

Einfluss von Mistelextrakt auf die Strahlenwirkung beim Mammakarzinom

Isabell Sasse

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Kathrin Schumann, Ph.D.

Prüfende der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Mathias Gehrmann
2. Priv.-Doz. Dr. Holger Bronger

Die Dissertation wurde am 27.11.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die School of Medicine and Health am 11.04.2024 angenommen.

Einfluss von Mistelextrakt auf die Strahlenwirkung beim Mammakarzinom

I Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| I | INHALTSVERZEICHNIS | 2 |
| II | ABKÜRZUNGS-, ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS | 4 |
| A | Abkürzungsverzeichnis: | 4 |
| B | Abbildungsverzeichnis: | 4 |
| C | Tabellenverzeichnis: | 5 |
| 1 | EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 | Mammakarzinom | 7 |
| 1.1.1 | Epidemiologie | 7 |
| 1.1.2 | Ätiologie | 8 |
| 1.1.3 | Klinik | 9 |
| 1.1.4 | Verlaufs- und Sonderformen | 9 |
| 1.1.5 | Stadien | 9 |
| 1.1.6 | Diagnostik | 10 |
| 1.1.9 | Therapie | 11 |
| 1.1.10 | Prognose | 14 |
| 1.1.11 | Prävention | 15 |
| 1.2 | Mistelextrakt | 15 |
| 1.2.1 | Hintergrund | 15 |
| 1.2.2 | Therapiekonzept | 16 |
| 1.2.3 | Inhaltsstoffe und Wirkung | 17 |
| 1.2.4 | Aktueller Stand der Forschung | 18 |
| 1.3 | Strahlenbiologie | 19 |
| 1.3.1 | Einfluss ionisierender Strahlung auf Zellen | 19 |
| 1.3.2 | Reparaturmechanismen | 20 |
| 1.3.3 | Strahlenschäden und Zelltod | 20 |
| 1.3.3 | Schlüsselrolle Zellzyklus | 21 |
| 1.3.4 | Strahlentherapie und Zellzyklus | 22 |
| 2 | FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG | 24 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 25 |

| | | |
|------------|---|---|
| 3.1 | Materialien..... | 25 |
| 3.1.1 | Zelllinien..... | 25 |
| 3.1.2 | Allgemeine Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 3.1.3 | Puffer und Lösungen..... | 25 |
| 3.1.4 | Chemikalien und Reagenzien..... | 26 |
| 3.1.5 | Geräte | 26 |
| 3.1.6 | Software | 27 |
| 3.2 | Methoden | 27 |
| 3.2.1 | Verwendete Zelllinien..... | 27 |
| 3.2.3 | Zellkultur | 27 |
| 3.2.4 | Bestimmung der Zellzahl | 28 |
| 3.2.4 | Bestimmung der Iscador®M-Konzentration | 28 |
| 3.2.5 | Proliferations-Assay mit WST-1 | 29 |
| 3.2.6 | Colony Forming Assay (CFA) | 30 |
| 3.2.7 | Zellzyklusanalyse und DNA-Reparatur-Induktion | 32 |
| 3.2.8 | Apoptose-Assay mit Annexin | 34 |
| 3.2.9 | Statistische Auswertung und Signifikanz | 37 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 38 |
| 4.1 | Proliferationsanalysen unter Iscador®M und Bestrahlung..... | 38 |
| 4.2 | Bestimmung einer geeigneten Iscador®M-Konzentration | 44 |
| 4.3 | Beeinflussung des Zellüberlebens durch Iscador®M..... | 45 |
| 4.4 | Einfluss von Iscador®M auf Zellzyklus und DNA-Reparaturinduktion..... | 47 |
| 4.5 | Apoptoseverhalten unter Iscador®M und Bestrahlung..... | 52 |
| 5 | DISKUSSION | 54 |
| 5.1 | Bedeutung und Wirkung verschiedener Iscador®M-Konzentrationen – präklinische Forschung vs. reale Therapiebedingungen | 54 |
| 5.2 | Beeinflusst Iscador®M das Zellüberleben unter Bestrahlung? | 56 |
| 5.3 | Wie wird die Strahlenwirkung durch Mistelextrakt beeinflusst? | 58 |
| 5.4 | Bedeutung der Ergebnisse | 62 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 64 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 65 |
| 8 | EIGENE VERÖFFENTLICHUNG | 73 |
| 9 | LEBENS LAUF | FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT. |

| | | |
|----|------------------|----|
| 10 | DANKSAGUNG | 74 |
|----|------------------|----|

II Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

A Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|------------------|--|
| AJCC | American Joint Committee of Cancer |
| CFA | Colony Forming Assay |
| CT | Computertomographie |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| et al. | et alii (und andere) |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| G-CSF | Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor |
| KG | Körpergewicht |
| LD ₅₀ | Letale Dosis 50% |
| LET | Linearer Energietransfer |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PE | Plating Efficiency, Plattierungseffizienz |
| PI | Propidium Iodid |
| PLD | Potentially lethal damage, letaler Strahlenschaden |
| RT | Raumtemperatur |
| SF | Survival Fraction, Anteil überlebender Zellen |
| SLD | Sublethal damage, subletaler Strahlenschaden |
| SLDR | Sublethal damage recovery |
| UICC | Union Internationale Contre le Cancer |
| VAE | Viscum album Extrakt, Iscador®M |

B Abbildungsverzeichnis:

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Häufigkeit Tumorlokalisationen | 7 |
| Abbildung 2: Weißbeerige Mistel | 15 |
| Abbildung 3: Übersicht Zellzyklus | 21 |
| Abbildung 4: Fraktionierte vs. einmalige Bestrahlung | 23 |
| Abbildung 5: 12-well-Platte CFA SK-BR-3-Zellen..... | 30 |
| Abbildung 6: Beispiel graphische Darstellung Durchflusszytometrie Zellzyklus SK-BR-3-Zellen..... | 34 |
| Abbildung 7: Beispiel graphische Darstellung Durchflusszytometrie γ -H2AX SK-BR-3-Zellen | 34 |
| Abbildung 8: Zelldiskriminierung mittels Marker beim Apoptose-Assay mit Annexin | 35 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 9: Beispiel graphische Darstellung Durchflusszytometrie Annexin-Assay SK-BR-3-Zellen... | 36 |
| Abbildung 10: Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 5 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador [®] M-Konzentrationen..... | 38 |
| Abbildung 11: Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 7 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador [®] M-Konzentrationen..... | 40 |
| Abbildung 12: Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 5 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador [®] M-Konzentrationen..... | 41 |
| Abbildung 13: Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 7 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador [®] M-Konzentrationen..... | 42 |
| Abbildung 14: Zellüberleben nach Behandlung mit verschiedenen Iscador [®] M-Konzentrationen für die Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 | 44 |
| Abbildung 15: Vergleich Zellüberleben MCF-7-Zellen nach Bestrahlung + 10 µg/ml VAE im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung | 45 |
| Abbildung 16: Vergleich Zellüberleben SK-BR-3-Zellen nach Bestrahlung + VAE im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung | 46 |
| Abbildung 17: Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse MCF-7-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador [®] M..... | 47 |
| Abbildung 18: Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse SK-BR-3-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador [®] M..... | 48 |
| Abbildung 19: Messung Expression von γ -H2AX bei MCF-7-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador [®] M mittels Durchflusszytometrie..... | 49 |
| Abbildung 20: Messung Expression von γ -H2AX bei SK-BR-3-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador [®] M mittels Durchflusszytometrie..... | 51 |
| Abbildung 21: Darstellung der früh-apoptischen Zellen in der Durchflusszytometrie der MCF-7-Zellen | 52 |
| Abbildung 22: Darstellung der früh-apoptischen Zellen in der Durchflusszytometrie der SK-BR-3-Zellen | 53 |

C Tabellenverzeichnis:

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Epidemiologie Mammakarzinom | 8 |
| Tabelle 2: Übersicht Staging Mammakarzinom | 11 |
| Tabelle 3: Zelllinien | 25 |
| Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien..... | 25 |
| Tabelle 5: Puffer und Lösungen | 25 |
| Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien | 26 |
| Tabelle 7: Geräte | 26 |
| Tabelle 8: Software | 27 |
| Tabelle 9: Übersicht Materialien und Zellzahlen für die Zellkultur..... | 28 |
| Tabelle 10: Pippetierschema WST-1-Assay..... | 29 |
| Tabelle 11: Zellzahlen/Wachstumszeiten CFA..... | 31 |
| Tabelle 12: Reagenzien Zellzyklus-Analyse | 33 |
| Tabelle 13: Reagenzien Annexin-V-Assay | 36 |
| Tabelle 14: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador [®] M-Konzentrationen | 39 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 15: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen | 39 |
| Tabelle 16: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen | 40 |
| Tabelle 17: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen | 40 |
| Tabelle 18: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen | 41 |
| Tabelle 19: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen | 42 |
| Tabelle 20: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen | 43 |
| Tabelle 21: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen | 43 |
| Tabelle 22: Mittelwerte Survival Fraction MCF-7/SK-BR-3 nach Zugabe verschiedener Iscador®M-Konzentrationen | 44 |
| Tabelle 23: Ergebnisse SF nach Bestrahlung allein und Bestrahlung + VAE bei MCF-7-Zellen mit Signifikanzniveau | 45 |
| Tabelle 24: Ergebnisse SF nach Bestrahlung allein und Bestrahlung + VAE bei SK-BR-3-Zellen mit Signifikanzniveau | 46 |
| Tabelle 25: Übersicht Werte Zellzyklusanalyse MCF-7-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen | 48 |
| Tabelle 26: Übersicht Werte Zellzyklusanalyse SK-BR-3-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen | 49 |
| Tabelle 27: Übersicht Werte γ -H2AX-Expression der MCF-7-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador®M-Zugabe. | 50 |
| Tabelle 28: Übersicht Werte γ -H2AX-Expression der SK-BR-3-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador®M-Zugabe. | 51 |
| Tabelle 29: Übersicht über die Werte der Annexin positiven MCF-7-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador®M-Zugabe | 52 |
| Tabelle 30: Übersicht über die Werte der Annexin positiven SK-BR-3-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador®M-Zugabe | 53 |

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

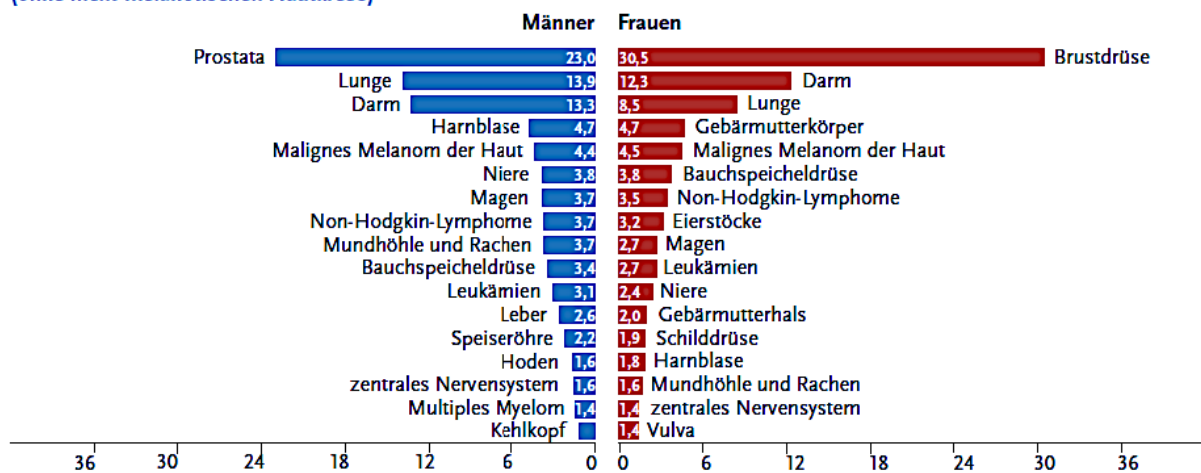
1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist vor Kolon- und Bronchialkarzinom die häufigste Krebserkrankung bei Frauen (vgl. Abbildung 1). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Inzidenz-, Prävalenz- und Mortalitätsraten aus dem Jahr 2014. Die Rate an Neuerkrankungen liegt bei ca. 69000 Frauen pro Jahr. Dies entspricht einem Anteil von 30,5% gemessen an allen Tumorlokalisationen insgesamt. Nur 1% aller erkrankten Personen sind Männer. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜ) für Frauen ist mit 88% sehr hoch und sinkt auch nach 10 Jahren nur um 6% auf insgesamt 82% ab. Männer haben mit 73% (5-JÜ) und 69% (10-JÜ) ein deutlich schlechteres Outcome. Etwa 1 von 8 Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom, dabei sind 3 von 10 Frauen unter 55 Jahre alt. (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. Berlin 2017)

Abbildung 1: Häufigkeit Tumorlokalisationen

Abbildung 3.0.1

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)



Quelle: Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017

Brustkrebs (Mammakarzinom)

ICD-10 C50

| | 2014 | |
|--|--------|---------|
| | Männer | Frauen |
| Neuerkrankungen | 650 | 69.220 |
| standardisierte Erkrankungsrate ¹ | 1,1 | 114,6 |
| Sterbefälle | 134 | 17.670 |
| standardisierte Sterberate ¹ | 0,2 | 23,0 |
| 5-Jahres-Prävalenz | 2.400 | 311.400 |
| 10-Jahres-Prävalenz | 3.800 | 559.900 |
| relative 5-Jahres-Überlebensrate | 73 % | 88 % |
| relative 10-Jahres-Überlebensrate | 69 % | 82 % |

1) je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach altem Europastandard

Tabelle 1: Epidemiologie Mammakarzinom

Quelle: Brustkrebs, Zentrum für Krebsregisterarten RKI v. 06.12.2017

(https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html am 19.03.2019)

1.1.2 Ätiologie

Risikofaktoren für das Auftreten eines Mammakarzinoms können in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet hormonelle Faktoren wie ein langer hormonell aktiver Zeitraum (frühe Menarche/späte Menopause), keine/wenige Schwangerschaften, späte erste Geburt oder keine/geringe Stillzeit. Auch erhöhte Hormonspiegel aufgrund von Adipositas, postmenopausale Hormonersatztherapie oder die langfristige Einnahme oraler Kontrazeptiva spielen eine Rolle. (Sun, Zhao et al. 2017, Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. Berlin 2017)

In der zweiten Gruppe finden sich die hereditären Risikofaktoren. Dabei sind in der Genetik vor allem die Mutationen der Hochrisikogene BRCA1 und BRCA2 von Bedeutung (Zhong, Peng et al. 2015). Aber auch Mutationen unspezifischer Gene wie p53 oder RB1 kommen in 20-30% der Fälle vor (Sun, Zhao et al. 2017). Ein gehäuftes Auftreten von Mammakarzinomen in der Familienanamnese erhöht ebenfalls das Risiko zu erkranken. Weitere Risikofaktoren sind weibliches Geschlecht, höheres Alter, dichtes Brustdrüsengewebe, bestimmte gutartige Gewebeveränderungen (z. B. lobuläre Neoplasie), Mammakarzinom in der Eigenanamnese oder Toxizitäten (z. B. Strahlenexposition, Alkohol-/Nikotinkonsum). Zusätzlich beeinflussen Lifestyle-Faktoren wie geringe körperliche Aktivität und Schlafmangel (v. a. bei Schichtarbeit) das Erkrankungsrisiko. (Janni and Hancke 2017, Sun, Zhao et al. 2017)

1.1.3 Klinik

In der Regel verläuft das Mammakarzinom in frühen Stadien symptomlos. Im späteren Verlauf können sich klinische Zeichen mit druckunempfindlichen Verhärtungen, nicht verschieblichen Knoten, Hauteinziehungen, Orangenhaut, bleibende Rötungen, Veränderungen der Mamille (Retraktion, Entzündung oder Sekretion) oder Größenveränderungen der Mamma manifestieren. Ein tastbarer schmerzloser Knoten ist dabei das Hauptsymptom (76% aller symptomatischen Frauen) (Koo, von Wagner et al. 2017) und dabei das am häufigsten mit Malignität assoziierte Symptom (Walker, Hyde et al. 2014). In sehr fortgeschrittenen Stadien kann es zu Exulzerationen oder auch Einwachsen in die Thoraxwand kommen („Cancer en cuirasse“).

Das Mammakarzinom metastasiert früh lymphogen und hämatogen. Bei der lymphogenen Streuung sind vor allem die regionalen axillären Lymphknoten derselben Seite (Level I-III) betroffen. Hämatogen erfolgt die Metastasierung vor allem in Knochen, Lunge/Pleura, Gehirn und Leber. (Janni and Hancke 2017) Neben einer B-Symptomatik kann es, je nach Metastasierung, auch zu weiteren Symptomen kommen.

1.1.4 Verlaufs- und Sonderformen

Im Allgemeinen wird zunächst zwischen duktalem (die Milchgänge betreffend) und lobulärem (von den Drüsenlappen ausgehend) Ausgangsepithel unterschieden. Es sind zwei Vorläufer- bzw. Risikoläsionen bekannt, die mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen. Das duktales Carcinoma in situ (DCIS) ist mit einem Anteil von 95% die mit Abstand größte Gruppe bei den nicht-invasiven Karzinomen. (Janni and Hancke 2017). Die lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN, früher lobuläres Carcinoma in situ oder LCIS) tritt im Gegensatz zu DCIS in 60% der Fälle multizentrisch auf (Weyerstahl and Stauber 2013).

Das invasive Mammakarzinom selbst lässt sich histopathologisch weiter in Subtypen differenzieren. Mit 65-80% ist das invasiv duktales Karzinom das häufigste, gefolgt vom invasiv lobulärem Karzinom (6-15%). Weitere Subtypen wie medullär, tubulär, muzinös oder papillär sind selten. (Sloane, Amendoeira et al. 1997)

Zu den klassischen Sonderformen zählen der Morbus Paget und das inflammatorische Karzinom. (Janni and Hancke 2017)

1.1.5 Stadien

Die Einteilung der Stadien kann nach zwei Klassifikationssystemen vorgenommen werden. Die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) definiert ihre Stadieneinteilung über Größe und Infiltration

des Primärtumors sowie Metastasierungswege. Das T-Stadium (T = Tumor) gibt dabei die Größe des Tumors anhand der größten Tumorausdehnung wieder. Im N-Stadium (N = Nodal) wird der Lymphknotenstatus erfasst. Dabei spielen Lokalisation und Anzahl der befallenen Lymphknoten eine Rolle. Im M-Stadium (M = Metastasen) werden Fernmetastasen berücksichtigt. In der Klassifikation des American Joint Committee of Cancer (AJCC) werden neben dem klassischen TNM-Stadium auch das Grading und die molekularen Subtypen (s. u.) mit einbezogen (Giuliano, Edge et al. 2018). Dies führt zu einer präziseren Prognose für das Outcome der Patienten (Weiss, Chavez-MacGregor et al. 2018, Jang, Choi et al. 2019).

Das Grading nach Elston und Ellis gibt Auskunft über die Differenzierung des Tumors. Dabei bedeuteten G1 gut differenziert, G2 mäßig differenziert und G3 schlecht differenziert. Je schlechter ein Tumor differenziert ist, desto höher ist der Malignitätsgrad. (Janni and Hancke 2017)

Zusätzlich werden am Tumorgewebe der Hormonrezeptorstatus für Östrogen- und Progesteronrezeptoren, der Proliferationsindex Ki67 und der HER-2-Status bestimmt. Ki67 ist ein Protein, das in proliferierendem Gewebe exprimiert wird. Es korreliert mit dem Grading und ein hohes Ki67 wird als prognostisch ungünstig angesehen (Jurikova, Danihel et al. 2016).

1.1.6 Diagnostik

Nach Empfehlungen der aktuellen S3-Leitlinie Mammakarzinom Version 4.0D (im Folgenden S3-Leitlinie) besteht die Basisdiagnostik aus Anamnese, klinischer Brustuntersuchung, Mammographie und Mammasonographie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017).

In der bildgebenden Diagnostik gehören die Mammographie und Mammasonographie zum Goldstandard (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017). Dabei zeigt die Kombination aus Sonographie und Mammographie gegenüber den Einzeluntersuchungen eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität (Lorenzen, Wedel et al. 2005) (Moss, Britton et al. 1999, Tiwari, Ghosh et al. 2018). Bei Verdacht oder zum Ausschluss eines malignen Prozesses folgt nach der Bildgebung in der Regel eine Gewebebiopsie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) konnte sich als bildgebendes Verfahren in der Routine-Diagnostik bisher nicht durchsetzen und wird nur bei speziellen Fragestellungen angewandt (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017). Ein flächendeckender Vorteil zum generellen präoperativen Staging oder Screening konnte in bisherigen Studien nicht gezeigt werden (Uematsu, Yuen et al. 2007, Kim, Lee et al. 2014, Bennani-Baiti and Baltzer 2017).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über das ergänzende Staging. Die S3-Leitlinie empfiehlt beim Mammakarzinom ein Staging ohne Symptomatik erst ab dem UICC Stadium II mit erhöhtem Risiko sowie in den Stadien III und IV. Bei klinischem Verdacht auf eine Metastasierung erfolgt eine Bildgebung unabhängig vom Stadium. Dabei kommt in Abhängigkeit zur Verdachtsdiagnose bildgebenden Diagnostik mittels Computertomographie (CT), Sonographie, Szintigraphie und/oder MRT zum Einsatz.

| Verdacht | Untersuchung (1. Wahl) | Anmerkungen / Untersuchungen zur Bestätigung oder bei unklarem Befund |
|-------------------|-------------------------|---|
| Skelettmetastasen | Skelettszintigraphie | MRT, CT ggf. CT-gesteuerte Biopsie bei V. a. solitäre Metastase |
| Lebermetastasen | Sonographie, CT Abdomen | die beiden Untersuchungen ergänzen sich |
| Lungenmetastasen | CT Thorax | höhere Sensitivität als Röntgen Thorax |
| ZNS-Metastasen | MRT | nur bei klinischem Verdacht CT bei Kontraindikationen gegen MRT und ggf. bei akutem Blutungsverdacht |

Tabelle 2: Übersicht Staging Mammakarzinom

Quelle: (Wunderle, Schneider et al. 2019)

1.1.9 Therapie

Die Behandlungsmöglichkeiten beim Mammakarzinom bestehen im Wesentlichen aus operativer Resektion, Chemotherapie, Bestrahlung und ggf. endokrin basierter Therapie. Auch zielgerichteten Therapien mittels tumorspezifischer Antikörper spielen inzwischen eine große Rolle. Je nach Tumorstadium und -biologie werden unterschiedliche Therapiekonzepte eingesetzt. Prinzipiell ist dabei zwischen kurativen und palliativen Therapiekonzepten zu unterscheiden.

1.1.9.1 Operative Therapie

Die operative Therapie steht bei der Behandlung des Mammakarzinoms im Vordergrund. Ziel ist dabei immer die vollständige Entfernung des Malignoms im Gesunden. Prinzipiell wird zwischen brusterhaltender Operation und Mastektomie unterschieden. Obligate Voraussetzung für eine brusterhaltende Operation ist die anschließende Nachbestrahlung der Mamma. Ist dies nicht möglich oder liegen weitere Kontraindikationen vor (z. B. ungünstiges Verhältnis Tumorgröße/Brustvolumen, nachgewiesene Multizentrität, Tumorbefall der Mamille oder ein inflammatorisches Karzinom) besteht die Indikation zur Mastektomie. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017, Janni and Hancke 2017) Die brusterhaltende Therapie mit Radiatio ist der Mastektomie in Bezug auf das Gesamtüberleben gleichwertig (Fisher, Anderson et al. 2002, Veronesi, Cascinelli et al. 2002). Im Rahmen einer Sentinel-Node-Biopsie wird überprüft, ob eine ergänzende Axilladisektion notwendig ist (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017). Der axilläre Lymphknotenstatus gilt als wichtigster Prognosefaktor für die Dauer der Rezidivfreiheit sowie das

Gesamtüberleben (Woodward, Vinh-Hung et al. 2006, Dings, Elferink et al. 2013) und ist therapieentscheidend für die Wahl der systemischen Therapie und Bestrahlungsform.

1.1.9.2. Bestrahlung

Bei brusterhaltender Therapie ist nach S3-Leitlinie eine anschließende Radiatio obligat. Nach Mastektomie sollte eine Bestrahlung nur in Situationen mit erhöhtem Rezidivrisiko erfolgen (z. B. T3-4, R1-/R2- Resektion ohne Möglichkeit zur Nachresektion oder > 3 tumorbefallenen axilläre Lymphknoten). Die Bestrahlung kann konventionell mit 50 Gy Gesamtdosis verteilt auf 25-28 x 1,8-2 Gy oder als hypofraktioniertes Konzept mit 40 Gy Gesamtdosis mit 15-16x 2,6 Gy erfolgen. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017). Vorteile der Hypofraktionierung sind eine verkürzte Behandlungszeit (3-4 Wochen statt 5-6 Wochen), reduzierte Hautreaktionen und leicht verminderte Spätfolgen (Haviland, Owen et al. 2013, Zhou, Mei et al. 2015). Whelan et. al zeigten in ihrer Studie 2010, dass beide Konzepte in Bezug auf Lokalrezidivrate und kosmetisches Ergebnis nach 10 Jahren gleichwertig sind (Whelan, Pignol et al. 2010). Eine adjuvante Radiatio verringert nicht nur das Lokalrezidivrisiko, sondern senkt zusätzlich die brustkrebsbezogene Mortalität (Clarke, Collins et al. 2005, Darby, McGale et al. 2011). Um die lokale Rezidivrate im Tumorbett weiter zu reduzieren, kann zusätzlich ein Boost (höhere Strahlendosis in wenigen Einzeldosen) in dieser Region appliziert werden. Die S3-Leitlinie empfiehlt einen Boost bei Patientinnen < 50 Jahre und ab 51 Jahren bei erhöhtem Rezidivrisiko (G3, HER2 pos. oder triple negativ) (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017).

Die Bestrahlung der axillären Lymphabflusswege bietet bei Patienten mit T1-/T2-Status gleiche Raten in Bezug auf das 5-Jahres-Rezidivrisiko wie die Axilladisektion und ist in Bezug auf die Entwicklung eines Lymphödems prognostisch günstiger (Donker, van Tienhoven et al. 2014).

1.1.9.3 Chemotherapie

Die Empfehlungen zur Indikation und Durchführung einer Chemotherapie werden im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz getroffen und beziehen neben dem UICC-Stadium auch individuelle Patientenfaktoren (z. B. Konstitution, Begleiterkrankungen) mit ein. Aus diesem Grund soll hier nur ein grober Überblick vermittelt werden. Ob eine Chemotherapie empfohlen werden kann, hängt von verschiedenen Kriterien ab. Dabei spielen T-Stadium, Lymphknotenstatus, Tumorbiologie (Hormonrezeptoren, HER2-Status, Ki67), Grading, Menopausenstatus, Alter und Konstitution der Patienten eine wesentliche Rolle.

Eine Chemotherapie kann adjuvant (postoperativ) oder neoadjuvant (präoperativ) eingesetzt werden. Eine neoadjuvante Chemotherapie erhöht bei größeren Tumoren die Möglichkeit für eine

brusterhaltende Therapie. Zusätzlich kann am OP-Präparat das Ansprechen auf applizierte Chemotherapeutika untersucht werden. In Bezug auf die Mortalität sind adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie als gleichwertig zu betrachten (Asselain, Barlow et al. 2018).

Zu den verwendeten Substanzklassen der klassischen Chemotherapeutika zählen Anthrazykline (z. B. Doxorubicin, Epirubicin), Cyclophosphamid, Taxane (z. B. Paclitaxel, Docetaxel) und Platinderivate (z. B. Carboplatin) (Weyerstahl and Stauber 2013). Ergänzend kommen verschiedene Antikörpertherapien zum Einsatz. Bei positivem HER2-Status stehen die Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab als zielgerichtete Therapie zur Verfügung. Beim metastasierten Mammakarzinom bietet der Angiogenesehemmer Bevacizumab eine Therapieoption. Im Rahmen von Studien können den Patienten alternative Behandlungskonzepte angeboten werden.

1.1.9.4 Endokrine Therapie

Voraussetzung für eine endokrine Therapie ist die Hormonsensibilität der Tumore (ER/PR-Expression $\geq 10\%$). Ziel ist es, das Tumorwachstum durch Östrogenentzug zu reduzieren. Zu den eingesetzten Substanzklassen gehören Aromataseinhibitoren, GnRH-Analoga und Antiöstrogene. Die Empfehlungen der S3-Leitlinie sehen vor, dass alle Frauen mit hormonsensitivem Tumor eine endokrin basierte Therapie erhalten sollten. Bei günstiger Tumorbiologie (ER/PR stark positiv, HER2 negativ, Ki67 5-10%) kann postoperativ eine alleinige endokrine Therapie erfolgen und auf eine Chemotherapie verzichtet werden. Ansonsten wird eine Hormontherapie im Anschluss an eine Chemotherapie begonnen. Mittels endokriner Therapie werden sowohl Rezidivrisiko als auch die Mortalität signifikant reduziert ((EBCTCG) 2005).

