

Viscum album als adjuvante onkologische
Therapieoption bei der Behandlung von
humanen Mamma- und Pankreaskarzinomen

von Justine Ludwig

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Viscum album als adjuvante onkologische
Therapieoption bei der Behandlung von
humanen Mamma- und Pankreaskarzinomen

von Justine Ludwig

aus Arnstadt

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt am:

Institut für Radioonkologie und Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München

Leitung: Univ.-Prof. Dr. Stephanie E. Combs

Mentor: PD Dr. Mathias Gehrmann

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Für meine Familie und Alice

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht	5
1.	Mammatumoren des Menschen	5
1.1	Epidemiologie	5
1.2	Klinik	7
1.3	Diagnostik	8
1.4	Therapie.....	9
1.5	Prognose.....	13
2.	Mammatumoren des Hundes	15
2.1	Epidemiologie	15
2.2	Klinik	17
2.3	Diagnose.....	18
2.4	Therapie.....	20
2.5	Prognose.....	22
3.	Exokrine Pankreastumoren des Menschen	23
3.1	Epidemiologie	23
3.2	Klinik	25
3.3	Diagnose.....	26
3.4	Therapie.....	28
3.5	Prognose.....	33
4.	Exokrine Pankreastumoren des Hundes	35
4.1	Epidemiologie	35
4.2	Klinik	36
4.3	Diagnostik	36
4.4	Therapie.....	37
4.5	Prognose.....	39
5.	Die Mistel und die Misteltherapie.....	41

5.1	Allgemeines	41
5.2	Inhaltsstoffe der Mistel und deren Wirkung.....	43
5.3	Präparate, Anwendungsbereiche und Wirkungsspektrum	46
6.	Das Immunsystem	53
6.1	Das angeborene Immunsystem.....	53
6.2	Das erworbene Immunsystem.....	57
6.3	Tumorimmunologie	60
7.	Materialien und Methodik	65
7.1	Materialien	65
7.2	Methodik	68
7.2.1	Zellkulturen	68
7.2.2	Zellkultur von peripheren Zellen aus frischem Blut	69
7.2.3	Passagieren und Aussäen am Beispiel der MCF-7 Zellkultur	69
7.2.4	Zytotoxizitätassay.....	70
7.2.5	Spektrophotometer.....	74
7.2.6	Durchflusszytometrie.....	75
III.	Ergebnisse	79
1.	Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und PHA stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Brustkrebszelllinie MCF-7	79
1.1	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen.....	79
1.2	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen ..	82
1.3	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen	87
1.4	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen ..	89
2.	Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und IL-2+Mistelextrakt stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Brustkrebszelllinie MCF-7	93
2.1	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen.....	93
2.2	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen ..	96

2.3	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen	101
2.4	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen	103
3.	Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und Mistelextrakt stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Brustkrebszelllinie MCF-7	107
3.1	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen	107
3.2	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen	110
3.3	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen	116
3.4	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen	119
4.	Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und Mistelextrakt stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Pankreaskrebszelllinie Panc-1.....	123
4.1	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen	123
4.2	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen	127
4.3	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen	133
4.4	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen	136
5.	Auswertung der Wirkung peripherer Blutzellen einer Spenderperson auf die Brustkrebszelllinie MCF-7.....	140
5.1	Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten peripheren Blutzellen	140
5.2	FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten peripheren Blutzellen	143
IV.	Diskussion.....	151
V.	Zusammenfassung.....	175
VI.	Summary.....	179
VII.	Anhang.....	181

VIII. Literaturverzeichnis	185
IX. Danksagung	207

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
ADCC	Antikörper-gebundene zelluläre Zytotoxizität
APC	Allophycocyanin
BET	brusterhaltende Therapie
BiTE	bispezifische T-Zell-Einrückelemente
B-NHL	B-Non-Hodgkin-Lymphom
BRCA 1/2	Breast Cancer 1/2
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CAR	Chimerischer Antigen-Rezeptor
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	Differenzierungsmarker
CEA	carcinoembryonales Antigen
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomografie
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4
CR	Komplementrezeptor
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikografie
ESPAC	European Study Group for Pancreatic Cancer
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNP	Feinnadelpunktion
FOLFIRINOX	Chemotherapie-Schema bestehend aus 5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin
FPC	familiäres Pankreaskarzinom
FSC	Vorwärtsstreuung des Lichtes
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
GCP	Gute klinische Praxis
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung

IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
INT	Tetrazolium Salz
KO	Kontrolle
KRAS	Kirsten-Rat-Sarkom virale Onkogene
LDH	Lactatdehydrogenase
M	Metastasen
MAX	Maximum
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (Brustkrebszelllinie)
ME	Mistelextrakt
MED	Medium
MFI	Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
MICA/MICB	Hapthistokompatibilitätskomplex Klasse-I-kettengebundenen Protein A/B
ML	Mistellektine
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
mrM	modifizierte radikale Mastektomie
MRT	Magnetresonanztomografie
N	Nodus
NCR	natürliche zytotoxische Rezeptoren
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Panc-1	Pankreaskarzinomzelllinie-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-1	Programmiertes Zelltod-Protein-1
PD-L 1/2	Programmierter Zelltod-Ligand 1/2
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PET	Positronen-Emissionstomografie
PHA	Phytohämagglutinin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RIP	Ribosomen-inhibierende Proteinfamilie
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSC	Seitwärtsstreuung des Lichtes
T	Tumor
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	unstimuliert
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VOL	Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Angelegte 6-Well-Zellkulturplatten mit den Effektorzellensuspensionen für das Zytotoxizitätassay.....	71
Abbildung 2: Angelegte Zytotoxizitätassays auf 96-Well-Zellkulturplatten.....	73
Abbildung 1.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (KHYG-1; PHA).....	80
Abbildung 1.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (KHYG-1;PHA).....	81
Abbildung 1.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (KHYG-1; PHA).....	82
Abbildung 1.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte (KHYG-1; PHA).....	84
Abbildung 1.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD94-FITC (KHYG-1; PHA).....	86
Abbildung 1.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (MOLT-4; PHA).....	87
Abbildung 1.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (MOLT-4; PHA).....	88
Abbildung 1.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (MOLT-4; PHA).....	89
Abbildung 1.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte (MOLT-4; PHA).....	91
Abbildung 1.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD4-FITC (MOLT-4; PHA).....	92
Abbildung 2.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (KHYG-1; IL-2+Mistelextrakt).....	94
Abbildung 2.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (KHYG-1; IL-2+Mistelextrakt).....	95
Abbildung 2.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (KHYG-1; IL-2+Mistelextrakt).....	96
Abbildung 2.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte (KHYG-1; IL-2+Mistelextrakt).....	98
Abbildung 2.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD94-FITC und CD16-PE (KHYG-1; IL-2+Mistelextrakt).....	100
Abbildung 2.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (MOLT-4; IL-2+Mistelextrakt).....	101

Abbildung 2.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (MOLT-4; IL-2+Mistelextrakt).....	102
Abbildung 2.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (MOLT-4; IL-2+Mistelextrakt).....	103
Abbildung 2.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte (MOLT-4; IL-2+Mistelextrakt).....	105
Abbildung 2.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD8-PE (MOLT-4; IL-2+Mistelextrakt).....	106
Abbildung 3.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (KHYG-1; Mistelextrakt; MCF-7).....	108
Abbildung 3.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (KHYG-1; Mistelextrakt; MCF-7).....	109
Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (KHYG-1; Mistelextrakt; MCF-7).....	111
Abbildung 3.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte (KHYG-1; Mistelextrakt; MCF-7).....	113
Abbildung 3.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD94-FITC (KHYG-1; Mistelextrakt; MCF-7).....	115
Abbildung 3.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (MOLT-4; Mistelextrakt; MCF-7).....	117
Abbildung 3.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (MOLT-4; Mistelextrakt; MCF-7).....	118
Abbildung 3.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (MOLT-4; Mistelextrakt; MCF-7).....	119
Abbildung 3.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte (MOLT-4; Mistelextrakt; MCF-7).....	121
Abbildung 3.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD8-PE und CD3-PerCP (MOLT-4; Mistelextrakt; MCF-7).....	122
Abbildung 4.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (KHYG-1; Mistelextrakt; Panc-1).....	124
Abbildung 4.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (KHYG-1; Mistelextrakt; Panc-1).....	125
Abbildung 4.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (KHYG-1; Mistelextrakt; Panc-1).....	128
Abbildung 4.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte (KHYG-1; Mistelextrakt; Panc-1).....	130

Abbildung 4.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD16-PE (KHYG-1; Mistelextrakt; Panc-1).....	132
Abbildung 4.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (MOLT-4; Mistelextrakt; Panc-1).....	134
Abbildung 4.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (MOLT-4; Mistelextrakt; Panc-1).....	135
Abbildung 4.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (MOLT-4; Mistelextrakt; Panc-1).....	136
Abbildung 4.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte (MOLT-4; Mistelextrakt; Panc-1).....	138
Abbildung 4.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz von CD3-PerCP (MOLT-4; Mistelextrakt; Panc-1).....	139
Abbildung 5.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm (PBZ; Mistelextrakt; MCF-7).....	141
Abbildung 5.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz (PBZ; Mistelextrakt; MCF-7).....	142
Abbildung 5.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion (PBZ; Mistelextrakt; MCF-7).....	144
Abbildung 5.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte (PBZ; Mistelextrakt; MCF-7).....	146
Abbildung 5.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz verschiedener Antikörper (PBZ; Mistelextrakt; MCF-7).....	148

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Iscador® Präparate und deren Wirtsbäume der Rohsubstanz.....47

I. Einleitung

Brustkrebs ist die bösartige Entartung der Brustdrüse von Mensch und Tier. Mit einer Inzidenz von 75.000 Neuerkrankungen pro Jahr stellt das humane Mammakarzinom bei Frauen die am häufigsten vorkommende Krebserkrankung dar. Trotz moderner Therapieverfahren wie Chirurgie, Bestrahlung, Chemotherapie und auch weiterer medikamentöser Ansätze wie Antiöstrogene und Aromatasehemmer, gilt Brustkrebs mit einer Mortalitätsrate von 18.000 pro Jahr nach wie vor als die häufigste Todesursache bei Frauen im Alter von 35 bis 55 Jahren (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Auch im veterinärmedizinischen Bereich ist das Mammakarzinom eine häufig auftretende und bösartige Erkrankung. So ist auch das kanine Mammakarzinom die bei unkastrierten Hündinnen am häufigsten vorkommende Neoplasie und macht innerhalb dieser Populationsgruppe insgesamt 50%-70% aller vorkommenden Tumorarten aus (Brønden et al. 2010; Dorn et al. 1968; Merlo et al. 2008; Misdorp 2002; Moe 2001). Die Therapieansätze in der Veterinärmedizin sind jedoch vergleichsweise eingeschränkt und beruhen, wie auch in der Humanmedizin, als Therapiestandard auf einen chirurgischen Ansatz bei nicht metastasierten Mammakarzinomen (Stratmann et al. 2008). Zwar wurden zahlreiche verschiedene Chemotherapeutika in vielzähligen experimentellen Studien (Arenas et al. 2016; De Campos et al. 2018; Karayannopoulou et al. 2001; Nunes et al. 2019; Ogilvie et al. 1991; Ogilvie et al. 1989; Poirier et al. 2004) erfolgreich angewendet, dennoch fehlen weitere klinische Studien und weitere überzeugende Resultate bevor eines oder mehrere dieser verschiedenen Therapieprotokolle erfolgversprechend im klinischen Alltag eingesetzt werden können. Einen anderen aussichtsreichen therapeutischen Ansatz in der Behandlung des humanen und veterinärmedizinischen Mammakarzinoms bietet die komplementäre Medizin, wobei sich hier insbesondere die Europäische weißbeerige Mistel (*Viscum album L.*) als Immunmodulator innerhalb der letzten Jahrzehnte etabliert hat. So gilt die Mistel, neben den konventionellen onkologischen Therapieansätzen, als eine der wichtigsten und stärksten pflanzlichen Arzneimittel gegen Krebserkrankungen, als alternative und unterstützende Therapieoption (Büssing 2000; Wilkens et al. 2016). Die onkologische Grundlagenforschung konzentriert sich dabei vor allem auf den Nachweis einer zytotoxischen und antitumoralen Wirkung. Neben den in Tier- und Kulturversuchen feststellbaren zytotoxischen Effekt isolierter Mistellektine und Mistelextrakte, konnten zudem immunstimulierende Wirkungen aufgezeigt werden (Dietrich et al. 1992; Salzer 1986). Jene immunstimulierende und immunmodulatorische Wirkung der Mistellektine wird als klinisch relevanter Ansatz für die Therapie von Tumorerkrankungen angesehen und konnte bereits in zahlreichen humanmedizinischen Studien, sowohl in vitro als auch

in vivo, vielversprechende Ergebnisse erzielen (Marvibaigi et al. 2014; Pieme et al. 2012; Zhao et al. 2012). So zeigt sich insbesondere für Brustkrebspatientinnen unter Misteltherapie, neben der immunstimulierenden Wirkung, auch eine Reduzierung der krankheits- und chemotherapiebedingten Nebenwirkungen, eine Steigerung der Lebensqualität, ein positiver Einfluss auf die Remissionsrate sowie Hinweise auf eine mögliche Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit (Büssing et al. 2012; Ostermann et al. 2012; Rostock et al. 2016; Weissenstein et al. 2016). Auch Biegel et al. (2017) und Spadiut (2001) berichten in ihren Studien ebenfalls über jene positiven Einflüsse bei der Behandlung von kaninen Mammakarzinomen.

Darüber hinaus lassen sich die positiven Einflüsse der Mistel auf eine weitere schwerwiegende Krebserkrankung für Mensch und Tier feststellen - das Pankreaskarzinom. Mit ca. 18.000 Neuerkrankungen pro Jahr stellt das Pankreaskarzinom, sowohl in Deutschland als auch in den USA, die vierthäufigste Tumorerkrankung mit tödlichem Ausgang dar und ist weltweit insgesamt die zehnthäufigste bösartige Erkrankung (Oettle 2018; Robert-Koch-Institut 2017a). Unter allen Krebserkrankungen weist das Pankreaskarzinom die niedrigste Überlebensrate auf. Aufgrund der ausgesprochen ungünstigen Prognose sterben nahezu ebenso viele Personen wie daran erkranken (Robert-Koch-Institut 2017a). Auch in der Veterinärmedizin geht die Diagnose Pankreaskarzinom mit einer infausten Prognose einher (Fossum 2009; Kessler 2013; Klopffleisch 2017b). Wie auch im Rahmen des Mammakarzinoms wurde die Wirkung der Mistel auf das Pankreaskarzinom in verschiedenen Studien untersucht. Dabei ist ebenfalls eine Steigerung der Lebensqualität, eine Senkung von tumor- und therapiebedingten Nebenwirkungen, ebenso wie eine teilweise deutliche Verlängerung des Gesamtüberlebens erkennbar (Axtner et al. 2016; Mansky et al. 2013; Schad et al. 2014; Tröger et al. 2013, 2014). Zudem demonstrieren vielzählige humanmedizinische Studien, sowohl in vitro als auch in vivo, einen Immunsystem verstärkenden Effekt der Mistel, welcher die Tumorzerstörung beziehungsweise die Tumorreduzierung steigern könnte (Marvibaigi et al. 2014; Pieme et al. 2012; Zhao et al. 2012). Demnach stimuliert die Mistel sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort, induziert eine Stabilisierung und Zunahme der Anzahl der direkt an der Tumorabwehr beteiligten Zellen, steigert die Zytokininduktion, stimuliert die Phagozytenaktivität und wird aufgrund dessen, als sogenannter „biological response modifier“ eingestuft (Gardin 2009; Kienle et al. 2009; Kienle Kiene 2003; Kienle et al. 2010; Kuttan et al. 1993; Marvibaigi et al. 2014; Matthes et al. 2005; Son et al. 2010).

