,400	24,711

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,106
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,059
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,132
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,197

### **CD32+ Monozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	454,600	135,070
nach 1 Woche Therapie	419,500	189,714
nach 2 Wochen Therapie	463,200	133,717
nach Therapiepause	409,200	119,163

#### Signifikanzniveau

	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,796
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,930
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,628
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,563

### **CD32+ Granulozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	4588,400	2055,040
nach 1 Woche Therapie	4467,250	1817,249
nach 2 Wochen Therapie	4469,600	1623,865
nach Therapiepause	3139,800	1070,615

#### Signifikanzniveau

	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,937
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,930
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,258
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,214

### **CD64+ Monozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	383,200	84,653
nach 1 Woche Therapie	371,750	200,143
nach 2 Wochen Therapie	407,600	150,158
nach Therapiepause	328,200	144,530

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,931
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,786
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,534
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,468

### **CD64+ Granulozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	55,400	24,703
nach 1 Woche Therapie	72,000	36,899
nach 2 Wochen Therapie	41,600	26,673
nach Therapiepause	77,400	48,976

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,531
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,470
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,454
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,245

**CD32+/CD64+ Monozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	380,600	84,587
nach 1 Woche Therapie	368,250	200,194
nach 2 Wochen Therapie	398,200	141,592
nach Therapiepause	326,600	144,723

## Signifikanzniveau

	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,925
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,838
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,542
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,499

**CD32+/CD64+ Granulozyten**

cells / cu mm	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	55,200	24,871
nach 1 Woche Therapie	71,250	35,787
nach 2 Wochen Therapie	39,800	25,301
nach Therapiepause	77,200	49,085

## Signifikanzniveau

	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,535
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,411
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,455
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,224

### **Phagozytose Monozyten**

% phagozytierende Zellen	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	77,440	6,077
nach 1 Woche Therapie	72,203	13,620
nach 2 Wochen Therapie	83,200	9,013
nach Therapiepause	82,694	11,819

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,566
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,311
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,452
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,948

### **Phagozytose Granulozyten**

% phagozytierende Zellen	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	95,162	2,538
nach 1 Woche Therapie	96,275	1,012
nach 2 Wochen Therapie	94,516	2,337
nach Therapiepause	93,900	3,672

Signifikanzniveau	p
nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,411
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,701
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,578
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,786

**ADCC ohne m-Ab**

% spezifische Lyse	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	9,99	16,38
nach 1 Woche Therapie	4,76	4,16
nach 2 Wochen Therapie	6,58	11,70
nach Therapiepause	4,83	3,05

## Signifikanzniveau

p

nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,438
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,651
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,450
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,691

**ADCC mit 10 µg/ml c17-1A (C46)**

% spezifische Lyse	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	28,59	20,05
nach 1 Woche Therapie	27,94	16,48
nach 2 Wochen Therapie	29,26	11,88
nach Therapiepause	29,91	25,65

## Signifikanzniveau

p

nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,946
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,939
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,942
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,970

**ADCC mit 50 ìg/ml m17-1A (Panorex®)**

% spezifische Lyse	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	19,56	11,82
nach 1 Woche Therapie	21,69	20,63
nach 2 Wochen Therapie	22,75	15,75
nach Therapiepause	18,17	14,26

## Signifikanzniveau

p

nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,799
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,650
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,891
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,664

**NK-Zellyse**

% spezifische Lyse	Mittelwert	Standardabweichung
vor Therapie	10,91	14,59
nach 1 Woche Therapie	9,16	9,50
nach 2 Wochen Therapie	7,94	8,28
nach Therapiepause	14,16	15,14

## Signifikanzniveau

p

nach 1 Woche Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,789
nach 2 Wochen Therapie im Vergleich zu vor der Therapie	0,642
nach Therapiepause im Vergleich zu vor der Therapie	0,769
nach Therapiepause im Vergleich zu nach 2 Wochen Therapie	0,557

## Verzeichnis der Abkürzungen

ADCC	Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation (Bezeichnung von Oberflächenantigenen)
CLFT	Cyclophosphamid, Leukovorin, 5-Fluorouracil, Tamoxifen
Cr	Chrom
cu mm	Kubikmillimeter ( $10^{-6}$ l)
Fc	constant fragment (langkettiger, konstanter Anteil der Antikörper)
FITC	fluorescein isothiocyanate (ein Fluoreszenzfarbstoff)
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
5-FU	5-Fluorouracil
G/l	$10^9$ pro Liter
Gy	Gray
IgG	Immunglobulin G
LAK	lymphokine activated killer-cell
LGL	large granular lymphocyte
m-Ab	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
µl	Mikroliter
NK	natural killer (Lymphozyten-Subtyp)
PALA	N-(phosphonacetyl)-L-aspartate acid
PE	phycoerythrin (ein Fluoreszenzfarbstoff)
RES	Retikulo-endotheliales System
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
T/l	$10^{12}$ pro Liter
UICC	Union International contre le Cancer

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Christian Lersch danke ich für die Überlassung des Themas, die geduldige Betreuung und für das große Interesse, welches er dieser Arbeit entgegenbrachte.