1.1.9.5 Supportivtherapie und Komplementärmedizin

Die S3-Leitlinie Mammakarzinom definiert die Supportivtherapie wie folgt: „Unter Supportivtherapie werden unterstützende Maßnahmen verstanden, die die Sicherheit und Verträglichkeit zytostatischer Therapien und anderer medikamentöser Maßnahmen, operativer Eingriffe oder einer Radiotherapie zur Behandlung der malignen Grunderkrankung optimieren. Supportive Maßnahmen gehören unverzichtbar zum onkologischen Behandlungskonzept, zur Prävention und Behandlung von Komplikationen und Nebenwirkungen der Krebstherapie. Ein wesentliches Ziel der Supportivtherapie ist, die Lebensqualität der Patientinnen zu erhalten oder zu verbessern als auch moderne Therapiestrategien möglichst ohne Abbruch, Dosisreduktion oder Intervallverlängerung durchführen zu können.“ (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017 S. 249) Zu den häufigsten Nebenwirkungen in der medikamentösen Therapie des Mammakarzinoms zählen Anämie/Neutropenie, Alopezie, Osteoporose, Übelkeit/Erbrechen, Mukositis sowie Haut- und Neurotoxizität. Empfehlungen zur entsprechenden Behandlung enthalten die S3-Leitlinien für die

Therapie des Mammakarzinoms und supportive Therapie bei onkologischen Patientinnen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017). In der Langzeitbetreuung spielen vor allem Kardiotoxizität, Klimakterium, Fertilität, Thrombembolien und Fatigue eine Rolle.

Eine offizielle Definition der Komplementärmedizin existiert bisher nicht. Zu ihr werden Therapiekonzepte gezählt für deren Wirksamkeit es keine eindeutige wissenschaftliche Evidenz gibt. Ihr Einsatz findet ergänzend zur Standardtherapie statt. Werden solche Therapien als Ersatz für etablierte Behandlungsstrategien eingesetzt, spricht man von Alternativmedizin. Die S3-Leitlinie Mammakarzinom nimmt Stellung zum Einsatz komplementärmedizinischer Verfahren. Beispiele sind, neben der Misteltherapie auch Homöopathie, Akupunktur/Akupressur, Entspannungsverfahren oder die Traditionelle Chinesische Medizin (TCM). Der Einsatz alternativmedizinischer Verfahren wird dabei abgelehnt. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017)

Drozdoﬀ et al. zeigten 2018 in ihrer retrospektiven Studie die zunehmende Bedeutung der Komplementärmedizin. Von 717 eingeschlossenen Patienten mit Mamma- und/oder anderen gynäkologischen Tumoren nahmen 74,1% komplementärmedizinische Verfahren in Anspruch. Für Mammakarzinom-Patientinnen allein ergab sich ein Anteil von 73,13%. 25,3% der Patientinnen nutzten dabei die Misteltherapie. (Drozdoﬀ, Klein et al. 2018)

Eine eigene S3-Leitlinie zur Komplementärmedizin durch die AWMF ist aktuell in Arbeit und eine Fertigstellung für Ende 2020 geplant (Hübner 2019).

1.1.10 Prognose

Zwei Faktoren nehmen besonderen Einfluss auf die Prognose des Mammakarzinoms. Zum einen hat der Einbezug der Tumorbilogie in das Staging nach der 8. Edition des AJCC die Vorhersage der Prognose deutlich präzisiert (Jung, Park et al. 2015, Wang, Chen et al. 2018, Weiss, Chavez-MacGregor et al. 2018, Yu, Quan et al. 2018, Jang, Choi et al. 2019). Zum anderen hat die Entwicklung neuer Medikamente (insbesondere die Immuntherapien) zu einer Verbesserung der Prognose geführt.

In einer von Perez et al. veröffentlichten Studie 2014 wurde das 10-Jahres-Gesamtüberleben durch den Einsatz von Trastuzumab bei HER2-positiven Tumoren um fast 10% gesteigert (75,2% vs. 84%). Das Progressionsfreie Überleben nach 10 Jahren stieg von 62,2% auf 73,7%. (Perez, Romond et al. 2014)

Dank gezielter Immuntherapie in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika stehen heute Behandlungskonzepte zur Verfügung, die die Prognose stark verbessert haben (Wuerstlein and Harbeck 2017).

1.1.11 Prävention

Bisher gilt die Mammographie als einzige Screening-Methode mit einer gesicherten Reduktion der Mortalität um ca. 20% für alle Altersgruppen (Broeders, Moss et al. 2012, Myers, Moorman et al. 2015, Nelson, Fu et al. 2016). Sie wird vom 50. bis einschließlich 69. Lebensjahr allen Frauen jährlich im Rahmen der Krebsfrüherkennung empfohlen.

1.2 Mistelextrakt

1.2.1 Hintergrund

Die Misteltherapie ist ein Bestandteil der anthroposophischen Medizin und wurde 1920 durch Rudolf Steiner (1861-1925) begründet. Dabei wird ein Extrakt aus der weißbeerigen Mistel gewonnen (Abbildung 2).

Abbildung 2: Weißbeerige Mistel



Quelle: (Mayerhofer) <https://www.pflanzen-vielfalt.net/wildpflanzen-a-z/%C3%BCbersicht-i-p/mistel-wei%C3%9Fbeerige/>
v. 02.02.2020

Die anthroposophische Medizin bezeichnet sich als Erweiterung – und nicht als Gegensatz - der konventionellen Schulmedizin. Es wird der Körper als Ganzes betrachtet und Krankheitsprozesse als Störung einer natürlichen Selbstregulation verstanden. Demnach ist es Ziel der anthroposophischen Medizin wieder eine Funktionsfähigkeit dieser Autoregulation herzustellen. Rudolf Steiner zog damals Parallelen zwischen der Lebensart der Mistel als Baumparasit und dem konsumierenden Wachstum eines Tumors im menschlichen Körper. Er beschrieb die Mistel als opportunistisches

Gewächs, das sich völlig gegensätzlich zu anderen Pflanzen verhalte (Blüte/Fruchtbildung im Winter statt im Frühjahr/Sommer) und genau daraus ihre Energie gewinne. Die Natur sei in diesem Fall geradezu „*irrsinnig*“ geworden. Und genau dieser Irrsinn führe zur Eigenschaft der Mistel, den Körper bei einer außer Kontrolle geratenen Reaktion (z. B. Geschwulstbildung) wieder zu regulieren. (Steiner 1985)

1.2.2 Therapiekonzept

Zu den Anwendungsbereichen einer Misteltherapie zählen vor allem diverse Tumorerkrankungen (benigne/maligne), sowohl in kurativer als auch palliativer Intention. Auch kann sie in der Rezidivprophylaxe eingesetzt werden. Die Durchführung einer Misteltherapie ist stark abhängig von den Erfahrungen des Arztes und kann sich individuell in Bezug auf Therapiebeginn, Baumart, Durchführung und Dauer unterscheiden. Die bekanntesten Hersteller Helixor und Weleda geben zu ihren Produkten eigene Empfehlungen zur Anwendung (Helixor , IscadorAG 2017).

Das Prinzip sieht dabei zunächst die Auswahl eines geeigneten Wirtsbaumes entsprechend der zugrundeliegenden Tumorerkrankung vor. Häufige Wirtsbäume sind Eiche, Apfel, Tanne oder Kiefer. Hierfür spielt neben den Empfehlungen der Hersteller vor allem die Erfahrung des Arztes eine Rolle (Girke 2012, Fintelmann 2016). In der Regel erfolgen dann subkutane Injektionen 2-3 Mal pro Woche in aufsteigender Dosierung. Hierfür gibt es von den Herstellern bereits vorgepackte Serien mit Dosierungen von 0,0001 mg bis 25 mg pro Ampulle. Dabei wird die geeignete Dosierung an verschiedenen Parametern überprüft (z. B. Hautreaktion, Körpertemperatur). An der Injektionsstelle entsteht in der Regel eine Lokalreaktion mit Rötung und Bildung einer Quaddel. Je höher die Dosierung, desto ausgeprägter fällt die Lokalreaktion aus, die im Durchmesser nicht größer als 3-5 cm sein sollte. Durch eine Art Desensibilisierung sind im Verlauf höhere Dosierungen möglich bzw. nötig. Zusätzlich kommt es zu einer zirkadianen Temperaturerhöhung, die 1°C nicht übersteigen sollte. Laborchemisch lässt sich häufig zu Beginn einer Therapie und bei Progredienz der Erkrankung eine Eosinophilie im Differentialblutbild nachweisen (Girke 2012). Zur Therapiedauer gibt es verschiedene Konzepte und es wird zwischen Einleitungs- und Erhaltungstherapie unterschieden. Die Einleitungstherapie erfolgt im akuten Stadium der Erkrankung, an die sich die Erhaltungstherapie zur Rezidivprophylaxe anschließt (Helixor , IscadorAG 2017). Die Empfehlungen zur Behandlungsdauer reichen von einem bis zu mehreren Jahren der kontinuierlichen Applikation, meist gefolgt von abwechselnden Phasen aus Therapie und Pausen (Girke 2012, Fintelmann 2016).

Neben der klassischen Subkutaninjektion kann Mistelextrakt auch anderweitig verabreicht werden (z. B. intravenös). So sind direkte intraläsionale Injektionen ebenso möglich wie ein Einsatz in

Kombination mit einer Radiofrequenzablation. Bei malignen Pleura- oder Perikardergüssen können Pleurodesen und Perikardesen mit Mistelpräparaten durchgeführt werden. (Girke 2012)

Bekannte Kontraindikationen sind Allergien auf Mistelpräparate, akute hoch entzündliche und fieberhafte (Autoimmun-)Erkrankungen oder eine Hyperthyreose. Sowohl Helixor als auch Weleda geben keine Einschränkungen bezüglich der Kombination aus ihren Mistelpräparaten und klassischer Chemotherapie, Strahlentherapie oder antihormoneller Therapie. Sie weisen lediglich auf eine eventuelle Dosisanpassung hin. Derzeit ist die Misteltherapie nur für Erwachsene zugelassen. Bei Kindern erfolgt ein off-label-Use. (Helixor , IscadorAG 2017)

1.2.3 Inhaltsstoffe und Wirkung

Für die Misteltherapie wird aus der weißbeerigen Mistel (*Viscum album*) ein Extrakt gewonnen, deren Inhaltsstoffen eine therapeutische Wirkung zugeschrieben wird. Dieses Extrakt enthält eine Mischung aus Lektinen, Viscotoxinen, Alkaloiden, Flavonoiden, Kohlenhydraten und anderen Inhaltsstoffen. Dabei ist die Zusammensetzung abhängig vom Wirtsbaum und variiert stark (Nazaruk and Orlikowski 2016) (Urech, Schaller et al. 2006). Zusätzlich verändert sich die Zusammensetzung in Abhängigkeit zum Erntezeitpunkt (z. B. Winter oder Sommer) (Urech, Schaller et al. 2006) (Bussing and Schietzel 1999). Je nach benötigter Zusammensetzung des Präparates werden auch verschiedene Erntechargen miteinander vermischt. Außerdem können die Extrakte mittels verschiedener Metalle (z. B. Silber-/Kupfercarbonat oder Quecksilbersulfat) in niedrigen Konzentrationen augmentiert werden.

Als therapeutische Wirkung werden vor allem Zytotoxizität, Apoptoseinduktion, Immunmodulation und antiangiogenetische Effekte diskutiert. Harmsma et al. konnten 2006 in ihrer Studie zeigen, dass es bei einigen Tumorzelllinien (u. a. Mammakarzinomzellen MCF-7) nach Behandlung mit Mistelextrakt zu einer Inhibition des Zellzyklus und Apoptose kommt (Harmsma, Ummelen et al. 2006, Hong, Park et al. 2014). Eine ähnliche Reaktion konnte auch bei Zelllinien von Multiplen Myelomen und Lymphomen nachgewiesen werden (Kovacs, Link et al. 2006). Über eine Inhibition der Angiogenese wurde von mehreren Forschungsgruppen berichtet (Park, Lyu et al. 2001, Elluru, Duong Van Huyen et al. 2009). In Bezug auf Apoptoseinduktion und Angiogeneseinhibition wurden vergleichbare Ergebnisse 2006 von Pryme et al. veröffentlicht (Pryme, Bardocz et al. 2006). Eine mögliche Rolle könnten dabei Viscotoxine spielen, die als Proteine im Mistelextrakt vorkommen und durch Inaktivierung der ribosomalen 60-S-Untereinheit die Proteinsynthese hemmen (Olsnes, Stirpe et al. 1982). Zusätzlich konnte eine Reduktion von Zellüberleben und Metastasierung in vitro beobachtet werden (Park, Lyu et al. 2001). Beuth et al. 2008 und Eisenbraun et al. 2011 untersuchten die Effekte der Gabe von Mistelextrakt unter Chemotherapie beim Mammakarzinom. Sie zeigten, dass Nebenwirkungen der

Chemotherapie signifikant reduziert (z. B. Übelkeit/Erbrechen, Schmerzen, Dyspnoe) und die Lebensqualität stabilisiert werden konnte (Beuth, Schneider et al. 2008, Eisenbraun, 2011 #10). Mehrere wissenschaftlichen Studien wiesen nach, dass sich die Wirkung von Mistelpräparaten nicht nur in Bezug auf Tumorzellen verschiedener Ursprungsgewebe (z. B. Mamma, Lunge, Darm, etc.) unterscheidet, sondern auch innerhalb derselben Tumorklasse (Knopfl-Sidler, Viviani et al. 2005, Kelter, Schierholz et al. 2007). Für Mistelextrakte ist nicht nur eine direkte Wirkung auf Tumorzellen, sondern auch eine Beeinflussung des Immunsystems beschrieben. So konnte u. a. im zellulären Kompartiment eine Aktivierung der über natürliche Killerzellen vermittelten Zytotoxizität nachgewiesen werden (Tabiasco, Pont et al. 2002, Braedel-Ruoff 2010). Über die vermehrte Ausschüttung von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) und Interleukinen werden auch Populationen anderer Granulozyten und Lymphozyten zur Proliferation angeregt (Huber, Rostock et al. 2005).

1.2.4 Aktueller Stand der Forschung

Oei et al. gaben in ihrem Review 2019 einen Überblick über den derzeitigen Forschungsstand. Sie kommen zu dem Schluss, dass es eine wachsende Evidenz für einen supportiven Effekt des Mistelextraktes in Bezug auf die Wirkung einer Chemotherapie gibt. Dabei werden Apoptoseverhalten, Zytotoxizität und antiinflammatorische sowie immunologische Effekte genannt. Zudem könne durch eine Reduktion Chemotherapie-assoziiertes Nebenwirkungen die Compliance der Patienten verbessert und vorzeitige Therapieabbrüche reduziert werden. (Oei, Thronicke et al. 2019)

In Studien konnten eine Erhöhung der Lymphozyten, insbesondere der Eosinophilen, CD4-Zellen (Huber, Ludtke et al. 2011) und bestimmter Zytokine (z. B. TNF- α oder Interferon- γ) nachgewiesen werden (Steinborn, Klemd et al. 2017).

Horneber et al. veröffentlichten 2008 in der Cochrane Library ein Review zum Thema Misteltherapie in der Onkologie. Gegenstand der Untersuchung waren nur randomisierte, kontrollierte Studien. Dafür wurden mehrere Datenbanken durchsucht (u. a. MEDLINE, EMBASE und weitere). Von 80 gefundenen Studien entsprachen nur 21 den Einschlusskriterien (richtiges Studiendesign, keine Tier- oder in-vitro-Studien). Abschließend sahen die Autoren unter einer Misteltherapie einen Benefit in Bezug auf Lebensqualität und Hinweise für eine mögliche Reduktion chemotherapieinduzierter Nebenwirkungen. Einen sicheren Nachweis für eine Verlängerung des Gesamtüberlebens gab es nicht. Häufige Kritikpunkte waren eine zu geringe Probandenzahl, mangelnde Reproduzierbarkeit, Mängel in der Methodik und eine schlechte Vergleichbarkeit aufgrund einer Vielzahl an verwendeten Mistelprodukten. (Horneber, Bueschel et al. 2008)

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Freuding et al. 2019 in ihrem zweiteiligen Review zum Thema Überleben und Sicherheit sowie Lebensqualität und Toxizität unter Misteltherapie. Sie kritisierten zusätzlich häufige Interessenkonflikte bzw. eine fehlende Stellungnahme zu diesen. Zudem hatten einige wissenschaftliche Arbeitsgruppen mehrere Studien veröffentlicht, sodass eine Unabhängigkeit angezweifelt wurde. (Freuding, Keinki et al. 2019, Freuding, Keinki et al. 2019)

In der aktuellen Leitlinie zum Mammakarzinom kann eine Misteltherapie als komplementärmedizinisches Verfahren derzeit nicht empfohlen werden. Dabei wurde sich unter anderem auf die Cochrane-Analyse von Horneber et al. von 2008 bezogen. Die entscheidenden Argumente waren, dass vorhandene Studien in ihrer Qualität nicht ausreichend seien und es keine sichere Evidenz für einen Vorteil im Überleben oder eine Verbesserung der Lebensqualität gäbe. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017)

1.3 Strahlenbiologie

1.3.1 Einfluss ionisierender Strahlung auf Zellen

Trifft ionisierende Strahlung auf Zellen muss zunächst zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung unterschieden werden. Als direkte Wirkung bezeichnet man Schäden, die durch direkte Ionisation oder Anregungen am Molekül verursacht werden. Im Gegensatz dazu steht die indirekte Strahlung. Hierbei entstehen zunächst freie Radikale, die dann weitere Strukturschäden (z. B. DNA-Schäden) hervorrufen. Da Zellen größtenteils aus Wasser bestehen, werden freie Radikale v. a. durch die Radiolyse des Wassers gebildet. Bei paralleler Anwesenheit von Sauerstoff bilden sich Peroxidradikale, die die Strahlenwirkung um das 2-3-fache steigern können. Die Ionisationsdichte wird mit dem linearen Energietransfer (LET) angegeben. Dieser beschreibt die Energieabgabe des ionisierten Teilchens pro zurückgelegte Wegstrecke im durchdrungenen Material. Je höher der LET, desto höher die direkte Strahlenwirkung. Bei einem niedrigeren LET überwiegt vor allem die indirekte Form. (Münter and Weber 2017, Krieger 2019)

Der strahlensensibelste Teil einer Zelle ist der Zellkern. Er enthält mit der DNA alle nötigen Informationen, die eine Zelle für ihren Stoffwechsel, Zellteilung und Differenzierung benötigt. Schäden, die am Erbgut verursacht werden, haben in der Regel die schwersten Auswirkungen. Zu ihnen zählen Einzel- oder Doppelstrangbrüche, DNA-Crosslinks oder einzelne Basenschäden. Diese können auch als sog. Bulky Lesion kombiniert auftreten und sind meist irreparabel. Dosis und Art der Strahlung haben dabei Einfluss auf die Art der Schäden. Ein hoher LET führt häufiger zu Doppelstrangbrüchen, die deutlich schwerer zu reparieren sind. Einzelstrangbrüche hingegen sind in

der Regel gut reparabel und treten vor allem bei einem niedrigen LET auf. Werden Proteine ionisierender Strahlung ausgesetzt, kommt es meist zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur. Dies kann die Enzymfunktion maßgeblich beeinflussen und bis zum kompletten Funktionsverlust führen. Eine Schädigung der Zellmembran äußert sich häufig durch Permeabilitätsstörungen. Zellorganellen (wie z. B. das endoplasmatische Retikulum oder Mitochondrien) hingegen werden erst bei höheren Strahlendosen geschädigt. (Münter and Weber 2017)

1.3.2 Reparaturmechanismen

Zellen sind in der Lage unterschiedliche DNA-Schäden zu reparieren und verfügen über verschiedene Enzyme, die diese Aufgabe übernehmen. Zunächst muss der Schaden erkannt werden. Sind einzelne Basen geschädigt, ist meist eine direkte Reparatur möglich. Alternativ wird bei der Basenexzisionsreparatur bzw. Nukleotidexzisionsreparatur die Base oder das gesamte Nukleotid ausgeschnitten. Da die DNA aus zwei zueinander komplementären Einzelsträngen besteht, dient der intakte Strang als Matrize für die zu ersetzenden Basen. Auch Doppelstrangbrüche können mittels zweier Reparatursysteme behoben werden. Beim Non-homologous-end-joining werden zwei DNA-Fragmente wieder miteinander verknüpft. Dieser Prozess ist sehr fehleranfällig, da es keinen Kontrollmechanismus gibt, ob beide Fragmente auch ursprünglich miteinander verbunden waren. Die Rekombinationsreparatur ist dagegen deutlich effektiver. Hier wird das homologe Chromosom einer diploiden Zelle als Matrize für die Reparatur des Doppelstrangbruches verwendet. (Heinrich 2014)

1.3.3 Strahlenschäden und Zelltod

Strahlenschäden können in potentiell letal, subletal und letal unterteilt werden. Potentiell letale Strahlenschäden (PLD) können von einer Zelle repariert werden. Entscheidend für den Erfolg ist dabei die Zusammensetzung des Zellmilieus und die Neigung zur Proliferation. Nicht proliferierende Zellen haben mehr Zeit zur Reparatur von Strahlenschäden und sind erfolgreicher als proliferierende. Subletale Strahlenschäden (SLD) sind ebenfalls noch reparabel. Die Erholung wird als „sublethal damage recovery“ (SLDR) bezeichnet. Der Erfolg hängt hierbei maßgeblich von der LET der Strahlung, dem Zeitintervall seit Bestrahlung und der Anzahl der SLDs ab. Mit steigender LET und Akkumulation mehrerer SLDs addieren sich die Wirkungen und es kommt zum Zelltod. Je länger eine Bestrahlung zurückliegt, desto höher ist die Chance auf Regeneration. Bei der letalen Zellschädigung kommt es zum Zelltod.

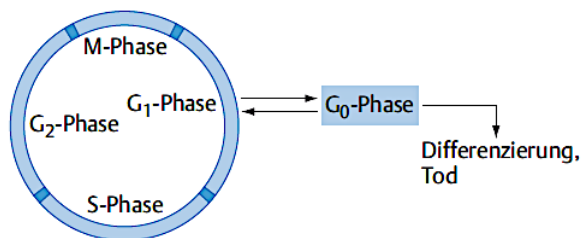
Schlägt eine Reparatur der Zelle fehl oder ist der Schaden durch die ionisierende Strahlung zu groß, können drei Formen des Zelltodes auftreten. Beim klonogenen Zelltod sind die Zellen nach der

Bestrahlung zunächst noch intakt. Sie verlieren allerdings nach kurzer Zeit ihre Fähigkeit zur Teilung, sodass eine Koloniebildung nicht mehr möglich ist. Eine weitere Form ist die Nekrose, bei der es zum vollständigen Untergang der Zelle kommt. Dieser geht mit einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes einher. Im Gegensatz dazu steht die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt. Hier kommt es zwar auch zum direkten Zelltod, allerdings schrumpft die Zelle und kann phagozytiert werden, so dass eine Entzündungsreaktion ausbleibt. Dies ist auch die Form des physiologischen Zelltodes, durch den alternde Zellen aussortiert werden. (Münter and Weber 2017)

1.3.3 Schlüsselrolle Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus verschiedenen Phasen, die die Zelle nacheinander durchläuft (s. Abbildung 3).

Abbildung 3: Übersicht Zellzyklus



Quelle: (Münter and Weber 2017)

In der G₁-Phase bereitet sich die Zelle auf eine bevorstehende Teilung vor. Alle dafür nötigen Proteine, Enzyme und Zellorganellen werden synthetisiert. An die G₁-Phase schließt sich die S-Phase an. In der S-Phase wird die DNA repliziert und weitere Proteine sowie RNA synthetisiert. Am Ende der S-Phase liegt ein diploider Chromosomensatz vor. Anschließend folgt die G₂-Phase, in der es zu weiteren Proteinsynthesen kommt. Die Zelle bereitet sich nun direkt auf die Mitose vor. Die Mitose selbst findet in der anschließenden M-Phase statt und es entstehen zwei Tochterzellen. Nach der Teilung bestehen für die Tochterzellen zwei Optionen in ihrer Funktion im Zellverband. Zum einen können sie erneut in den Zellzyklus eintreten. Dieser beginnt dann mit der G₁-Phase wieder von vorne. Alternativ können sie den Zellzyklus entweder passager (z. B. durch Entzug von Wachstumsfaktoren/Nährstoffen) oder dauerhaft (bei Ausdifferenzierung) verlassen. Sie treten dann in die G₀-Phase ein und verbleiben hier bis zum erneuten Eintritt in die G₁-Phase oder sterben mittels Apoptose. Der zeitliche Rahmen beträgt für die S-, G₂- und M-Phase ca. 8-20 Stunden. Die G₁- und G₀-Phasen haben dagegen kein festes Zeitintervall. Die Dauer kann von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen variieren. Am Ende der G₁- und G₂-Phase sowie der Metaphase wird an Kontrollpunkten überprüft, ob alle nötigen Voraussetzungen für den nächsten Schritt gegeben sind. Dies wird durch verschiedene Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen kontrolliert. Ist dies nicht der

Fall, wird der Zellzyklus gestoppt und nötige Reparatur- bzw. Syntheseschritte eingeleitet. Kann der Zellzyklus abschließend nicht erfolgreich fortgesetzt werden, wird in der Regel die Apoptose eingeleitet. (Heinrich 2014, Münter and Weber 2017)

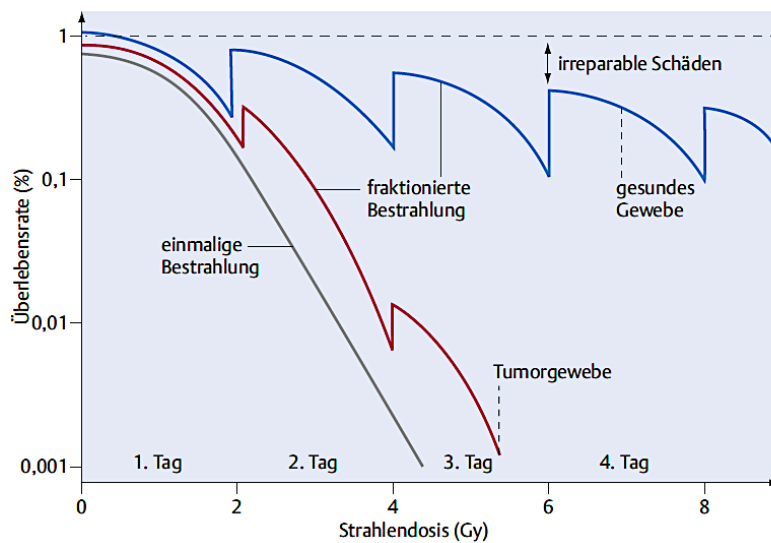
Die einzelnen Phasen des Zellzyklus weisen eine unterschiedliche Strahlensensibilität auf. Während einer langen G_1 - und auch späten S-Phase ist die Zelle relativ unempfindlich für Strahlenschäden. In der G_2 - und frühen S-Phase steigt die Empfindlichkeit und hat ihr Maximum in der M-Phase. Dies trifft besonders für locker ionisierende Strahlung zu. Bei dicht ionisierender Strahlung ist die Abhängigkeit vom Zellzyklus weniger stark ausgeprägt. (Münter and Weber 2017)

1.3.4 Strahlentherapie und Zellzyklus

Zur Strahlentherapie gehören verschiedene Bestrahlungskonzepte. Dabei kann mittels Distanz zwischen Strahlungsquelle und Tumor (Tele- vs. Brachytherapie) oder auch nach Bestrahlungsfrequenz unterschieden werden (einmalig vs. fraktioniert). Bei der Teletherapie wird perkutan mit Distanz zum Tumor bestrahlt. Im Gegensatz dazu steht die Brachytherapie, bei der sich die Strahlungsquelle direkt am Tumor befindet. (Schulz-Ertner, Sterzing et al. 2017)

Nun soll auf die fraktionierte Bestrahlung eingegangen werden. Dabei wird die Gesamtdosis in mehrere Fraktionen aufgeteilt und nach einem zeitlichen Schema appliziert. Pro Fraktion wird in Abhängigkeit der Tumorentität eine Einzeldosis von ca. 2 Gy appliziert. Der Zeitraum erstreckt sich dabei über mehrere Wochen, in denen in der Regel an 5 Tagen einmal pro Tag bestrahlt wird. Bei der fraktionierten Bestrahlung nutzt man die Tatsache, dass Tumorzellen eine schlechtere Regenerationsfähigkeit aufweisen als gesunde Zellen. Mit der verwendeten Dosis muss ein Gleichgewicht zwischen einer Minimierung langfristiger Strahlenschäden des gesunden Gewebes und gleichzeitiger maximaler Dosis des Zielvolumens gefunden werden. Einen Überblick gibt Abbildung 4.