Jener immunstimulierende und zytotoxische/antitumorale Effekt der Mistel zeigt sich neben Mamma- und Pankreaskarzinomzelllinien auch auf zahlreiche weitere Tumorzell-

linien, weshalb die Misteltherapie einen vielversprechenden Ansatz als potenzielle adjuvante onkologische Therapiemöglichkeit bietet (Burger et al. 2001; Maier et al. 2002). Im deutschsprachigen Raum werden derzeit bei etwa 40%-50% der humanmedizinischen Tumorpatienten komplementärmedizinische Krebstherapien angewandt, wobei *Viscum album L.* das am meisten verwendete Mittel darstellt (Schwabe et al. 2004). Auch in der Veterinärmedizin gewinnt Mistelextrakt als postoperative oder alleinige Therapieoption zunehmend an Bedeutung (Biegel et al. 2017; Spadiut 2001). Trotz zahlreich vorliegenden vorklinischen und klinischen Studien über die vielfältigen Effekte der Mistel, gilt sie nicht allgemeingültig als Onkotherapeutikum und ist weiterhin Gegenstand großer Skepsis, vor allem im Bereich der konventionellen Medizin.

Zielsetzung dieser Arbeit soll es sein, jene immunstimulierende/immunmodulierende Wirkung des Mistelpräparates Iscador® M auf die hier verwendeten Effektorzelllinien und eine mögliche zytotoxische/antitumorale Wirkung auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und die Pankreaskarzinomzelllinie Pan-1, zu untersuchen. Dafür wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit in vitro Studien mittels Zytotoxizitätassay und Mehrfarbendurchflusszytometrie durchgeführt.

II. Literaturübersicht

1. Mammatumoren des Menschen

1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist mit einer Inzidenz von ca. 75.000 Neuerkrankungen pro Jahr die bei Frauen in westlichen Ländern am häufigsten auftretende Krebserkrankung. Das Erkrankungsrisiko von Frauen in Deutschland beträgt somit ca. 9%-10%. Ab dem Alter von 45 Jahren steigt das Erkrankungsrisiko stetig an, wobei das höchste Erkrankungsrisiko bei einem Alter von 45 bis 75 Jahren liegt, mit einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren. Brustkrebs stellt die häufigste Todesursache bei Frauen im Alter von 35 bis 55 Jahren dar, mit einer Mortalitätsrate von ca. 18.000 pro Jahr (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Die Anzahl der Sterbefälle macht demnach ca. ein Viertel aller Neuerkrankungen pro Jahr aus. Laut Robert-Koch-Institut (2017b) sind fast 30% der betroffenen Frauen bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre, womit das Mammakarzinom im Vergleich zu anderen Krebsarten auch häufiger in jungem Alter auftritt. In dem Altersbereich bis zum 50. Lebensjahr beträgt die Inzidenz ca. 18%, in der Altersgruppe zwischen 50 und 69 Jahre ca. 45% und ab einem Alter von 70 bis über 70 Jahre ca. 37%. Dabei zeigt sich innerhalb der letzten 20 Jahre für die genannten Altersbereiche ein leichter Anstieg der Inzidenz, welche auch weiterhin, sowohl national als auch international, steigen wird. Demgegenüber steht die Mortalitätsrate, die sich bei den unter 50-Jährigen um ein Drittel und bei den 50- bis 69-Jährigen sogar um ein Viertel reduziert hat. Ein möglicher Grund, sowohl für die steigende Inzidenzrate als auch für die sinkende Mortalitätsrate, kann das zwischen 2005 bis 2009 eingeführte Mammografie-Screening-Programm sein. Hierdurch werden zwar mehr Mammatumorerkrankungen festgestellt, aber dadurch auch vermehrt Tumore im Frühstadium erkannt, sodass die meisten der betroffenen Frauen frühzeitig entsprechend kurativ behandelt werden können. Das mediane Lebenszeitrisko von Frauen in Deutschland beträgt ca. 12,9% um während des gesamten Lebens an Brustkrebs zu erkranken. Somit ist jede 8. Frau in Deutschland betroffen. Brustkrebserkrankungen bei Männern machen im Vergleich dazu nur ca. 1% aller Brustkrebsfälle aus (Rhiem et al. 2015; Robert-Koch-Institut 2016a).

Als belegte Risikofaktoren für eine Erkrankung zählen: das weibliche Geschlecht, eine frühzeitige erste Regelblutung (Menarche) beziehungsweise eine späte letzte Regelblutung (Menopause), fortgeschrittenes Lebensalter, postmenopausale Hormonersatzpräparate und bereits vorhandene Vorläuferläsionen.

Andere Risikofaktoren sind eine familiäre Mamma- oder Ovarialkarzinombelastung sowie eine genetische Prädisposition wie sie bei ca. 5%-10% aller Frauen auftritt. Eine entscheidende Rolle hierbei spielen vor allem Mutationen der Brustkrebsgene BRCA1 und BRCA2. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit beim Vorliegen von Mutationen des BRCA1- und des BRCA2-Genes beträgt 50%-85% für eine Mammakarzinomerkrankung und 20%-40% für eine Ovarialkarzinomerkrankung. Aber auch eine niedrige Geburtenzahl, eine späte erste Schwangerschaft nach dem 30. Lebensjahr und eine kurze Laktationsdauer erhöhen das Risiko, ebenso wie eine westliche Lebensweise mit dazu gehörigem Alkoholkonsum, verstärkt auftretenden Übergewicht bis hin zur Adipositas und einen damit oft einhergehenden Bewegungsmangel. So zählt vor allem ein hoher BMI in der Menopause als risikoverstärkender Faktor. Hormonelle Ovulationshemmer haben dahingegen nur einen geringen Einfluss.

Umgekehrt bedeutet das, dass unter anderem frühe beziehungsweise mehrere Geburten, eine längere Laktationsdauer, eine gesunde Lebensweise insbesondere postmenopausal, sowie eine späte Menarche und eine frühe Menopause das Erkrankungsrisiko senken (Eucker et al. 2018; Robert-Koch-Institut 2016a, 2017b; Schem et al. 2019).

Histologisch betrachtet, haben maligne Tumore des Brustgewebes ihren Ursprung überwiegend innerhalb des Drüsengewebes. In ca. 55% der Fälle befindet sich das Mammakarzinom innerhalb des oberen äußeren Quadranten, da dieser als axillärer Ausläufer des Brustdrüsengewebes das größte Drüsenvolumen ausmacht. Mit je etwa 10%-15% Betroffenheit folgen vor allem der innere obere und der äußere untere Quadrant, sowie das retromamilläre Gewebe, wobei der Mammillenbereich insgesamt am seltensten betroffen ist. Aber auch innerhalb dystopem Gewebes, hier vor allem zwischen dem Lobus axillaris der Brustdrüse und der Axilla, finden sich Mammakarzinome (Robert-Koch-Institut 2016a; Schem et al. 2019). Grundsätzlich unterscheidet man anhand des invasiven Verhaltens des Mammakarzinoms zwischen den nicht-invasiven und den invasiven Karzinomen. Zu den nicht-invasiven Karzinomen zählen das duktale Carcinoma in situ (DCIS) und das seltenere, nur in den Läppchen vorkommende Carcinoma lobulare in situ (CLIS). Das DCIS befindet sich nur innerhalb der Brustdrüsengänge ohne Stromainvasion. Es macht ca. 10%-20% aller mammografischen Befunde aus und gilt als Vorläufer des invasiven Karzinoms (Schem et al. 2019). So zeigt eine Studie von Sanders et al. (2005), dass ca. 39% aller DCIS ohne Therapie innerhalb von 30 Jahren in ein invasives Karzinom übergehen können. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem CLIS um neoplastische Epithelproliferationen, welche von den Drüsenläppchen ausgehen und ca. 2%-5% aller nicht-invasiven Karzinome repräsentieren (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Das

invasive duktales Karzinom, mit seinem Ursprung innerhalb der Milchgänge, macht ca. 70%-80% aller Mammakarzinome aus. Das invasive lobuläre Karzinom, mit seinem Ursprung in den Drüsenläppchen, ca. 10%-15%. Muzinöse, tubuläre, sziröse und weitere Karzinome sind histologisch seltenere Typen und definieren die restlichen 5% (Eucker et al. 2018). Insgesamt werden invasive Mammakarzinome in ca. 20 spezielle Subtypen unterteilt, wobei das inflammatorische Karzinom als entzündliche Brustkrankung eine Sonderform darstellt (Schem et al. 2019). Darüber hinaus wird das Wachstum des invasiven Mammakarzinoms anhand der Verteilung der Tumorherde in einen multizentrischen und in einen multifokalen Charakter unterteilt.

Invasive Karzinome zeigen zudem eine frühe lymphogene und hämatogene Fernmetastasierungsrate von bis zu 30%. Neben einer Lymphknotenmetastasierung, metastasieren diese bevorzugt in das Skelettsystem, in die Lunge und in die Leber (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019).

1.2 Klinik

Frühstadien wie das DCIS und das CLIS zeigen häufig keine klinischen Symptome. Bei ca. 60% der betroffenen Frauen wird per eigenständiger Abtastung ein Knoten entdeckt. Grundsätzlich lässt sich klinisch meist ein derber, unregelmäßig begrenzter Knoten palpieren. Weitere klinische Symptome können beispielsweise eine Rötung der Brust ohne/mit umschriebenem Tumor, Hauteinziehungen über einem tastbaren Knoten, ein Ödem, eine blutige Sekretion aus der Mamille, das Orangenhautphänomen mit Verdickung der Haut, eine einseitige Einziehung der Mamille, vergrößerte axillare und/oder supraklavikuläre Lymphknoten, ein Lymphödem einer der oberen Extremitäten, sowie Husten, Knochenschmerzen, Atemnot und Oberbauchschmerzen als Folge bereits stattgefundener Fernmetastasierung sein. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind bei ca. 5%-8% der betroffenen Frauen bereits Fernmetastasen in Leber, Knochen oder Lunge vorhanden. Fernmetastasen treten mit ca. 50%-85% insbesondere im Skelettsystem auf. Andere typische Lokalisationen sind die Lunge und die Pleura mit jeweils 60%, die Leber mit 40%-50% und mit 15%-20% das ZNS, die Haut und andere Weichteilgewebe (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019).

1.3 Diagnostik

Für eine genaue Diagnostik eines Mammakarzinoms stehen verschiedene Diagnosemittel zur Verfügung. Hierzu gehören in entsprechender diagnostischer Reihenfolge die Inspektion, die Palpation, die Mammasonografie, die Mammografie, die Magnetresonanztomografie (MRT), die Positronen-Emissions-Tomografie (PET), eine Galaktografie, eine weiterführende immunhistologische Untersuchung, sowie eine Stanzbiopsie, eine Vakuumbiopsie oder eine offene Biopsie zur Diagnostik unklarer histologischer und abklärungsbedürftiger mammografischer und sonografischer Befunde.

Mittels alleiniger Palpation ist eine Dignitätseinschätzung nicht möglich, auch sind Veränderungen mittels Tastbefund erst ab einer Größe von 1-2 cm ertastbar. Dennoch ist die palpatorische und die inspektorische Beurteilung der Brust und die der dazugehörigen Lymphabflusssysteme Bestandteil der jährlichen klinischen gynäkologischen Untersuchung. Zur Abklärung von Tastbefunden, unklaren mammografischen Verdichtungen und zur Diagnostik von Zysten, sowie zur bildgebenden Steuerung von Punktions- und Biopsiemethoden, hat sich die Sonografie als hilfreiches Hilfsmittel etabliert (Cordner et al. 2015; Schem et al. 2019). Eines der zuverlässigsten Diagnosemittel stellt jedoch die Mammografie dar, wobei es sich um eine röntgenologische Untersuchung der Brust in zwei Ebenen handelt. Sie dient dazu, einen klinischen Verdacht zu bestätigen, aber auch als Mittel der Wahl zur Vorsorge und Nachsorge. So haben alle Frauen im Alter zwischen 50 und 69 Jahren in Deutschland das Recht, alle 2 Jahre im Rahmen der Brustkrebsfrüherkennung ein Mammografie-Screening durchführen zu lassen (Robert-Koch-Institut 2016a). Als Nachteil erweist sich jedoch eine schwierige Interpretation, vor allem bedingt durch die unterschiedlichen Zyklusphasen einer Frau und bei dichtem Drüsengewebe. Je nach Befund ist weiteres diagnostisches Vorgehen notwendig. Ein bevorzugtes additives Diagnosemittel zur Mammografie ist die MRT. Sie eignet sich vor allem bei dichtem Drüsengewebe, für eine Differenzierung zwischen einer Narbe und einem Karzinom und zur Tumorsuche bei unbekanntem Primärtumor (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Mittels PET ist zudem eine gute Detektion von Lymphknoten- und Fernmetastasen möglich. Bei pathologischer Mamillensekretion ist zusätzlich das Verfahren der Galaktografie indiziert. Um nach Diagnosestellung eine genaue Klassifizierung des vorliegenden Mammakarzinom-Subtypen vornehmen zu können, dient die immunhistologische Untersuchung. Mittels dieser können mögliche, von dem Mammatumor exprimierte Rezeptoren, nachgewiesen werden. Je nach immunhistologischem Befund erfolgt die anschließende Klassifizierung des Tumorsubtypen anhand einer festgelegten Einteilung. Dabei dient der Tumorsubtyp als wichtiger Prognosefaktor und ist mit ausschlaggebend

für die anschließende Therapie. Entsprechend der Ausprägung der Entwicklung tubulärer Strukturen, der Kernpolymorphie und der Mitoserate des Tumors erfolgt eine Grading-Einteilung in 3 Stufen und sieht wie folgt aus: G1 - gut differenziert, G2 - mittel differenziert, G3 - schlecht differenziert. Auch das Grading fungiert dabei als wichtige prognostische Untersuchung. Eine weitere wichtige und entscheidende Einteilung ist die sogenannte TNM-Klassifikation, die es grundsätzlich für alle Tumorerkrankungen gibt. Hiernach wird der Tumor anhand seiner klinischen und pathologischen Größe (T), dem Befall von regionären Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) in die Stadien I-IV eingeteilt und nützt ebenfalls der Therapiewahl und als Prognosefaktor (Eucker et al. 2018). Zur weiteren Abklärung von eventuell bereits vorliegenden Fernmetastasen dienen als Standard-Staging-Untersuchungen das Thoraxröntgen, die MRT, die Oberbauchsonografie, die CT und auch die Skelettszintigrafie (Schem et al. 2019).

1.4 Therapie

Die Wahl der Therapie richtet sich nach dem Tumorsubtyp, der Invasivität, dem Alter und dem Menopausenstatus der jeweiligen Patientin, sowie nach einer möglicherweise bereits vorliegenden Streuung des Tumors.

Die Standardtherapie beim Mammakarzinom ist seit Jahrzehnten der primäre operative Eingriff. Bei der chirurgischen Therapie entscheidet man zwischen brusterhaltender Therapie (BET) und modifizierter radikaler Mastektomie (mrM), wobei die BET bei ca. 60%-70% aller Patientinnen das Mittel der Wahl darstellt. Von einer mrM sind somit ca. 20%-40% aller Mammakarzinom-Patientinnen betroffen. Für eine mögliche zusätzliche operative Entfernung der Axilla ist eine pathologisch-histologische Bestimmung des Nodalstatus notwendig. Besteht jedoch der Verdacht auf eine Invasion, ist eine Lymphonodektomie in den meisten Fällen indiziert. Bei invasiven Tumoren der Stadien I-III befinden sich ca. 90% der Tumore zum Zeitpunkt der Diagnose in einem operablen Stadium. 5%-10% der Tumore sind dagegen bereits lokal fortgeschritten oder haben ein metastasiertes Stadium erreicht. Mittels multimodaler Therapie, bestehend aus OP, Strahlentherapie und medikamentöser Therapie, ist eine Senkung der Rezidivrate von invasiven Karzinomen der Stadien I-III auf unter 20% möglich. Auch bei einem nicht-invasiven DCIS ist das Mittel der Wahl die vollständige chirurgische Exstirpation aller betroffener Areale. Wichtig ist hierbei eine adäquate Resektion mit einem tumorfreien Randsaum. Sollte eine adäquate Resektion nicht möglich sein, ist die lokale Therapie der Wahl die Mastektomie (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019).