Abbildung 4: Fraktionierte vs. einmalige Bestrahlung



Gesundes Gewebe kann im Gegensatz zu Tumorgewebe im Bestrahlungsintervall fast alle subletalen Strahlenschäden beseitigen. Zum Vergleich ist die Zellüberlebenskurve nach Einzeitbestrahlung dargestellt.

(nach Kauffmann G, Moser E, Sauer R, Hrsg. Radiologie: Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie und Strahlenschutz. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer; 2011)

Quelle: (Münter and Weber 2017)

Dabei wird die Wirkung der fraktionierten Bestrahlung durch die 5 R's der Strahlenbiologie modifiziert. Dazu zählen Repair, Redistribution, Repopulation, Reoxygenation und Radiosensitivity. Unter Repair werden Reparaturmechanismen der Zelle selbst zusammengefasst. Bei der Redistribution kommt es zu einer vorübergehenden Teilsynchronisation des Zellzyklus sowie einer Abnahme der Mitoserate. Es überleben hauptsächlich Zellen in strahlenresistenten Zyklen und der Zellzyklus wird durch die Reparaturmechanismen verlängert. Im Verlauf treten auch diese Zellen wieder in strahlensensible Phasen ein und sprechen dann besser auf die Bestrahlung an. Durch den Zellverlust im Rahmen der Bestrahlung kann die Zellproliferation gesteigert und somit höheren Strahlendosis zum Ausgleich notwendig werden. Dies wird als Repopulation bezeichnet. Wie bereits beschrieben ist die Strahlenwirkung auf oxygenierte Zellen höher im Vergleich zu hyp- oder anoxischen Zellen. Im Laufe der fraktionierten Bestrahlung nimmt die Tumormasse ab, sodass sich der Diffusionsweg zu den verbliebenen Tumorzellen verringert. Somit steigt im Rahmen der Reoxygenation der Oxygenierungsgehalt und die Strahlenwirkung nimmt zu. Radiosensitivity beschreibt Unterschiede in der Strahlensensibilität von Tumorzellen, die in einem Bestrahlungskonzept berücksichtigt werden müssen. (Münter and Weber 2017)

Die Stereotaxie ist eine Bestrahlungsvariante mit hoher Strahlendosis und führt meist zu letalen Strahlenschäden. Wird sie als Einzeitbestrahlung angewendet, bezeichnet man sie als Radiochirurgie. Häufiger Einsatzbereich ist dabei der Kopf. Ebenso sind fraktionierte Konzepte möglich.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Als anthroposophisches Medikament wird die Misteltherapie schon lange bei der Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt. Die Nachfrage nach komplementärmedizinischen Verfahren, und damit auch der Misteltherapie, steigt weiter, insbesondere bei Frauen. Das Mammakarzinom ist das häufigste Karzinom der Frau und beide Faktoren zusammen bedingen einen breiten Einsatz der Misteltherapie, obwohl die Studienlage nicht eindeutig ist. Bisher wurden in Bezug auf das Mammakarzinom hauptsächlich Interaktionen mit diversen Chemotherapeutika und Einfluss auf die Lebensqualität untersucht. Studien zum kombinierten Einsatz mit einer Radiotherapie stehen aktuell nicht zur Verfügung, obwohl diese fast ein obligater Bestandteil in der multimodalen Therapie des Mammakarzinoms ist. Mit dieser Arbeit wird mittels Mammakarzinomzelllinien in-vitro untersucht, ob durch Zugabe von Mistelextrakt die Strahlenwirkung auf Zellen beeinflusst wird. Dazu werden verschiedene Experimente durchgeführt, in denen Proliferation, Apoptose und Zellzyklus analysiert werden. Langfristig sollte es das Ziel sein, bezüglich dem Einsatz von Mistelextrakt in der Onkologie, eine klare Empfehlung zu Nutzen oder Schaden aussprechen zu können. Die bisherigen präklinischen und klinischen Forschungsergebnisse sind aufgrund der wenigen und teils widersprüchlicher Daten dafür nicht ausreichend.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien

| Zellen | Bezugspartner und Datenblatt |
|----------------|--|
| MCF-7 | MCF7 (ATCC® HTB22™) https://www.lgcstandards-atcc.org/~ps/HTB-22.ashx |
| SK-BR-3 | SKBR3 (ATCC® HTB30™) https://www.lgcstandards-atcc.org/~ps/HTB-30.ashx https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/57B3BB20A6144488ACF55D7BDC2B86E0.ashx |

Tabelle 3: Zelllinien

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|--|
| 12-well-Platten | Costar USA |
| 64-well-Platten | TPP Schweiz |
| Zellkulturflaschen (T25 und T75) | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl) | Sarstedt Nürnbrecht, Deutschland |
| Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml) | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| Combitips advanced Pipetten (2, 10, 25 ml) | Eppendorf Deutschland |
| Falcon Tubes (15, 50 ml) | Eppendorf Deutschland |
| Eppendorf Tubes (1,5, 2, 5 ml) | Eppendorf Deutschland |

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Puffer und Lösungen

| Substanzen | Hersteller |
|--|-------------------------|
| Phosphate buffered saline | Sigma-Aldrich USA |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich UK |
| Fetal Bovine Serum | Sigma-Aldrich UK |
| Penicillin-Streptomycin | Sigma-Aldrich Israel |
| Sodiumpyruvat | Sigma-Aldrich UK |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose | Sigma-Aldrich UK |

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

| Substanzen | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| Propidium Iodid | Calbiochem USA |
| Annexin-V-Fluos-Staining-Kit | Roche Deutschland |
| Cell Proliferation Reagent WST-1 | Roche Deutschland |
| Kristallviolett 0,1% wässrige Fertiglösung | |
| Ethanol | Carl Roth Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol | Carl Roth Karlsruhe, Deutschland |
| Iscador® M (Chargen-Nr: 70520/60319 70520/60337) | Iscador® AG Lörrach, Deutschland |
| Triton-X-100 | Sigma-Aldrich USA |
| Trypsin EDTA-Solution | Sigma-Aldrich USA |
| Anti-gamma-H2AX (p Ser139) (2F3) Mouse mAB | Novus |

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

3.1.5 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---------------------|--|
| Zentrifuge | Heraeus Multifuge 3SR+ Zentrifuge Thermo Scientific |
| Epi-Zentrifuge | Heraeus Fresco 17 Zentrifuge Thermo Electron Corporation |
| FACS | FACS Calibur Becton Dickinson |
| Inkubator | Heraeus BD 6220 Thermo Electron Corporation |
| Multistepper | Multipipette Plus Eppendorf |
| Neubauer Zählkammer | |
| Pipet Boy | Stripettor Ultra Corning |
| Lichtmikroskop | Axiovert 135 Zeiss |
| Wasserbad | HMGU Wasserbad Schuettler 14 L Memmert |
| Sicherheitswerkbank | HERAsafe Class II Safety Cabinet Thermo Electron Corporation |
| ELISA Reader | Biotek ELx808 |
| Bestrahlungsgerät | RS225 Gulmay Medical Systems Tube Voltage: 200 kV, Tube Current 15 mA Filter 5, Tischhöhe 500 |

Tabelle 7: Geräte

3.1.6 Software

| Software | Hersteller und Version |
|----------------|---|
| GelCount | OXFORD OPTRONIX GelCount Version 1.1.8.0 |
| Cell Quest Pro | BD Biosciences Version 6.0 |
| Excel | Microsoft Word Excel für Mac Version 16.16.2 |

Tabelle 8: Software

3.2 Methoden

3.2.1 Verwendete Zelllinien

Für die Versuche wurden zwei etablierte humane Mammakarzinom-Zelllinien verwendet.

Die Zelllinie MCF-7 (ATCC® HTB22™) stammt von einer 69-jährigen kaukasischen Frau und wurde 1970 aus einem malignen Pleuraerguss gewonnen ((ATCC) 2018). Dabei handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen eines Adenokarzinoms. Sie waren die ersten Mammakarzinomzellen, die sich in vitro kultivieren ließen (Soule, Vazquez et al. 1973).

Als zweite Zelllinie wurden SK-BR-3-Zellen (ATCC® HTB30™) verwendet. Sie stammen von einer 40-jährigen kaukasischen Frau und wurden ebenfalls aus einem malignen Pleuraerguss gewonnen. Die Zellen wurden als Adenokarzinom klassifiziert. Es ist bekannt, dass die Zelllinie SK-BR-3 vom Rezeptorstatus Her2-neu-positiv und im p53-Status mutiert ist. ((ATCC) 2018)

3.2.3 Zellkultur

Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose (DMEM) verwendet und mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) ergänzt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Antibiotika (Penicillin 100IU/ml, Streptomycin 100mg/ml), L-Glutamin (2mM) und Sodium-Pyruvat (1mM). Anschließend wurde das Medium steril filtriert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Die Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen im Inkubator bei einem CO₂-Gehalt von 5%, einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Alle für die Zellkultur verwendeten Flüssigkeiten wurden vor der Zugabe auf Raumtemperatur erwärmt.

Das Passagieren der Zellen wurde 2x wöchentlich in einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurde aus den Zellkulturflaschen Medium und mögliche

Restsubstanz durch zweimaliges Waschen mit Phosphate buffered saline (PBS) entfernt. Danach wurden die Zellen je drei Minuten bei 37°C im Inkubator trypsinisiert und anschließend durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturflasche vom Flaschenboden gelöst. Es folgte die Neutralisation des Trypsins mit Medium. Genaue Dosierungen je nach Zellkulturflasche sind Tabelle 9 zu entnehmen.

| Zellkulturflasche [Wachstumsfläche in cm ²] | PBS [ml] | Trypsin [ml] | Medium zur Neutralisation [ml] | Kulturmedium [ml] | Ausgesäte Zellzahl |
|---|----------|-----------------|--------------------------------------|----------------------|--|
| T25 | 2 | 0,5 | 5 | 5 | MCF-7: 0,5 x 10 ⁶ SK-BR-3: 0,3 x 10 ⁶ |
| T75 | 5 | 1,5 | 10 | 15 | MCF-7: 1,5 x 10 ⁶ SK-BR-3: 0,9 x 10 ⁶ |

Tabelle 9: Übersicht Materialien und Zellzahlen für die Zellkultur

Anschließend wurden die Zellen erneut in Zellkulturflaschen ausgesät und inkubiert.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde durch Zählung mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Dafür wurden 20 µl der Zellsuspension in eine 96-well-Platte gegeben. Um abgestorbene Zellen zu erkennen, wurden 20 µl Trypanblau hinzugefügt und mit der Zellsuspension gut resuspendiert. Trypanblau durchdringt die Zellmembran abgestorbener Zellen und färbt diese blau. So kann zwischen blauen toten und vitalen farblosen Zellen unterschieden werden. Die Zählkammer wurde mit der Zellsuspension befüllt und die Zellen mithilfe des Rasters gezählt. Die Ermittlung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte mit folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \text{gezählte Zellen} \times \frac{\text{Verdünnungsfaktor}}{\text{gezählte große Quadrate}} \times 10000$$

3.2.4 Bestimmung der Iscador®M-Konzentration

Bevor mit den eigentlichen Versuchsreihen begonnen werden konnte, war es nötig eine Iscador®M-Konzentration zu bestimmen, mit der die Zellreihen behandelt werden sollten. Dafür wurde zunächst ein Proliferationsassay mittels WST-1-durchgeführt. Der genaue Versuchsablauf ist in Kapitel 3.2.5 beschrieben. Da die Ergebnisse zur Ermittlung einer Iscador®M-Konzentration nicht geeignet waren (vgl. Kapitel 4.1), erfolgte die Bestimmung mittels CFA (s. Versuchsdurchführung Kapitel 3.2.6.3). Ergebnisse des CFA und Begründung der gewählten Konzentration sind in den Kapiteln 4.2 und 5.1 ausführlich beschrieben.

3.2.5 Proliferations-Assay mit WST-1

Für den Proliferations-Assay (auch Viability Assay genannt) wurden zunächst 96-well-Platten nach einem zuvor festgelegten Schema (s. Tabelle 10) mit 13500 Zellen in 90 µl Medium pro Well beimpft. In den Feldern A-D (weiß) wurden pro Reihe je 4 Replikate MCF-7, in den Feldern E-H (grau) SK-BR-3 ausgesät. Pro Iscadordosis und Zelllinie konnten somit 8 wells ausgewertet werden.

| | A | B | C | D | E | F | G | H |
|----|-----------------------------------|---|---|---|-----------------------------------|---|---|---|
| 1 | 0 µg/ml Iscador®M | | | | 0 µg/ml Iscador®M | | | |
| 2 | 0 µg/ml Iscador®M | | | | 0 µg/ml Iscador®M | | | |
| 3 | 5 µg/ml Iscador®M | | | | 5 µg/ml Iscador®M | | | |
| 4 | 5 µg/ml Iscador®M | | | | 5 µg/ml Iscador®M | | | |
| 5 | 10 µg/ml Iscador®M | | | | 10 µg/ml Iscador®M | | | |
| 6 | 10 µg/ml Iscador®M | | | | 10 µg/ml Iscador®M | | | |
| 7 | 20 µg/ml Iscador®M | | | | 20 µg/ml Iscador®M | | | |
| 8 | 20 µg/ml Iscador®M | | | | 20 µg/ml Iscador®M | | | |
| 9 | 50 µg/ml Iscador®M | | | | 50 µg/ml Iscador®M | | | |
| 10 | 50 µg/ml Iscador®M | | | | 50 µg/ml Iscador®M | | | |
| 11 | Positivkontrolle mit Camptothecin | | | | Positivkontrolle mit Camptothecin | | | |
| 12 | Leerprobe nur Medium | | | | Leerprobe nur Medium | | | |

Legende: A – D (weiß): MCF-7, E – H (grau): SK-BR-3

Tabelle 10: Pippetierschema WST-1-Assay

Zur Kontrolle wurde 90 µl reines Medium verwendet. Pro Versuchsreihe wurden insgesamt 8 96-well-Platten angelegt. 24 Stunden nach Aussaat erfolgte die Bestrahlung von je 2 Well-Platten pro Strahlendosis (0, 2, 4, 6 Gy). Direkt im Anschluss an die Bestrahlung wurden die verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen in je 10µl Medium pro Well hinzugegeben. Die Positivkontrolle erfolgte mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin in 1:250 Verdünnung bei 5 mg/ml Stocklösung (entspricht 4 µl Camptothecin/well). Zur Leerprobe wurden ebenfalls noch einmal 10 µl Medium hinzupipetiert. Die Platten wurden anschließend in zwei Versuchsreihen 5 und 7 Tage im inkubiert. WST-1 ist ein Reagenz, das nach Zugabe ins Nährmedium von den Zellen aufgenommen und in der Atmungskette verstoffwechselt wird. Dies bewirkt einen Farbumschlag, der sich photometrisch als Extinktion messen lässt. Nach der Inkubationszeit wurden alle Wells mit je 10 µl WST-1 (auf Raumtemperatur erwärmt) beimpft und anschließend erneut für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte dann im ELISA-Reader bei 37°C und den Wellenlängen 450 nm sowie 630 nm. Zuvor wurden die Platten zur Resuspension drei Sekunden vom Gerät gerüttelt.

Für die Berechnung wurde zunächst von allen Proben der Mittelwert gebildet. Der Leerwert (blank), die Probe mit reinem Medium, wurde als Eichwert verwendet und von den Proben beider Wellenlängen substrahiert (Wert 450 nm – blank // Wert 630 nm – blank). Im letzten Schritt erfolgte die Subtraktion der Werte der Wellenlängen (Mean = 450 nm – 630 nm). Die Wellenlängen wurden

anschließend zur besseren Darstellung in Prozente umgerechnet und graphisch dargestellt. Der Versuch wurde insgesamt 5-mal wiederholt.

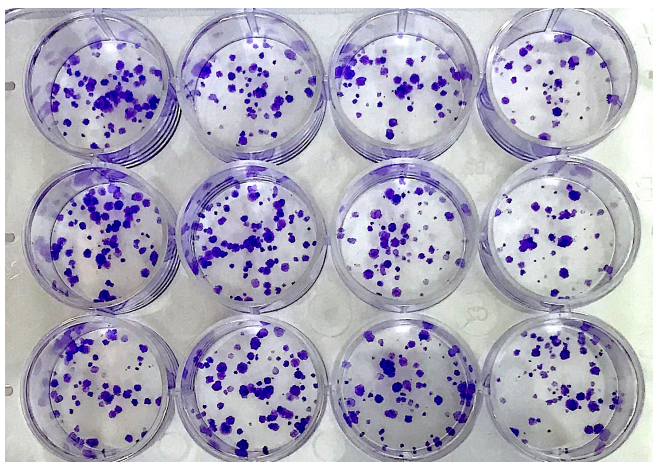
3.2.6 Colony Forming Assay (CFA)

3.2.6.1 Allgemeine Durchführung eines CFA

Ziel eines CFA (auch Clonogenic Assay genannt) ist es, die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen zu untersuchen. Äußere Einflüsse (z. B. Medikamente oder Bestrahlung) können sich auf das Wachstumsverhalten der Zellen auswirken und mit diesem Assay untersucht werden. Der CFA ist für diese Fragestellung ein sehr etabliertes Verfahren (Franken, Rodermond et al. 2006).

Im Versuch wurden 12-well-Platten mit einer definierten Zellzahl beimpft, die so gering bemessen wurde, dass sich gebildete Kolonien nicht überlagerten und besser ausgewertet werden konnten. Ausgangspunkt war die beim Passagieren gewonnene Zellsuspension. Diese wurde entsprechend verdünnt bis die gewünschte Zellzahl pro Milliliter erreicht war. Nach Aussaat der Zellen in die 12-well-Platten wurden diese über einen bestimmten Zeitraum (z. B. 1 Woche) im Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung mussten die Zellen fixiert und gefärbt werden. Hierzu wurde zunächst das Medium aus den Wells entfernt. Danach folgte ein Waschschrift durch Zugabe von 1 ml PBS pro Well. Zur Fixierung wurde pro Well 1 ml Methanol mit einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hinzugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde das Methanol entfernt und fachgerecht entsorgt. Zum Schluss folgte die Färbung mit 1 ml Kristallviolett 0,1% für 2 Minuten. Anschließend wurde das Kristallviolett entfernt und die Well-Platten gründlich unter fließendem Wasser abgespült. Abbildung 5 zeigt exemplarisch eine 12-well-Platte eines CFA mit SK-BR-Zellen.

Abbildung 5: 12-well-Platte CFA SK-BR-3-Zellen



Nach Trocknung wurden die Platten im GelCount eingelesen und die Kolonien gezählt. Eine Kolonie umfasste dabei einen Zellverbund aus mind. 50 Zellen. Die Versuchsreihen wurden mehrfach

wiederholt und ein Mittelwert gebildet. Aus diesen Mittelwerten wurden dann Plating Efficiency (PE) und Survival Fraction (SF) erfasst, deren Berechnung mit folgenden Formeln erfolgte:

$$PE = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{ausgesäte Zellzahl}} * 100$$

$$SF = \frac{\text{Anzahl Kolonien ohne Behandlung}}{\text{Anzahl Kolonien mit Behandlung}}$$

Abschließend erfolgt die Bildung eines Mittelwertes aus den SF der einzelnen Versuchstagen sowie die Berechnung von Standardabweichung und Varianz.

3.2.6.2 Vorversuche

Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl und Inkubationszeit wurden Vorversuche durchgeführt. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde die Zellsuspension soweit verdünnt, dass sich Zellkonzentrationen von 50, 100, 200, 400 und 800 Zellen pro Well erreichen ließen. Verwendet wurden 12-well-Platten, die mit einem Gesamtvolumen von 1 ml aus Zellsuspension und Medium befüllt wurden. Durch verschiedene Inkubationszeiten (7, 9, 11, 13, 15 Tage) konnten für die folgenden Versuche optimale Zellzahlen und Wachstumszeit bei beiden Zelllinien bestimmt werden. Für die verschiedenen Bestrahlungsdosen wurden die Zellzahlen abschließend erhöht, um trotz der Strahlentoxizität ausreichend Kolonien für eine Auswertung zu erhalten. Dafür musste bei den MCF-7 die Inkubationszeit für die 4 Gy- und 6 Gy-Gruppen verlängert werden. Die somit ermittelten Zellzahlen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 11 dargestellt. Durch die Berechnung der Plating Efficiency (PE) erfolgte eine Normierung der unterschiedlichen Zellzahlen.

| Zelllinie | Zellzahl nach Strahlendosis | Wachstumszeit |
|----------------|--|--|
| MCF-7 | 0 Gy = 300 Zellen/well 2 Gy = 600 Zellen/well 4 Gy = 1200 Zellen/well 6 Gy = 1800 Zellen/well | 0 Gy + 2 Gy: 10 Tage 4 Gy + 6 Gy: 14 Tage |
| SK-BR-3 | 0 Gy = 100 Zellen/well 2 Gy = 100 Zellen/well 4 Gy = 250 Zellen/well 6 Gy = 500 Zellen/well | 0, 2, 4, 6 Gy: 9 Tage |

Tabelle 11: Zellzahlen/Wachstumszeiten CFA

3.2.6.3 CFA zur Konzentrationsbestimmung des Iscador®M

Die Testung der Iscador®M-Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml und 50 µg/ml erfolgte mittels CFA. Das verwendete Iscador®M wurde vom Hersteller in der Dosis 5 mg/ml bezogen. Eine direkte Zugabe von Iscador in die Wells war aufgrund der geringen Konzentration

technisch nicht möglich. Somit wurde Iscador®M mit Medium verdünnt, sodass nach Zugabe von 100µl Iscador®M-Medium-Gemisch die oben genannten Konzentration von 0,1 – 20 µg/ml pro Well erreicht wurden. Für die Durchführung eines CFA siehe Kapitel 3.2.6.1. Die einzelnen Wells wurden bei der Zelllinie MCF-7 mit 300 Zellen/Well und bei der Zelllinie SK-BR-3 mit 100 Zellen/Well beimpft. Nach 24 Stunden wurden dann je 100 µl der verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen in zuvor beschriftete Wells gegeben. Fixierung und Färbung folgte bei den MCF-7-Zellen an Tag 10 und den SK-BR-3-Zellen an Tag 9. Es folgte die Zählung mittels GelCount und anschließender Berechnung von PE und SF. Als Zielwert sollte die Bestimmung der LD₅₀ dienen. Der LD₅₀-Wert („letale Dosis“) gibt wieder, bei welcher Konzentration noch 50% der Zellen überleben. Die graphische Darstellung wurde mit Excel durchgeführt. Insgesamt wurden die Vorversuche 7-mal wiederholt. Für die weiteren Versuche wurde die Dosis von 10 µg/ml Iscador®M ermittelt. Ausführliche Informationen hierzu sind in Kapitel 4.2 aufgeführt.

3.2.6.4 CFA mit Bestrahlung und Iscador® M

Zur allgemeinen Durchführung des CFA siehe 3.2.6.1. Ausgesäte Zellzahlen und Inkubationszeiten sind Tabelle 11 zu entnehmen. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in den Dosen 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy erfolgte 24 Stunden nach Aussaat der Zellen. Dazu wurde das Bestrahlungsgerät RS225 der Fa. Gulmay verwendet und auf folgende Parameter eingestellt: 15 mA, 200 kV, Tischhöhe 500 mm, Filter 5. Die unterschiedlichen Strahlendosen wurden durch entsprechende Bestrahlungszeiten erreicht. Diese Einstellungen wurden ebenfalls für alle weiteren Versuchreihen verwendet. Direkt im Anschluss wurden 10 µg/ml Iscador®M hinzupipettiert. Zusätzlich zu den mit Iscador®M und Bestrahlung behandelten Zellen gab es Negativproben, die nur Mistelextrakt erhielten (ohne Bestrahlung) und Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden. Der Versuch wurde insgesamt 8-mal wiederholt.

3.2.7 Zellzyklusanalyse und DNA-Reparatur-Induktion

Zur Zellzyklusanalyse wurde die Durchflusszytometrie genutzt, mit der die Zellen nach Färbung mit fluoreszierendem Propidiumiodid (PI) auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht werden konnten. Parallel erfolgte eine Färbung mit einem γ-H2AX-Antikörper, mit dem sich Reparaturhistone H2AX nachweisen lassen. Diese Histone werden vermehrt bei DNA-Doppelstrangbrüchen synthetisiert und sind an ihrer Reparatur beteiligt. Für diese Versuchsreihe wurden die Zellen in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Aufgrund der kurzen Wachstumszeit dieses Versuchs wurden die Zellzahlen im Vergleich zur Erhaltungskultur deutlich erhöht. Bei den MCF-7 wurden insgesamt 1,2 Mio. Zellen pro T25-Flasche ausgesät. Bei den SK-BR-3 waren es 1,5 Mio Zellen pro T25-Flasche. Pro Versuchsreihe und Zelllinie wurden insgesamt 8 T25-Flaschen ausgesät. Nach Aussaat konnten die Zellen 24 Stunden

anwachsen und wurden im Anschluss bestrahlt. Je zwei Flaschen pro Zelllinie erhielten die gleiche Strahlendosis (0, 2, 4, 6 Gy). Davon wurde wiederum je eine Flasche pro Strahlendosis und Zelllinie mit Iscador®M in der Konzentration 10 µg/ml beimpft. Die restlichen Zellkulturflaschen blieben als Kontrollgruppe unbehandelt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte 24 Stunden nach Bestrahlung. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 0,5 ml Trypsin und kurzer Inkubation im Wärmeschrank vom Flaschenboden gelöst. Der Vorgang wurde mit 2 ml DMEM-Medium gestoppt und die Zellsuspension im Anschluss für 5 Minuten bei 500g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 250 µl kaltem PBS aufgenommen und sehr gut resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension unter Vortexen langsam in 2,25 ml Ethanol (70%, -20°C) getropft und mind. 2 Stunden bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. In dieser Form waren die Zellen für die Färbung und Auswertung einen Monat haltbar.

Der Versuch wurde innerhalb einer Woche fortgesetzt. Für die Herstellung der verwendeten Reagenzien s. Tabelle 12.

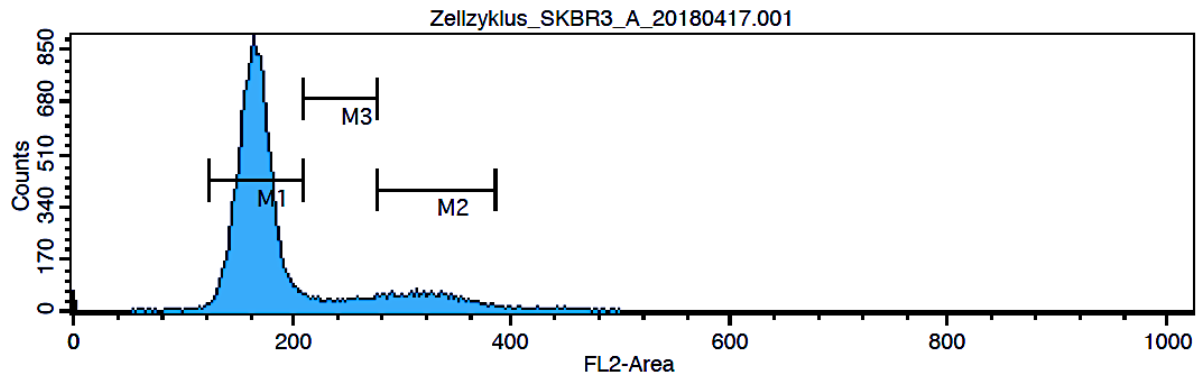
| Reagenz | Konzentration/Dosierung |
|---------------------------|---|
| FACS-Puffer | 10% fetales Kälberserum in PBS |
| Triton X-100 0,15% | 75 µl Triton X-100 + 49,925 ml PBS |
| Triton X-100 0,1% | 50 µl Triton X-100 + 49,950 ml PBS |
| PI-Staining-Lösung | 0,1 % Triton X-100 in PBS + 0,2 mg/ml DNase-free-RNase A + 0,02 mg/ml Propidium Iodid (PI) (Maximal 2 Wochen im Kühlschrank bei 4°C haltbar (Lagerung dunkel)) |

Tabelle 12: Reagenzien Zellzyklus-Analyse

Für die Färbung wurde die Zellsuspension zunächst 5 Minuten bei Raumtemperatur und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Proben einige Minuten stehen gelassen, damit verbliebenes Ethanol verdunsten konnte. Anschließend wurden die Zellpellets mit 1 ml PBS gewaschen und erneut bei Raumtemperatur und 500 g 5 Minuten lang zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Zellpellets in 1 ml Triton-X-Lösung (0,15%) resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugation (500 g, 5 Minuten, Raumtemperatur) und anschließende Resuspension in 100 µl FACS-Puffer. Nach einer Zugabe von 2 µl γ -H2AX-Antikörper (Anti-gamma-H2AX (p Ser139) (2F3) Mouse mAB) wurden die Proben dunkel auf Eis inkubiert. Als nächstes folgte wieder ein Waschschrift mit Zugabe von 300 µl FACS-Puffer und erneute Zentrifugation (500 g, 5 Minuten, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 300 µl PI-Staining-Lösung resuspendiert und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. PI bindet DNA und kann aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaft durch einen Laser während der FACS-Analyse angeregt werden. Je größer der DNA-Gehalt der Zelle (haploid vds. diploid), desto intensiver das

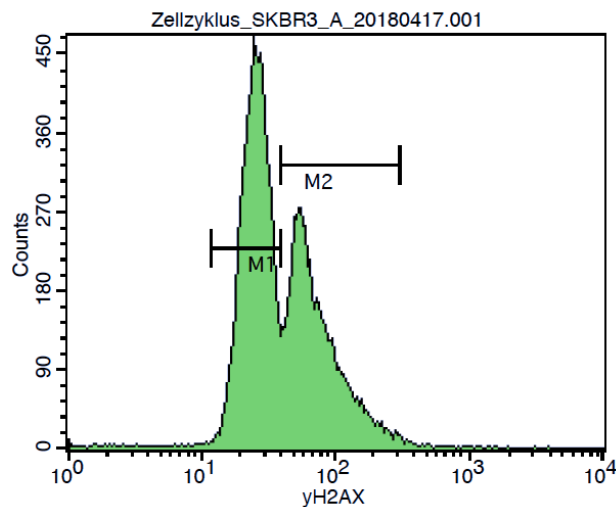
Signal. Die graphische Darstellung der Auswertung ist in Abbildung 6 und 7 exemplarisch für die SK-BR-3-Zellen gezeigt.

Abbildung 6: Beispiel graphische Darstellung Durchflusszytometrie Zellzyklus SK-BR-3-Zellen



Der Peak M1 zeigt Zellen in der G₁/G₀-Phase mit haploidem Chromosomensatz. M2 enthält Zellen mit diploidem Chromosomensatz in der G₂/M-Phase. Zwischen M1 und M2 liegt der Bereich M3, in dem sich Zellen in der S-Phase befinden.

Abbildung 7: Beispiel graphische Darstellung Durchflusszytometrie γ -H2AX SK-BR-3-Zellen



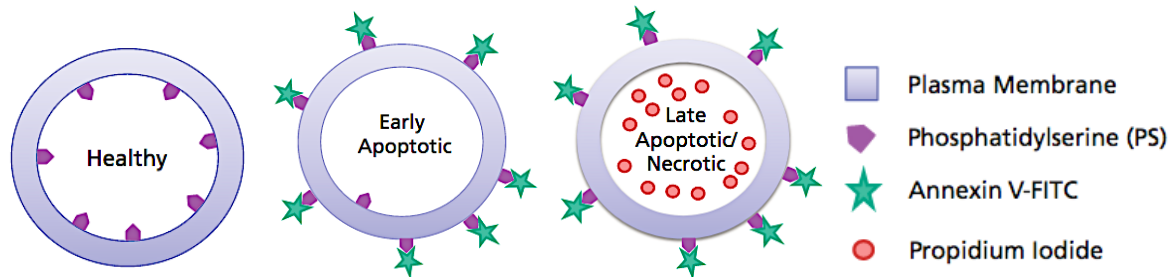
In Abbildung 7 ist das Ergebnis der γ -H2AX-Färbung graphisch dargestellt. Dabei können zwei Peaks (M1 und M2) unterschieden werden. Bei M2 liegt im Verhältnis zu M1 eine vermehrte Anzahl der Histone H2AX vor.

3.2.8 Apoptose-Assay mit Annexin

Beim Apoptose-Assay wird Annexin als fluoreszierender Marker benutzt. Dabei bindet es an Phosphatidylserin, welches bei Einleitung der Apoptose von der inneren auf die äußere Zellmembran umgelagert wird. Zusätzlich erfolgt eine Färbung mittels Propidium Iodid (PI). PI lagert sich an der DNA der Zellen an, kann aber nur in die Zelle eindringen, wenn die Zellmembran bereits perforiert ist. Dies ist bei spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen der Fall. So wird in der Durchflusszytometrie

zwischen gesunden, früh apoptischen und spät-apoptischen/nekrotischen Zellen unterschieden. Abbildung 8 stellt den Prozess graphisch dar.

Abbildung 8: Zelldiskriminierung mittels Marker beim Apoptose-Assay mit Annexin



Quelle: (Hingorani, Deng et al. 2011)

https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf v. 02.01.2020

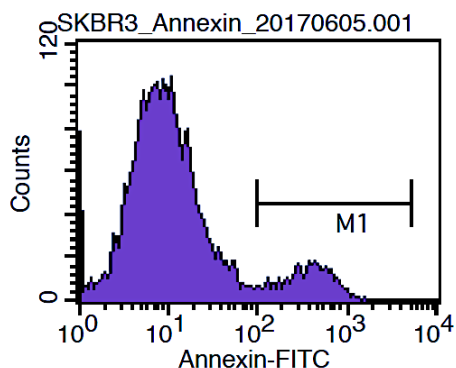
Für diesen Versuch wurden die Zellreihen in T25-Zellkulturflaschen kultiviert. Bei den MCF-7-Zellen lag die Zellzahl bei 500.000 Zellen pro T25-Flasche. Bei den SK-BR-3-Zellen waren es 300.000 Zellen pro T25-Flasche. Je Zelllinie wurden insgesamt 8 T25-Flaschen ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat erfolgte die Bestrahlung mit 0, 2, 4 und 6 Gy (pro Strahlendosis je zwei Flaschen pro Zelllinie). Je eine Flasche pro Strahlendosis und Zelllinie wurde anschließend mit Iscador®M in der Konzentration 10 µg/ml beimpft. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Als nächstes folgte die Vorbereitung der Zellen für die Färbung. Dafür wurden sie zur Gewinnung zunächst trypsiniert und der Vorgang anschließend durch Zugabe von Medium gestoppt. Durch Zentrifugieren (Raumtemperatur, 500g, 7 Minuten) der Zellsuspension blieb ein Zellpellet zurück. Der Überstand wurde abgegossen. Zum Waschen erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 5 ml PBS. Anschließend wurde bei gleicher Einstellung erneut zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Für die Färbung wurde das Annexin-V-Fluos Staining Kit der Firma Roche verwendet. Das Kit enthielt eine gebrauchsfertige Fixierlösung sowie den fluoreszierenden Annexin-V-Antikörper. Für die Färbung wurden eine Lösung aus dem Antikörper und der Fixierlösung hergestellt. Einen Überblick gibt Tabelle 13.

| Stocklösungen | Hersteller | Aufbewahrung | Verwendung | Ort |
|--|---|--------------|------------|-------------------------|
| Annexin V -FLUOS | Roche Cat.No. 1 828 681 | -20°C | RT | -20°C Gefrierschrank |
| Propidium Iodid (PI) | Stock 100µg/ml | 4°C | RT | Kühlschrank |
| Puffer | Hersteller/Inhalt | Aufbewahrung | Verwendung | Ort |
| PBS | Gibco/Sigma | RT | RT | Regal |
| Annexin Fixierlösung (Annexin-V-Fluos Staining-Kit ready for use) | HEPES 10mM (adjust to pH 7.4 with NaOH) | 4°C | 4°C | Kühlschrank |
| | NaCl 140mM | RT | RT | Regal |
| | CaCl ₂ 2.5mM | RT | RT | Regal |
| Färbelösung | 20µL Annexin V-FLUOS per 1ml Annexin binding buffer | - | RT | frisch ansetzen |

Tabelle 13: Reagenzien Annexin-V-Assay

Die Zellpellets wurden in 100 µl Färbelösung resuspendiert und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zur Verdünnung nochmals 400 µl Fixierlösung pro Tube hinzugefügt. Dann folgte die letzte Färbung mit PI. Dafür wurden 10 µl der PI-Stocklösung in die Tubes pipettiert und anschließend für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die FACS-Analyse durchgeführt. In Abbildung 9 ist exemplarisch eine Auswertung von Apoptose der SK-BR-3-Zellen dargestellt.

Abbildung 9: Beispiel graphische Darstellung Durchflusszytometrie Annexin-Assay SK-BR-3-Zellen



In der Grafik sind zwei Peaks zu sehen, bei dem der erste Peak lebende Zellen und der zweite Peak (M1) apoptotische Zellen enthält.

3.2.9 Statistische Auswertung und Signifikanz

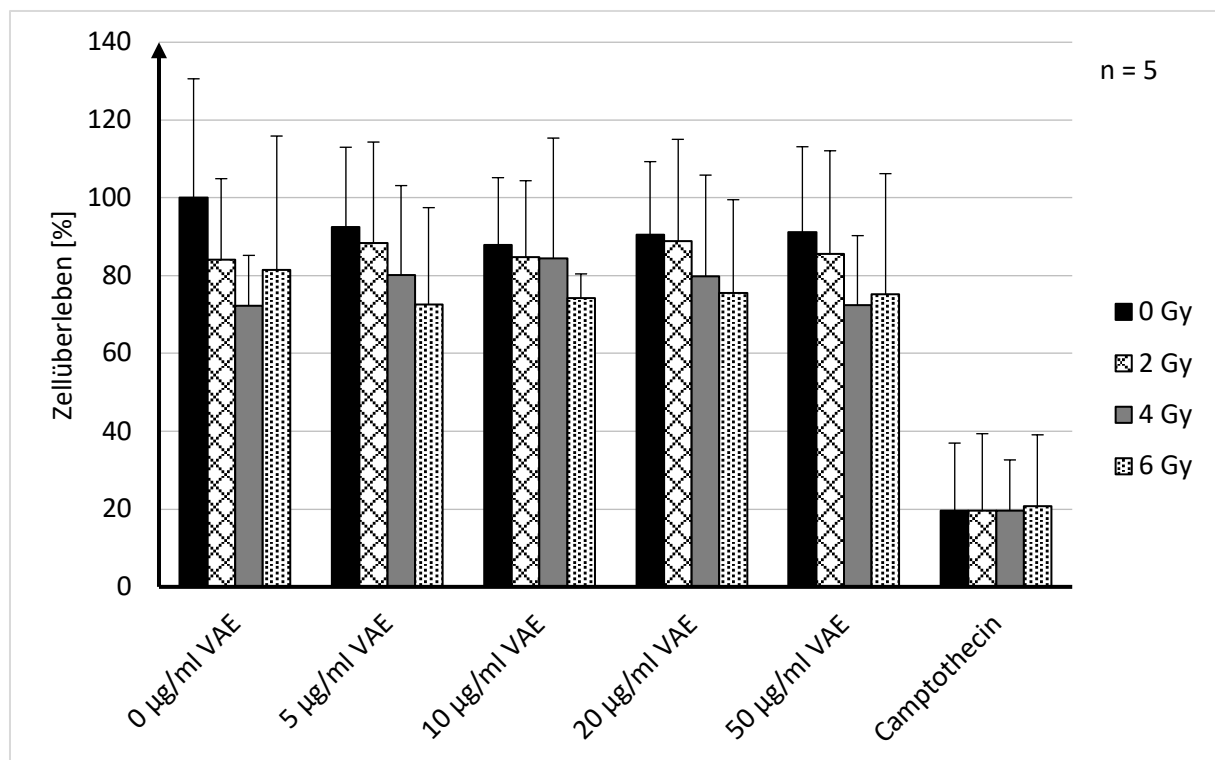
Die statistische Auswertung wurde mit Excel durchgeführt. Aus den Ergebnissen der einzelnen Versuchstage erfolgte zunächst die Berechnung von Mittelwert, Varianz und Standardabweichung. Mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test wurden die Stichproben auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft. Aufgrund der geringen Stichprobengröße war nicht von einer Verzerrung des Ergebnisses auszugehen. Für die weitere statistische Auswertung wurde bei allen Versuchen der ungepaarte t-Test für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Testung erfolgte zweiseitig und der Varianz angepasst. Das Signifikanzniveau wurde mit 5% (p-Wert < 0,05) als signifikant und 1% (p-Wert < 0,01) als hoch signifikant festgelegt. Als Nullhypothese (H_0) wurde in allen Versuchsreihen angenommen, dass es keinen Unterschied zwischen einer alleinigen Bestrahlung und der Kombination aus Bestrahlung und Mistelextrakt gab.

4 Ergebnisse

4.1 Proliferationsanalysen unter Iscador®M und Bestrahlung

Ziel des Proliferationsassays mittels WST-1 war es zunächst eine geeignete Iscador®M-Konzentration anhand der LD₅₀ für die weiteren Versuchsreihen zu finden. Gleichzeitig wurden verschiedene Strahlendosen verwendet, um Strahlungseffekte bei der ermittelten Iscador®M-Konzentration zu berücksichtigen. Beim WST-1-Assay korreliert die gemessene Absorption mit dem Zellwachstum. Das bedeutet, je dichter die Zellschicht ist, desto mehr Licht wird absorbiert. Bei geringem Wachstum wird weniger Licht durch Zellen abgeschirmt und die Absorption ist geringer. Die Verwendung von Camptothecin diente als Positivkontrolle und ist in beiden Diagrammen der Form halber mit aufgeführt. Das Ergebnis des Assays für die MCF-7-Zellen nach 5 Tagen Inkubationszeit ist in Abbildung 10 dargestellt. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 14 und 15 aufgeführt.

Abbildung 10: Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 5 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador®M-Konzentrationen



| VAE-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] | Zellüberleben [%] bei 0 Gy | Zellüberleben [%] bei 2 Gy | Zellüberleben [%] bei 4 Gy | Zellüberleben [%] bei 6 Gy |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | 100 (-) | 84,12 (-) | 72,33 (-) | 81,53 (-) |
| 5 | 92,58 (0,96) | 88,43 (0,94) | 80,16 (0,83) | 72,57 (0,77) |
| 10 | 87,88 (0,89) | 84,79 (0,99) | 84,50 (0,85) | 74,26 (0,97) |
| 20 | 90,60 (0,86) | 88,90 (0,99) | 79,87 (0,83) | 75,49 (0,97) |
| 50 | 91,14 (0,88) | 85,53 (0,98) | 72,38 (0,73) | 75,27 (0,57) |

Tabelle 14: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador[®]M-Konzentrationen

(Mittels t-Test sind die verschiedenen Iscador[®]M-Konzentrationen einer Strahlendosis auf ihr Signifikanzniveau zu 0 $\mu\text{g/ml}$ VAE untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

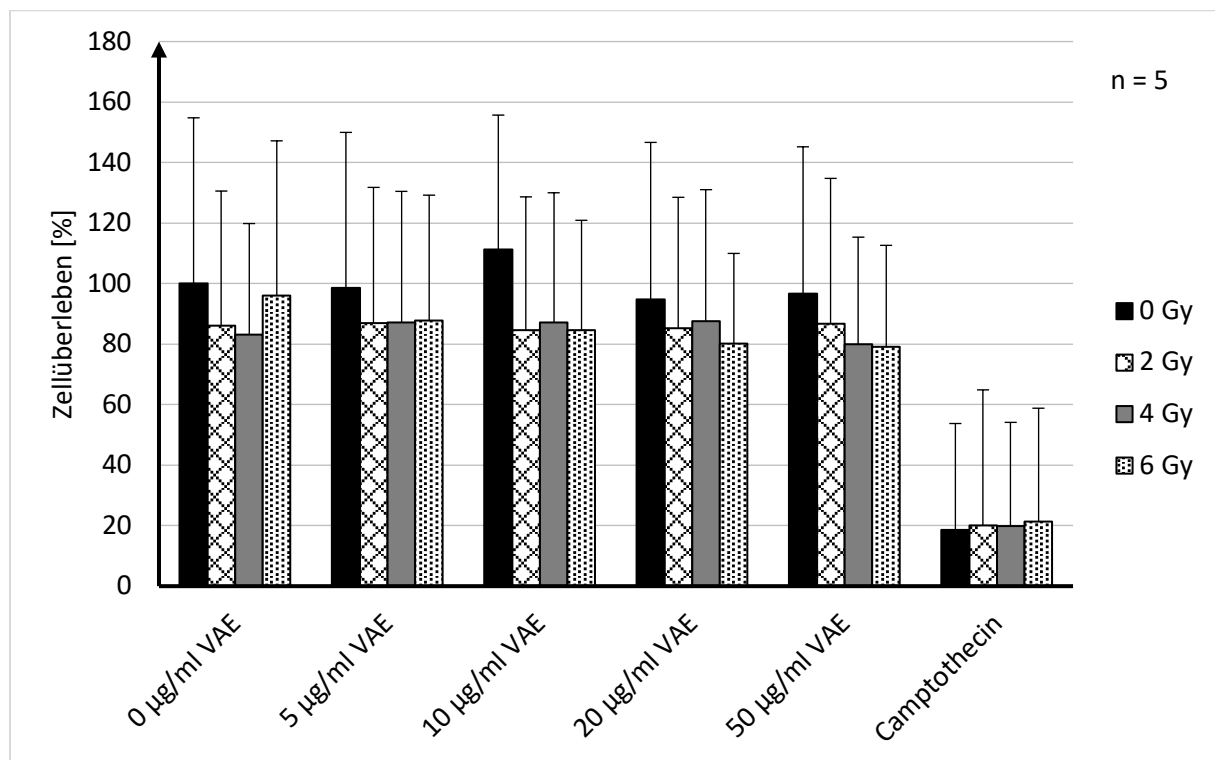
| Strahlendosis [Gy] | Zellüberleben [%] VAE 0 $\mu\text{g/ml}$ | Zellüberleben [%] VAE 5 $\mu\text{g/ml}$ | Zellüberleben [%] VAE 10 $\mu\text{g/ml}$ | Zellüberleben [%] VAE 20 $\mu\text{g/ml}$ | Zellüberleben [%] VAE 50 $\mu\text{g/ml}$ |
|--------------------|--|--|---|---|---|
| 0 | 100 (-) | 92,58 (-) | 87,88 (-) | 90,60 (-) | 91,14 (-) |
| 2 | 84,12 (0,50) | 88,43 (0,51) | 84,79 (0,52) | 88,90 (0,55) | 85,53 (0,55) |
| 4 | 72,33 (0,37) | 80,16 (0,47) | 84,50 (0,51) | 79,87 (0,56) | 72,38 (0,21) |
| 6 | 81,53 (0,66) | 72,57 (0,38) | 74,26 (0,60) | 75,49 (0,28) | 75,27 (0,18) |

Tabelle 15: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen

(Mittels t-Test sind die verschiedenen Strahlendosen einer Iscador[®]M-Konzentration auf ihr Signifikanzniveau zu 0 Gy untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

Es zeigte sich weder ein Unterschied im Zellüberleben bei verschiedenen Strahlendosen noch durch die unterschiedlichen Iscador[®]M-Konzentrationen. Ähnliche Ergebnisse ergab auch eine Inkubationszeit von 7 Tagen. Hier ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede feststellen. Eine LD₅₀ ließ sich für Iscador[®]M mit diesem Versuchsaufbau nicht ermitteln. Die Auswertung nach 7 Tagen Inkubationszeit ist in Abbildung 11 dargestellt. Die zugehörigen Messwerte sind in Tab. 16 und 17 aufgeführt.

Abbildung 11: Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 7 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador®M-Konzentrationen



| VAE-Konzentration [µg/ml] | Zellüberleben [%] bei 0 Gy | Zellüberleben [%] bei 2 Gy | Zellüberleben [%] bei 4 Gy | Zellüberleben [%] bei 6 Gy |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | 100 (-) | 86,18 (-) | 83,15 (-) | 96,03 (-) |
| 5 | 98,48 (0,96) | 86,85 (0,94) | 87,18 (0,83) | 87,69 (0,77) |
| 10 | 111,35 (0,89) | 84,53 (0,99) | 87,06 (0,85) | 84,64 (0,97) |
| 20 | 94,75 (0,86) | 85,25 (0,99) | 87,49 (0,83) | 80,14 (0,64) |
| 50 | 96,59 (0,88) | 86,81 (0,98) | 80,03 (0,73) | 79,01 (0,57) |

Tabelle 16: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen

(Mittels t-Test sind die verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen einer Strahlendosis auf ihr Signifikanzniveau zu 0 µg/ml VAE untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

| Strahlendosis [Gy] | Zellüberleben [%] VAE 0 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 5 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 10 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 20 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 50 µg/ml |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 100 (-) | 98,48 (-) | 111,35 (-) | 94,75 (-) | 96,59 (-) |
| 2 | 86,18 (0,50) | 86,85 (0,51) | 84,53 (0,52) | 85,25 (0,55) | 86,81 (0,55) |
| 4 | 83,15 (0,37) | 87,18 (0,47) | 87,06 (0,51) | 87,49 (0,83) | 80,03 (0,21) |
| 6 | 96,03 (0,66) | 87,69 (0,38) | 84,64 (0,60) | 80,14 (0,28) | 79,01 (0,18) |

Tabelle 17: Werte Proliferationsassay MCF-7-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen

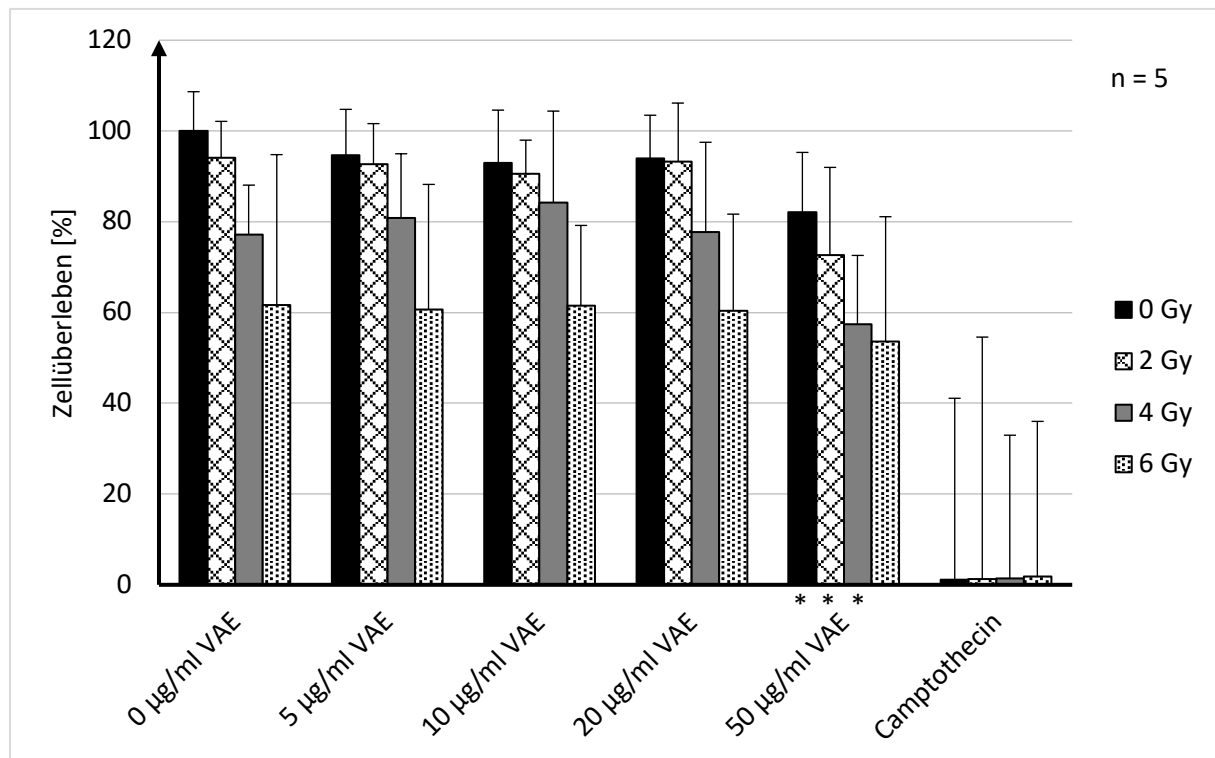
(Mittels t-Test sind die verschiedenen Strahlendosen einer Iscador®M-Konzentration auf ihr Signifikanzniveau zu 0 Gy untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

Bei den SK-BR-3-Zellen ließ sich ein Bestrahlungsdosis-abhängiger Effekt auf das

Proliferationsverhalten zeigen. Abbildung 12 gibt einen Überblick über die Ergebnisse nach 5 Tagen Inkubationszeit.

Abbildung 12: Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 5 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador®M-Konzentrationen

(Mittels * sind Signifikanzen unterhalb der x-Achse aus Tabelle 18 markiert.)



Bei Zugabe von 50 µg/ml VAE kam es bei 0, 2 und 4 Gy zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Proliferationsraten bei 0 Gy von initial 100% auf 82,10% ($p = 0,03$), bei 2 Gy von 94,13% auf 72,64% ($p = 0,04$) und bei 4 Gy von 77,20% auf 57,37% ($p = 0,01$). Bei 6 Gy unter 50 µg/ml Iscador®M und alle geringeren Iscador®M-Dosen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Für die genauen Messwerte siehe Tabelle 18 und 19.

| VAE-Konzentration [µg/ml] | Zellüberleben [%] bei 0 Gy | Zellüberleben [%] bei 2 Gy | Zellüberleben [%] bei 4 Gy | Zellüberleben [%] bei 6 Gy |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | 100 (-) | 94,13 (-) | 77,20 (-) | 61,62 (-) |
| 5 | 94,62 (0,43) | 92,64 (0,80) | 80,83 (0,62) | 60,61 (0,94) |
| 10 | 92,90 (0,34) | 90,60 (0,50) | 84,24 (0,49) | 61,55 (1,00) |
| 20 | 93,94 (0,36) | 93,20 (0,90) | 77,78 (0,95) | 60,38 (0,92) |
| 50 | 82,10 (0,03) | 72,64 (0,04) | 57,37 (0,01) | 53,66 (0,55) |

Tabelle 18: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen

(Mittels t-Test sind die verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen einer Strahlendosis auf ihr Signifikanzniveau zu 0 µg/ml VAE untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

| Strahlendosis [Gy] | Zellüberleben [%] VAE 0 µg/ml | | Zellüberleben [%] VAE 5 µg/ml | | Zellüberleben [%] VAE 10 µg/ml | | Zellüberleben [%] VAE 20 µg/ml | | Zellüberleben [%] VAE 50 µg/ml | |
|--------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|
| | [%] | VAE | [%] | VAE | [%] | VAE | [%] | VAE | [%] | VAE |
| 0 | 100,00 | (-) | 94,62 | (-) | 92,90 | (-) | 93,94 | (-) | 82,10 | (-) |
| 2 | 94,13 | (0,34) | 92,64 | (0,76) | 90,60 | (0,73) | 93,20 | (0,93) | 72,64 | (0,32) |
| 4 | 77,20 | (0,005) | 80,83 | (0,10) | 84,24 | (0,42) | 77,78 | (0,12) | 57,37 | (0,008) |
| 6 | 61,62 | (0,02) | 60,61 | (0,01) | 61,55 | (0,003) | 60,38 | (0,003) | 53,66 | (0,02) |

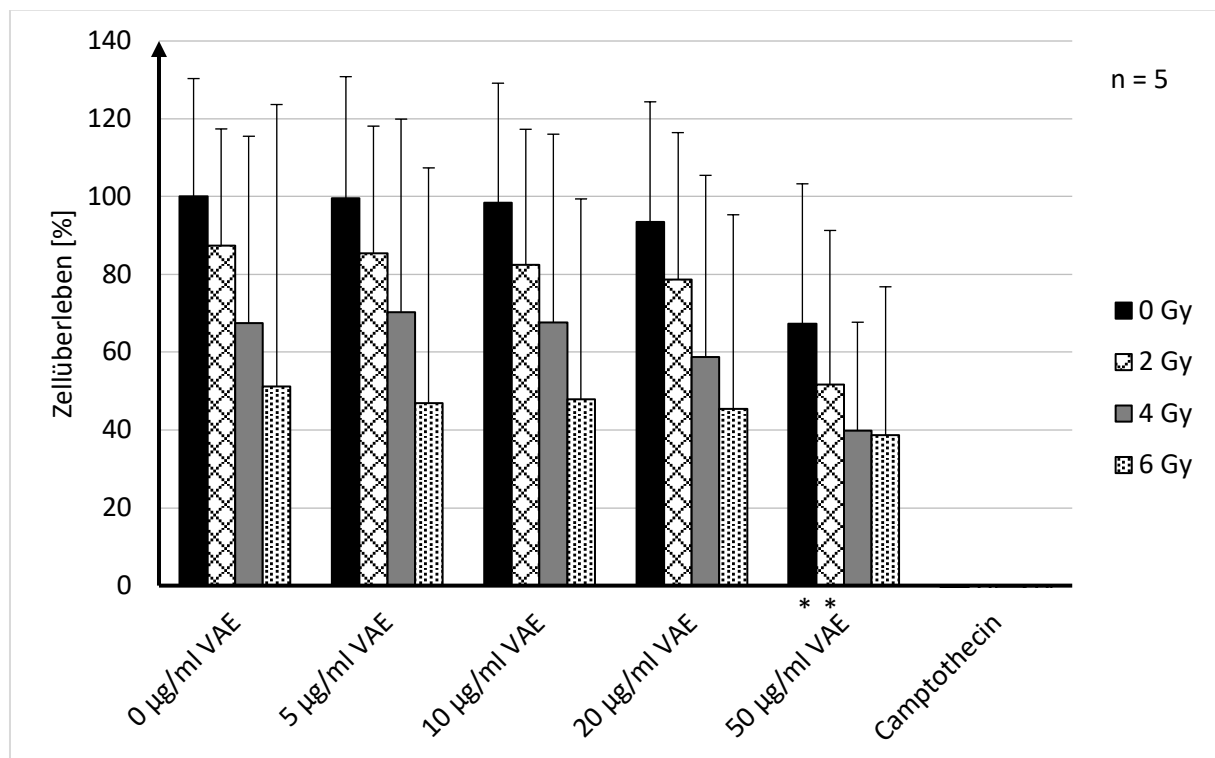
Tabelle 19: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 5 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen

(Mittels t-Test sind die verschiedenen Strahlendosen einer Iscador®M-Konzentration auf ihr Signifikanzniveau zu 0 Gy untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

Nach 7 Tagen Inkubationszeit waren die Effekte bei den SK-BR-3-Zellen in Bezug auf die Strahlenwirkung noch etwas deutlicher zu erkennen (s. Abbildung 13).