Ein weiterer Bestandteil der multimodalen Therapie des invasiven Mammakarzinoms ist die Strahlentherapie. Die Strahlentherapie weist im Gegensatz zur Chemotherapie eine

höhere Ansprechrate und eine geringe Toxizität auf. Jedoch kommt es im Zuge einer primären Strahlentherapie, im Vergleich zu einer postoperativen Strahlenanwendung, zu verstärkten Komplikationsraten (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Indiziert ist eine Strahlentherapie immer nach einer BET, um mittels dieser das Lokalrezidivrisiko von 35% auf 19% zu senken und um die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von Risikopatientinnen um bis zu 10% und die 15-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit um ca. 4% zu verbessern (Buchholz et al. 2002; Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019; Whelan et al. 2000). Empfohlen wird eine Radiatio der Brustwand auch nach erfolgter Mastektomie. Der Bestrahlungsbeginn liegt optimalerweise bei paralleler adjuvanter Hormontherapie innerhalb von 4-8 Wochen nach der Primär-OP und im Falle einer adjuvanten Chemotherapie, nach Abschluss dieser (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019).

Den dritten Bestandteil der multimodalen Therapie des Mammakarzinoms stellt die medikamentöse Therapie dar. So hat sich als erfolgreiches Vorgehen bei operativem Therapieansatz die präoperative (neoadjuvante) Chemotherapie, mit dem Ziel der Minimierung der Tumorausdehnung, etabliert. Ein entscheidender Vorteil einer Chemotherapie gegenüber einer Strahlentherapie besteht in ihrer systemischen Wirkung, welche bei fortgeschrittenen Mammakarzinom-Stadien auch höchstwahrscheinlich eine Mikrometastasierung mitbehandelt. Ziel der neo- und adjuvanten Therapie ist somit die Vernichtung weder klinisch noch labortechnisch noch bildgebend erfassbarer Fernmetastasierungen. Ein weiteres vordergründiges Ziel der neoadjuvanten Therapie ist insbesondere die Verkleinerung des entarteten Gewebes und einer daraus resultierenden möglichen Resektion im gesunden Gewebe mit anschließendem möglichen primären Wundverschluss. Neoadjuvante Therapien dienen gegenüber adjuvanten Therapien der Reduktion lokaler Tumormassen in der Brust und der Axilla, ermöglichen somit eine BET oder mrM und eine frühzeitige Ermittlung der Effektivität des gewählten Therapieprotokolls. Die Möglichkeit einer BET liegt mithilfe einer neoadjuvanten Chemotherapie bei ca. 75% (Büssing et al. 2007; Eucker et al. 2018; Hortobagyi et al. 1988; Schem et al. 2019). Grundsätzlich handelt es sich bei einer neoadjuvanten Therapie um eine präoperativ stattfindende systemische Therapie. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der adjuvanten Therapie eine postoperative systemische Therapie. Beide Protokolle beinhalten jedoch die gleichen Medikamente und Medikamentenkombinationen, sind in ihrer Effektivität gleich und werden über den gleichen Zeitraum angewandt. Die Entscheidung für eine systemische Therapie richtet sich grundsätzlich nach zahlreichen Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören die Tumorgröße, das Alter der Frau, der Nodalstatus, das Grading, der Menopausenstatus, der Hormonrezeptorstatus, der Proliferationsindex Ki67 und der Tumorsubtyp (Eucker et

al. 2018; Schem et al. 2019). Eine (neo)adjuvante Polychemotherapie, welche auf anthrazyklischen und taxanbasierten Medikamenten beruht, ist bei Patientinnen mit endokrin sensitiven und zusätzlich prognostisch ungünstigen Prognosefaktoren indiziert. Bei Patientinnen mit einem niedrigen Risiko kann auch vollständig auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet werden. Eine adjuvante Hormontherapie ist jedoch obligat (Schem et al. 2019). Typische Anthrazykline zur Therapie von Brustkrebs sind Epirubicin und Doxorubicin (Moebus et al. 2010). Im Rahmen einer Polychemotherapie werden diese in Kombination mit Cyclophosphamid und/oder Taxanen eingesetzt, wobei sich Taxane insbesondere bei der Therapie von Patientinnen mit positivem Nodalstatus und negativem Hormonrezeptorstatus bewährt haben (Henderson et al. 2003).

Bei inoperablen oder inflammatorischen Mammakarzinomen ist grundsätzlich eine primäre Chemotherapie indiziert, um somit eine ausreichende lokale Tumorkontrolle zu erreichen. Als Mittel der Wahl stehen Trastuzumab, Lapatinib, Pertuzumab und Carboplatin zur Verfügung. Dabei hat sich eine neoadjuvante Therapie vor allem bei dem inflammatorischen Mammakarzinom, bei Triple-Negativität und bei HER2-Überexpression des Tumors als Standardtherapie etabliert. Mittels neo- und adjuvanter systemischer Therapie ist insgesamt eine absolute um 12%ige und eine relative um 30%ige Senkung der 15-Jahre-Sterberate möglich (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Entscheidend für die endgültige Auswahl der neoadjuvanten und/oder adjuvanten Therapie ist letztendlich der Menopausenstatus der jeweiligen Patientin und der Tumorsubtyp. Differenziert wird dabei zwischen den Subtypen Triple-negativ, Hormonrezeptor (HR)-negativ und humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2 (HER2)-positiv, HR-positiv und HER2-positiv sowie HR-positiv und HER2-negativ (Eucker et al. 2018).

Triple-negativen Tumoren fehlen die Rezeptoren für HER2, Östrogen und Progesteron. Die empfohlene Chemotherapie besteht aus anthrazyklischen und taxanbasierten Medikamenten.

HR-negative und HER2-positive Tumore werden mit Chemotherapie und dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab therapiert. Ein höheres T- oder N-Stadium innerhalb dieses Tumorsubtypen indiziert eine simultane Therapie mit Anthrazyklinen, Taxanen und Trastuzumab. Eine zusätzliche Gabe von Pertuzumab ist eine weitere Kombinationsmöglichkeit, erwies sich als effektiv und ist derzeit weiterhin Bestandteil aktueller Studien.

HR-positive und HER2-positive Tumore sprechen am besten auf eine Chemotherapie zusammen mit Trastuzumab und endokriner Therapie an. Entscheidend für die Therapie dieses Tumorsubtypen ist der Menopausenstatus der Patientin.

Der Tumorsubtyp HR-positiv und HER2-negativ ist gekennzeichnet durch seine endokrine Sensitivität und indiziert somit eine adjuvante endokrine Therapie, welche sich ebenfalls nach dem Menopausenstatus der Patientin richtet. Befindet sich die Patientin in der Prämenopause wird bei geringem Rückfallrisiko Tamoxifen verabreicht (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Bei erhöhtem Rückfallrisiko wird entweder Tamoxifen oder eine Kombinationstherapie bestehend aus Ovarialsuppression mit oder ohne Tamoxifen, oder aber auch eine Therapie bestehend aus Ovarialsuppression und Aromatasehemmer verabreicht. Bei postmenopausalen Patientinnen werden zur antihormonellen Therapie bei geringem Rückfallrisiko Tamoxifen und bei höherem Rückfallrisiko Tamoxifen und Aromatasehemmer eingesetzt (Eucker et al. 2018).

Treten Metastasen auf ist in der Regel eine Heilung nicht mehr möglich. Ziel der Therapie ist dann vorrangig die körperliche und psychische Stabilisierung der Patientin mit Minderung tumorbedingter Schmerzen. Grundsätzlich ist die Wahl der Therapie bei Fernmetastasen die systemische Therapie. Je nach Tumorsubtyp und je nach Remissionsdruck erfolgt die Wahl der medikamentösen Therapie. Medikamente, die für eine palliative Therapie grundsätzlich in Frage kommen, sind Zytostatika, antihormonelle Medikamente, Anti-HER2-Substanzen, Angiogenese-Inhibitoren und immuntherapeutische Verfahren.

Indikationen für eine operative oder radiotherapeutische Therapie ergeben sich nur für spezielle Fälle. So ist eine palliative Strahlentherapie beispielsweise indiziert bei Weichteilmetastasen mit anderweitig nicht kontrollierbarer Kompressions- und Verdrängungssymptomatik. Mittels lokaler Bestrahlungstherapie oder auch einer Brachytherapie kann eine Schmerzlinderung, ebenso wie eine funktionelle Verbesserung, erzielt werden.

Ein palliatives operatives Vorgehen dient der Wiederherstellung und/oder dem Erhalt von Stabilität und Funktion, zur Aufrechterhaltung einer gewissen Lebensqualität sowie zur Schmerzbehandlung. Die Exstirpation des Primarius bei eingetretener Fernmetastasierung, um akut drohenden Komplikationen wie Infektionen, Perforationen und Blutungen rechtzeitig vorzubeugen, zählt dabei als eine der höchsten Operationsindikationen (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019).

Neben den drei konventionellen Therapieansätzen der Chirurgie, der Strahlentherapie und der Chemotherapie zur Behandlung von Mammakarzinomen, etablieren sich auch immer mehr Therapieansätze aus der Komplementärmedizin. Eine der aussichtsreichsten Ansätze stellt dabei die Misteltherapie als adjuvante Therapiemöglichkeit dar. Im deutschsprachigen Raum werden derzeit bereits bei etwa 40%-50% der humanmedizinischen Tumorpatienten komplementärmedizinische Krebstherapien angewandt. *Viscum album*, das Extrakt der Europäischen weißbeerrigen

Mistel, stellt hierbei das am meisten verwendete Mittel dar (Schwabe et al. 2004). Zahlreiche Studien über den Einsatz von Mistelextrakten bei der Behandlung humaner Mammakarzinome zeigen unter anderem positive Ergebnisse hinsichtlich guter Verträglichkeit (Beuth et al. 2008; KienleBerrino et al. 2003; Kienle et al. 2007; Melzer et al. 2009; Rostock et al. 2016). Andere klinische Studien präsentieren zudem eine Steigerung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität, einen positiven Einfluss auf die Remissionsrate sowie eine Reduzierung krankheits- und therapiebedingter Nebenwirkungen (Beuth et al. 2008; Bock et al. 2004; Büssing et al. 2008; Eisenbraun et al. 2011; Piao et al. 2004; Semiglazov et al. 2006; Tröger et al. 2009; Tröger et al. 2012; Weissenstein et al. 2016). Zudem berichten weitere Studien auch über eine Tumorregression unter Misteltherapie, wie auch über Hinweise darauf, dass Mistelextrakt die Gesamtüberlebensrate verlängern kann (Beuth et al. 2006; Grossarth-Maticsek et al. 2001; Ostermann et al. 2009; Werner et al. 2011). Somit könnte die Misteltherapie durchaus eine potenziell gut verträgliche, Lebensqualität steigernde und Remission senkende, adjuvante Therapiemöglichkeit in der Behandlung von Mammakarzinomen darstellen.

1.5 Prognose

Die Prognose der jeweiligen Patientin ist abhängig von zahlreichen verschiedenen Faktoren und ist somit nur sehr ungenau zu stellen. Entsprechend dazu sind auch Aussagen zur Wahrscheinlichkeit von Metastasen und Rezidiven nur schwer zu treffen. Laut Robert-Koch-Institut (2016a) beträgt die derzeitige relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen 88% und bei Männer 77% sowie die relative 10-Jahres-Überlebensrate bei Frauen 82% und bei Männern 65%.

Entscheidende prognostische Faktoren sind grundsätzlich die primäre Tumorgroße, das Tumorstadium nach TNM-Klassifikation, der axilläre Lymphknotenstatus und der biologische Subtyp des Tumors. Beide zuletzt genannten Faktoren korrelieren dabei direkt mit der Überlebens- und Rezidivrate, sowie mit der Größe des Tumors. Der Gradingstatus, das Alter der Patientin, der Menopausenstatus und eine vorliegende Gefäßinvasion stellen weitere, die Prognose beeinflussende Faktoren da. Entscheidend für eine Prognose ist auch der Hormonstatus des Tumors sowie eine fehlende oder vorhandene Expression des HER2, der mit einem schnellen progredienten und oftmals metastasierenden klinischen Verlauf einhergeht. Weitere Prognosefaktoren sind das Vorhandensein tumorassoziierter Proteolysefaktoren, welche bei niedrigen Messwerten und fehlender Lymphknoteninvasion auf eine gute Prognose hinweisen. Zirkulierende Tumorzellen nach adjuvanter Therapie weisen wiederum auf ein hohes Rezidivrisiko hin (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Prognostisch entscheidend ist vor allem aber

auch das Vorhandensein/Auffinden von Fernmetastasen. Das inflammatorische Karzinom als ein diffus infiltrierendes Karzinom ist prognostisch als besonders ungünstig zu bewerten. Auch haben Männer insgesamt eine deutlich schlechtere Prognose trotz identischer Diagnostik und Therapie (Eucker et al. 2018).

Mittels klinischen Staging und histopathologischer Aufarbeitung ist eine zunehmend exaktere Klassifizierung von Neoplasien möglich. Eine genaue Aussage über die Gesamtprognose, mögliche Rezidive und mögliche Metastasierungen sind trotz aller vorhandener diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten auch weiterhin nur vage zu treffen.

2. Mammatumoren des Hundes

2.1 Epidemiologie

Mammatumoren sind in Europa mit 41,7% die bei unkastrierten Hündinnen am häufigsten vorkommenden Neoplasien und machen insgesamt 50%-70% aller in unkastrierten Hündinnen vorkommenden Tumorarten aus (Brønden et al. 2010; Dorn et al. 1968; Merlo et al. 2008; Misdorp 2002; Moe 2001). Eine groß angelegte Studie von Dobson et al. (2002) in Großbritannien zeigt bei einer ausgewählten Population von 100.000 krankenversicherten Hunden eine Inzidenz von 205 Fällen/100.000 Hunden/Jahr. Eine sehr ähnliche Inzidenz von 192 Fällen/100.000 Hunden/Jahr ergab eine Studie aus Italien (Merlo et al. 2008). Die tatsächliche Inzidenz unterscheidet sich jedoch länderspezifisch innerhalb verschiedener Studien. Ein direkter Vergleich ist somit aufgrund divergenter statistischer Angaben nicht möglich (Egenvall et al. 2005; Kessler et al. 2013; Moe 2001). Als ausschlaggebende Faktoren, die einen Einfluss auf diese Unterschiede haben, zählen das Alter, die Rasse, die Gabe von hormonunterdrückenden Mitteln und der Zeitpunkt der Kastration (MacVean et al. 1978; Moe 2001; Priester 1979). Das insgesamt durchschnittliche Lebenszeitrisko um an einen Mammatumor zu erkranken, wird bei Hündinnen mit über 50% angegeben (Klopffleisch 2017a). Eine andere Studie berichtet, dass mehr als 70% aller unkastrierten Hündinnen bei der Diagnose bereits mehr als einen Tumor haben (Sorenmo et al. 2009). Hündinnen, die an Mammatumoren erkranken sind in der Regel mittelalt bis alt. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter. Das höchste Risiko haben unkastrierte Hündinnen im Alter von 10 bis 14 Jahren, wobei das Risiko ab dem 7. Lebensjahr deutlich steigt und das Auftreten von Mammatumoren vor dem 4. Lebensjahr selten ist (Klopffleisch 2017a; Priester 1979; Schneider 1970; Sorenmo et al. 2013). Neben steigendem Alter berichten zahlreiche Studien, dass verschiedene Rassen ein unterschiedlich hohes Risiko haben, um an Mammatumoren zu erkranken. Grundsätzlich scheinen kleinwüchsige und reinreinerassige Hunde besonders häufig von Mammatumoren betroffen zu sein. Hierzu zählen Dackel, Pudel, Yorkshire Terrier, Chihuahuas, Cocker Spaniel und Malteser (Dorn et al. 1968; Goldschmidt et al. 2001; Moe 2001). Aber auch großwüchsige Rassen scheinen ein zumindest erhöhtes Risiko für Mammatumorerkrankungen aufzuweisen. Studien stellen hierbei eine besondere Prädisposition für Deutsche Schäferhunde, Englische Setter, Spaniel-Rassen, Terrier, Rottweiler, English Pointer, Doberman, Pudel und Boxer fest (Kurzman et al. 1986; Moe 2001; Priester 1979; Sorenmo et al. 2013). Insgesamt zeigt sich laut einer japanischen Studie von Itoh et al. (2005), dass kleinwüchsige Rassen eine deutlich bessere Prognose und einen deutlich niedrigeren Anteil maligner Tumore aufweisen als großwüchsige

Hunderassen. Mammatumore treten, wie bereits erwähnt, zu 99% bei weiblichen, sexuell intakten Hündinnen auf. Somit spielt neben der Rassendisposition auch das Geschlecht und geschlechtsspezifische Hormone eine entscheidende Rolle. Der Einfluss von Sexualhormonen und einer Kastration auf die frühe Karzinogenese und Tumorinitiation sind allgemeingültig anerkannt. In Ländern wie den USA, in denen Hündinnen üblicherweise in jungem Alter kastriert werden, treten Mammatumore prozentual deutlich weniger auf, als in Ländern in denen dies keine gängige Praxis ist (Beauvais et al. 2012; Dobson et al. 2002; Moe 2001). So demonstriert eine Studie von Schneider et al. (1969), dass bei einer Kastration vor der ersten Läufigkeit das Mammatumorrisiko eliminiert werden konnte. Ebenso ergab die Studie, dass das relative Risiko bei einer Kastration nach der 1. Läufigkeit bei 8% liegt und dieses auf 26% bei einer Kastration nach der 2. Läufigkeit steigt. Später erfolgte Kastrationen hatten keinen entscheidenden hemmenden Einfluss auf die Entstehung von Mammatumoren (Misdorp 1988). Priester (1979) berichtet, dass frühzeitige Kastrationen nicht nur das Risiko für maligne, sondern auch für benigne Tumoren senken. Andere, auch auf Hormonen basierende, nicht-invasive Methoden zur Läufigkeitsunterdrückung, wie Medikamente beruhend auf Progesteronderivaten, stellen sich ebenfalls als krebserregend dar und erhöhen laut Norwegian Canine Cancer Register das Tumorrisiko um das 2,3-fache (Støvring et al. 1997). Dabei steigert die Applikation von Progesteron beziehungsweise von Medroxyprogesteronacetat dosisabhängig und die hochdosierte Applikation von Östrogen-Gestagen-Kombinationen das Risiko für maligne Mammatumore (Casey et al. 1979; Fowler et al. 1977; Frank et al. 1979; Støvring et al. 1997). Im Gegensatz dazu scheinen Faktoren wie frühe Geburten, Anzahl der Geburten und der Welpen, Östrusstörungen und Scheinträchtigkeiten keinen Einfluss auf die Entstehung von Mammakarzinomen zu haben (Brodey et al. 1966; Hamilton 1974; Schneider et al. 1969). Epidemiologisch betrachtet, spielen auch diätetische Faktoren bei der Entstehung von Mammatumoren eine entscheidende Rolle. So erhöhen ein hoher Fettgehalt in der Nahrung und Adipositas den Östrogenspiegel im Blut sowie die lokale Östrogenproduktion (Cleary et al. 2010; Wu et al. 1999). Dabei wird insbesondere eine übergewichtige Körperkondition im jungen Alter von 9-12 Monaten mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert (Alenza et al. 1998). Rüden stellen nur ca. 1% aller Tumorträger dar, wobei die meisten Tumore histologisch gutartig sind (Bearss et al. 2012; Gottwald 1998; Saba et al. 2007). Benigne Tumore sind histologisch betrachtet meist Mischtumore mit Strukturen epithelialen, myoepithelialen und mesenchymalen Ursprungs, wohingegen maligne Tumore histologisch meistens durch eine epitheliale Struktur gekennzeichnet sind. Es wird angenommen, dass das kanine Mammakarzinom dem Verlauf einer progressiven, malignen Transformation von Dysplasien über

Adenome und letztendlich zum malignen Karzinom folgt. Beweisend für diese Annahme ist unter anderem, dass in malignen Neoplasien morphologisch sowohl benigne als auch maligne Tumorzellen nachgewiesen werden können (Cassali et al. 2012; Klopffleisch 2017a). So liegen laut Sorenmo et al. (2009) in mehr als 50% der Fälle eine primäre Multiplizität vor, was bedeutet, dass multiple Tumore mit heterogener Art und Dignität auftreten (Sorenmo et al. 2009). Zahlreiche Studien geben die Malignität kaniner Mammatumoren mit ca. 30%-60% an. Mit ca. 85% bilden einfache oder komplexe Karzinome hierbei die Mehrheit aller maligner Mammatumore (Gizinski et al. 2004; Itoh et al. 2005; Nunes et al. 2019). Dabei sind einfache tubuläre Karzinome die am häufigsten diagnostizierten malignen Tumore der Gesäugeleiste der Hündin. Auch komplexe Mammatumore sind beim Hund verhältnismäßig sehr häufig, wohingegen sie bei Katzen und Menschen sehr selten sind. Weitere histologische Formen wie solide und anaplastische Karzinome treten mit abnehmender Differenzierung und daraus folgender Verschlechterung der Prognose auf (Gottwald 1998; Misdorp W. et al. 1999).

2.2 Klinik

Betroffen sind üblicherweise mittelalte bis alte unkastrierte oder spätkastrierte Hündinnen (Kurzman et al. 1986). Patientenbesitzer werden oft vorstellig mit ihrem Hund, weil sie an dessen Gesäugeleiste eine Masse ertastet haben. Ebenso sind Mammatumore auch oftmals Nebenbefunde der körperlichen Untersuchung beim Tierarzt. Die meisten Hündinnen zeigen bis auf die palpierbare Masse keine klinischen Anzeichen, sie sind symptomfrei. Auch die klinische Chemie, die Hämatologie und die Urinanalyse sind meistens unauffällig (Kessler et al. 2013). Klinisch werden die meisten Hündinnen erst bei vorliegender und zunehmender Metastasierung oder bei entzündlichen Karzinomen, wobei die klinischen Anzeichen hierbei sehr vielfältig sein können (de M Souza et al. 2009; Sorenmo 2003). Lokalisiert sind Mammatumore hauptsächlich im Drüsengewebe und nur selten an der Zitze. Am häufigsten betroffen sind dabei vor allem die beiden kaudalen Milchdrüsenkomplexe aufgrund ihrer größeren Gewebemassen (Sorenmo et al. 2009; Stratmann et al. 2006). Laut Sorenmo (2003) sind der Palpationsbefund, die Größe, die Dauer der Erkrankung, die Wachstumsgeschwindigkeit und das Erscheinungsbild der Masse sehr variabel. Auch können regionäre Lymphknoten palpatorisch verändert oder unverändert sein. Eine sichere Diagnose der Malignität ist anhand einer alleinigen Palpation nicht möglich. Jedoch zeigen sich maligne Neoplasien meistens wenig verschieblich und nur schlecht abgrenzbar. Weitere Anzeichen für Malignität können ein schnelles, umschriebenes Wachstum, Ödeme der Hintergliedmaßen, Ulzerationen, die Vergrößerung oder Verhärtung des regionären Lymphknotens und auch Dyspnoe sein (Klopffleisch 2017a;

Sorenmo 2003). In einer von Rutteman (2005) angelegten Studie wurde festgestellt, dass 87% aller Tumore mit einem Durchschnitt über 5 cm histologisch maligne sind. Grundsätzlich haben alle malignen Veränderungen der Mamma das Potenzial zu metastasieren. Epitheliale Tumore entarten in der Regel lymphogen und in die Lunge, wohingegen mesenchymale Tumore im Allgemeinen über den hämatogenen Weg direkt in die Lunge entarten (Donnay et al. 1996). Metastasen und die Infiltration regionärer Lymphknoten neben dem primären Gewebe, sind dabei wichtige Prognosefaktoren. Aufgrund anatomischer und physiologischer Verhältnisse zeigen hochmaligne Mammatumore zunächst eine lymphogene Metastasierung mit anschließender hämatogener Metastasierung. Der primäre Ort der Metastasierung bei kaninen Mammatumoren ist die Lunge. Unter 10% aller Metastasen treten in anderen Organen auf, wie zum Beispiel in der Leber und im Knochen (Kessler et al. 2013; Klopffleisch 2017a).

2.3 Diagnose

Eine genaue Diagnose ist bei mammären Massen unentbehrlich. Nur mittels Palpation ist eine eindeutige Diagnosestellung nicht möglich. Es stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, unter anderem eine klinische Chemie, die Sonografie des Mammagewebes, eine zytologische Untersuchung der Masse und der regionären Lymphknoten, eine inzisionale Biopsie und Röntgenaufnahmen zur Detektion von Fernmetastasen. Die klinische Blutchemie gehört als solches zur Standarddiagnose, ist aber für die Diagnosestellung kaniner Mammatumore zu unspezifisch. Häufig zeigen sich typische geriatrische Veränderungen des Blutbildes, was in der Regel an dem eher fortgeschrittenen Alter des klassischen Mammatumorpatienten liegt. Lediglich bei metastasierten, invasiv wachsenden und stark nekrotischen Neoplasien sowie bei entzündlichen Mammakarzinomen können Blutgerinnungsstörungen, inklusive einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC), auftreten (Maruyama et al. 2004; Stockhaus et al. 2001). Mittels Sonografie der Neoplasie lassen sich nur bedingt, durch Nekroseareale oder Zysten, Rückschlüsse auf die Gewebheterogenität sowie auf die Gefäßversorgung des Tumors schließen. Eine verlässliche Aussage über den genauen Tumortyp oder die Dignität ist jedoch auch mittels ultrasonografischer Befundung nicht möglich und indiziert eine zyto- und histologische Untersuchung (Marquardt 2003; Nyman et al. 2006). Eine zytologische Untersuchung von Feinnadelbiopsien der entsprechenden Umfangsvermehrungen dient vor allem dem Ausschluss von Differentialdiagnosen, wie zum Beispiel Mastitiden. Jedoch ist auch die Sensitivität zytologischer Untersuchungen aufgrund der typischerweise heterogenen Zusammensetzung des Tumors und des Vorhandenseins entzündlicher, nekrotischer

und/oder zystischer Bereiche innerhalb des Tumors sehr eingeschränkt und kann dadurch zu falsch-positiven, wie auch falsch-negativen Befunden führen (Stockhaus et al. 2001). Es wird empfohlen neben der zytologischen Untersuchung auch eine histologische Untersuchung durchzuführen. So zeigen Studien, dass die Korrelation zwischen Zytologie und Histopathologie zwischen 67,5% und 93% liegt (Cassali et al. 2007; Simon et al. 2009). Für eine genaue Bestimmung der Dignität, des Tumorsubtypes und der Resezierbarkeit sollte eine Inzisionsbiopsie oder eine Exzisionsbiopsie durchgeführt und anschließend histopathologisch bestimmt werden (Kessler et al. 2013). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Diagnosestellung ist die Untersuchung auf Lymphknoten- und Fernmetastasen. Vergrößerte, verhärtete und grundsätzlich alle palpierbaren tributären Lymphknoten sollten per Feinnadelaspiration zytologisch untersucht und abgeklärt werden (Langenbach et al. 2001; Sorenmo 2003). Bei Verdacht auf Metastasierung einer Neoplasie der drei kaudalen Mammakomplexe ist eine abdominale ultrasonografische Untersuchung der Lymphknoten, der Leber und der Milz indiziert. Mittels Feinnadelaspiration oder Biopsieentnahme kann ein bestehender Verdacht gesichert werden (Kessler et al. 2013). Die Durchführung eines Thoraxröntgens dient zusätzlich der Fernmetastasenabklärung (Arnicke 1998; Kessler et al. 2013). Falls vorhanden, ist eine CT Untersuchung des Thorax aufgrund höherer Sensitivität vorzuziehen (Eberle et al. 2011; Nemanic et al. 2006; Otoni et al. 2010). Nach ausgiebiger Diagnostik erfolgt eine klinische Stadieneinteilung nach dem von Rutteman et al. (2001) einheitlich modifizierten TNM-System der WHO. Wie auch in der Humanmedizin basiert die Einteilung dabei auf der Tumorgröße des größten Primärtumors (T), der Metastasierung in regionäre Lymphknoten (N) und der Metastasierung in entfernte Organe (M). Ziel dieser Stadieneinteilung ist es, eine Grundlage für das individuelle therapeutische Vorgehen und für eine genaue Prognose zu schaffen.

2.4 Therapie

Wie auch in der Humanmedizin gilt die chirurgische Exzision der Neoplasie als Standardtherapie (Stratmann et al. 2008). Sie ist weiterhin die grundlegende, allgemeingültig anerkannte Therapie für nicht metastasierte canine Mammatumore (Sorenmo 2003). Je nach Ausmaß der Neoplasie werden unterschiedliche chirurgische Verfahren durchgeführt. Bei einer „Nodulektomie“ erfolgt die Entfernung der Umfangsvermehrung gemeinsam mit einem kleinen Saum des anliegenden gesunden Gewebes. Dabei handelt es sich jedoch mehr um ein diagnostisches als um ein kuratives Verfahren. Von einer „einfachen Mastektomie“ spricht man bei der Entfernung eines kompletten Mammakomplexes. Besteht die Indikation zur Exzision von mehreren benachbarten Mammakomplexen wird das Verfahren der „regionalen Mastektomie“ angewendet. Bei der vollständigen Entfernung der gesamten Mammaleiste kommt das Verfahren der „radikalen Mastektomie“ zum Einsatz. Die „regionale Mastektomie“ wird empfohlen, wenn die beiden kranialen oder die drei kaudalen Mammakomplexe betroffen sind. Eine „radikale Mastektomie“ wird bei dem Vorhandensein multipler Tumore angeraten. Sie bietet die größte Sicherheit gegen die Entwicklung neuer Tumore und neuer Rezidive (Kessler et al. 2013). Das genaue Ausmaß der Resektion ist je nach Tumor und patientenspezifisch eigenständig festzulegen. Allgemeingültig gilt, dass bei der Exstirpation eines Tumors ein lateraler Sicherheitsabstand von mindesten 1 cm und bei schlecht begrenzten Tumoren von mindestens 3 cm einzuhalten ist. Insgesamt zeigen jedoch mehrere Studien, dass die Wahl der chirurgischen Therapie grundsätzlich keinen Einfluss auf die Prognose hat, solange die Umfangsvermehrung histologisch komplett entfernt wurde (Chang et al. 2005; Klopffleisch 2017a). Im Gegensatz dazu berichten Stratmann et al. (2008), dass nach einer „regionalen Mastektomie“ 58% der Hunde erneut Neoplasien entwickelten. Weitere, die chirurgische Therapie ergänzende Therapieansätze sind die Chemo-, die Radio- und die Hormontherapie sowie immunologische Verfahren, wie die der Misteltherapie. Jedoch liegen nur wenige klinische veterinärmedizinische Studien zu den genannten Therapieansätzen vor (Lavalle et al. 2009; Simon et al. 2006; Sleenckx et al. 2011a; Tran et al. 2016). So demonstriert beispielsweise eine Studie von Arenas et al. (2016), dass Hunde mit hochmalignen Mammatumoren, die mit Firocoxib behandelt wurden, eine deutlich höhere Gesamtüberlebenszeit haben als die Hunde der Kontrollgruppe ohne adjuvante Therapie. Auch konnte eine aktuelle Studie von Nunes et al. (2019) zeigen, dass Hündinnen mit einem fortgeschrittenen Karzinom (Stadium IV-V), die postoperativ in vier Zyklen mit Carboplatin behandelt wurden, eine deutlich höhere Gesamtüberlebenszeit haben als Hunde ohne Chemotherapie (ohne Chemotherapie median 331 Tage; mit Chemotherapie median 964 Tage). Eine noch höhere Gesamtüberlebenszeit

präsentieren Hündinnen, die postoperativ sowohl mit Chemotherapeutika als auch mit antiangiöser Therapie behandelt wurden, mit einer medianen Überlebenszeit von 1.052 Tagen. Eine Signifikanz ist jedoch nicht feststellbar ($p= 0,5$). Auch De Campos et al. (2018) stellte ein Jahr davor fest, dass Hündinnen, die postoperativ eine Chemotherapie erhielten, eine deutlich höhere Gesamtüberlebenszeit aufweisen als solche ohne adjuvante Therapie. Ein anderes Therapieprotokoll mit einer Kombination aus 5-Fluorouracil (FU) und Cyclophosphamid erzielt eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 6 Monaten ohne Chemotherapie, auf eine mediane Überlebenszeit von 24 Monaten mit Chemotherapie (Karayannopoulou et al. 2001). Zudem wurde auch von partiellen Remissionen bei Hunden berichtet, welche unter der Behandlung mit Doxorubicin, Mitoxantron und Paclitaxel standen (Ogilvie et al. 1991; Ogilvie et al. 1989; Poirier et al. 2004). Dennoch fehlen weitere klinische Studien und weitere überzeugende Resultate bevor eines oder mehrerer dieser verschiedenen Therapieprotokolle erfolgversprechend im klinischen Alltag eingesetzt werden können. Einen weiteren Therapieansatz stellt die Immuntherapie dar. Dabei gilt insbesondere die adjuvante Misteltherapie als erfolgversprechender Ansatz. Entscheidend hierfür sind insbesondere die zytotoxischen und antitumoralen Eigenschaften der Mistellektine und der Viscotoxine (Rippe 2017). In einer aktuellen Studie von Biegel et al. (2017) wird berichtet, dass Mistelpräparate inzwischen auch bei verschiedenen Tierarten erfolgreich angewendet werden. Des Weiteren konnte die Studie zeigen, dass Mistelextrakt eine gut verträgliche adjuvante, postoperative Behandlungsmöglichkeit für Hündinnen mit kaninen Mammatumoren darstellt und im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe das tumorbedingte Sterberisiko auf 25% gesenkt werden konnte ($p= 0,07$). Auch blieb im Verlauf der Therapie die Lebensqualität aller behandelten Tiere auf hohem Niveau stabil. Ein Vorteil der Misteltherapie gegenüber der Chemotherapie ist, dass die für Tiere entscheidende Lebensqualität nicht durch Nebenwirkungen wie beispielsweise Durchfall und Erbrechen eingeschränkt wird, da solche Nebenwirkungen weitestgehend ausbleiben (Biegel et al. 2017). Ein anderer Ansatz, wie der der Strahlentherapie, erweist sich anders als in der Humanmedizin, in der Veterinärmedizin bisher als kaum wirksam (Sorenmo 2003). Auch die humanmedizinisch bewerte Hormonbehandlung verspricht bei Hündinnen nur einen sehr geringen Erfolg (Henry 2009; Janni et al. 2010; Orlando et al. 2010).