Abbildung 13: Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 7 Tagen mit verschiedenen Strahlendosen und Iscador®M-Konzentrationen

(Mittels * sind Signifikanzen unterhalb der x-Achse aus Tabelle 20 markiert.)



Die Tabellen 20 und 21 geben einen Überblick über die Messwerte. Eine signifikante Proliferationshemmung durch das Mistelextrakt lag bei 50 µg/ml Iscador®M für die Strahlendosen 0 Gy und 2 Gy vor. Dabei sank das Zellüberleben bei 0 Gy von 100% auf 67,39% ($p = 0,0008$) und bei 2 Gy von 87,33% auf 51,70% ($p = 0,003$). Für 4 Gy und 6 Gy und einer Dosis von 50 µg/ml Iscador®M sowie niedrigeren Iscador®M-Konzentrationen in Kombination mit allen Bestrahlungsdosen zeigten sich keine signifikanten Effekte. Eine LD_{50} für Iscador®M ließ sich auch bei den SK-BR-Zellen für 0 Gy nicht bestimmen, da die Zellproliferation unter allen gewählten Iscador®M-Konzentrationen noch zu

hoch war. Dieser Wert wurde nur bei einer Kombination aus 50 µg/ml Iscador®M in Kombination mit Bestrahlung erreicht.

| VAE-Konzentration [µg/ml] | Zellüberleben [%] bei 0 Gy | Zellüberleben [%] bei 2 Gy | Zellüberleben [%] bei 4 Gy | Zellüberleben [%] bei 6 Gy |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | 100 (-) | 87,33 (-) | 67,48 (-) | 51,15 (-) |
| 5 | 99,63 (0,88) | 85,36 (0,81) | 70,36 (0,88) | 46,98 (0,85) |
| 10 | 98,39 (0,68) | 82,50 (0,65) | 67,69 (0,96) | 47,87 (0,10) |
| 20 | 93,48 (0,23) | 78,70 (0,27) | 58,81 (0,52) | 45,41 (0,96) |
| 50 | 67,39 (0,0008) | 51,70 (0,003) | 39,79 (0,07) | 38,67 (0,61) |

Tabelle 20: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen

(Mittels t-Test sind die verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen einer Strahlendosis auf ihr Signifikanzniveau zu 0 µg/ml VAE untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

| Strahlendosis [Gy] | Zellüberleben [%] VAE 0 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 5 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 10 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 20 µg/ml | Zellüberleben [%] VAE 50 µg/ml |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 100 (-) | 99,63 (-) | 98,39 (-) | 93,48 (-) | 67,39 (-) |
| 2 | 87,33 (0,06) | 85,36 (0,11) | 82,50 (0,11) | 78,69 (0,08) | 51,70 (0,10) |
| 4 | 67,48 (0,03) | 70,36 (0,06) | 67,69 (0,04) | 58,81 (0,02) | 39,79 (0,002) |
| 6 | 51,15 (0,02) | 46,98 (0,005) | 47,87 (0,003) | 45,41 (0,002) | 38,67 (0,003) |

Tabelle 21: Werte Proliferationsassay SK-BR-3-Zellen nach 7 Tagen mit Signifikanzniveau der verschiedenen Strahlendosen

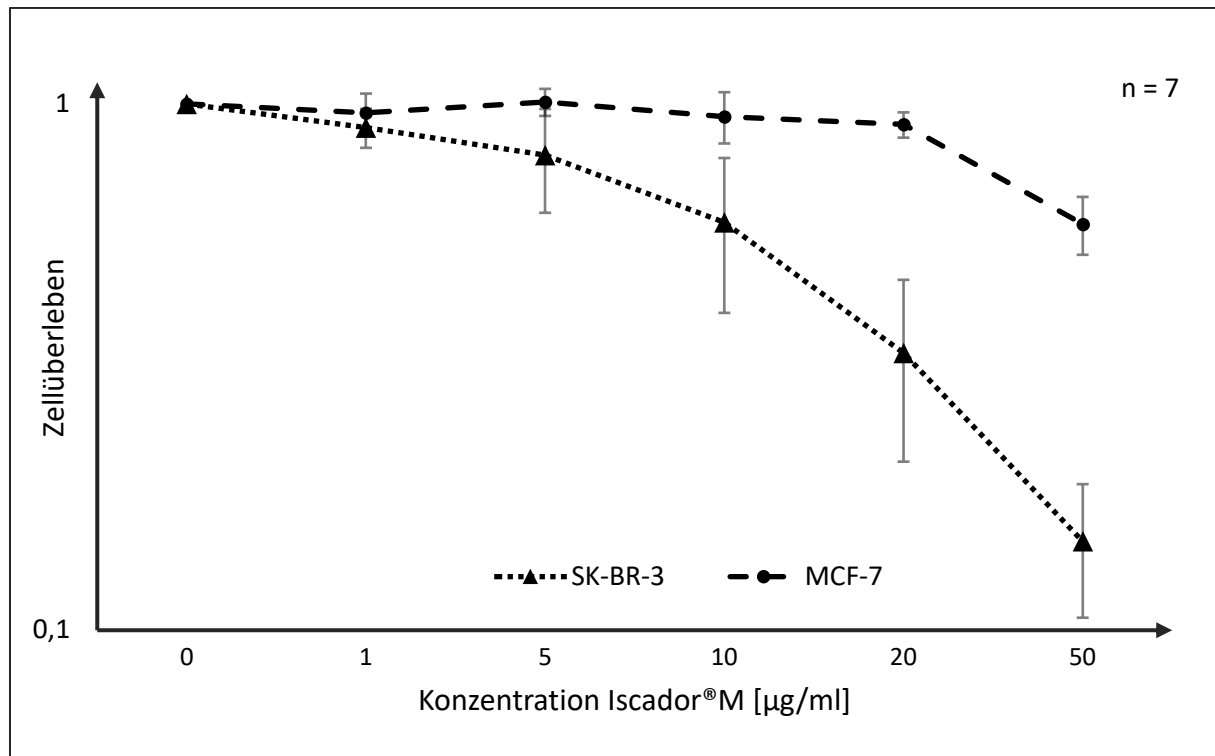
(Mittels t-Test sind die verschiedenen Strahlendosen einer Iscador®M-Konzentration auf ihr Signifikanzniveau zu 0 Gy untersucht worden. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

Da die Ergebnisse der Proliferationsassays zur Bestimmung der Iscador®M-Konzentration für weitere Versuche nicht zielführend waren, wurde im nächsten Schritt der Colony Forming Assay durchgeführt.

4.2 Bestimmung einer geeigneten Iscador®M-Konzentration

Der zu bestimmenden Parameter dieser Versuchsreihe war der LD₅₀-Wert. Beide Zelllinien zeigten jeweils sehr unterschiedliches Überleben nach Behandlung mit Mistelextrakt. Die Abbildung 14 stellt das Zellüberleben in einer logarithmierten Skala graphisch dar. Tabelle 22 zeigt die Mittelwerte für die SF.

Abbildung 14: Zellüberleben nach Behandlung mit verschiedenen Iscador®M-Konzentrationen für die Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3



| | 0 µg/ml VAE | 1 µg/ml VAE | 5 µg/ml VAE | 10 µg/ml VAE | 20 µg/ml VAE | 50 µg/ml VAE |
|--|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Mittelwerte Survival Fraction MCF-7 (%) | 100 | 96,27 | 100,87 | 94,70 | 91,34 | 59,14 |
| Mittelwerte Survival Fraction SK-BR-3 (%) | 100 | 90,19 | 79,98 | 59,52 | 33,62 | 14,76 |

Tabelle 22: Mittelwerte Survival Fraction MCF-7/SK-BR-3 nach Zugabe verschiedener Iscador®M-Konzentrationen

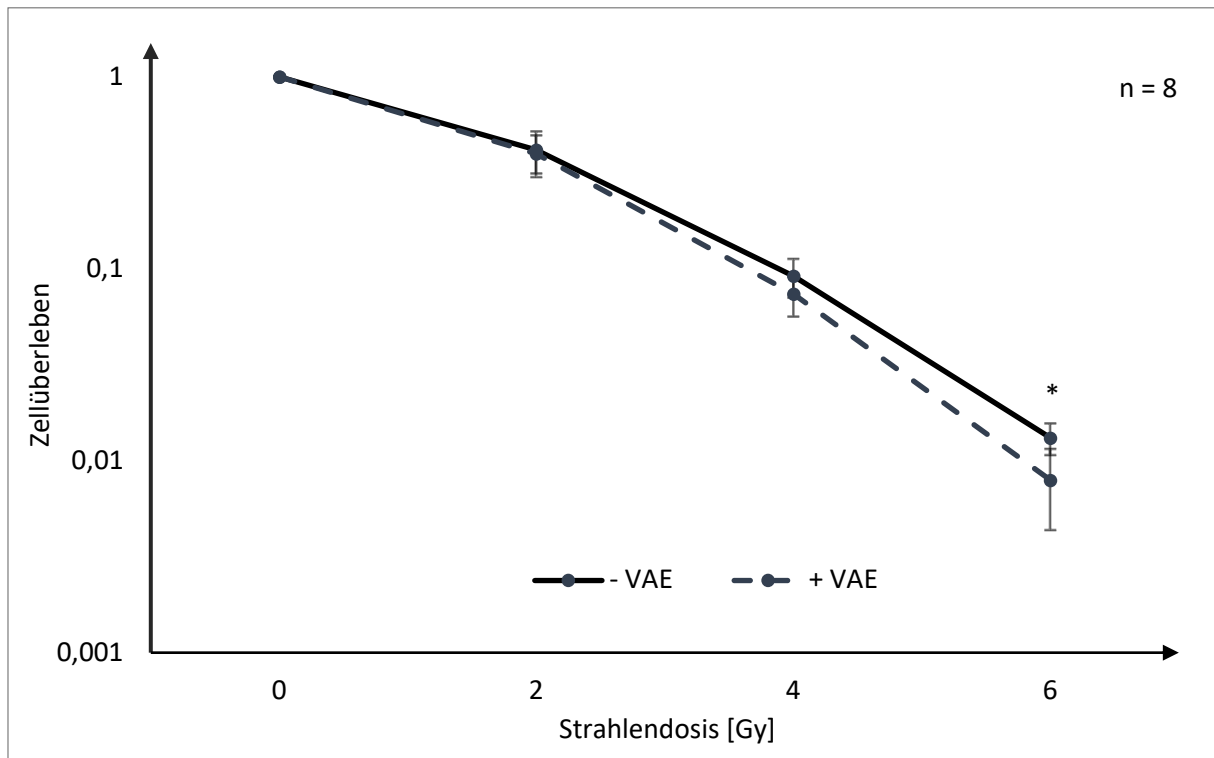
Die LD₅₀ lag für SK-BR-3-Zellen in einem Bereich zwischen 10-20 µg/ml Iscador®M. Bei den MCF-7-Zellen konnte der LD₅₀-Wert in dieser Versuchsreihe nicht bestimmt werden. Bei einer Iscador®M-Dosis von 50 µg/ml lag die mittlere SF noch bei 59%.

Für die folgenden Versuche wurde basierend auf den Vorversuchen und nach Literaturrecherche eine Konzentration von 10 µg/ml Iscador®M verwendet (für nähere Informationen siehe Kapitel 5.1). Im nächsten Schritt wurde mittels CFA untersucht, ob Iscador®M das Zellüberleben nach Bestrahlung mit 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy beeinflusst.

4.3 Beeinflussung des Zellüberlebens durch Iscador®M

Abbildung 15 zeigt das Zellüberleben der MCF-7-Zellen nach alleiniger Bestrahlung im Vergleich zur Kombination aus Bestrahlung und Zugabe von 10 µg/ml Iscador®M.

Abbildung 15: Vergleich Zellüberleben MCF-7-Zellen nach Bestrahlung + 10 µg/ml VAE im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung
(Mittels * sind Signifikanzen aus Tabelle 23 markiert.)



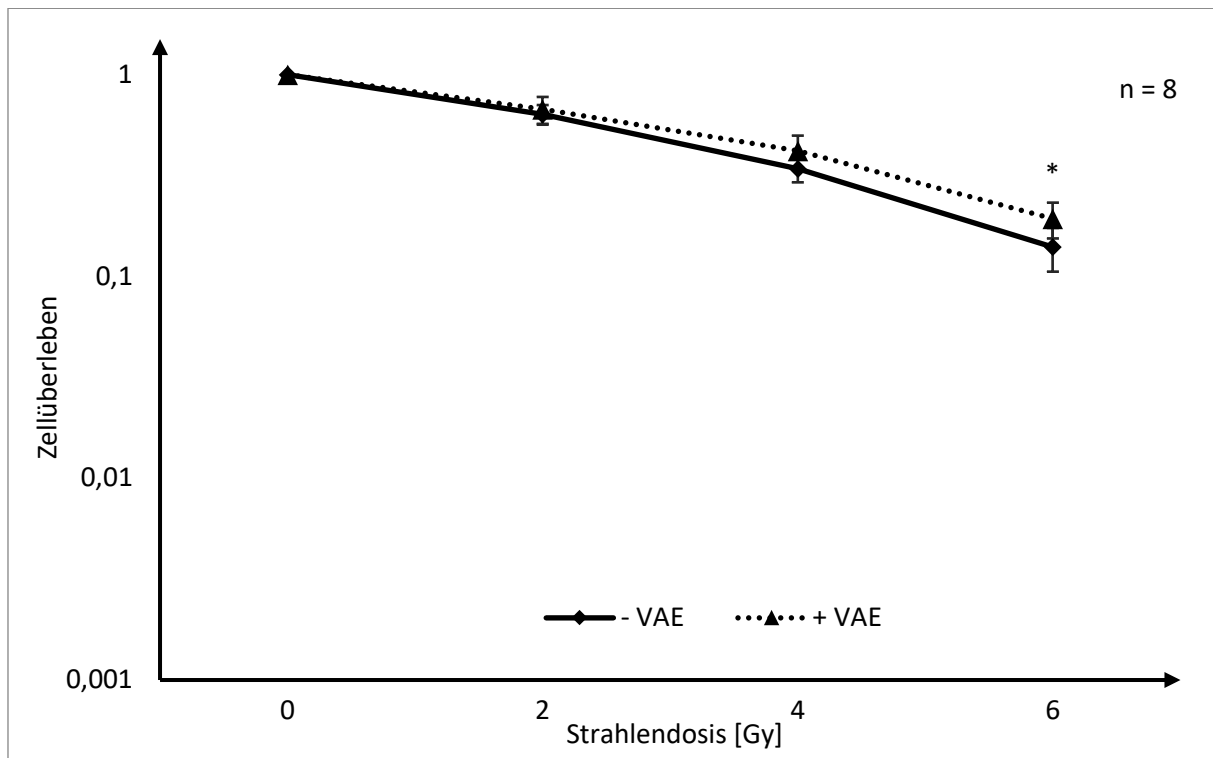
Bei Strahlendosen von 2 und 4 Gy ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsreihen. Mit einer SF von 0,8% bei Kombination aus 6 Gy Bestrahlung und Iscador®M-Zugabe war das Zellüberleben hochsignifikant geringer im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (1,3%; $p = 0,01$). Die konkreten Daten für SF und Signifikanz sind in Tabelle 23 noch einmal dargestellt.

| Strahlendosis | SF Bestrahlung allein | SF Bestrahlung + VAE | Signifikanzniveau (p-Wert) |
|---------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|
| 2 Gy | 41,7% | 39,8% | 0,75 |
| 4 Gy | 9,2% | 7,4% | 0,14 |
| 6 Gy | 1,3% | 0,8% | 0,01 |

Tabelle 23: Ergebnisse SF nach Bestrahlung allein und Bestrahlung + VAE bei MCF-7-Zellen mit Signifikanzniveau

Die SK-BR-3-Zellen unterschieden sich in ihrem Zellüberleben deutlich von den MCF-7-Zellen. Abbildung 16 gibt auch hier zunächst einen Überblick.

Abbildung 16: Vergleich Zellüberleben SK-BR-3-Zellen nach Bestrahlung + VAE im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung
(Mittels * sind Signifikanzen aus Tabelle 24 markiert.)



Auch bei den SK-BR-3-Zellen zeigte sich der einzige signifikante Unterschied zwischen allein bestrahlten Zellen und der Kombination mit Iscador®M bei einer Strahlendosis von 6 Gy (14% vs. 19,3%; $p = 0,02$). Allerdings kam es hier zu einer Verstärkung der Strahlenresistenz mit gesteigertem Zellüberleben. Die genauen Daten für SF und Signifikanz sind in Tabelle 24 dargestellt.

| Strahlendosis | SF Bestrahlung allein | SF Bestrahlung + VAE | Signifikanzniveau (p-Wert) |
|---------------|-----------------------|----------------------|----------------------------|
| 2 Gy | 63,6% | 67,3% | 0,48 |
| 4 Gy | 34,1% | 41,8% | 0,07 |
| 6 Gy | 14,0% | 19,3% | 0,02 |

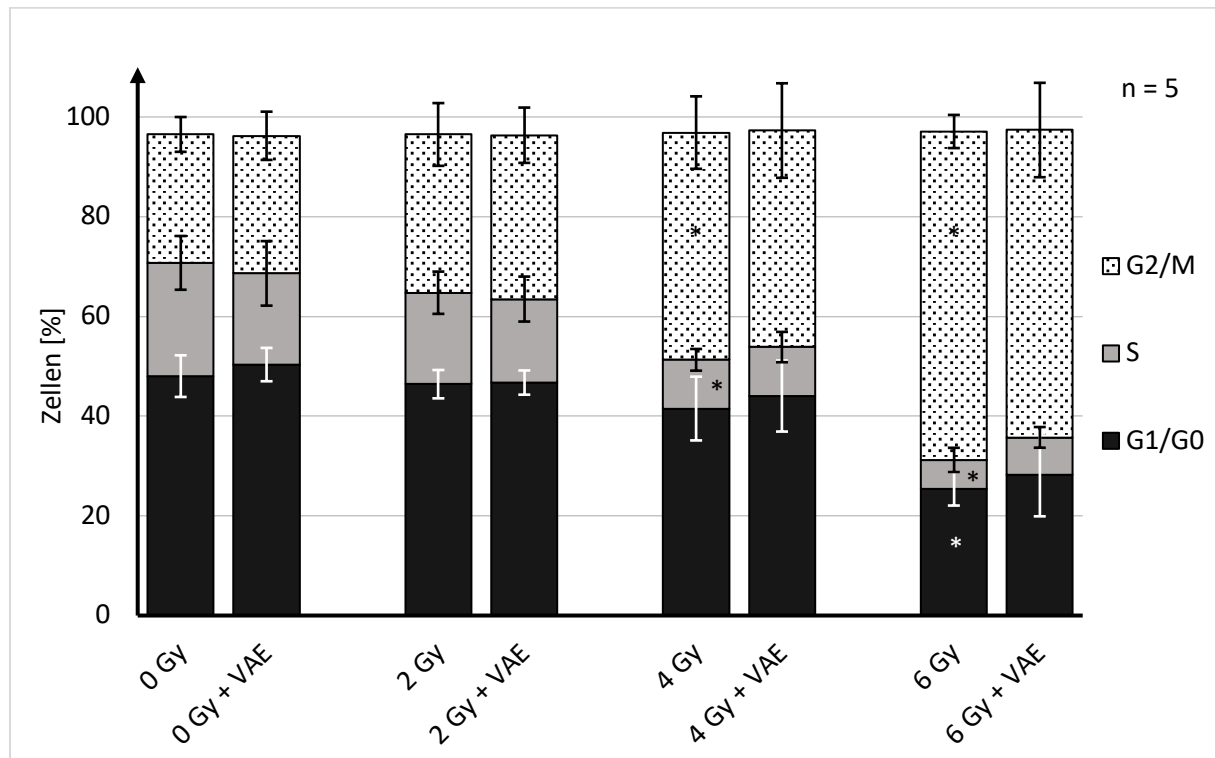
Tabelle 24: Ergebnisse SF nach Bestrahlung allein und Bestrahlung + VAE bei SK-BR-3-Zellen mit Signifikanzniveau

Nach orientierenden Versuchen zu Proliferation und Zellüberleben wurden nun Assays durchgeführt, die Hinweise auf einen Wirkmechanismus von Iscador®M geben sollten. Dazu wurden zunächst Zellzyklus und DNA-Reparaturinduktion untersucht.

4.4 Einfluss von Iscador®M auf Zellzyklus und DNA-Reparaturinduktion

Abbildung 17 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse der MCF-7-Zellen.

Abbildung 17: Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse MCF-7-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador®M
(Mittels * sind Signifikanzen aus Tab. 25 markiert.)



Mit höheren Strahlendosen kam es zu einer Veränderung der Zellverteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen. Der Anteil an Zellen in der G_1 - und S-Phase nahm zu Gunsten einer Erhöhung der G_2/M -Phase ab. Dies ließ sich mit p-Werten $< 0,05$ statistisch belegen (4 Gy G_2/M - und S-Phase, 6 Gy alle Zellzyklusphasen je im Vergleich zu 0 Gy). Bei 4 Gy sank der Anteil an Zellen in der S-Phase von 22,72% (0 Gy) auf 9,78% ($p = 0,006$), während sich der Zellanteil in der G_2/M -Phase von 25,76% (0 Gy) auf 45,58% ($p = 0,003$) steigerte. Nach einer Strahlendosis von 6 Gy waren die Effekte noch deutlicher zu erkennen. Der Zellanteil in der S-Phase sank von 22,72% (0 Gy) auf 5,78% ($p = 0,002$). In der G_1/G_0 -Phase kam es ebenfalls zu einer Reduktion von 48,02% (0 Gy) auf 25,43% ($p = < 0,001$). Der Anteil von Zellen in der G_2/M -Phase stieg von 25,76% (0 Gy) auf 65,87% ($p = < 0,001$). Einen Unterschied zwischen den allein bestrahlten Gruppen und den zusätzlich mit Iscador®M behandelten Gruppen gab es nicht. Messwerte und Signifikanzen sind in Tabelle 16 aufgeführt.

| | G ₁ /G ₀ -Anteil [%] bei 0 Gy | G ₁ /G ₀ -Anteil [%] bei 2 Gy | G ₁ /G ₀ -Anteil [%] bei 4 Gy | G ₁ /G ₀ -Anteil [%] bei 6 Gy |
|--------------------------|--|--|--|--|
| Bestrahlung | 48,02 (-) | 46,41 (0,54) | 41,52 (0,13) | 25,43 (< 0,001) |
| Bestrahlung + VAE | 50,33 (0,41) | 46,73 (0,87) | 44,03 (0,61) | 28,20 (0,56) |
| | | | | |
| | G ₂ /M-Anteil [%] bei 0 Gy | G ₂ /M-Anteil [%] bei 2 Gy | G ₂ /M-Anteil [%] bei 4 Gy | G ₂ /M-Anteil [%] bei 6 Gy |
| Bestrahlung | 25,76 (-) | 31,75 (0,15) | 45,58 (0,003) | 65,87 (< 0,001) |
| Bestrahlung + VAE | 27,60 (0,56) | 32,86 (0,80) | 43,43 (0,73) | 61,65 (0,44) |
| | | | | |
| | S-Anteil [%] bei 0 Gy | S-Anteil [%] bei 2 Gy | S-Anteil [%] bei 4 Gy | S-Anteil [%] bei 6 Gy |
| Bestrahlung | 22,72 (-) | 18,34 (0,24) | 9,78 (0,006) | 5,78 (0,002) |
| Bestrahlung + VAE | 18,29 (0,33) | 16,75 (0,62) | 9,82 (0,98) | 7,53 (0,31) |

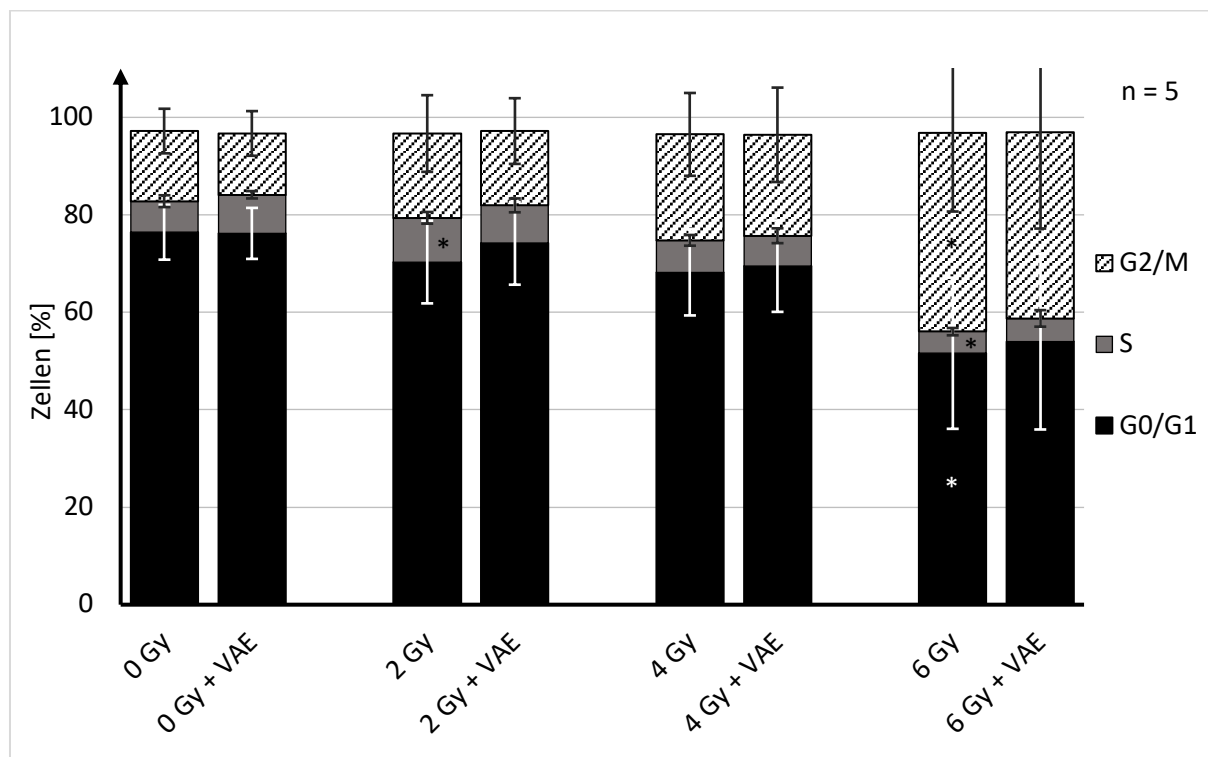
Tabelle 25: Übersicht Werte Zellzyklusanalyse MCF-7-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen

(Bei der Bestrahlung ist der Referenzwert für die Signifikanz bei 0 Gy, bei Bestrahlung + VAE sind es jeweils die Strahlendosen ohne Iscador[®]M-Zugabe. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

Abbildung 18 zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen bei den SK-BR-Zellen.