2.5 Prognose

Die entscheidenden prognostischen Faktoren sind neben dem Alter auch die Tumorgroße und eine bereits erfolgte Lymphknoten- und Fernmetastasierung (Rutteman et al. 2001). Aber auch die Ergebnisse der histologischen Untersuchung sind prognostisch ausschlaggebend. Entscheidend hierbei sind der exakt bestimmte Tumorsubtyp, die Dignität, die Art des Wachstums (infiltrativ/invasiv), der Malignitätsgrad und eine vorliegende lymphogene und/oder hämatogene Infiltration (Cassali et al. 2014; Clemente et al. 2010; Misdorp 2002). So deutet beispielsweise der Verlust von Oströgen- und Progesteronrezeptoren der kaninen Mammatumorzellen auf einen malignen Phänotyp und eine schlechtere Prognose hin (Klopfleisch 2017a). Auch ist die Möglichkeit einer vollständigen chirurgischen Exzision prognostisch entscheidend. Von jenen Hunden mit kleinen, gut differenzierten und nicht-invasiven Karzinomen sterben mehr als 25% aufgrund von Rezidiven oder Metastasen innerhalb von 2 Jahren. Eine mediane Überlebenszeit von 21 Monaten zeigen jene Hunde mit einfachen Adenokarzinomen (Philibert et al. 2003). Hunde mit Karzinomsarkomen, Sarkomen oder aggressiv wachsenden Karzinomen weisen demgegenüber eine postoperative Mortalitätsrate von 60%-80% innerhalb der ersten 2 Jahre auf. Ursächlich sind ebenfalls das erhöhte Risiko für Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen (Bostock 1973; Yamagami et al. 1996). Letztendlich sind die Prognose und die Wahl der Therapie von zahlreichen Faktoren abhängig und sollte für jeden Fall individuell genauestens evaluiert werden.

3. Exokrine Pankreastumoren des Menschen

3.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom ist weltweit die zehnthäufigste bösartige Tumorerkrankung. Es handelt sich dabei um eine maligne und höchstgradig aggressive Neoplasie der Bauchspeicheldrüse. Mit ca. 18.000 Neuerkrankungen pro Jahr stellt das Pankreaskarzinom, sowohl in Deutschland als auch in den USA, die vierthäufigste Tumorerkrankung mit tödlichem Ausgang dar (Oettle 2018; Robert-Koch-Institut 2017a). Das Pankreaskarzinom weist unter allen Krebserkrankungen die niedrigste Überlebensrate auf. Aufgrund der ausgesprochen ungünstigen Prognose sterben auch nahezu ebenso viele Personen wie daran erkranken (Robert-Koch-Institut 2017a). Annahmen des Robert-Koch-Institut (2016b) gehen davon aus, dass bis 2020 mit einem weiteren Anstieg der Erkrankungs- und Sterbefälle zu rechnen ist. Laut Farrell et al. (2014) und Jemal et al. (2011) wird Bauchspeicheldrüsenkrebs bis 2020 sogar die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in den USA sein. Mit ursächlich für die steigende Tendenz ist unter anderem vor allem die Zunahme der Lebenserwartung und die damit einhergehende wachsende Anzahl der älteren Bevölkerung (Robert-Koch-Institut 2016b). So treten zwischen dem 60. und dem 80. Lebensjahr 80% aller Erkrankungsfälle auf, wobei das mediane Erkrankungsalter für Frauen bei 75 Jahren und für Männer bei 72 Jahren liegt (Robert-Koch-Institut 2017a; Spalding et al. 2011). Eine Geschlechtspräferenz ist laut Oettle (2018), Seufferlein et al. (2014) und dem Robert-Koch-Institut (2016b) allerdings nicht zu beobachten. Sahara et al. (2008) wiederum berichten über eine Geschlechtspräferenz für Frauen mit über 54%. Gesicherte Hauptrisikofaktoren für eine Pankreaskarzinomerkrankung sind das fortschreitende Alter und eine stetig steigende Lebenserwartung, Tabakkonsum, aber auch Passivrauchen sowie starkes Übergewicht (Adipositas) und einen damit oft einhergehenden Diabetes mellitus Typ 2. Auch andere lebensstilbezogene Faktoren wie ein hoher Konsum von Alkohol und rotem Fleisch sowie genetisch bedingte und autosomal vererbte Krankheitsbilder, wie zum Beispiel familiär häufig auftretende chronische Pankreatiden, wirken sich negativ auf das Erkrankungsrisiko aus (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Maisonneuve et al. 2010; Petersen et al. 2003; Robert-Koch-Institut 2017a; Spalding et al. 2011; Yadav et al. 2013; Zambirinis et al. 2013). So ergab eine Metaanalyse aus 82 Studien, dass Raucher ein um 75% erhöhtes Erkrankungsrisiko aufweisen (Gall et al. 2015). Weitere, das Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs erhöhende genetische Prädispositionen, neben der hereditären Pankreatitis, sind zahlreich und umfassen beispielsweise das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom sowie das familiäre Pankreaskarzinom (FPC) (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Eser et al. 2014; Oettle

2018; Sahora et al. 2008). Demnach geht sowohl eine akute als auch eine chronische Pankreatitis mit einer Verdopplung des relativen Risikos einher, ebenso wie die metabolische Erkrankung Diabetes mellitus Typ 2. Bezüglich Diabetes mellitus sind jedoch nur Frauen von einer Risikoerhöhung betroffen (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Insgesamt haben ca. 5%-10% aller Pankreaskarzinome eine hereditäre Ursache (Eser et al. 2014; Sahora et al. 2009). Auf molekulargenetischer Ebene werden Pankreaskarzinome häufig mit Genmutationen assoziiert. Hierzu zählen beispielsweise insbesondere Punktmutationen im Bereich der Kirsten-Rat-Sarkom viralen Onkogene (KRAS). Dabei handelt es sich um eine prägnante, beinahe ausschließlich bei Pankreaskarzinomen vorkommende Kombination aus Mutationen, die mehr als 90% aller duktaler Pankreasadenokarzinome in sich tragen (Gall et al. 2015; Seufferlein et al. 2012; Vincent et al. 2011). Neben lebensstilbedingten Faktoren und genetisch und nicht genetisch bedingten Erkrankungen erhöht auch die Exposition gegenüber bestimmter Noxen das Pankreaskarzinomrisiko. Zu diesen Noxen gehören beispielsweise Benzolderivate und Benzidin (Oettle 2018).

Pankreastumore haben mit ca. 95% ihren Ursprung im exokrinen Anteil. Tumore des endokrinen Anteils, ausgehend von den Langerhans-Inseln, machen demgegenüber nur ca. 5% aller Pankreastumore aus (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018). Da ausschließlich exokrine Pankreaskarzinomzellen Gegenstand dieser Arbeit sind, wird nicht weiter auf endokrine Tumore des Pankreas eingegangen. Grundsätzlich sind nahezu alle Pankreastumore maligne. Nur ca. 2% sind benignen Dignität. Neoplasien des Pankreas treten mit 70%-75% im Bereich des Pankreaskopfes, mit 15%-20% im Bereich des Korpus und mit 5%-10% im Schwanzbereich auf. Eine Sonderform stellt hierbei das periampulläre Karzinom dar. Es handelt sich dabei um Karzinome in der Nähe der Ampulla Vateri. Histologisch differenziert werden sie in pankreatobiliäre und intestinale Typen, wobei der intestinale Typ mit einer besseren Prognose einhergeht (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Gall et al. 2015; Oettle 2018; Seufferlein et al. 2012; Vincent et al. 2011). Pankreastumore werden aufgrund ihrer histologischen Differenzierung in duktale, aszinäre und endokrine Tumore sowie Mischformen untergliedert, wobei duktale Adenokarzinome ca. 80% aller Pankreastumore ausmachen. Duktale Karzinome werden in zahlreiche Subtypen unterteilt und sind durch eine frühzeitige Infiltration benachbarter neurovaskulärer Strukturen und einer damit einhergehenden Irresektabilität sowie einer ausgeprägten Metastasierungsrate charakterisiert. Neben den eigentlichen Kanzerosen des duktales Andenokarzinoms gibt es auch sogenannte zystische Neoplasien beziehungsweise Präkanzerosen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie sich alle maligne entwickeln können. Weitere Sonderformen stellen die seltener vorkommenden hepatoiden, anaplastischen und

aszinären Pankreaskarzinome dar, ebenso wie das Pankreatoblastom. Das Pankreaskarzinom ist aufgrund seiner hohen Malignität und seines hohen Metastasierungspotenzials schon in frühen Stadien eine systemische Erkrankung (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018).

3.2 Klinik

Das typische am Pankreaskarzinom ist, dass es charakteristisch asymptomatisch ist und keine Frühsymptome zeigt. Erst infolge von Metastasierung und einer Invasion in das umgebende Gewebe treten erste Symptome auf. Je nach Lokalisation des Primärtumors innerhalb des Pankreas und vorhandener Metastasen ist die klinische Symptomatik sehr unterschiedlich (Oettle 2018; Robert-Koch-Institut 2017a). Oettle (2018) und Beger et al. (2008) berichten über gürtelförmigen Schmerz vorwiegend im Ober- und Mittelbauch, Schwäche, teilweise heftige Rückenschmerzen, Übelkeit, Appetitlosigkeit und Fieber. Bei ca. 10% der Patienten tritt zudem eine Thrombophlebitis auf. Auch zeigen sich spezifischere Symptome wie ein Ikterus, eine Pankreatitis oder aber auch ein neu aufgetretener Diabetes mellitus Typ 2. Laut Vincent et al. (2011) liegt bei ca. 25% der Patienten ein klinisch manifester Diabetes und bei 40% eine verminderte Glucosetoleranz vor. Ein Ikterus zusammen mit heftigen Rückenschmerzen dient oftmals als Hinweis auf ein fortgeschrittenes inoperables Tumorstadium (Oettle 2018). Zudem tritt ein Ikterus als Erstsymptom sowohl bei Karzinomen des Pankreaskopfes als auch bei periampullären Karzinomen auf (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Vincent et al. 2011; Wolfgang et al. 2013). Eines der häufigsten Symptome bei einem periampullären Karzinom ist jedoch eine Gallenabflussstörung aufgrund der Lokalisation des Tumors. Infolgedessen zeigen die Patienten acholischen Stuhl, dunklen Urin und einen bereits erwähnten schmerzlosen Ikterus. Im Gegensatz dazu äußern sich Tumore im Korpus- und Kaudalbereich meistens nur durch unspezifische Beschwerden. Infolge des Voranschreitens der Erkrankung lässt sich zudem bei ca. 25% aller Patienten eine große, harte Masse im Oberbauch palpieren (Classen et al. 2003; Oettle 2018; Sahora et al. 2008). Abgeklärt werden sollte ein Pankreaskarzinom auch bei akuten, chronischen, nichtbiliären, rezidivierenden oder alkoholbedingten Pankreatiden (Oettle 2018).

Pankreasadenokarzinome weisen ein hohes und aggressives Metastasierungsverhalten auf. Die Ausbreitung erfolgt dabei mittels Invasion der Perineuralscheiden sowie mittels Lymph- und Blutgefäßinvasion. Die lymphatische Invasion verläuft dabei in 2 Stufen. Zunächst findet eine Metastasierung in den pankreasnahen Lymphknoten mit anschließender Metastasierung in weitere regionäre Lymphknoten statt. Infolge einer darauffolgenden hämatogenen Metastasierung treten bevorzugt Metastasen in Leber,

Lunge und Lymphknoten auf. Häufig entwickeln sich aber auch eine Peritonealkarzinose und Knochen- und Hirnmetastasen nach längerem Krankheitsverlauf. Zudem bilden sich gehäuft Implantationsmetastasen im Bauchraum. Eine besonders frühe lymphatische Metastasierungstendenz zeigt hierbei vor allem das periampulläre Adenokarzinom (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Li et al. 2004; Oettle 2018). Aufgrund der meist unklaren Klinik von Pankreaskarzinomen und oftmals vorliegender Metastasen ist eine genaue und aussagekräftige Diagnostik unabdingbar.