Abbildung 18: Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse SK-BR-3-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador[®]M

(Mittels * sind Signifikanzen aus Tabelle 26 markiert.)



Auch hier kam es zu einer Verschiebung der Zellanteile in den einzelnen Zellzyklusphasen nach Bestrahlung. In der S-Phase konnte bei 2 Gy einmalig eine Zunahme des S-Phase-Anteils im Vergleich zu 0 Gy gemessen werden. Der Zellanteil stieg von 6,37% (0 Gy) auf 9,07% ($p = 0,01$). Bei 6 Gy trat eine Erhöhung der Zellzahlen in der G₂/M-Phase ein (von 14,39% vs. 40,78%; $p = 0,03$). Parallel nahmen die Zellzahlen in der S- und G₁/G₀-Phase ab. In der S-Phase reduzierte sich der Zellanteil von

6,37% (0 Gy) auf 4,43% ($p = 0,03$) bei 6 Gy. In der G_1/G_0 -Phase sank der Zellanteil von 76,43% (0 Gy) auf 51,60% ($p = 0,03$). Eine Übersicht über die Messwerte der einzelnen Zellzyklusphasen sowie der Signifikanzwerte gibt Tabelle 26.

| | G_1/G_0 -Anteil [%] bei 0 Gy | G_1/G_0 -Anteil [%] bei 2 Gy | G_1/G_0 -Anteil [%] bei 4 Gy | G_1/G_0 -Anteil [%] bei 6 Gy |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Bestrahlung | 76,43 (-) | 70,32 (0,27) | 68,19 (0,16) | 51,60 (0,03) |
| Bestrahlung + VAE | 76,19 (0,95) | 74,15 (0,54) | 69,46 (0,85) | 54,01 (0,84) |
| | | | | |
| | G_2/M -Anteil [%] bei 0 Gy | G_2/M -Anteil [%] bei 2 Gy | G_2/M -Anteil [%] bei 4 Gy | G_2/M -Anteil [%] bei 6 Gy |
| Bestrahlung | 14,39 (-) | 17,30 (0,54) | 21,74 (0,18) | 40,78 (0,03) |
| Bestrahlung + VAE | 12,59 (0,59) | 15,25 (0,70) | 20,71 (0,88) | 38,21 (0,85) |
| | | | | |
| | S-Anteil [%] bei 0 Gy | S-Anteil [%] bei 2 Gy | S-Anteil [%] bei 4 Gy | S-Anteil [%] bei 6 Gy |
| Bestrahlung | 6,37 (-) | 9,07 (0,01) | 6,58 (0,81) | 4,43 (0,03) |
| Bestrahlung + VAE | 7,93 (0,07) | 7,78 (0,21) | 6,25 (0,73) | 4,73 (0,76) |

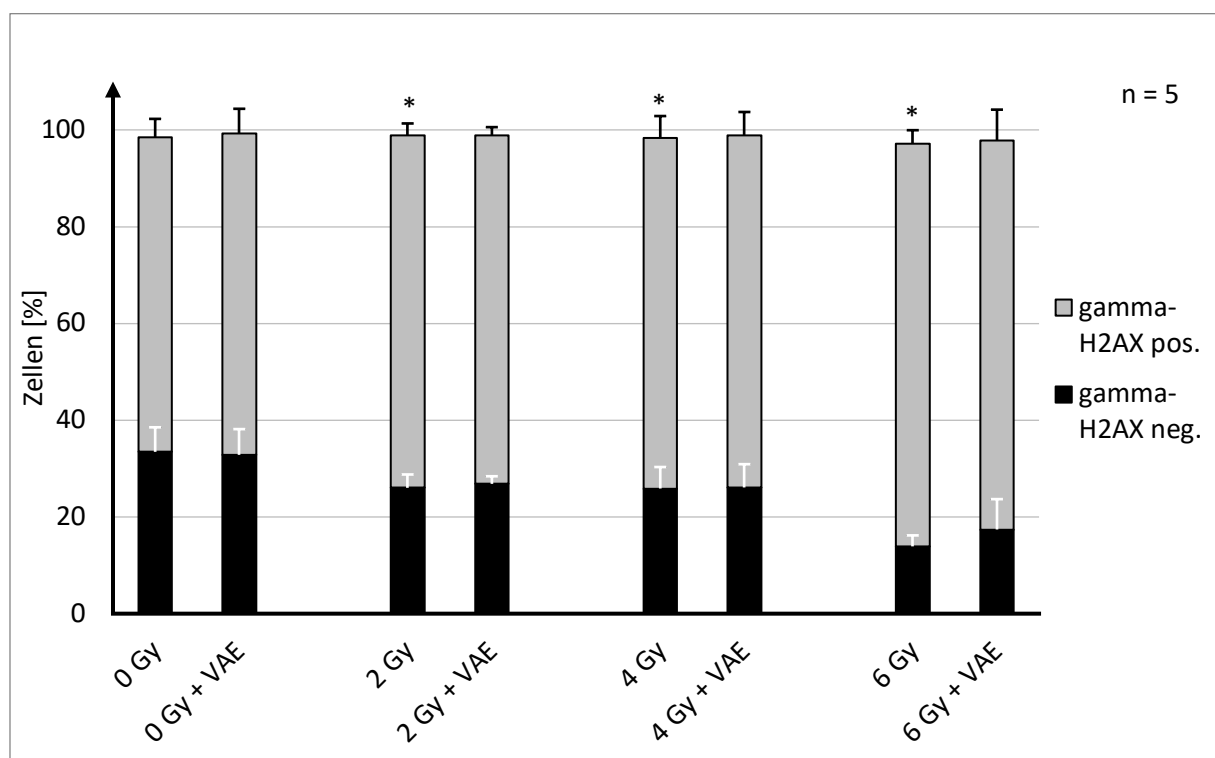
Tabelle 26: Übersicht Werte Zellzyklusanalyse SK-BR-3-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen

(Bei der Bestrahlung ist der Referenzwert für die Signifikanz bei 0 Gy, bei Bestrahlung + VAE sind es jeweils die Strahlendosen ohne Iscador®M-Zugabe. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

Im gleichen Versuchsaufbau wurde die Expression von γ -H2AX als Marker für den DNA-Schaden gemessen. Abbildung 19 gibt einen Überblick über die Verteilung bei den MCF-7-Zellen.

Abbildung 19: Messung Expression von γ -H2AX bei MCF-7-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador®M mittels Durchflusszytometrie

(Mittels * sind Signifikanzen aus Tabelle 27 markiert.)



Mit zunehmenden Strahlendosen stieg der Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen, während die γ -H2AX-negativen Zellen reduziert wurden. Dabei kam es zu einem Anstieg der γ -H2AX-positiven Zellen von 65,00% bei 0 Gy auf 72,80% bei 2 Gy ($p = 0,03$) und auf 83,25% bei 6 Gy ($p = < 0,001$). Die Strahlendosis von 4 Gy war mit 75,84% und einem p-Wert von 0,07 knapp nicht signifikant. Der Anteil an γ -H2AX-negativen Zellen bei 4 Gy wies jedoch mit einem p-Wert von 0,03 (33,45% vs. 26,40%) einen signifikanten Unterschied auf. Die Zugabe von Iscador[®]M führt im Verhältnis zur jeweiligen Strahlendosis zu keiner signifikanten Veränderung. Einen Überblick über die Messwerte und Signifikanzen gibt Tabelle 27.

| | γ -H2AX neg. [%] bei 0 Gy | γ -H2AX neg. [%] bei 2 Gy | γ -H2AX neg. [%] bei 4 Gy | γ -H2AX neg. [%] bei 6 Gy |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Bestrahlung | 33,45 (-) | 26,01 (0,01) | 26,40 (0,03) | 13,91 (< 0,001) |
| Bestrahlung + VAE | 32,83 (0,85) | 26,83 (0,60) | 26,09 (0,52) | 17,40 (0,36) |
| | | | | |
| | γ -H2AX pos. [%] bei 0 Gy | γ -H2AX pos. [%] bei 2 Gy | γ -H2AX pos. [%] bei 4 Gy | γ -H2AX pos. [%] bei 6 Gy |
| Bestrahlung | 65,00 (-) | 72,80 (0,03) | 75,84 (0,07) | 83,25 (< 0,001) |
| Bestrahlung + VAE | 66,39 (0,72) | 72,07 (0,66) | 72,79 (0,60) | 80,36 (0,43) |

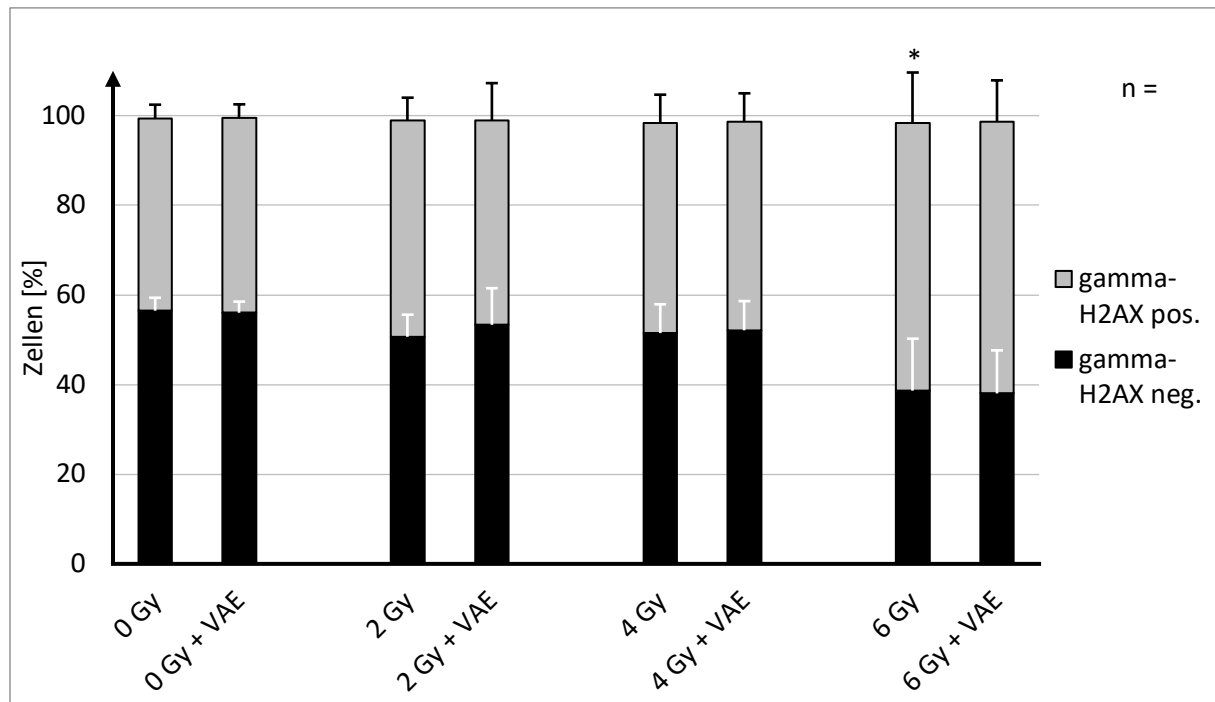
Tabelle 27: Übersicht Werte γ -H2AX-Expression der MCF-7-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador[®]M-Zugabe.

(Bei der Bestrahlung ist der Referenzwert für die Signifikanz bei 0 Gy, bei Bestrahlung + VAE sind es jeweils die Strahlendosen ohne Iscador[®]M-Zugabe. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

Die Ergebnisse der SK-BR-3-Zellen sind in Abbildung 20 dargestellt.

Abbildung 20: Messung Expression von γ -H2AX bei SK-BR-3-Zellen nach Bestrahlung +/- Iscador[®]M mittels Durchflusszytometrie

(Mittels * sind Signifikanzen aus Tabelle 28 markiert.)



Auch bei den SK-BR-3-Zellen kam es zu einer Erhöhung von γ -H2AX nach Bestrahlung. Diese zeigte sich jedoch erst signifikant bei 6 Gy Strahlendosis. Der Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen stieg von 42,83% (0 Gy) auf 59,75% ($p = 0,04$). Ein Einfluss von Iscador[®]M ließ sich statistisch nicht nachweisen. Tabelle 28 enthält die zugehörigen Messwerte mit Signifikanzniveau.

| | γ -H2AX neg. [%] bei 0 Gy | γ -H2AX neg. [%] bei 2 Gy | γ -H2AX neg. [%] bei 4 Gy | γ -H2AX neg. [%] bei 6 Gy |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Bestrahlung | 56,48 (-) | 50,66 (0,08) | 51,49 (0,21) | 38,64 (0,03) |
| Bestrahlung + VAE | 56,02 (0,82) | 53,33 (0,59) | 52,11 (0,90) | 38,02 (0,94) |
| | γ -H2AX pos. [%] bei 0 Gy | γ -H2AX pos. [%] bei 2 Gy | γ -H2AX pos. [%] bei 4 Gy | γ -H2AX pos. [%] bei 6 Gy |
| Bestrahlung | 42,83 (-) | 48,30 (0,11) | 46,93 (0,26) | 59,75 (0,04) |
| Bestrahlung + VAE | 43,43 (0,79) | 45,62 (0,60) | 46,57 (0,94) | 60,56 (0,91) |

Tabelle 28: Übersicht Werte γ -H2AX-Expression der SK-BR-3-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador[®]M-Zugabe.

(Bei der Bestrahlung ist der Referenzwert für die Signifikanz bei 0 Gy, bei Bestrahlung + VAE sind es jeweils die Strahlendosen ohne Iscador[®]M-Zugabe. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

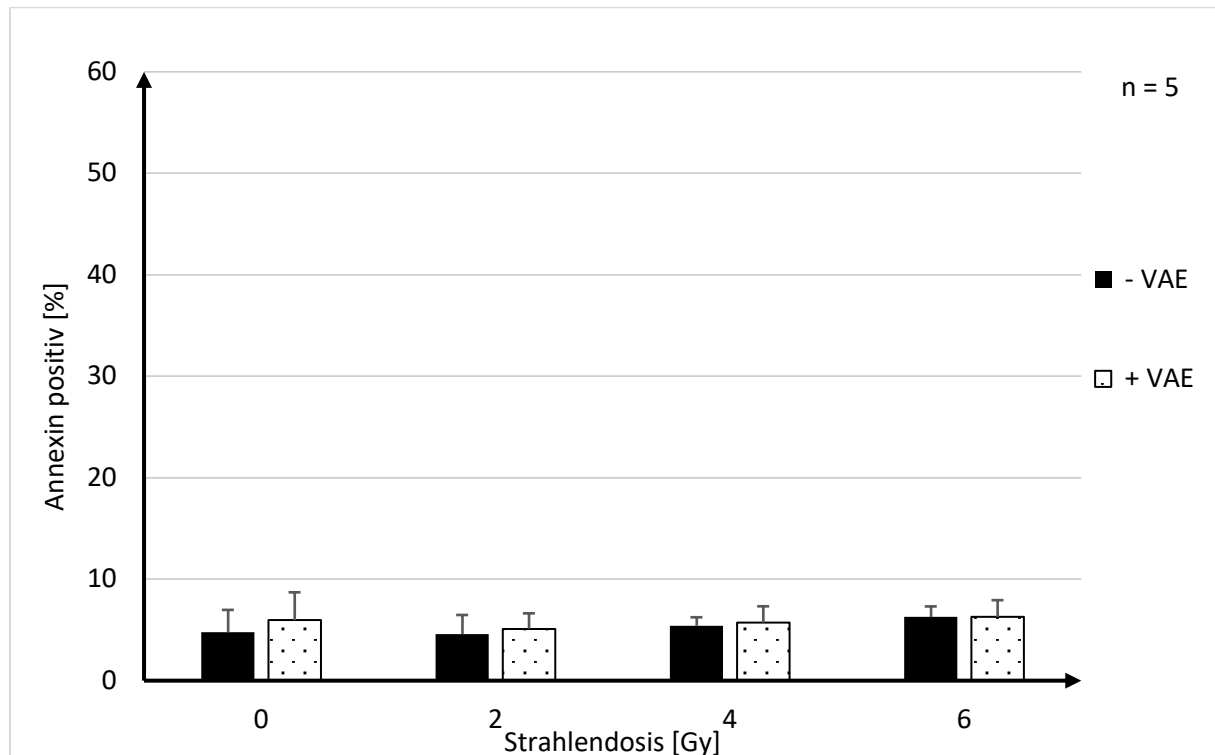
Insgesamt lässt sich aus den Daten ableiten, dass MCF-7-Zellen im Vergleich zu SK-BR-3-Zellen deutlich mehr γ -H2AX-Histone synthetisieren. Bei den MCF-7-Zellen lag der γ -H2AX-Anteil bei 0 Gy bereits bei 65%, während nur knapp 43% der SK-BR-3-Zellen γ -H2AX-positiv waren.

Mittels Zellzyklusanalyse und γ -H2AX-Assay wurden Strahlenwirkung und DNA-Reparatur untersucht. Ein weiterer wichtiger Strahlungseffekt ist die Apoptose. Das Apoptoseverhalten der Zelllinien und ein Einfluss von Iscador[®]M wurde im folgenden Versuch ermittelt.

4.5 Apoptoseverhalten unter Iscador[®]M und Bestrahlung

Die Ergebnisse für die MCF-7-Zellen zeigt Abbildung 21.

Abbildung 21: Darstellung der früh-apoptischen Zellen in der Durchflusszytometrie der MCF-7-Zellen



Mit Erhöhung der Strahlendosis kam es zu keiner Zunahme der früh-apoptischen Zellen. Auch eine Beeinflussung durch das Mistelextrakt war nicht zu erkennen. Der Vollständigkeit halber sind die Messwerte mit Signifikanzniveau in Tabelle 29 aufgeführt.

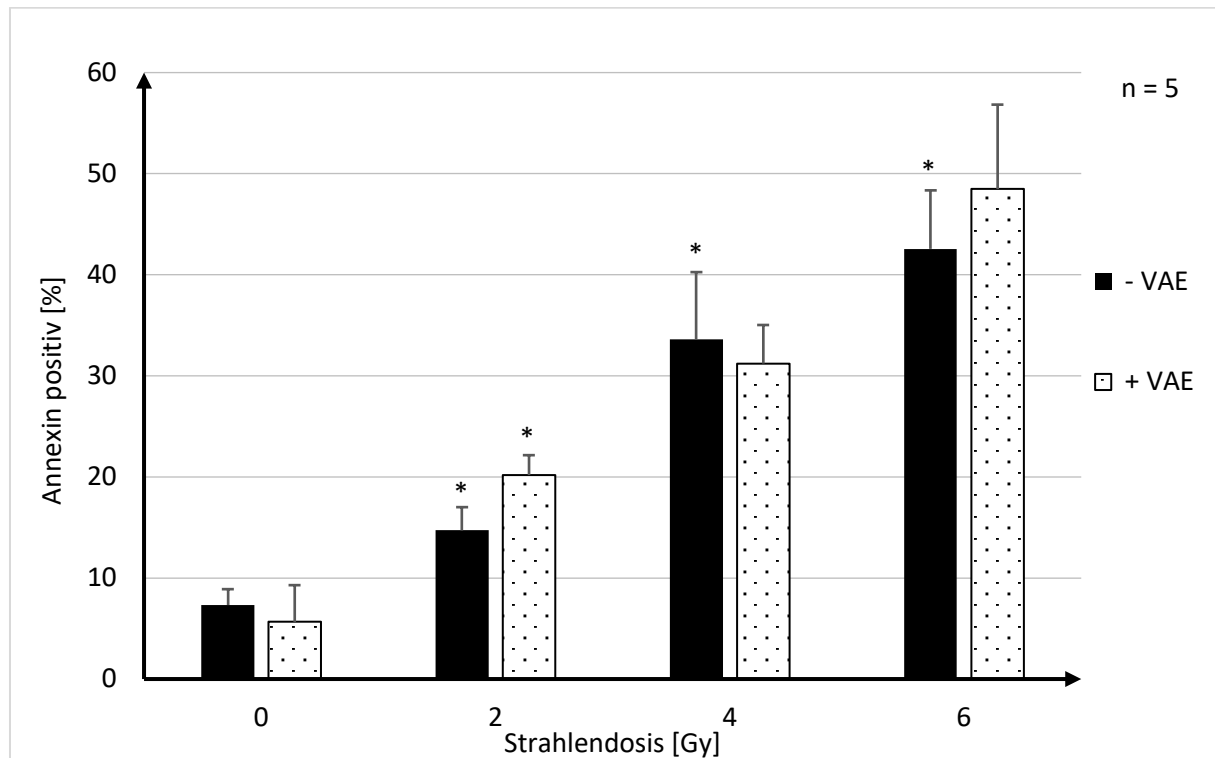
| | Annexin pos. [%] bei 0 Gy | Annexin pos. [%] bei 2 Gy | Annexin pos. [%] bei 4 Gy | Annexin pos. [%] bei 6 Gy |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Bestrahlung | 4,77 (-) | 4,59 (0,90) | 5,41 (0,61) | 6,26 (0,27) |
| Bestrahlung + VAE | 5,96 (0,52) | 5,12 (0,67) | 5,73 (0,74) | 6,28 (0,99) |

Tabelle 29: Übersicht über die Werte der Annexin positiven MCF-7-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador[®]M-Zugabe

(Bei der Bestrahlung ist der Referenzwert für die Signifikanz bei 0 Gy, bei Bestrahlung + VAE sind es jeweils die Strahlendosen ohne Iscador[®]M-Zugabe. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse für die SK-BR-3-Zellen dargestellt.

Abbildung 22: Darstellung der früh-apoptischen Zellen in der Durchflusszytometrie der SK-BR-3-Zellen
(Mittels * sind Signifikanzen aus Tabelle 30 markiert.)



Mit steigender Bestrahlungsdosis wurde ein größerer Anteil an früh-apoptischen Zellen beobachtet. Dieser ist, im Vergleich zu 0 Gy, für 2 Gy signifikant und für 4 Gy und 6 Gy hochsignifikant. Der Anteil Annexin-positiver Zellen stieg von 7,33% (0 Gy) auf 14,7% bei 2 Gy ($p = 0,001$), auf 20,18% bei 4 Gy ($p = < 0,001$) und auf 42,56% bei 6 Gy ($p = 0,001$). Beim Vergleich zwischen mit Iscador[®]M behandelten und nicht behandelten Zellen zeigt sich nur bei 2 Gy eine signifikante Erhöhung durch die Zugabe von Iscador[®]M (14,7% -VAE vs. 20,18% + VAE; $p = 0,008$). Die Messwerte sind in Tabelle 30 aufgeführt.

| | Annexin pos. [%] bei 0 Gy | Annexin pos. [%] bei 2 Gy | Annexin pos. [%] bei 4 Gy | Annexin pos. [%] bei 6 Gy |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Bestrahlung | 7,33 (-) | 14,7 (0,001) | 20,18 (< 0,001) | 42,56 (< 0,001) |
| Bestrahlung + VAE | 5,65 (0,43) | 20,18 (0,008) | 31,21 (0,55) | 48,47 (0,28) |

Tabelle 30: Übersicht über die Werte der Annexin positiven SK-BR-3-Zellen bei verschiedenen Strahlendosen mit und ohne Iscador[®]M-Zugabe

(Bei der Bestrahlung ist der Referenzwert für die Signifikanz bei 0 Gy, bei Bestrahlung + VAE sind es jeweils die Strahlendosen ohne Iscador[®]M-Zugabe. Der p-Wert ist in Klammern genannt, signifikante Werte fett/kursiv gedruckt.)

5 Diskussion

5.1 Bedeutung und Wirkung verschiedener Iscador®M-Konzentrationen – präklinische Forschung vs. reale Therapiebedingungen

Eine wesentliche Voraussetzung für die eigentlichen Versuchsreihen war zunächst die Bestimmung einer geeigneten Iscador®M-Dosis. Die verwendete Konzentration sollte bestenfalls mit der in der Misteltherapie erreichten Dosis im Körper vergleichbar sein, um die Ergebnisse der eigenen Forschung auf die klinische Therapie übertragen zu können. In den Überlegungen zur Dosisauswahl spielten 3 Aspekte eine zentrale Rolle, die die Bereiche Volumenberechnung, Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen und eigene Versuche zur Bestimmung umfassten.

Zunächst stellte sich heraus, dass eine reine klassische Volumenberechnung nicht zielführend war. Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 70 ml/kg und einem Körpergewicht von 65 kg wäre mit einer Einmalgabe Iscador®M 10 mg/ml in einer 5 ml Ampulle eine Blutkonzentration von 11,10 µg/ml möglich. Dies ist jedoch nur eine theoretische Berechnung. In der Fachinformation zu Iscador®M werden keine Angaben zu Verteilungsvolumen, Halbwertszeit oder Verstoffwechslung/Elimination aufgeführt (Weleda 2012), sodass eine genauere Berechnung nicht möglich war. Aktuell gibt es nur sehr wenige Studien, die sich mit der Pharmakokinetik von Mistelextrakten beschäftigen. 2010 veröffentlichten Huber et al. erstmals eine Studie zur Pharmakokinetik natürlicher Mistellektine nach subkutaner Injektion. Sie zeigten, dass die individuellen Blutkonzentrationen der Mistellektine in einem Zeitraum von 2 Wochen bei den einzelnen Probanden sehr unterschiedlich waren und stark schwankten. Die Berechnung einer gemittelten Halbwertszeit war nicht möglich, da die individuellen Halbwertszeiten zwischen 13 Minuten und 2 Wochen variierten. (Huber, Eisenbraun et al. 2010) Im klinischen Einsatz wird die geeignete Therapiedosis nicht anhand der Blutkonzentration, sondern durch die hervorgerufene lokale Hautreaktion bestimmt, die für jeden Patienten individuell ausfällt. Dieser Parameter des Monitorings entfällt in der präklinischen Forschung.

Im nächsten Schritt wurden die Versuchsdurchführungen anderer Arbeitsgruppen betrachtet. Dabei zeigte sich, dass auch die in Studien verwendeten Konzentrationen stark variierten. Beispielsweise arbeiteten Harmsma et al. 2006 mit Konzentrationen von 0 – 1,5 mg/ml Iscador®M während Weissenstein et al. 2016 Konzentrationen von 0 – 100 µg/ml Iscador®M nutzten. (Harmsma, Ummelen et al. 2006, Weissenstein, Kunz et al. 2016). Dabei wurden häufig in ein und derselben Studie mehrere Mistelextraktkonzentrationen parallel getestet.

Um sich dem Thema mit eigenen Versuchsreihen zu nähern, wurde zunächst der WST-1-Assay mit verschiedenen Iscador[®]M - und Bestrahlungsdosen durchgeführt. Bei der Konzentrationsbestimmung sollte idealerweise gleichzeitig eine mögliche Strahlentoxizität berücksichtigt werden. Für die MCF-7-Zellen war im Assay bei keiner Inkubationszeit eine Proliferationshemmung nachzuweisen, nicht einmal durch die Bestrahlung. Die SK-BR-3-Zellen zeigten eine signifikante Beeinflussung durch die Strahlendosen 4 Gy und 6 Gy, allerdings war ein zusätzlicher Effekt durch das Mistelextrakt erst bei einer Dosis von 50 µg/ml erkennbar. Dieser Effekt zeigte sich bei beiden Inkubationszeiten, nach 7 Tagen allerdings deutlicher als nach 5 Tagen. Eine Ursache für den fehlgeschlagenen Versuch könnte eine zu hohe Zellzahl pro Well gewesen sein. Die Empfehlungen laut Hersteller Fa. Roche lagen bei 7.000 Zellen pro Well in 100 µl. Aufgrund der zusätzlichen Bestrahlung wurde eine höhere Zellzahl mit insgesamt 13.500 Zellen in 100 µl gewählt, um den direkten Zellverlust durch Strahlenschäden auszugleichen. Weissenstein et al. hatten 2016 in ihrem WST-1-Assay zur Testung von Iscador[®]M ebenfalls MCF-7-Zellen mit einer Zellzahl von 15.000 pro Well in 100 µl gewählt und bei einer Inkubationszeit von 3 und 7 Tagen deutliche Ergebnisse erzielt (Weissenstein, Kunz et al. 2016). 2019 führten sie in einer anderen Studie nochmals einen WST-1-Assay mit MCF-7-Zellen und Iscador[®]M durch. Die Zellzahl pro Well lag bei nur bei 4.000 und die Inkubationszeit betrug wieder 7 Tage. Auch hier gab es verwertbare Ergebnisse. In den vorliegenden Daten konnte keine Erklärung gefunden werden, warum das Mistelextrakt nur bei den SK-BR-3-Zellen in höchster Konzentration einen Effekt gezeigt. Die Inkubationszeit mit 7 Tagen schien ausreichend gewesen zu sein, da bei 50 µg/ml nach 5 und 7 Tagen eine signifikante Proliferationshemmung nachweisbar war.