3.3 Diagnose

Für das Pankreaskarzinom gibt es derzeit weder präventive Vorsorgemaßnahmen noch eine spezielle Früherkennungsdiagnostik (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Gall et al. 2015; Kleger et al. 2014). Aktuell besteht in Deutschland keine Indikation für molekularbiologische oder bildgebende Diagnoseverfahren bei asymptomatischer Vorstellung. Erst bei hinweisender Klinik und dem Verdacht auf ein Pankreaskarzinom ist eine schnellstmögliche effektive Diagnostik indiziert (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018). Bei erfolgter Diagnosestellung befindet sich das Pankreaskarzinom jedoch bei ca. 80% der Patienten bereits in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (Kunzmann et al. 2014; Sahora et al. 2008; Vincent et al. 2011). Die stufenweise Diagnostik besteht zunächst aus der Patientenanamnese, einer körperlichen Untersuchung, gefolgt von labordiagnostischen und bildgebenden Verfahren. Als hinweisende Befunde innerhalb der körperlichen Untersuchung gelten beispielsweise ein Verschlussikterus infolge einer gestauten palpablen Gallenblase sowie bei Tumoren des distalen Pankreas eine Spleno- und Hepatomegalie. Laborchemische Parameter sind grundsätzlich wenig aussagekräftig, da keine ausreichende Spezifität und Sensitivität gegeben ist. So lässt sich bei ca. 20% aller Patienten im Serum eine Erhöhung der Lipase- und Amylasewerte feststellen, welche sich auf eine Verlegung des Pankreasganges zurückführen lässt. Eine Erhöhung der Cholestasewerte, der γ -Glutamyl-Transferase, des Serumbilirubin und der alkalischen Phosphatase lassen sich bei ca. 80% aller Patienten infolge einer durch den Tumor bedingten Gallengangbeeinträchtigung beobachten. Unspezifische laborchemische Veränderungen wie Hyperglykämie, erhöhte Leberwerte und Anämie zeigen sich öfter im Zusammenhang mit in Pankreaskörper und Pankreasschwanz lokalisierten fortgeschrittenen Tumoren. Die entsprechenden Werte resultieren dabei sowohl aus der tumorbedingten Beeinträchtigung des Pankreasparenchyms als auch aus einer Metastasierung in die Leber (Gall et al. 2015; Oettle 2018; Sahora et al. 2009). Weitere klinisch relevante Parameter sind Tumormarker. Die relevantesten Tumormarker im Falle eines Pankreaskarzinoms sind das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9) und das

Carcinoembryonale Antigen (CEA) (Oettle 2018). Eine Erhöhung beider kann somit hinweisend auf ein Pankreaskarzinom sein, aber nicht beweisend. Molekularbiologisch hat sich die Bestimmung des Protoonkogens KRAS etabliert. Eine Bestimmung ist insbesondere im Falle einer unklaren Primärdiagnostik und bei wenig vorhandenem Biopsiematerial hilfreich. Dem gegenüber stehen die bildgebenden Verfahren, mit einer deutlich höheren Spezifität und Sensitivität. Ziel hierbei ist die Sicherung der Verdachtsdiagnose, wobei verschiedene Diagnoseverfahren zur Verfügung stehen. Das Mittel der Wahl zur initialen Diagnostik des Primärtumors stellt der abdominale Ultraschall dar. Ausschlaggebend ist hierbei vor allem die Erfahrung des Untersuchers und das Vorliegen hinweisender Begleitsymptome wie beispielsweise einer Cholestase. Ein weiteres, an Bedeutung zunehmendes Diagnosemittel, ist die Endosonografie, welche gemeinsam mit dem abdominalen Ultraschall und der Mehrschicht-CT die Standardverfahren zur Beurteilung der lokalen Ausdehnung, der Größe und der Resektabilität von Tumoren des Pankreas darstellen. Unter endosonografischer Sicht ist unter Umständen auch die Punktion verdächtiger maligner Areale möglich. Die PET dient zusätzlich einem genaueren TNM-Staging, der Detektion lokaler Tumordinfiltrationen und der Detektion einer Pfortader- und Lymphknotenbeteiligung. Das dritte Standardverfahren neben dem abdominalen Ultraschall und der Endosonografie ist das CT. Es dient dem Nachweis von Fernmetastasen und der Bestimmung der Tumorgöße. Ist mittels Spiral-CT oder Sonografie kein eindeutiger Tumornachweis möglich, bietet sich die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikografie (ERCP) und die Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie (MRCP) an. Ziel ist die Darstellung des Gallen- und Pankreasgangsystems und einer damit verbundenen Unterscheidung zwischen einer malignen oder entzündlich bedingten Gangveränderung. Durch eine zusätzliche Darstellung der Gefäße ist eine wesentliche Aussage zur Operabilität möglich. Auch mittels MRT sind die Gefäße darstellbar. Als Standarddiagnoseverfahren im Rahmen der präoperativen Pankreaskarzinomdiagnostik gilt grundsätzlich jedoch eine Kombination aus abdominalem Ultraschall, Endosonografie und CT (Beger et al. 2008; Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018; Sahora et al. 2008; Seufferlein et al. 2012; Wolfgang et al. 2013). Neben bildgebender und molekularbiologischer Diagnostik stellen auch die Zytologie und die Histologie einen wichtigen, wenn auch untergeordneten Bestandteil, innerhalb des Diagnoseprozesses dar. Eine zytologische beziehungsweise histologische Diagnosesicherung ist dennoch für die weitere therapeutische Planung zwingend erforderlich. Das wichtigste, zur Materialgewinnung zur Verfügung stehende Verfahren, ist die Feinnadelpunktion (FNP), welche Sonografie- oder CT-gesteuert durchgeführt wird. Anwendung findet diese vor allem bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder bei Metastasenverdacht. Bei unklarer Diagnose

bietet sich auch eine Laparoskopie an, die dem Nachweis eventuell vorliegender Bauchmetastasen dient. Zur Abklärung einer möglichen systemischen Tumorausbreitung bieten sich jedoch insbesondere das Röntgen und/oder eine CT des Thorax sowie eine abdominale CT oder MRT an (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018).

Nach ausgiebiger Diagnostik erfolgt in Hinblick auf das weitere therapeutische Vorgehen und auf die Prognose, wie auch beim Mammakarzinom, eine Einteilung des Tumors in die festgelegte TNM-Klassifikation. Eine Sonderstellung nehmen hierbei die Karzinome der Ampulla Vateri ein. Für diese existiert eine eigene TNM-Klassifikation, wobei zusätzlich die Infiltration des benachbarten Gewebes berücksichtigt und einbezogen wird. Für eine effektive und gezielte Therapie, wie auch für eine aussagekräftige Prognose, werden auch Pankreaskarzinome noch zusätzlich in eine 3-stufige Differenzierungsgraduierung von gut differenziert (G1) bis gering differenziert (G3) eingeteilt, wobei die jeweiligen Stufen an eine unterschiedliche Mitosezahl pro 10 High Power Fields (HPF) gebunden sind (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018).

Trotz zahlreicher zur Verfügung stehender diagnostischer Verfahren ist eine präoperative Sicherung der Diagnose Pankreaskarzinom nicht immer möglich.

3.4 Therapie

Grundlage für die Erstellung eines individuellen Behandlungsprotokolles ist das Vorliegen aller diagnostischer Ergebnisse. Entscheidend hierbei ist vor allem der Allgemeinzustand des jeweiligen Patienten, das Tumorstadium und die Ausbreitung des Tumors (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung besteht nur für eine geringe Anzahl an Patienten ein kurativer Therapieansatz aufgrund des schnell fortschreitenden Krankheitsverlaufes und des hohen Metastasierungspotenziales. Für 80%-95% aller Patienten steht zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nur noch ein palliativer Behandlungsansatz zur Verfügung. Das Ziel hierbei ist eine Krankheitsstabilisierung, eine Progressionsverhinderung des Tumors und vor allem eine Lebensverlängerung mit einer möglichst hohen Lebensqualität (Cascinu et al. 2001). Die einzige potenzielle kurative Therapiemaßnahme bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms ist die radikale chirurgische Therapie, mit dem Ziel einer Tumoresektion im gesunden Gewebe inklusive des regionären Lymphabflussgebietes (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Sahora et al. 2008; Seufferlein et al. 2013). Gleichzeitig stellt die chirurgische Therapie den wichtigsten Therapieansatz bei lokal begrenzten Pankreaskarzinomen dar. So kann mittels chirurgischen Ansatzes im Vergleich zur Radiochemotherapie eine deutliche Steigerung des medianen Überlebens erzielt werden (22,6 Monate vs. 10,8 Monate) (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Zum

Zeitpunkt der Diagnosestellung sind bereits mindestens 70% der Pankreaskarzinome nicht mehr operabel, was mit der meist vorausgegangenen Lebermetastasierung erklärt wird (Oettle 2018). Unter kurativer Intention resektabel sind nur ca. 10%-15% aller Tumore (Neoptolemos et al. 2001). Gall et al. (2015) gibt in Abhängigkeit von Lymphknotenstatus, Tumorstadium und adjuvanten Therapiemaßnahmen nach komplett erfolgter Tumorsektion eine mediane Überlebenszeit von 28,7 Monaten an. Nach erfolgter kurativ indizierter OP berichtet Oettle (2018) über eine mediane Überlebenszeit von 10-24 Monaten. Jedoch auch über eine Rezidivrate von 80%-90%. Eine sinnvolle Resektabilität ist nur gegeben beim Fehlen von Fernmetastasen, beim fehlenden Verschluss der Pfortader und bei fehlender Gefäßinfiltration. Weitere entscheidende Faktoren sind das Alter, die Komorbidität und der Allgemeinzustand des jeweiligen Patienten. Entscheidend für die Wahl des richtigen Operationsverfahrens ist die Tumorlokalisierung und die Tumorausbreitung. Mögliche Operationsverfahren sind dabei die partielle, die subtotaler und die totale Pankreatektomie sowie die Pankreaslinksresektion. So wird bei einer Tumorlokalisierung im Bereich des Pankreaskopfes als Standardverfahren eine partielle Duodenopankreatektomie durchgeführt. Pankreaskorpuskarzinome werden per subtotaler Pankreaslinksresektion, gegebenenfalls mit zusätzlicher totaler Duodenopankreatektomie, chirurgisch entfernt. Das Mittel der Wahl bei einer Tumorlokalisierung im Pankreasschwanz ist ebenfalls eine Pankreaslinksresektion. Die Entfernung von Pankreaskörper- und Pankreasschwanztumoren wird oftmals aufgrund ihres fortgeschrittenen Stadiums in Verbindung mit einer sogenannten multiviszeralen Resektion durchgeführt. Trotz chirurgischer Therapiemöglichkeiten stellen sich etwa 90% aller Pankreaskorpus- und Pankreasschwanztumore zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als inoperabel dar. Eine totale Pankreatektomie als radikalste Form der Therapie, als sogenannte Ultima Ratio, ist nur in seltenen Fällen, bei den das gesamte Pankreas einnehmenden Tumoren oder bei Doppelkarzinomen, notwendig. Allerdings geht diese OP-Methode mit einer starken Morbidität einher, da es postoperativ zu schwersten metabolischen Entgleisungen des Zuckerstoffwechsels kommt und eine lebenslange Substitution exokriner und endokriner Enzyme zur Folge hat (Bachmann et al. 2006; Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018; Seufferlein et al. 2014; Wolfgang et al. 2013). Grundsätzliche mögliche postoperative Komplikationen sind unter anderem eine verzögerte Magenentleerung (10%-30%), eine erhöhte Morbidität (25%-40%) und ein Diabetes mellitus bei über 40% der Patienten, insbesondere nach subtotaler distaler Pankreatektomie und totaler Pankreatektomie. Eine weitere Komplikation nach vollständiger Pankreasentfernung stellt die Substitution aller vom Pankreas sezernierter Enzyme dar (Oettle 2018). Im Falle von fortgeschrittenen, primär inoperablen Pankreaskarzinomen bietet sich grundsätzlich

eine palliative Operation an, auf welche aber verzichtet werden sollte, da postoperativ keine Verbesserung der Prognose feststellbar ist (Seufferlein et al. 2013). Das alleinige Ziel der palliativen Chirurgie beruht auf der Vermeidung von möglichen Komplikationen, wie beispielweise das Beheben einer tumorbedingten Cholestase (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018).

Der Stellenwert einer Strahlentherapie und einer kombinierten Radiochemotherapie zur Therapie des Pankreaskarzinoms sind aufgrund widersprüchlicher und eingeschränkter Datenlagen sehr umstritten. Das Pankreaskarzinom ist grundsätzlich wenig strahlensensibel. Eine zusätzliche Strahlentherapie führt im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie zu einer erhöhten Toxizität und zeigt keinen Vorteil im Gesamtüberleben (Oettle 2018). Lediglich eine palliative Strahlentherapie dient einer verbesserten Symptomkontrolle und der Vermeidung von Komplikationen bei symptomatischen Metastasen (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Seufferlein et al. 2012; Seufferlein et al. 2014). Bezüglich einer Radiochemotherapie stellt sich eine ähnliche Lage dar. Aufgrund eingeschränkter und nicht eindeutiger Datenlage wird die Radiochemotherapie laut Seufferlein et al. (2013) in adjuvanter und additiver Form sowohl bei resektablen als auch bei nicht-resektablen Tumoren nur im Rahmen von klinischen Studien empfohlen. Jene Studien berichten über eine erhöhte Toxizität und über keine Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu einer adjuvanten Chemotherapie. Innerhalb von Metaanalysen ließ sich jedoch bei Tumoren im lokal fortgeschrittenen Stadium, welche mittels Radiochemotherapie behandelt wurden, eine signifikante Verbesserung der 18-Monate-Überlebensrate im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie feststellen. Allerdings lässt sich infolge der Radiochemotherapie eine erhöhte Inzidenz von hämatologischer und nicht hämatologischer Toxizität erkennen (Deutsche Krebsgesellschaft 2018).

Da bei ca. 70% aller Pankreastumorpatienten bereits bei der Diagnosestellung eine disseminierte Tumorerkrankung vorliegt, ist die Chemotherapie als systemische Therapie die einzige Therapieoption und spielt eine zentrale Rolle bei der multimodalen Behandlung des Pankreaskarzinoms. Dabei hat die Chemotherapie ihre Bedeutung vor allem in Form eines adjuvanten und palliativen Therapieansatzes (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018). Nach einer primär kurativen Operation erfolgt bei Pankreaskarzinompatienten der Stadien I-III standardisiert eine adjuvante Chemotherapie. Mittels adjuvanter Chemotherapie kann im Vergleich zum alleinigen chirurgischen Ansatz die 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 10% auf 20% und die 10-Jahres-Überlebensrate von ca. 8% auf 12% verbessert werden. Auch lässt sich analog die Mortalität senken. Seufferlein et al. (2013) empfiehlt als Mittel der Wahl für resezierte Pankreaskarzinome entweder eine Monotherapie mit Gemcitabin oder das

sogenannte Mayo-Protokoll, eine Kombinationstherapie aus 5-FU und Folinsäure. Dabei beträgt der klinische Benefit unter Gemcitabin ca. 25% und geht mit einer Verbesserung des Allgemeinzustandes, einer Gewichtszunahme und der Reduktion einer eventuellen Schmerztherapie einher. Adjuvante Therapieansätze zeigen deutlich Erfolge. So steigt unter Gemcitabin das mediane Überleben von ca. 3 Monate auf ca. 6,5 Monate und die 1-Jahres-Überlebensrate von 2% auf ca. 25% an. Auch sind die unter Gemcitabin auftretenden Nebenwirkungen insgesamt sehr günstig (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018). Eine Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) verglich Patienten die postoperativ eine adjuvante Chemotherapie bestehend aus 5-FU und Folinsäure erhielten, mit Patienten, die nur operativ versorgt wurden. Von den Patienten die postoperativ eine adjuvante Chemotherapie erhielten lebten nach 5 Jahren noch 21% und von den Patienten, die nur operativ versorgt worden, 8% (Sahora et al. 2008; Valle et al. 2014). Gemcitabin und 5-FU sind somit die aktuellen Empfehlungen im Rahmen einer adjuvanten Chemotherapie (Kleger et al. 2014). Ist der Tumor jedoch bereits lokal fortgeschritten oder sind Metastasen nachweisbar empfiehlt sich eine palliative Chemotherapie. In der Erstlinientherapie ist für lokal fortgeschrittene Pankreastumore nab-Paclitaxel mit Gemcitabin und FOLFIRINOX das Mittel der Wahl. Dabei besteht das FOLFIRINOX-Schema aus 5-FU, Leucovorin, Irinotecan und Oxaliplatin. Bei der Behandlung von metastasierten Pankreaskarzinomen wird entweder mit einer Monotherapie bestehend aus Gemcitabin oder mit FOLFIRINOX therapiert, welches im Vergleich zu Gemcitabin eine signifikante Steigerung der medianen Überlebenszeit (6,8 Monate vs. 11,1 Monate), eine verlängerte progressionsfreie Überlebenszeit (3,3 Monate vs. 6,4 Monate) sowie eine Steigerung der Remissionsrate präsentiert (Oettle 2018). Nachteil einer Behandlung mit FOLFIRINOX ist jedoch die erhöhte Toxizität und die Schwere der Nebenwirkungen (Conroy et al. 2011; Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Kunzmann et al. 2014; Valsecchi et al. 2014). Eine weitere Therapieoption ist ebenfalls die Behandlung mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel. In Kombination mit Gemcitabin konnte nab-Paclitaxel als erste Substanz bei metastasierten Pankreaskarzinomen eine deutliche Verlängerung des Gesamtüberlebens (6,7 Monate vs. 8,5 Monate) und eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (3,7 Monate vs. 5,5 Monate), im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin, erzielen. Auch zeigt sich eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu FOLFIRINOX (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Kleger et al. 2014; Oettle 2018; Valsecchi et al. 2014; Von Hoff et al. 2013). Neben den drei konventionellen Verfahren der Tumorthherapie (Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie) ist auch die sogenannte supportive Therapie, vor allem im Sinne einer Schmerztherapie, von großer Bedeutung. So beschreiben Patienten Pankreastumore als äußerst schmerzhaft (Chen

et al. 2006; Dennis et al. 2008). Zu den wichtigsten Optionen der Schmerztherapie zählen die medikamentöse Versorgung mit Opioiden und nichtsteroidalen Analgetika. Ein weiteres Ziel der supportiven Therapie ist das Vermeiden und das Beheben von, mit der Erkrankung einhergehenden, Komplikationen (Thromboprophyaxe, Punktion bei Aszites). Im Sinne einer Begleittherapie werden auch oftmals Pankreasenzyme und fettlösliche Vitamine substituiert. Zur Erhaltung einer möglichst hohen Lebensqualität sind antiemetische Medikamente sowie eine frühzeitige enterale beziehungsweise parenterale Ernährung bei unzureichender Nahrungsaufnahme und bei Gewichtsverlust dringend indiziert. Ziel ist es eine gewisse Lebensqualität solange wie möglich aufrechtzuerhalten, da beispielweise starker Gewichtsverlust mit einem schnelleren Krankheitsverlauf und einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018; Seufferlein et al. 2013). Erprobt werden in klinischen Studien auch neue, die Standardtherapie ergänzende Therapieansätze, wie beispielsweise Tumorstimmungsimpfung, die Applikation von Prodrugs, Angiogeneseinhibitoren, ebenso wie immunologische Ansätze (Arslan et al. 2014; Kleger et al. 2014). Eine vielversprechende immuntherapeutische Option stellt dabei das Extrakt der Europäischen Mistel dar. Wie auch bei der Behandlung des Mammakarzinoms wird *Viscum album* oftmals in Kombination mit einer Chemotherapie verabreicht, wobei sich eine gute Verträglichkeit gemeinsam mit Gemcitabin zeigt (Mansky et al. 2013). Einsatz findet die Misteltherapie vor allem bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinomen. In einer Studie von Axtner et al. (2016) ist für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, welche zusätzlich zur Chemotherapie Mistelextrakt erhielten, im Vergleich zu Patienten, welche ausschließlich eine Chemotherapie unterliefen, eine deutliche Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit erkennbar (12,1 Monate vs. 7,3 Monate). Auch gibt die Studie an, dass Patienten, welche nur mit Mistelextrakt behandelt wurden im Vergleich zu jenen Patienten, die keine adjuvante Therapie erhalten haben, ebenfalls eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit aufweisen (5,4 vs. 2,5 Monate). Über einen positiven Einfluss von Mistelextrakt in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin auf das Überleben von Pankreaskarzinompatienten berichten auch Matthes et al. (2010). Auch Schad et al. (2014) und Tröger et al. (2013) stellen jenen positiven Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit von Pankreaskarzinompatienten fest. Tröger et al. (2013) geben in ihrer randomisierten klinischen Studie mit 220 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom das mediane Überleben von Patienten, welche nur Mistelextrakt erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nur mittels Begleittherapie (best supportiv care) therapiert worden, mit 4,8 Monaten vs. 2,7 Monaten an ($p < 0,0001$). In einer weiteren Studie von Matthes et al. (2008) mit Patienten mit inoperablem Stadium

III/IV Pankreaskarzinom ist eine Äquivalenz zwischen der medianen Überlebenszeit unter Misteltherapie und unter Chemotherapie mit FOLFIRINOX feststellbar (11,6 Monate vs. 11,1 Monate).

Neben einer verlängerten Gesamtüberlebenszeit zeigt die komplementäre Therapie mit Mistelextrakt bei subkutaner und intravenöser Applikation innerhalb verschiedener Studien ebenfalls eine hohe Verträglichkeit, geringe Nebenwirkungen und eine damit einhergehende Symptomkontrolle (Matthes et al. 2010; Schad et al. 2014; Steele et al. 2014a, 2014b). Schad et al. (2014) gibt hierbei vor allem systemische Nebenwirkungen in Form von Fieber, erhöhter Körpertemperatur, Übelkeit, Kopfschmerzen und generellen Hautirritationen an. Tröger et al. (2013) berichten zudem, dass die krankheitsbezogene Symptomatik unter Mistelextrakttherapie bezüglich ihrer Schwere und ihrer Frequenz signifikant reduziert werden konnte. Auch innerhalb einer weiteren Studie von Tröger et al. (2014) lässt sich ebenfalls unter Therapie mit Mistelextrakt eine teilweise signifikante Senkung krankheitsbedingter Symptome und eine damit einhergehende Steigerung der Lebensqualität feststellen. Dabei präsentieren sich unter anderen vor allem bezüglich Fatigue, Schmerzen, Appetit- und Schlaflosigkeit deutlich bessere Ergebnisse. Aufgrund all jener Studien könnte die Misteltherapie als gut verträgliche und wirksame Zweitlinientherapie in der Behandlung lokal fortgeschrittener oder metastasierter Pankreaskarzinome bewertet werden.

3.5 Prognose

Das Pankreaskarzinom stellt aufgrund seiner hohen Malignität und seines schnellen und hohen Metastasierungspotenzials eine der prognostisch ungünstigsten Krebserkrankungen dar. So befinden sich bei Diagnosestellung ungefähr 70% aller Patienten in einem bereits fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018; Robert-Koch-Institut 2017a). Infolge der sehr ungünstigen Prognose sterben nahezu ebenso viele Personen an einem Pankreaskarzinom wie an diesem erkranken. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 9% sowohl bei Frauen als auch bei Männern und mit einer relativen 10-Jahres-Überlebensrate von 8% bei Frauen und 7% bei Männern, weist das Pankreaskarzinom die niedrigste mediane Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Robert-Koch-Institut 2016b, 2017a). Laut Li et al. (2004) liegt die mediane Überlebenszeit bei einem Pankreaskarzinom im fortgeschrittenen Stadium ohne Behandlung bei 3,5 Monaten. Mithilfe adäquater Behandlung kann diese auf 6 Monate steigen. Im Falle einer Resektion mit kurativer Absicht beträgt das Langzeitüberleben unter 20% (Deutsche Krebsgesellschaft 2018). Die beste und dennoch ungünstige Prognose ist nach einem

kurativ indizierten chirurgischen Therapieansatz gegeben, mit einer medianen Überlebenszeit von 10-24 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 25%. Nur das periampulläre Karzinom zeigt im Vergleich zu einem Pankreaskopfkarzinom eine um 30% verbesserte 5-Jahres-Überlebensrate. Grundsätzlich ist die Prognose mit abnehmender Differenzierung des Tumors und erfolgter lymphogener und hämatogener Streuung zunehmend schlechter (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Oettle 2018). Trotz zahlreicher Diagnoseverfahren und zunehmender therapeutischer Ansätze stellt das Pankreaskarzinom auch heute noch eine der tödlichsten und aggressivsten Krebsformen dar und verdeutlicht die Notwendigkeit für weitere effiziente Therapiemöglichkeiten.

4. Exokrine Pankreastumoren des Hundes

4.1 Epidemiologie

Das Adenokarzinom des Pankreas kommt mit einer Prävalenz von unter 5% bei Hunden und Katzen eher selten vor und stellt nur etwa 1% aller Tumorerkrankungen beim Hund dar (Driver 1997; Ettinger et al. 2005; Klopffleisch 2017b; Morrison 2002). Auch wurden Pankreasadenokarzinome bereits für weitere Tierarten, wie Rind und Pferd, beschrieben (Kircher et al. 1976; Klopffleisch 2017b; Rowlatt 1967). Laut Bennett et al. (2001) liegt das Risiko für Hunde bei einer geschätzten Inzidenz von 17,8/100.000 pro Jahr. Im Vergleich dazu ist das humane Pankreasadenokarzinom die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland und in den USA, mit 18.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Oettle 2018; Robert-Koch-Institut 2017a).

Das Alter betroffener Hunde beträgt durchschnittlich 9 beziehungsweise 10 Jahre, mit einer unteren Altersgrenze von 2 Jahren (Klopffleisch 2017b; Münster et al. 1988; Priester 1974; Seaman 2004). Zudem geben Withrow et al. (2001) und Priester (1974) eine Geschlechtsdisposition für weibliche Hündinnen an, wohingegen Fossum (2009) eine höhere Tendenz bei Rüden beschreibt. Ein erhöhtes Risiko zeigt sich auch insbesondere für verschiedene Terrier-Rassen, Labrador Retriever, Cocker und für andere Spaniel-Rassen. Kohn et al. (2012), Nelson et al. (2010) und Priester (1974) geben Tumore des exokrinen Pankreas als grundsätzlich meist hochmaligne und sehr aggressiv an, mit hoher und frühzeitiger Metastasierungstendenz und Metastasierungswahrscheinlichkeit. Exokrine Pankreastumoren können entweder primär pankreatischen Ursprungs sein oder sekundär metastatisch auftreten (Fossum 2009; Head et al. 2002; Klopffleisch 2017b; Seaman 2004). Metastasen des Pankreas treten dabei bevorzugt in den regionalen Lymphknoten, der Lunge, der Leber, dem anliegenden Peritoneum und dem Knochen auf. Primärtumore die sekundär in das Pankreas metastasieren, sind Melanome, Hämangiosarkome, Karzinome anderer Organe sowie Lymphome und Osteosarkome (Anderson et al. 1967; Chang et al. 2007; Dennis et al. 2008; Klopffleisch 2017b; Rowlatt 1967; Steiner et al. 2007). Ihren Ursprung nach, entstammen exokrine Pankreastumoren aus duktalem oder azinären Zellen. In den meisten Fällen entstammen sie jedoch duktalem Ursprung (Dennis et al. 2008; Ettinger et al. 2005; Klopffleisch 2017b). Im Gegensatz zum Menschen treten Adenokarzinome aufgrund der anatomischen Begebenheiten im Tier vor allem im zentralen Teil des Pankreas (Corpus) auf, aber auch häufig im duodenalen Schenkel (Dahme et al. 2007; Hecht et al. 2007; Klopffleisch 2017b). Die Ätiologie exokriner Pankreastumore ist ungeklärt. Es werden jedoch verschiedene ätiologische Faktoren wie biliärer Reflux, fett- und cholesterinreiche Ernährung, karzinogene Substanzen, chronische Pankreatiden und

Langzeitmedikamente als Ursache angenommen. Auch genetische Ursachen, wie die Aktivierung von KRAS-Genen, ebenso wie deren Mutation, wie sie in humanen Pankreastumoren bereits identifiziert wurden, konnten ebenfalls in Pankreasadenokarzinomen des Hundes und der Katze nachgewiesen werden und stellen eine der häufigsten genetischen Veränderungen innerhalb dieses Krankheitsbildes dar (Eser et al. 2014; Mayr et al. 2003; Nelson et al. 2010).

4.2 Klinik

Die klinischen Symptome sind oftmals unspezifisch und ähneln einer akuten Pankreatitis, einem akuten Abdomen und einer exogenen Pankreasinsuffizienz mit einem Maldigestionssyndrom. Üblicherweise zeigen betroffene Tiere hauptsächlich Durchfall, abdominale Schmerzen, Lethargie, Schwäche, Erbrechen, Anorexie, Gewichtsverlust sowie eine abdominale Ausdehnung aufgrund raumfordernder Massen und Flüssigkeiten. Des Weiteren können ein sekundärer Diabetes Mellitus, ein Pleuraerguss, ein Ikterus infolge einer extrahepatischen Gallenobstruktion, abdominaler Palpationsschmerz und ein Aszites durch eine Pankreatitis und eine Peritonealkarzinomatose auftreten. So ist bei ca. 1/3 der Katzen eine abdominale Masse palpierbar. Bei Hunden ist dies eher selten (Bennett et al. 2001; Bright 1985; Fossum 2009; Klopffleisch 2017b; Kohn et al. 2012; Münster et al. 1988; Seaman 2004). In wenigen Fällen können sich im Zusammenhang mit dem Pankreasadenokarzinom auch paraneoplastische Syndrome, wie beispielsweise Alopezie und Anämie, entwickeln (Cave et al. 2007; Dennis et al. 2008; Fabbrini et al. 2005; Klopffleisch 2017b).

4.3 Diagnostik

Um einen Pankreastumor zuverlässig zu diagnostizieren, sollten alle zur Verfügung stehenden diagnostischen Mittel ausgeschöpft werden. Dazu gehören eine Blutchemie, eine abdominale Ultraschalluntersuchung, eine thorakale Röntgenaufnahme zur Feststellung von Metastasen, wenn vorhanden eine CT-Aufnahme und im Zweifelsfalle eine Laparotomie. Die Blutchemie ist meistens unspezifisch. Die labormedizinische Untersuchung kann jedoch Leukozytose, Anämie, Hyperglykämie, Hyperbilirubinämie, erhöhte Serum-Alaninaminotransferase-Aktivität beziehungsweise allgemein erhöhte Leberwerte, sowie erhöhte Amylase und signifikant erhöhte Lipasewerte ergeben (Dennis et al. 2008; Fossum 2009; Klopffleisch 2017b; Quigley et al. 2001). Dabei wird die Sensitivität der Serumaktivität der Amylase und der Lipase mit mäßig bis hoch angegeben (Hess et al. 1998). Auch die der kaninen spezifischen pankreatischen Lipase soll hoch sensitiv sein, hat aber auch bei Hunden mit akuten Abdomen ein 40%iges

Risiko für falsch positive Diagnosen (Haworth et al. 2014). Eine röntgenologische Untersuchung hat aufgrund der schlechten Darstellbarkeit des Pankreas vor allem eine differenzialdiagnostische Bedeutung und dient unter anderem der Detektion von Lungenmetastasen (Fossum 2009; Hecht et al. 2007; Münster et al. 1988). Ein entscheidendes Diagnosemittel ist der abdominale Ultraschall. Mittels Sonografie ist es möglich die Pankreasmasse darzustellen, jedoch ist auch per Sonografie keine Differenzierung zwischen Pankreatitis und Pankreastumoren möglich. Sonografische Befunde wie beispielweise Lebertumore können jedoch hinweisend auf ein bösartiges Geschehen sein (Hecht et al. 2007; Hess et al. 1998; Kohn et al. 2012; Mayr et al. 2003; Morrison 2002). Um den Ultraschallbefund zu sensitivieren, empfiehlt sich eine ultraschallgestützte Feinnadelaspiration, welche für den Nachweis von Tumorzellen diagnostisch sein kann (Bennett et al. 2001; Corder et al. 2015; Klopffleisch 2017b). So besteht laut Klopffleisch (2017b) und Corder et al. (2015) eine hohe Korrelation zwischen den zytologischen und histologischen Untersuchungen. Ein weiteres hoch sensitives Diagnosemittel ist die kontrastmittelverstärkte Computertomografie zur Diagnose des Tumors und von Metastasen (Klopffleisch 2017b; Kohn et al. 2012; Posch 2002). Auch die beiden invasiven diagnostischen Methoden der Organbiopsie und der Laparoskopie ermöglichen eine genaue Diagnostik, ein therapeutisches Eingreifen jedoch nicht (Spillmann et al. 2000). Falls alle bis dato durchgeführten bildgebenden Befunde unklar waren, empfiehlt sich schlussendlich die Laparotomie mit der Möglichkeit eines palliativen-chirurgischen Vorgehens (Klopffleisch 2017b; Spillmann et al. 2013).