Aufgrund der Unterschiede zwischen den eigenen Ergebnissen des Proliferationsassays und den Angaben in der Literatur, erfolgte zur LD₅₀-Bestimmung zusätzlich ein CFA. Bei den MCF-7-Zellen ließ sich die LD₅₀ abschließend nicht bestimmen, da bei einer Dosis von 50 µg/ml Iscador[®]M die SF noch bei 59% lag. Für die SK-BR-3-Zellen ließ sich die LD₅₀ auf einen Bereich von 10 – 20 µg/ml Iscador[®]M eingrenzen.

Beide Versuche (WST-1 und CFA) ergaben unabhängig voneinander, dass die verwendeten Mammakarzinomzelllinien unterschiedlich auf eine Behandlung mit Iscador[®]M ansprechen. Dies bestätigen auch eine Vielzahl anderer Studien. Beispielsweise untersuchten Kelter et al. 2007 mehrere Mistelextrakte in Bezug auf Zytotoxizität und Wachstumsstimulation bei verschiedenen Tumorzelllinien (u. a. Adenokarzinome von Pankreas, Mamma, Prostata, Lunge, Kolon, Harnblase sowie Lymphom- und Sarkomzellen). Sie zeigten, dass alle Tumorzelllinien (auch mehrere Zelllinien gleichen Ausgangsgewebes) individuell auf eine Behandlung mit Mistelextrakt reagieren. Das Verhalten einer Zelllinie nach Behandlung mit verschiedenen Mistelextrakten (hier Helixor P, M und

A) war für jedes Präparat anders und erforderte individuelle Dosierungen. (Kelter, Schierholz et al. 2007)

Zusammenfassend scheint die Beziehung zwischen Mistelextrakt, Dosis und Tumorzelllinie äußerst komplex zu sein. Für eine exakte Beurteilung müsste für jede Zelllinie eine individuelle Dosis in der Behandlung mit einem Mistelextrakt gleicher Charge getestet werden. Da die Inhaltsstoffe der Mistelextrakte variieren, sollte auch nach Wechsel einer Charge eine erneute Testung erfolgen. Dies erhöht den Aufwand einer Forschung mit Mistelextrakten enorm. Aus diesem Grund scheint es sinnvoll bei der Arbeit mit verschiedenen Zelllinien auch gleichzeitig mit mehreren Mistelextraktdosierungen zu arbeiten. Dieses Prinzip wird von vielen Arbeitsgruppen bereits angewandt.

Beim Versuch die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse in Bezug auf die Zytotoxizität auf den klinischen Einsatz der Misteltherapie zu übertragen, zeigen sich Schwierigkeiten. Wichtige Ziele der wissenschaftlichen Forschung sind eine nachweislich erfolgreiche Behandlung bei parallel größtmöglicher Patientensicherheit. Dafür werden Unmengen von Daten erhoben, Messungen durchgeführt und Statistiken berechnet. Die Misteltherapie selbst basiert auf Grundsätzen der anthroposophischen Medizin, der in ihren Grundzügen eher Gedankengänge und Theorien zu Grunde liegen. Der wissenschaftliche Nachweis erfolgt hier meist sekundär. Als ein entscheidender Faktor für den Erfolg einer Misteltherapie wird vor allem die Erfahrung des Behandlers genannt (Girke 2012, Fintelmann 2016). Für eine direkte Übertragung der wissenschaftlichen Erkenntnisse müsste die Misteltherapie grundlegend umgestellt werden. Zunächst wäre eine individuelle Testung des Tumorgewebes nötig, in welcher Dosierung ein optimaler Therapieeffekt des zu verwendenden Mistelpräparates erreicht werden kann. Eine Dosiskontrolle müsste mittels regelmäßiger Blutspiegelbestimmungen erfolgen. Dies wäre für die anthroposophische Medizin wahrscheinlich genauso undenkbar, wie für die Wissenschaft eine Dosiskontrolle mittels lokaler Hautreaktion. Sind also Wissenschaft und anthroposophische Medizin miteinander vereinbar?

5.2 Beeinflusst Iscador®M das Zellüberleben unter Bestrahlung?

Die Ergebnisse im CFA waren für beide Zelllinien sehr unterschiedlich. Das Zellüberleben der MCF-7-Zellen wurde bei einer Strahlendosis von 6 Gy und Zugabe von Mistelextrakt signifikant reduziert. Bei den SK-BR-3-Zellen zeigte sich ein gegenteiliger Effekt. Das Zellüberleben verbesserte sich bei 6 Gy Bestrahlung und Zugabe von Mistelextrakt signifikant.

Auch in diesem Experiment spiegelt sich das bereits beschriebene individuelle Ansprechen von Zelllinien auf Mistelextrakt wider. Interessanterweise kommt es bei MCF-7-Zellen zu einer

signifikanten Reduktion des Zellüberlebens durch die Zugabe von 10 µg/ml Iscador®M, obwohl diese Dosis in vorherigen Versuchen keinen Effekt zeigte. Es wäre denkbar, dass die Wirkung des Iscador®M durch Bestrahlung potentiell werden könnte. Zur Bestätigung wäre eine weitere Versuchsreihe mit verschiedenen Iscador®M-Dosierungen in Kombination mit Bestrahlung sinnvoll.

Gründe für die reduzierte Strahlensensibilität der SK-BR-3-Zellen könnte eine Studie von Kim et al. von 2010 liefern. Sie untersuchten protektive Effekte von koreanischem Mistellektin auf die Bildung freier Radikale. Dabei konnten sie zeigen, dass bei renalen Epithelzellen vom Schwein die Zugabe von Mistellektinen zu einer reduzierten Bildung von Hydroxyl- und Sauerstoffradikalen führte. Da die Radikalbildung einen wesentlichen Mechanismus der sekundären Strahlenwirkung darstellt, könnte dies ein Hinweis für die reduzierte Strahlensensibilität sein. (Kim, Choi et al. 2010)

Vereinzelt gab es Hinweise für eine stimulierende Wirkung von Mistellektinen in Bezug auf das Wachstum einiger weniger Tumorzelllinien. So kam es beispielsweise in einer Studie von Gabius et al. 2001 bei 2 Zelllinien (benigne Prostatahyperplasie und Liposarkom) zu einer Zellproliferation bei sehr niedrigen Mistellektinkonzentrationen von 1 ng/ml. Ab einer Dosis von 10 ng/ml Mistellektin überwog allerdings die Zytotoxizität (Gabius, Darro et al. 2001). Die überwiegende Mehrheit von Daten der präklinischen Forschung belegte, dass Mistelpräparate entweder einen zytoreduktiven Effekt unterschiedlichen Ausmaßes hatten oder sich kein Effekt nachweisen ließ (Burger, Mengs et al. 2001, Gabius, Darro et al. 2001, Pryme, Bardocz et al. 2006, Kelter, Schierholz et al. 2007).

Zur Sicherung der eigenen Ergebnisse könnte die Stichprobenanzahl erhöht werden, denn sie lag mit 7 unabhängigen Versuchen im unteren Bereich. In diesem Versuchsaufbau wurde das Mistelextrakt direkt im Anschluss an die Bestrahlung zugegeben. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Zellkultur permanent mit Mistelextrakt, bereits auch vor und zum Zeitpunkt der Bestrahlung, zu versetzen. Möglicherweise könnte eine gegenüber Mistelextrakt resistente Zellpopulation selektiert werden, deren Strahlensensibilität sich genauer untersuchen lässt. Es wäre ebenfalls denkbar, dass Molekülstrukturen im Mistelextrakt durch eine Bestrahlung verändert werden und sich dies auf die Wirksamkeit auswirkt. Um die gewonnenen Daten besser in Bezug auf ihre klinische Relevanz einschätzen zu können, bedarf es einer Anpassung des Versuchsaufbaus.

Aktuell gibt es nur sehr wenige wissenschaftliche in-vitro Studien zur Kombination aus Bestrahlung und Mistelextrakt in der Tumorthherapie. Bereits 1999 vermuteten Kubasova et al., dass die Kombination von Mistellektin und Bestrahlung in Tumorzellen zu Stresseffekten führt, die sie mit einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zellen begründeten (Kubasova, Petcu et al. 1999). Hostanska et al. führten 2003 Proliferationsassays bei der Adenokarzinomzelllinie des Kolons SW480 durch, nachdem sie mit Bestrahlung und rekombinanten Mistellektinen behandelt wurden. Sie

beschrieben einen additiven Effekt von rekombinantem Mistellektin in Kombination mit einer Bestrahlung von 5 Gy im Vergleich zur Zugabe von Mistellektinen oder Bestrahlung allein. Genauere Messwerte oder Angaben zu Signifikanz wurden nicht benannt. (Hostanska, Vuong et al. 2003)

Es sollte auch beachtet werden, dass in der klassischen adjuvanten Strahlentherapie keine Einzeitbestrahlung mit bis zu 6 Gy durchgeführt wird. Um die Relevanz der Ergebnisse in Bezug auf die Klinik zu überprüfen, wäre eine Versuchsreihe mit fraktionierter Bestrahlung und real verwendeten Strahlendosen nötig. Eine Aussage in Bezug auf die mögliche Beeinflussung einer Strahlentherapie durch die Verwendung von Mistelextrakt ist vorher nicht mit Sicherheit möglich. Die Wichtigkeit der Beantwortung dieser Frage ergibt sich aus dem fast obligaten Einsatz der Strahlentherapie beim Mammakarzinom und dem Anteil der Patientinnen, die parallel eine Misteltherapie nutzen. Laut Drozdoff et al. greifen fast dreiviertel (74,1%) der Mammakarzinompatientinnen auf komplementärmedizinische Verfahren zurück und davon gut ein Viertel (25,3%) auf die Misteltherapie (Drozdoff, Klein et al. 2018). Bei 69.220 Neuerkrankungen pro Jahr aus den Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. Berlin 2017) läge die Prävalenz für eine Misteltherapie rechnerisch bei ca. 17.500 Frauen pro Jahr.

5.3 Wie wird die Strahlenwirkung durch Mistelextrakt beeinflusst?

Zu den wesentlichen Mechanismen in der Strahlenwirkung zählen vorrangig Zellzyklusarrest, DNA-Schäden und Apoptose- bzw. Nekroseinduktion. Aus diesem Grund wurden zur Klärung der Frage, inwieweit die Strahlenwirkung durch Mistelextrakt beeinflusst wird, Assays ausgewählt, die diese zugrundeliegenden radiobiologischen Mechanismen untersuchen.

In der Zellzyklusanalyse kam es bei beiden Zelllinien nach Bestrahlung zum erwarteten Zellzyklusarrest mit Erhöhung der Zellzahl in der G₂-/M-Phase zu Gunsten einer Verringerung der Zellzahlen in G₀-/G₁-Phase und S-Phase. Die MCF-7-Zellen zeigten sich auch hier strahlensensibler im Vergleich zu den SK-BR-Zellen. Zwischen allein bestrahlten und zusätzlich mit Mistelextrakt behandelten Zellpopulationen ergab sich kein Unterschied.

Mistelextrakt wird in der Literatur eine hemmende Wirkung auf Proteinbiosynthese und den Zellzyklus nachgesagt (Harmsma, Ummelen et al. 2006, Kovacs 2010, Hong, Park et al. 2014). Dies konnte in Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen durch in-vitro-Forschung belegt werden. Harmsma et al. arbeiteten 2006 unter anderem ebenfalls mit MCF-7-Zellen und untersuchten Zellzyklus und Tumorüberleben unter Einfluss von Mistelextrakt (hier Iscador®Qu). In ihrem Paper beschrieben sie bei steigenden Iscador®Qu-Konzentrationen zunächst eine leichte Zunahme des S-

Phase-Anteils bei anschließender Abnahme. Allerdings waren die verwendeten Iscador®Qu-Konzentrationen von 0,0625 mg/ml bis 1 mg/ml deutlich höher als in den hier durchgeführten Versuchen. Zudem wurde ein anderes Mistelextrakt verwendet (Iscador®Qu statt Iscador®M), welches aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Inhaltsstoffe nicht direkt vergleichbar ist. (Harmsma, Ummelen et al. 2006)

Weissenstein et al. berichteten 2016 in ihrem Paper zum Thema Interaktionen zwischen proliferationshemmendem Mistelextrakt und Trastuzumab über einen signifikanten Einfluss von Mistelextrakt auf den Zellzyklus. Sie verwendeten SK-BR-3-Zellen und konnten bei alleiniger Zugabe von 10 µg/ml Iscador®M hochsignifikante Verschiebungen (p -Wert < 0,0001 mittels f-Test) in den einzelnen Zellzyklusphasen zeigen. So stieg die Zellzahl in der G₂-/M-Phase nach Zugabe des Mistelextraktes von 7% auf 11%, der Anteil in der S-Phase fiel von 31% auf 24% und die Zellzahl in der G₀/G₁-Phase blieb mit 61% statt 60% fast identisch. Die Inkubationszeit betrug bis zur Auswertung 3 Tage. Bei niedrigeren Iscador®M-Konzentrationen zeigte sich kein Effekt. (Weissenstein, Kunz et al. 2016)

2019 veröffentlichte Weissenstein ein weiteres Paper zum Thema Interaktionen zwischen Mistelextrakt und Tamoxifen-Therapie beim Mammakarzinom. Es wurden wieder Zellzyklusanalysen durchgeführt, diesmal allerdings mit MCF-7-Zellen. Wie 2016 wurde auch hier Iscador®M verwendet, allerdings in höheren Konzentrationen (10 µg/ml und 100 µg/ml). Zusätzlich wurden die Messungen mit und ohne Östrogenzusatz im Medium durchgeführt, da MCF-7-Zellen Östrogenrezeptor positiv sind. Zu einer Zellzahlerhöhung in G₂-/M-Phase (von 9,09% auf 11%) kam es nur bei Zugabe von 100 µg/ml Iscador®M unter Östrogeneinfluss. Bei 10 µg/ml Iscador®M zeigte sich kein Effekt. Ohne Östrogenzugabe konnte ein signifikanter Effekt mit G₂-/M-Erhöhung nur bei 100 µg/ml Iscador®M nachgewiesen werden. Alle anderen Zellzyklusphasen veränderten sich nicht signifikant. Die Inkubationszeit betrug wieder 3 Tage. (Weissenstein, Kunz et al. 2019)

2014 wurde ein Paper von Hong et al. veröffentlicht, in dem synergistische Effekte zwischen koreanischen Mistellektinen und Doxorubicin an Mammakarzinomzelllinien untersucht wurden. Sie beschrieben einen leichten Zellzyklusarrest von MCF-7-Zellen bei bereits 10 ng/ml Mistellektin ohne Angaben zu genauen Werten oder Signifikanzen. (Hong, Park et al. 2014)

Ein Einfluss des Mistelextraktes auf den Zellzyklus ließ sich hier in diesem Versuch nicht nachweisen. Da ein Zellzyklusarrest durch Bestrahlung induzierbar war, schien der Versuchsaufbau prinzipiell stimmig zu sein. Durch die Auswertung 24 Stunden nach Bestrahlung und Iscador®M-Zugabe war die Inkubationszeit für das Mistelextrakt relativ kurz (vgl. Weissenstein et al. 2016/2019 mit 3 Tagen) (Weissenstein, Kunz et al. 2016, Weissenstein, Kunz et al. 2019). Analog zur Interpretation der Daten

des CFA wäre eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Mistelextrakt oder die Versuchswiederholung mit einer Population selektierter Mistelextrakt-resistenter Zellen denkbar. Auch die errechnete Standardabweichung als Fehler war relativ groß und könnte durch gesteigerte Versuchszahlen reduziert werden.

Mit Erhöhung der Strahlendosis kam es zu einer zunehmenden Expression des Reparaturhistones γ -H2AX. Dieser wird als Marker für DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüche, Nukleotidexzision oder Crosslink-Reparatur verwendet und steigt bei Zellschädigung (z. B. durch ionisierende Strahlung) an (Paull, Rogakou et al. 2000, Revet, Feeney et al. 2011). In den hier durchgeführten Versuchen stieg der Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen bei beiden Zelllinien erwartungsgemäß mit zunehmender Strahlendosis an. Je höher die Strahlendosis ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit für Strahlenschäden. Da der Anteil γ -H2AX-positiver Zellen bei den MCF-7-Zellen bereits ohne Bestrahlung deutlich höher war als bei den SK-BR-3-Zellen, lässt dies auf ein erhöhtes Reparaturpotential für DNA-Doppelstrangbrüche schließen. Eine Beeinflussung durch das Mistelextrakt war nicht erkennbar.

Wie bereits bei den vorherigen Versuchen erwähnt, sollten auch diese Ergebnisse durch gesteigerte Versuchswiederholungen präzisiert werden. Bei den MCF-7-Zellen ist der Wert bei den γ -H2AX-positiven Zellen bei 4 Gy knapp nicht signifikant. Dies könnte sich durch zusätzliche Messwerte ändern. Um einen möglichen Einfluss durch Mistelextrakt zu detektieren, wären auch hier Versuche mit verlängerter Inkubationszeit und/oder selektierten Iscador[®]M-resistenten Zellen sinnvoll.

Im Apoptose-Assay mittels Annexin wurde die Population der früh-apoptotischen Zellen näher untersucht. Bei den MCF-7-Zellen blieb der Anteil an Zellen in der früh-apoptotischen Phase über alle Strahlendosen hinweg konstant. Eine Beeinflussung durch Iscador[®]M war nicht erkennbar. Da kein Bestrahlungseffekt nachweisbar war, sollte der Versuchsaufbau modifiziert werden.

Höchstwahrscheinlich war die Inkubationszeit mit 72 Stunden zu lang gewählt. Die Auswertung der anderen Zellpopulationen (spät-apoptotisch und nekrotisch) könnte dazu Hinweise liefern. Alternativ wäre auch die Auswahl eines anderen Assays, z. B. mittels Caspasen, denkbar. Im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen war bei den SK-BR-3-Zellen durchaus ein Bestrahlungseffekt erkennbar. Mit steigenden Strahlendosen erhöhte sich der Anteil früh-apoptotischer Zellen signifikant. Durch Zugabe von Iscador[®]M zeigte sich bei einer Strahlendosis von 2 Gy ein signifikant höherer Anteil des früh-apoptotischen Anteils, jedoch nicht bei 4 Gy und 6 Gy. Zur Klärung der Frage nach Relevanz wären zusätzliche Versuchsdurchführungen nötig, die den Fehler reduzieren könnten. Bisher wurde der Versuch 5-mal wiederholt. Auch hier wäre die Betrachtung der restlichen Zellpopulationen

interessant. Wie bei den vorherigen Assays könnte auch diese Versuchsreihe noch mit Zellen durchgeführt werden, die dauerhaft in Iscador®M kultiviert werden.

Harmsma et al. zeigten in Ihrem Paper 2006 zum Thema Effekte von Mistelextrakten auf Zellzyklus und Überleben von Tumorzellen, dass das Apoptoseverhalten von Zellen durch Iscador®-Präparate unterschiedlich beeinflusst werden kann. Sie verwendeten dafür eine HUVEC-Zelllinie und untersuchten nach Zugabe von verschiedenen Dosen Iscador®M und Qu (Kontrollgruppe, Äquivalent zur klinischen Dosis und Maximaldosis) die Zellen auf Apoptose mittels Annexin-Assay. Nach Zugabe von 0,09 mg/ml Iscador®M fiel der Anteil apoptotischer Zellen von 9,2% in der Kontrollgruppe zunächst auf 7% und stieg nach Maximaldosis von 1,5 mg/ml auf 66% an. (Harmsma, Ummelen et al. 2006)

Andere Studien belegen, dass die Augmentation einer Therapie mit Mistelpräparaten die Apoptoserate von Tumorzellen steigern kann. Weissenstein et al. führten 2016 Apoptoseassays mittels Annexin V an SK-BR-3-Zellen durch, um eine Therapiekombination aus Trastuzumab und Iscador®M zu untersuchen. Bei einer Zugabe von 10 µg/ml Trastuzumab und 10 µg/ml Iscador®M stieg nach 3 Tagen Inkubationszeit der Anteil an früh-apoptotischen Zellen von 4,9% auf 32,6% (im Vergleich zu 10 µg/ml Trastuzumab). Bei geringeren Iscador®-M-Dosierungen ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. (Weissenstein, Kunz et al. 2016)

Eine weitere Studie wurde von Hong et al. 2014 veröffentlicht, die synergistische Effekte zwischen koreanischen Mistellektinen und Doxorubicin an Mammakarzinomzelllinien belegte. Sie untersuchten das Apoptoseverhalten von MCF-7-Zellen nach Zugabe von 100 ng/ml Mistellektin, 100 ng/ml Doxorubicin und der Kombination aus beiden. Die Auswertung erfolgte nach 48 Stunden Inkubationszeit. Dabei stieg der Anteil früh-apoptotischer Zellen von 0,16% auf 1,77% nach der Zugabe von Doxorubicin und auf 5% nach der Behandlung mit Mistellektin. Die Kombination aus beiden führte zu einem Anstieg auf 9,73%. Zu Signifikanzen gab es keine Angaben. (Hong, Park et al. 2014) Diese Ergebnisse stützen auch die Theorie, dass im eigenen Apoptoseassay die Inkubationszeit für die MCF-7-Zellen zu lang gewählt war.

Die Frage ob Mistelextrakt radiobiologische Mechanismen beeinflusst, lässt sich nicht abschließend beantworten. Aus den durchgeführten Versuchen ergaben sich darauf bisher zwar konkret keine Hinweise, allerdings sollten zunächst weitere Versuchsreihen mit modifizierten Konzepten durchgeführt werden. In der Literatur wird häufig beschrieben, dass die Augmentation einer Standardtherapie mit Mistelextrakt zu synergistischen Effekten führt (vgl. z. B. Weissenstein et al. 2016, Hong et al. 2014 oder Hostanska 2003) (Hostanska, Vuong et al. 2003, Hong, Park et al. 2014,

Weissenstein, Kunz et al. 2016). Dies ist einer der Gründe, warum die Strahlenwirkung unter Einfluss von Mistelextrakten weiter untersucht werden sollte.

5.4 Bedeutung der Ergebnisse

Betrachtet man die bisherige Forschung zur Misteltherapie, so lassen sich die Ergebnisse in 2 Gruppen unterteilen. Dabei stehen der Einfluss von Mistelextrakt auf die Tumorzellen selbst, das Immunsystem sowie Synergieeffekte mit anderen Therapieregimen auf der einen und der Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten auf der anderen Seite.

Wie bereits angesprochen, beschäftigt sich ein Teil der klinischen Forschung mit dem Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten, therapieassoziierter Nebenwirkungen, Gesamtüberleben und Verträglichkeit des Mistelextraktes selbst. Dabei soll Misteltherapie zu einer signifikanten Reduktion therapiebedingter Nebenwirkungen und Verlängerung des Gesamtüberlebens führen (Bock, Friedel et al. 2004, Piao, Wang et al. 2004). Eisenbraun et al. berichteten zusätzlich über eine gute Verträglichkeit der Misteltherapie (Eisenbraun, Scheer et al. 2011). Ähnliches beschrieben auch Pelzer et al. 2018 (Pelzer, Troger et al. 2018).

Freuding et al. veröffentlichten 2019 2 Reviews, in denen sie systematisch Studien zu den Themen Überleben und Sicherheit (Teil 1) sowie Lebensqualität und Toxizität (Teil 2) auswerteten. Eingeschlossen wurden insgesamt 28 randomisierte, kontrollierte Studien. Im ersten Teil kamen sie zu dem Schluss, dass eine Misteltherapie keinen Vorteil in Bezug auf das Gesamtüberleben brächte. Sie bemängelten in den untersuchten Studien meist eine unzureichende Qualität in der Methodik und Interessenkonflikte in Bezug auf pharmazeutische Unternehmen. Auch wurden von 28 eingeschlossenen Studien insgesamt 12 Paper von nur 2 Arbeitsgruppen veröffentlicht. Eine unabhängige Betrachtung der Daten sei somit nicht möglich. (Freuding, Keinki et al. 2019)

Im zweiten Teil ermittelten 17 der eingeschlossenen Studien eine Verbesserung der Lebensqualität. Studien von höherer methodischer Qualität hätten allerdings keine oder nur eine geringe Steigerung ergeben. Größter Kritikpunkt war, dass eine Verblindung aufgrund der Lokalreaktion nicht möglich gewesen wäre und Placeboeffekte nicht sicher ausgeschlossen werden könnten. Zudem sei die Beurteilung der eigenen Lebensqualität sehr subjektiv und anfällig für den Placeboeffekt. (Freuding, Keinki et al. 2019)

Es wurde häufig kritisiert, dass die Methodik der Studien in ihrer wissenschaftlichen Qualität nicht ausreichend sei (vgl. Freuding 2019) (Freuding, Keinki et al. 2019, Freuding, Keinki et al. 2019). In der S3-Leitlinie zum Mammakarzinom konnte für die Misteltherapie aufgrund mangelnder Evidenz für eine Verbesserung der Lebensqualität und fehlende Verlängerung des Gesamtüberlebens keine

Empfehlung ausgesprochen werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe et al. 2017). Doch sollte das Fehlen einer Empfehlung nicht mit dem konsequenten Ablehnen der Misteltherapie gleichgesetzt werden. In Studien gab es bisher keine Hinweise, dass eine Misteltherapie das Gesamtüberleben verkürzt oder die Lebensqualität verschlechtert. Wäre es sinnvoll die minimale Anforderung an die Forschung soweit abzumildern, dass es nicht mehr um den Nachweis einer Verbesserung, sondern um den Ausschluss eines nachteiligen Effektes geht? Mit dem wissenschaftlichen Nachweis, dass eine komplementär begleitende Misteltherapie keinen Schaden für den Patienten verursacht, könnte, nach entsprechender Aufklärung, dem Patienten die Entscheidung zur Therapie selbst überlassen werden. Es läge in seinem Ermessen inwiefern er, trotz Aufwand (z. B. mehrfache wöchentliche Subkutaninjektionen) und Begleiterscheinungen (z. B. Lokalreaktion), einen möglichen Benefit durch die Misteltherapie für sich sieht. Selbst wenn ein Erfolg der Therapie nur auf einem Placeboeffekt beruht, sollte das wesentliche Argument doch der Profit für den Patienten und nicht die fehlende Evidenz sein. Zu diskutieren bleibt, ob für eine Therapie ohne Empfehlung einer Leitlinie die Kosten von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen werden sollten.

Die einmalige Bestrahlung zweier Mammakarzinomzelllinien in dieser Arbeit hat gezeigt, dass bei Strahlendosen von 6 Gy die Zellproliferation sowohl gehemmt als auch induziert werden kann. Assays zum Wirkmechanismus des Mistelextraktes unter Bestrahlung zeigten keine signifikanten Ergebnisse. Eindeutig nachgewiesen ist, dass Zelllinien generell sehr individuell auf einzelne Präparate sowie Konzentrationen einer Misteltherapie ansprechen, auch im Rahmen einer Bestrahlung (vgl. exemplarisch Kelter et al. 2007) (Kelter, Schierholz et al. 2007). Die Frage inwieweit eine Misteltherapie mit Iscador[®]M Einfluss auf eine Strahlentherapie nimmt und auch, ob dem Patienten ein Schaden entstehen könnte, lässt sich mit den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit nicht abschließend beurteilen. Es bedarf weiterer Forschung mit Versuchsmodellen, die den klinischen Einsatz einer Bestrahlungstherapie besser abbilden.

6 Zusammenfassung

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde untersucht, ob das Mistelpräparat Iscador®M einen Einfluss auf eine Bestrahlung von Mammakarzinomzelllinien hat. Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau und in den meisten Fällen erfolgt im Rahmen einer multimodalen Therapie eine adjuvante Bestrahlung. Die Misteltherapie ist Teil der anthroposophischen Medizin und wird seit ca. 1 Jahrhundert bereits in der Tumorthherapie eingesetzt. Zu den nachgesagten Wirkungen zählen neben zytotoxischen Eigenschaften, Angiogenesehemmung und Immunstimulation auch eine Verbesserung der Lebensqualität und Reduktion therapieassoziierter Nebenwirkungen. Komplementärmedizinische Therapieverfahren erfreuen sich immer größerer Beliebtheit, obwohl die Evidenz für einen Einsatz oft nicht ausreichend wissenschaftlich belegt ist. Während die Kombination aus Mistelpräparaten und verschiedenen Chemo- und Hormontherapien bereits in einigen Studien untersucht wurde, mangelt es zur Kombination mit Bestrahlung noch an wissenschaftlicher Forschung.

Die beiden etablierten humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7- und SK-BR-3 wurden für die Versuche verwendet. Die Dosisbestimmung des Iscador®M erfolgte anhand einer LD₅₀-Bestimmung mittels Proliferations- und Colony Forming Assay. Weitere Versuche wurden dann mit einer Konzentration von 10 µg/ml Iscador®M durchgeführt. Zur Klärung der Fragestellung wurden Koloniebildung, Zellzyklus, DNA-Reparaturfähigkeit und Apoptoseverhalten unter Iscador®M und verschiedenen Bestrahlungsdosen untersucht. Als Ergebnis zeigte sich, dass beide Zelllinien sehr unterschiedlich auf eine Behandlung mit Iscador®M und Bestrahlung reagierten. Während die MCF-7-Zellen in ihrer Koloniebildungsfähigkeit bei 6 Gy signifikant reduziert waren, kam es bei den SK-BR-3-Zellen (ebenfalls bei 6 Gy) zu einer Steigerung der Koloniebildung. Alle weiteren Versuche zum Wirkmechanismus konnten keinen signifikanten Einfluss unter Iscador®M nachweisen.

Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit nur wenig eindeutige Aussagen zulassen, so konnten Erkenntnisse für gezieltere und optimierte Versuchsdurchführungen gewonnen werden. Die erhobenen Daten sollen als Basis für weitere Forschung in diesem Bereich dienen. Die Notwendigkeit für eine Fortsetzung der Forschung ergibt sich aus der hohen Prävalenz des Mammakarzinoms und dem bislang nicht unerheblichen Anteil bereits eingesetzter Misteltherapie. So sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob sich der Einsatz von Mistelpräparaten für die Patienten nachteilig auswirken und der Effekt einer leitliniengerechten Therapie reduziert werden könnte. Kann ein Schaden ausgeschlossen werden, bleibt dann zu klären, inwieweit der Nachweis für eine Evidenz erforderlich oder ob auch der Profit von einem Placeboeffekt für eine Therapieempfehlung ausreichend ist.

7 Literaturverzeichnis

(ATCC), A. T. C. C. (2018). Product Sheet MCF7 (ATCC® HTB22™).

(ATCC), A. T. C. C. (2018). Product Sheet SKBR3 (ATCC® HTB30™).

(EBCTCG), E. B. C. T. C. G. (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." *Lancet* **365**(9472): 1687-1717.

Asselain, B., W. Barlow, J. Bartlett, J. Bergh, E. Bergsten-Nordström, J. Bliss, F. Boccardo, C. Boddington, J. Bogaerts, G. Bonadonna, R. Bradley, E. Brain, J. Braybrooke, P. Broet, J. Bryant, J. Burrett, D. Cameron, M. Clarke, A. Coates, R. Coleman, R. C. Coombes, C. Correa, J. Costantino, J. Cuzick, D. Danforth, N. Davidson, C. Davies, L. Davies, A. Di Leo, D. Dodwell, M. Dowsett, F. Duane, V. Evans, M. Ewertz, B. Fisher, J. Forbes, L. Ford, J.-C. Gazet, R. Gelber, L. Gettins, L. Gianni, M. Gnant, J. Godwin, A. Goldhirsch, P. Goodwin, R. Gray, D. Hayes, C. Hill, J. Ingle, R. Jagsi, R. Jakesz, S. James, W. Janni, H. Liu, Z. Liu, C. Lohrisch, S. Loibl, L. MacKinnon, A. Makris, E. Mamounas, G. Mannu, M. Martín, S. Mathoulin, L. Mauriac, P. McGale, T. McHugh, P. Morris, H. Mukai, L. Norton, Y. Ohashi, I. Olivotto, S. Paik, H. Pan, R. Peto, M. Piccart, L. Pierce, P. Poortmans, T. Powles, K. Pritchard, J. Ragaz, V. Raina, P. Ravdin, S. Read, M. Regan, J. Robertson, E. Rutgers, S. Scholl, D. Slamon, L. Sölkner, J. Sparano, S. Steinberg, R. Sutcliffe, S. Swain, C. Taylor, A. Tutt, P. Valagussa, C. van de Velde, J. van der Hage, G. Viale, G. von Minckwitz, Y. Wang, Z. Wang, X. Wang, T. Whelan, N. Wilcken, E. Winer, N. Wolmark, W. Wood, M. Zambetti and J. A. Zujewski (2018). "Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials." *The Lancet Oncology* **19**(1): 27-39.

Bennani-Baiti, B. and P. A. Baltzer (2017). "MR Imaging for Diagnosis of Malignancy in Mammographic Microcalcifications: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Radiology* **283**(3): 692-701.

Beuth, J., B. Schneider and J. M. Schierholz (2008). "Impact of complementary treatment of breast cancer patients with standardized mistletoe extract during aftercare: a controlled multicenter comparative epidemiological cohort study." *Anticancer Res* **28**(1B): 523-527.

Bock, P. R., W. E. Friedel, J. Hanisch, M. Karasmann and B. Schneider (2004). "[Efficacy and safety of long-term complementary treatment with standardized European mistletoe extract (*Viscum album* L.) in addition to the conventional adjuvant oncologic therapy in patients with primary non-metastasized mammary carcinoma. Results of a multi-center, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland]." *Arzneimittelforschung* **54**(8): 456-466.

Braedel-Ruoff, S. (2010). "Immunomodulatory effects of *Viscum album* extracts on natural killer cells: review of clinical trials." *Forsch Komplementmed* **17**(2): 63-73.

Broeders, M., S. Moss, L. Nystrom, S. Njor, H. Jonsson, E. Paap, N. Massat, S. Duffy, E. Lynge and E. Paci (2012). "The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies." *J Med Screen* **19** Suppl 1: 14-25.

Burger, A. M., U. Mengs, J. B. Schuler and H. H. Fiebig (2001). "Antiproliferative activity of an aqueous mistletoe extract in human tumor cell lines and xenografts in vitro." Arzneimittelforschung **51**(9): 748-757.

Bussing, A. and M. Schietzel (1999). "Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins." Anticancer Res **19**(1a): 23-28.

Clarke, M., R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, V. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor and Y. Wang (2005). "Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." Lancet **366**(9503): 2087-2106.

Darby, S., P. McGale, C. Correa, C. Taylor, R. Arriagada, M. Clarke, D. Cutter, C. Davies, M. Ewertz, J. Godwin, R. Gray, L. Pierce, T. Whelan, Y. Wang and R. Peto (2011). "Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials." Lancet **378**(9804): 1707-1716.

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe and AWMF (2017). Leitlinienprogramm Onkologie: Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen - Langversion 1.1. **Langversion 1.1.**

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe and AWMF (2017). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.0, 2017 AWMF Registernummer: 032-0450L, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 09.03.2019).

Dings, P. J., M. A. Elferink, L. J. Strobbe and J. H. de Wilt (2013). "The prognostic value of lymph node ratio in node-positive breast cancer: a Dutch nationwide population-based study." Ann Surg Oncol **20**(8): 2607-2614.

Donker, M., G. van Tienhoven, M. E. Straver, P. Meijnen, C. J. van de Velde, R. E. Mansel, L. Cataliotti, A. H. Westenberg, J. H. Klinkenbijn, L. Orzalesi, W. H. Bouma, H. C. van der Mijle, G. A. Nieuwenhuijzen, S. C. Veltkamp, L. Slaets, N. J. Duez, P. W. de Graaf, T. van Dalen, A. Marinelli, H. Rijna, M. Snoj, N. J. Bundred, J. W. Merkus, Y. Belkacemi, P. Petignat, D. A. Schinagl, C. Coens, C. G. Messina, J. Bogaerts and E. J. Rutgers (2014). "Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial." Lancet Oncol **15**(12): 1303-1310.

Drozdoiff, L., E. Klein, M. Kiechle and D. Paepke (2018). "Use of biologically-based complementary medicine in breast and gynecological cancer patients during systemic therapy." BMC Complement Altern Med **18**(1): 259.

Eisenbraun, J., R. Scheer, M. Kroz, F. Schad and R. Huber (2011). "Quality of life in breast cancer patients during chemotherapy and concurrent therapy with a mistletoe extract." Phytomedicine **18**(2-3): 151-157.

Elluru, S. R., J. P. Duong Van Huyen, S. Delignat, F. Prost, D. Heudes, M. D. Kazatchkine, A. Friboulet and S. V. Kaveri (2009). "Antiangiogenic properties of viscum album extracts are associated with endothelial cytotoxicity." Anticancer Res **29**(8): 2945-2950.

Fintelman, V. (2016). Intuitive Medizin : Theorie und Praxis der anthroposophischen Medizin. Stuttgart, Karl F. Haug Verlag.

Fisher, B., S. Anderson, J. Bryant, R. G. Margolese, M. Deutsch, E. R. Fisher, J. H. Jeong and N. Wolmark (2002). "Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer." N Engl J Med **347**(16): 1233-1241.

Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman and C. van Bree (2006). "Clonogenic assay of cells in vitro." Nat Protoc **1**(5): 2315-2319.

Freuding, M., C. Keinki, S. Kutschan, O. Micke, J. Buentzel and J. Huebner (2019). "Mistletoe in oncological treatment: a systematic review : Part 2: quality of life and toxicity of cancer treatment." J Cancer Res Clin Oncol **145**(4): 927-939.

Freuding, M., C. Keinki, O. Micke, J. Buentzel and J. Huebner (2019). "Mistletoe in oncological treatment: a systematic review : Part 1: survival and safety." J Cancer Res Clin Oncol **145**(3): 695-707.

Gabius, H. J., F. Darro, M. Rimmelink, S. Andre, J. Kopitz, A. Danguy, S. Gabius, I. Salmon and R. Kiss (2001). "Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts." Cancer Invest **19**(2): 114-126.

Girke, M. (2012). Innere Medizin : Grundlagen und therapeutische Konzepte der anthroposophischen Medizin ; [neu! ; mit "Intensivmedizin" und verbessertem Schriftbild!]. Berlin, Salumed-Verl.

Giuliano, A. E., S. B. Edge and G. N. Hortobagyi (2018). "Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer." Annals of Surgical Oncology **25**(7): 1783-1785.

Harmsma, M., M. Ummelen, W. Dignef, K. J. Tusenius and F. C. Ramaekers (2006). "Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on cell cycle and survival of tumor cells." Arzneimittelforschung **56**(6A): 474-482.

Haviland, J. S., J. R. Owen, J. A. Dewar, R. K. Agrawal, J. Barrett, P. J. Barrett-Lee, H. J. Dobbs, P. Hopwood, P. A. Lawton, B. J. Magee, J. Mills, S. Simmons, M. A. Sydenham, K. Venables, J. M. Bliss and J. R. Yarnold (2013). "The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials." Lancet Oncol **14**(11): 1086-1094.

Heinrich, P. C. (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg, Springer.

Helixor Kompendium der Misteltherapie mit Helixor in der integrativen Onkologie. [https://www.helixor.de/uploads/tx_helixorcore/infomaterial/Kompendium Misteltherapie.pdf](https://www.helixor.de/uploads/tx_helixorcore/infomaterial/Kompendium_Misteltherapie.pdf) am 16.12.2019.

- Hingorani, R., J. Deng, J. Elia, M. C. and D. Mittar (2011) "Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System."
- Hong, C. E., A. K. Park and S. Y. Lyu (2014). "Synergistic anticancer effects of lectin and doxorubicin in breast cancer cells." Mol Cell Biochem **394**(1-2): 225-235.
- Horneber, M. A., G. Bueschel, R. Huber, K. Linde and M. Rostock (2008). "Mistletoe therapy in oncology." Cochrane Database Syst Rev(2): Cd003297.
- Hostanska, K., V. Vuong, S. Rocha, M. S. Soengas, C. Glanzmann, R. Saller, S. Bodis and M. Pruschy (2003). "Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation." Br J Cancer **88**(11): 1785-1792.
- Huber, R., J. Eisenbraun, B. Miletzki, M. Adler, R. Scheer, R. Klein and C. H. Gleiter (2010). "Pharmacokinetics of natural mistletoe lectins after subcutaneous injection." Eur J Clin Pharmacol **66**(9): 889-897.
- Huber, R., H. Ludtke, J. Wieber and C. Beckmann (2011). "Safety and effects of two mistletoe preparations on production of Interleukin-6 and other immune parameters - a placebo controlled clinical trial in healthy subjects." BMC Complement Altern Med **11**: 116.
- Huber, R., M. Rostock, R. Goedel, R. Ludtke, K. Urech, S. Buck and R. Klein (2005). "Mistletoe treatment induces GM-CSF- and IL-5 production by PBMC and increases blood granulocyte- and eosinophil counts: a placebo controlled randomized study in healthy subjects." Eur J Med Res **10**(10): 411-418.
- Hübner, P. D. m. J. (2019). "Komplementärmedizin in der Behandlung von onkologischen PatientInnen." from <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/anmeldung/1/II/032-055OL.html>.
- IscadorAG (2017). Iscador in der Tumorthherapie - Empfehlungen für die Behandlung in Deutschland. I. AG. <https://www.iscador.com/de-de/fachkreise/informationen/iscador-in-der-tumorthherapie/> am 16.12.2019.
- Jang, N., J. E. Choi, S. H. Kang and Y. K. Bae (2019). "Validation of the pathological prognostic staging system proposed in the revised eighth edition of the AJCC staging manual in different molecular subtypes of breast cancer." Virchows Arch **474**(2): 193-200.
- Janni, W. and K. Hancke (2017). Facharztwissen Gynäkologie.
- Jung, H. A., Y. H. Park, M. Kim, S. Kim, W. J. Chang, M. K. Choi, J. Y. Hong, S. W. Kim, W. H. Kil, J. E. Lee, S. J. Nam, J. S. Ahn and Y. H. Im (2015). "Prognostic relevance of biological subtype overrides that of TNM staging in breast cancer: discordance between stage and biology." Tumour Biol **36**(2): 1073-1079.
- Jurikova, M., L. Danihel, S. Polak and I. Varga (2016). "Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer." Acta Histochem **118**(5): 544-552.
- Kelter, G., J. M. Schierholz, I. U. Fischer and H. H. Fiebig (2007). "Cytotoxic activity and absence of tumor growth stimulation of standardized mistletoe extracts in human tumor models in vitro." Anticancer Res **27**(1a): 223-233.

Kim, B. K., M. J. Choi, K. Y. Park and E. J. Cho (2010). "Protective effects of Korean mistletoe lectin on radical-induced oxidative stress." Biol Pharm Bull **33**(7): 1152-1158.

Kim, J. S., S. M. Lee and E. S. Cha (2014). "The diagnostic sensitivity of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and breast-specific gamma imaging in women with calcified and non-calcified DCIS." Acta Radiol **55**(6): 668-675.

Knopfl-Sidler, F., A. Viviani, L. Rist and A. Hensel (2005). "Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different mistletoe extracts." Pharmazie **60**(6): 448-454.

Koo, M. M., C. von Wagner, G. A. Abel, S. McPhail, G. P. Rubin and G. Lyrtzopoulos (2017). "Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis." Cancer Epidemiol **48**: 140-146.

Kovacs, E. (2010). "Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. Comparison of *Viscum album* QuFrF extract with vincristine in an in vitro model." ScientificWorldJournal **10**: 311-320.

Kovacs, E., S. Link and U. Toffol-Schmidt (2006). "Cytostatic and cytotoxic effects of mistletoe (*Viscum album* L.) quercus extract Iscador." Arzneimittelforschung **56**(6A): 467-473.

Krieger, H. (2019). Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes. Berlin, Heidelberg, Springer Spektrum.

Kubasova, T., I. Petcu, U. Pfuller and G. J. Koteles (1999). "Effects of mistletoe lectin I and ionizing radiation on the glucose and thymidine uptake in tumour cells in vitro." Phytother Res **13**(8): 655-659.

Lorenzen, J., A. K. Wedel, B. W. Lisboa, T. Löning and G. Adam (2005). "Diagnostische Mammographie und Sonographie: Korrelation von diagnostischer BI-RADS-Einstufung mit dem histologischen und klinischen Endbefund." Fortschr Röntgenstr **177**(11): 1545-1551.

Mayerhofer, R. "<https://www.pflanzen-vielfalt.net/>." from <https://www.pflanzen-vielfalt.net/wildpflanzen-a-z/%C3%BCbersicht-i-p/mistel-wei%C3%9Fbeerige/> v. 02.01.2020.

Moss, H. A., P. D. Britton, C. D. Flower, A. H. Freeman, D. J. Lomas and R. M. Warren (1999). "How reliable is modern breast imaging in differentiating benign from malignant breast lesions in the symptomatic population?" Clin Radiol **54**(10): 676-682.

Münter, M. and K.-J. Weber (2017). Strahlenbiologie. Duale Reihe Radiologie. M. Reiser, F.-P. Kuhn and J. Debus, Georg Thieme Verlag.

Myers, E. R., P. Moorman, J. M. Gierisch, L. J. Havrilesky, L. J. Grimm, S. Ghate, B. Davidson, R. C. Montgomery, M. J. Crowley, D. C. McCrory, A. Kendrick and G. D. Sanders (2015). "Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: A Systematic Review." Jama **314**(15): 1615-1634.

Nazaruk, J. and P. Orlikowski (2016). "Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L." Nat Prod Res **30**(4): 373-385.

Nelson, H. D., R. Fu, A. Cantor, M. Pappas, M. Daeges and L. Humphrey (2016). "Effectiveness of Breast Cancer Screening: Systematic Review and Meta-analysis to Update the 2009 U.S. Preventive Services Task Force Recommendation." Ann Intern Med **164**(4): 244-255.

Oei, S. L., A. Thronicke and F. Schad (2019). "Mistletoe and Immunomodulation: Insights and Implications for Anticancer Therapies." Evid Based Complement Alternat Med **2019**: 5893017.

Olsnes, S., F. Stirpe, K. Sandvig and A. Pihl (1982). "Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe)." J Biol Chem **257**(22): 13263-13270.

Park, W. B., S. Y. Lyu, J. H. Kim, S. H. Choi, H. K. Chung, S. H. Ahn, S. Y. Hong, T. J. Yoon and M. J. Choi (2001). "Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis." Cancer Biother Radiopharm **16**(5): 439-447.

Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert and W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Curr Biol **10**(15): 886-895.

Pelzer, F., W. Troger and D. R. Nat (2018). "Complementary Treatment with Mistletoe Extracts During Chemotherapy: Safety, Neutropenia, Fever, and Quality of Life Assessed in a Randomized Study." J Altern Complement Med **24**(9-10): 954-961.

Perez, E. A., E. H. Romond, V. J. Suman, J. H. Jeong, G. Sledge, C. E. Geyer, Jr., S. Martino, P. Rastogi, J. Gralow, S. M. Swain, E. P. Winer, G. Colon-Otero, N. E. Davidson, E. Mamounas, J. A. Zujewski and N. Wolmark (2014). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831." J Clin Oncol **32**(33): 3744-3752.

Piao, B. K., Y. X. Wang, G. R. Xie, U. Mansmann, H. Matthes, J. Beuth and H. S. Lin (2004). "Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients. A prospective randomized controlled clinical trial." Anticancer Res **24**(1): 303-309.

Pryme, I. F., S. Bardocz, A. Pusztai and S. W. Ewen (2006). "Suppression of growth of tumour cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins." Histol Histopathol **21**(3): 285-299.

Revet, I., L. Feeney, S. Bruguera, W. Wilson, T. K. Dong, D. H. Oh, D. Dankort and J. E. Cleaver (2011). "Functional relevance of the histone γ H2Ax in the response to DNA damaging agents." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(21): 8663.

Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V., Z. f. K. (Berlin 2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014.

Schulz-Ertner, D., F. Sterzing and C. Karger (2017). Strahlentherapie. Duale Reihe Radiologie. M. Reiser, F.-P. Kuhn and J. Debus, Georg Thieme Verlag.

Sloane, J. P., I. Amendoeira, N. Apostolikas, J. P. Bellocq, S. Bianchi, W. Bocker, G. Bussolati, C. E. Connolly, C. De Miguel, P. Dervan, R. Drijkoningen, C. W. Elston, D. Faverly, A. Gad, R. Holland, J. Jacquemier, M. Lacerda, A. Lindgren, J. Martinez-Penuela, J. L. Peterse, F. Rank, V. Tsakraklides, C. de Wolf and B. Zafrani (1997). "[Guidelines for pathology--supplement to European guidelines for quality

assurance in mammography screening. Report by the Pathology Working Group of the European Community]." Pathologie **18**(1): 71-88.

Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert and M. Brennan (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1409-1416.

Steinborn, C., A. M. Klemd, A. S. Sanchez-Campillo, S. Rieger, M. Scheffen, B. Sauer, M. Garcia-Kaufer, K. Urech, M. Follo, A. Ucker, G. S. Kienle, R. Huber and C. Grundemann (2017). "Viscum album neutralizes tumor-induced immunosuppression in a human in vitro cell model." PLoS One **12**(7): e0181553.

Steiner, R. (1985). Geisteswissenschaft und Medizin : zwanzig Vorträge, gehalten in Dornach vom 21. März bis 9. April 1920 vor Ärzten und Medizinstudierenden. Dornach, Rudolf-Steiner-Verl.

Sun, Y. S., Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao and H. P. Zhu (2017). "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." Int J Biol Sci **13**(11): 1387-1397.

Tabiasco, J., F. Pont, J. J. Fournie and A. Vercellone (2002). "Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity." Eur J Biochem **269**(10): 2591-2600.

Tiwari, P., S. Ghosh and V. K. Agrawal (2018). "Evaluation of breast lesions by digital mammography and ultrasound along with fine-needle aspiration cytology correlation." J Cancer Res Ther **14**(5): 1071-1074.

Uematsu, T., S. Yuen, M. Kasami and Y. Uchida (2007). "Dynamic contrast-enhanced MR imaging in screening detected microcalcification lesions of the breast: is there any value?" Breast Cancer Res Treat **103**(3): 269-281.

Urech, K., G. Schaller and C. Jaggy (2006). "Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador." Arzneimittelforschung **56**(6A): 428-434.

Veronesi, U., N. Cascinelli, L. Mariani, M. Greco, R. Saccozzi, A. Luini, M. Aguilar and E. Marubini (2002). "Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer." N Engl J Med **347**(16): 1227-1232.

Walker, S., C. Hyde and W. Hamilton (2014). "Risk of breast cancer in symptomatic women in primary care: a case-control study using electronic records." Br J Gen Pract **64**(629): e788-793.

Wang, M., H. Chen, K. Wu, A. Ding, M. Zhang and P. Zhang (2018). "Evaluation of the prognostic stage in the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer in locally advanced breast cancer: An analysis based on SEER 18 database." Breast **37**: 56-63.

Weiss, A., M. Chavez-MacGregor, D. Y. Lichtensztajn, M. Yi, A. Tadros, G. N. Hortobagyi, S. H. Giordano, K. K. Hunt and E. A. Mittendorf (2018). "Validation Study of the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Prognostic Stage Compared With the Anatomic Stage in Breast Cancer." JAMA Oncol **4**(2): 203-209.

Weissenstein, U., M. Kunz, M. Oufir, J. T. Wang, M. Hamburger, K. Urech, U. Regueiro and S. Baumgartner (2019). "Absence of herb-drug interactions of mistletoe with the tamoxifen metabolite (E/Z)-endoxifen and cytochrome P450 3A4/5 and 2D6 in vitro." BMC Complement Altern Med **19**(1): 23.

Weissenstein, U., M. Kunz, K. Urech, U. Regueiro and S. Baumgartner (2016). "Interaction of a standardized mistletoe (*Viscum album*) preparation with antitumor effects of Trastuzumab in vitro." BMC Complement Altern Med **16**: 271.

Weleda (2012). Fachinformation Iscador®M.

Weyerstahl, T. and M. Stauber (2013). Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe.

Whelan, T. J., J. P. Pignol, M. N. Levine, J. A. Julian, R. MacKenzie, S. Parpia, W. Shelley, L. Grimard, J. Bowen, H. Lukka, F. Perera, A. Fyles, K. Schneider, S. Gulavita and C. Freeman (2010). "Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer." N Engl J Med **362**(6): 513-520.

Woodward, W. A., V. Vinh-Hung, N. T. Ueno, Y. C. Cheng, M. Royce, P. Tai, G. Vlastos, A. M. Wallace, G. N. Hortobagyi and Y. Nieto (2006). "Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer." J Clin Oncol **24**(18): 2910-2916.

Wuerstlein, R. and N. Harbeck (2017). "Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer." Rev Recent Clin Trials **12**(2): 81-92.

Wunderle, M., M. O. Schneider, A.-L. Brandl, R. Erber, E. Balbach, A. Hartmann, R. Schulz-Wendtland, S. M. Jud, M. P. Lux, C. Rauh, C. C. Hack, M. W. Beckmann and F. Heindl (2019). "Mammakarzinom: Neuerungen in Früherkennung und Diagnostik." Frauenheilkunde up2date **13**(01): 39-57.

Yu, F., F. Quan, J. Xu, Y. Zhang, Y. Xie, J. Zhang, Y. Lan, H. Yuan, H. Zhang, S. Cheng, Y. Xiao and X. Li (2018). "Breast cancer prognosis signature: linking risk stratification to disease subtypes." Brief Bioinform.

Zhong, Q., H. L. Peng, X. Zhao, L. Zhang and W. T. Hwang (2015). "Effects of BRCA1- and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis." Clin Cancer Res **21**(1): 211-220.

Zhou, Z. R., X. Mei, X. X. Chen, Z. Z. Yang, J. Hou, L. Zhang, X. L. Yu and X. M. Guo (2015). "Systematic review and meta-analysis comparing hypofractionated with conventional fraction radiotherapy in treatment of early breast cancer." Surg Oncol **24**(3): 200-211.

8 Eigene Veröffentlichung

„Influence of mistletoe extract on the viability and proliferative capacity of irradiated breast cancer cells“

Sasse I.¹, **Dobiasch S.**¹, **Combs S. E.**^{1,2}, **Gehrmann M.**¹

¹Technical University of München (TUM), Department of Radiation Oncology, Klinikum rechts der Isar, Munich, Germany,

²Institute of Innovative Radiotherapy (iRT), Department of Radiation Sciences (DRS), Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

Strahlenther Onkol (2018) (Suppl 1) 194: S1–S222

<https://doi.org/10.1007/s00066-018-1301-7>

Online publiziert: 17 May 2018

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

10 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe vieler großartiger Menschen nicht möglich gewesen und ich möchte diese Zeilen nutzen, um Ihnen meinen Dank auszusprechen.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Mathias Gehrmann bedanken. Er hat mich das gesamte Promotionsprojekt begleitet und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, ermöglichte mir meine Forschungsarbeit mit Studium und später Berufsleben zu vereinigen. Ein gutes Betreuungsverhältnis ist nicht selbstverständlich und das weiß ich sehr zu schätzen.

Mein zweiter Dank gilt meiner Mentorin PD Dr. med. Sophie Dobiasch. Stetig erhielt ich von ihr viele wertvolle Tipps in Bezug auf meine Versuche aber auch während des Schreibprozesses, die diese Arbeit merklich bereichert haben.

Nicht zu vergessen sind andere Doktoranden und wissenschaftliche Mitarbeiter, die mich während der experimentellen Phase begleitet und unterstützt habe. Somit möchte ich Max Berlet, Saskia Frehde, Andrea Wächter, Andrea Mair, Katarina Ilicic, Lily Nguyen, Michaela Wank, Dr. rer. nat. Daniela Schilling und Anna Fuchs ebenfalls meinen besonderen Dank aussprechen.

Und nicht zuletzt wären sowohl diese Arbeit als auch mein Medizinstudium ohne meine Eltern und meinen Lebensgefährten nicht möglich gewesen. Ihre Unterstützung hat mir stets Raum und Kraft gegeben und tut das noch heute. Ohne sie hätte ich meinen bisherigen beruflichen Werdegang nicht erreichen können.