4.4 Therapie

Bei Hunden, bei denen nur das Pankreas makroskopisch betroffen ist, kann die chirurgische Therapie ein sinnvoller palliativer Eingriff sein. Die Therapie der Wahl ist dabei die partielle Pankreatektomie. Je nach Ausmaß der Neoplasie empfiehlt sich eine zusätzliche partielle Duodenektomie nach dem Vorbild der humanmedizinischen Whipple-Operation (Dennis et al. 2008; Kessler 2013; Klopffleisch 2017b). Eine andere chirurgische Methode als lebensverlängernde Maßnahme ist die totale Pankreatektomie, welche aufgrund zahlreicher Komplikationen, einem sehr hohen Mortalitätsrisiko und sehr geringen Heilungschancen, jedoch nur selten in der Veterinärmedizin angewandt wird (Fossum 2009; Withrow et al. 2013). Aufgrund der äußerst ungünstigen Prognose werden viele Patienten intraoperativ oder bereits direkt nach Diagnosestellung euthanasiert (Fossum 2009; Kessler 2013; Nolte et al. 2000). Neben einer chirurgischen Therapie kann auch eine pharmakologische Therapie mittels Chemotherapeutika versucht werden, jedoch erweist sich das Pankreasadenokarzinom als sehr

chemotherapieresistent und trägt so zu dessen äußerst schlechten Prognose bei. Das Mittel der Wahl bei einem Therapieversuch ist Gemcitabin. So wurde laut Martinez-Ruzafa et al. (2009) mittels einer Kombination aus Gemcitabin und Carboplatin nach sechs Zyklen bei einer von drei Katzen eine komplette Remission des Pankreaskarzinoms erzielt. Ein anderer aktuell diskutierter Ansatz ist der intrakavitäre Einsatz von Cisplatin/Carboplatin beim Hund beziehungsweise Carboplatin bei der Katze (Kessler 2013). Einen weiteren Ansatz zeigt Althaus (2010) mit dem Einsatz von 5-FU und Paclitaxel. Aber auch diese Therapieversuche beschränken sich bis dato nur auf Einzelberichte und sind nicht kliniktauglich. Aufgrund der fehlenden Radiosensitivität von Pankreaskarzinomen ist auch eine Strahlentherapie nicht erfolgversprechend (Ghaneh et al. 2007; Tempero et al. 2017). Einen Goldstandard für die Behandlung von exokrinen Pankreaskarzinomen gibt es somit bis heute nicht (Paoloni et al. 2007). Grundsätzlich existiert für das fortgeschrittene exokrine Pankreaskarzinom derzeit keine erfolgversprechende heilende Behandlung (Bennett et al. 2001).

Von humanmedizinischen Patienten werden Pankreastumore als äußerst schmerzhaft beschrieben, weshalb angenommen wird, dass das auf veterinärmedizinische Patienten ebenso zutrifft (Chen et al. 2006; Dennis et al. 2008). Palliative Behandlungsgrundlagen beruhen somit vor allem auf einer Schmerzlinderung. Zur Vermeidung von Nausea und Vomitus werden Antiemetika verabreicht. Des Weiteren ist es ratsam, diätische Maßnahmen zu ergreifen. Um den Appetit des Tieres anzukurbeln und zu steigern, stehen verschiedene medikamentöse Mittel zur Verfügung. Sollte sich trotz alledem, plus zusätzlicher chirurgischer und chemotherapeutischer Maßnahmen, die Lebensqualität des tierischen Patienten nicht verbessern, ist die Euthanasie des Tieres die einzige vertretbare Alternative (Kessler 2013). Entsprechend der kaum vorhandenen Therapiemöglichkeiten sind auch in diesem Bereich weitere Therapieansätze dringend notwendig. Eine mögliche Behandlungsoption könnte auch hier eine Immuntherapie mittels Mistelextrakt sein. Zwar gibt es bisher keine entsprechenden Studien, die die Wirkung von Mistelextrakten auf das veterinärmedizinische Pankreasadenokarzinom untersuchen, betrachtet man aber die dazu durchgeführten humanmedizinischen Studien, könnte Mistelextrakt auch für dieses Krankheitsbild eine durchaus vielversprechende alternative Therapiemöglichkeit darstellen.

4.5 Prognose

Aufgrund der sehr hohen Metastasierungsrate, der stark eingeschränkten wirksamen Behandlungsmöglichkeiten und der krankheitsbedingten einhergehenden massiven Zerstörung des Pankreas, ist die Prognose des exokrinen Pankreasadenokarzinoms als äußerst schlecht, sogar als infaust zu bewerten. Bei den meisten Patienten werden bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Metastasen festgestellt und werden nicht selten während des chirurgischen Therapieversuches intraoperativ euthanasiert (Fossum 2009; Kessler 2013; Klopffleisch 2017b; Nolte et al. 2000). Die medianen Überlebenszeiten dokumentierter Fälle betragen laut Kessler (2013) und Larsson et al. (1989) 3-90 Tage nach Diagnosestellung und laut Dennis et al. (2008) 5-120 Tage nach chirurgischem Eingriff. Ist es trotz aller zur Verfügung stehender Maßnahmen nicht möglich die Lebensqualität des Tieres schmerzfrei aufrechtzuerhalten beziehungsweise zu verbessern, ist die Euthanasie die einzige ethisch und moralisch vertretbare Alternative (Kessler 2013).

5. Die Mistel und die Misteltherapie

5.1 Allgemeines

Über die Mistel und ihre medizinische Bedeutung gibt es schon seit mindestens 2.500 Jahren heilkundliche Überlieferungen (Rippe 2017). So berichtet bereits Hippokrates (460-377 v.Chr.), wie auch Dioskurides (40-90 n.Chr.), über Mistelextrakt und dessen Anwendung bei „Milzsucht“ (heute Hypochondrie) und chronischen Stoffwechselerkrankungen von Milz und Leber (Rippe 2017). Plinius G. P. Secundus (27-79 n.Chr.) hingegen überlieferte die Anwendung von Mistel bei Epilepsie und Schwindel. Auch Celsus (um die Geburt Christi) dokumentierte ebenfalls die Anwendung bei Epilepsie, jedoch sah er bereits eine Indikation der Misteltherapie bei Krebserkrankungen. Die Kelten, wie auch Mediziner des Altertums und des Mittelalters, sahen die Mistel ebenfalls als Heilpflanze und Allheilmittel an (Franz 1985; Luther et al. 1986). In der anthroposophischen Medizin gilt die Mistel neben den konventionellen onkologischen Therapieansätzen als alternative und unterstützende Therapieoption und als eine der wichtigsten und stärksten pflanzlichen Arzneimittel gegen Tumorerkrankungen (Büssing 2000; Wilkens et al. 2016). Jener Ansatz wurde erstmalig Ende 1916 von Rudolf Steiner, dem Begründer der Anthroposophie, aufgegriffen. 1920 stellte er die Mistel als unkonventionelle Therapiemöglichkeit gegen Krebs öffentlich vor und empfahl deren Anwendung als Onkologikum. Die Ärztin Ita Wegmann war es dann, welche die Idee der Misteltherapie von Steiner bereits 1917 aufgriff und gemeinsam mit dem Apotheker Adolf Hauser das erste Mistelpräparat Iscar entwickelte und auch anwandte (Steiner 1961; Wilkens et al. 2016). Parallel dazu begann Koch (1938) in ersten Versuchen die zytostatische Wirkung der Mistel mit Hilfe von in vivo- und in vitro Krebsmodellen nachzuweisen. Vor allem aber innerhalb der letzten Jahrzehnte nahm die Bedeutung der Mistel hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen und immunstimulierenden Inhaltsstoffe als vielversprechender Ansatz im Kampf gegen Krebserkrankungen zu. Steiners Ansatz wurde wissenschaftlich aufgegriffen und erforscht. Die Forschung konzentrierte sich dabei hauptsächlich auf die Analyse der Inhaltsstoffe sowie auf deren Wirkung und deren Effekt auf das Immunsystem (Stein 1995).

Botanisch gehört die weißbeerige Mistel, *Viscum album* L. zur Familie Viscaceae, eine Unterfamilie der Loranthaceae. Sie ist ein immergrüner, halbstrauchiger, epiphytischer semi- und hauptsächlich ektoparasitisch lebender Sprossparasit. Als Halbschmarotzer wächst sie auf den Ästen verschiedener Laubbäume, aus deren Holzteil sie Wasser und darin gelöste Nährsalze entzieht (Luther et al. 1986). Weltweit wurden schätzungsweise bereits 1.500 verschiedene Mistelarten

identifiziert. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich dabei vor allem von Europa, über Südwest- und Zentralasien, bis nach Japan. *Viscum album* L. findet sich in Mittel- und Südeuropa sowie in den milden Regionen Skandinaviens. Typische Laubbäume auf denen die weißbeerige Mistel wächst, sind Linden, Pappeln, Apfelbäume, Ahorn, Birken, Weiden, Hainbuchen, Robinien und Weißdorn (Becker 1986; Grieve 1994; Wilkens et al. 2016). Neben der Laubholzmistel (*Viscum album* ssp. *album*) wird die Art *Viscum album* hinsichtlich ihrer Wirtsspezifität in zwei weitere Unterarten unterteilt – in die der Tannen- (*Viscum album* ssp. *abietis*) und in die der Kiefermistel (*Viscum album* ssp. *austriacum*). Unterschiede innerhalb dieser drei Arten bestehen nicht nur bezüglich ihrer Wirtsspezifität, sondern auch hinsichtlich ihres Gesamtextraktes, dessen jahreszeitlich bedingten schwankenden Gehaltes innerhalb der verschiedenen Bestandteile der Mistelpflanze und bezüglich der verschiedenen Anwendungsgebiete der unterschiedlichen Mistelextrakte. Trotz Unterschiede ist eine eindeutige morphologische Bestimmung der Mistel nur über die dazugehörige Wirtspflanze möglich (Hegi 1981; Rippe 2017; Wilkens et al. 2016).

Für eine Verbreitung ist die Mistel obligat auf Vögel angewiesen (Ornithochorie). Die Früchte der Mistel reifen im November/Dezember aus, bleiben bis ins kommende Frühjahr hängen und dienen so verschiedenen Vogelarten als Winternahrung. Vogelarten wie die Mönchsgrasmücke fressen lediglich die Fruchthülle und das daran hängende äußere Fruchtfleisch. Der übrig gebliebene Kern mit seiner klebrigen Hülle wird in der Nähe des Mistelbusches zurückgelassen und die mit einer Schleimschicht behafteten Samen bleiben somit auf einem dem Mistelbusch benachbarten Ast zurück. Dem gegenüber steht beispielsweise die Misteldrossel. Die Misteldrossel schluckt die gesamte Frucht und scheidet anschließend über den Darm den Mistelkern und die unverdaute Fruchthülle wieder aus (Endochorie). Die Samen werden somit mit einer Restschleimhaut, aber ohne Beerenhaut, auf den zukünftigen Wirtsbaum ausgeschieden. Im Frühjahr beginnt der Samen dann zu keimen. Im Winter, von Januar/Februar bis Anfang Mai, blühen dann alle drei Unterarten. Mistelpflanzen sind diözisch, weshalb ein immergrüner Mistelbusch entweder nur weibliche oder nur männliche Blüten besitzt. Eine anschließende Bestäubung erfolgt entomogamisch. Typische Vertreter hierfür sind unter anderem Hummeln, Wespen, Ameisen und Fliegen. Ende des Jahres werden die Beeren, welche im botanischen Sinne sogenannte Scheinbeeren sind, reif und dienen den verschiedenen Vogelarten wieder als Nahrung, welche so die Samen erneut verbreiten (Luther et al. 1986; Petercord et al. 2017; Ramm 2006).

5.2 Inhaltsstoffe der Mistel und deren Wirkung

Die Bedeutung der Mistel in der Medizin beziehungsweise insbesondere in der Onkologie beruht auf den biologisch aktiven Inhaltsstoffen der Mistelextrakte, welche für die wachstumshemmenden, immunstimulierenden und mittels induzierter Apoptose zytotoxischen Eigenschaften der Mistel verantwortlich sind (Büssing 2000; Kienle Kiene 2003; Marvibaigi et al. 2014).

Das Gesamtextrakt einer Mistel besteht aus mehr als 1.000 Inhaltsstoffen. Dazu gehören 600 verschiedene Proteine wie Glykoproteine (Mistellektine), ebenso wie Polypeptide (Viskotoxine), Kohlenhydrate, Aminosäuren, zahlreiche Enzyme, Fette, Oligo- und Polysaccharide, Flavonoide, Phenylpropane, DNA, Triterpene, Lignane, Alkaloide, Kalium, Vesikel und Phosphor (Büssing 2000; Jäger et al. 2007; Kienle Kiene 2003; Klett et al. 1989; Mueller et al. 1990; Orhan et al. 2006; Paepke 2018; Winkler et al. 2005). Die schlussendliche chemische Zusammensetzung des Mistelextraktes ist dabei abhängig von der Jahreszeit (Sommer-/Wintersaft), der Erntezeit, der Lokalisation und der Art des Wirtsbaumes sowie von der Technik der Extrakterstellung und von der Wachstumsphase der Pflanze (Bar-Sela 2011; Zee-Cheng 1997). Die beiden bedeutendsten und am besten erforschten Inhaltsstoffe der Mistel, sind die sogenannten Mistellektine (ML) und die Viskotoxine. Die Mistellektine, welche aufgrund ihrer Zuckerspezifität in Mistellektine I-III eingeteilt werden, bilden die Hauptkomponente des Mistelextraktes und befinden sich überwiegend im Zentrum der Pflanze, im Senker und in älteren Stengeln. Der Lektin Gehalt eines Mistelextrakts unterliegt, wie bereits erwähnt, verschiedenen Faktoren. Am höchsten ist er im Winter. Als lektinreiche Wirtsbaumarten zählen vor allem Laubbäume wie die Pappel, die Eiche, die Linde, der Apfelbaum und die Esche. Dem gegenüber steht die Kiefermistel, welche den geringsten Lektin Gehalt aufweist (Paepke 2018). Funktionell und strukturell weisen Mistellektine Verwandtschaft zu Abrinlektinen (*Abrus praecatorius*) und Ricinuslektinen auf, welche ebenfalls zytolytisch und hämolytisch wirksam sind. ML bilden eine Gruppe von Proteinen, welche die Fähigkeit besitzen Zuckerreste zu erkennen und sich an diese zu binden. So wird D-Galaktose spezifisch von ML I gebunden, ML II bindet D-Galaktose und N-Acetyl-Galaktosamin und ML III bindet ausschließlich N-Acetyl-Galaktosamin. Mistellektine I-III gehören zu der Ribosomen-inhibierenden Proteinfamilie (RIP) und bestehen strukturell aus zwei Ketten, einer A-Kette und einer B-Kette, welche per Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die A-Kette hemmt in zellfreien und zellulären Systemen die Proteinbiosynthese, indem sie den Schritt der Elongation inhibiert. Jene Inhibierung ist die Folge einer Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung an Adenin-4324 an der 28. Untereinheit der ribosomalen RNS. Als Folge der Inhibierung wird die Apoptose oder der nekrotische Zelltod der Zelle eingeleitet. Aufgabe der B-Kette ist es wiederum

Kohlenhydrate zu binden, dadurch den Kontakt mit der Zellmembran herzustellen und somit die zelluläre Aufnahme des Hololectins zu vermitteln. Sie dient somit also der Bindungsspezifität zu den Zielzellen. (Bantel et al. 1999; Endo et al. 1988; Franz et al. 1981; Kienle Kiene 2003; Kreis 2009; Schink 1990; Voelter et al. 2005). Auf jene, durch beide Ketten induzierte Ereignisse, beruht der antitumorale beziehungsweise zytotoxische Effekt, welcher sich in vitro für eine Vielzahl von Tumorzelllinien demonstrieren lässt (Büssing 2000; Büssing et al. 1996; Kienle Kiene 2003; Pryme et al. 2006). Neben ihren antitumoralen Effekt erzeugt die Mistel zudem einen immunmodulatorischen Effekt. Jener Effekt ist ebenfalls auf die B-Kette zurückzuführen, welche die Sekretion von zahlreichen Zytokinen, ebenso wie die daraus resultierende Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Helferzellen steigert (Hajto et al. 1998; Lee et al. 2009). Beuth et al. (2008) zeigen in einer Studie jene signifikante Steigerung von NK- und T-Zellen in 20 Mammakarzinompatientinnen, die subkutan Mistellektine erhalten haben. Auch lässt sich eine vermehrte Phagozytoseaktivität und ein erhöhter Aktivitätszustand von TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und IFN- γ (Interferon- γ) sowie von lymphatischen Zellen beobachten. Ein Schutz der DNA vor Methylierungsprozessen kann ebenfalls festgestellt werden (Fischer 2006; Hajto et al. 1997; Hajto et al. 1998; Kienle Kiene 2003; Lee et al. 2009). Stauder et al. (2002) berichten in ihrem Überblick über präklinische und klinische Studien bezüglich Mistellektine und ihrer Wirkung, dass in einer Vielzahl von Experimenten der zytotoxische und immunstimulierende Effekt von Mistelextrakten nachgewiesen werden konnte.

Die zweitwichtigsten misteltypischen Inhaltsstoffe bilden die Viskotoxine. Viskotoxine sind basische Polypeptide und gehören zur Gruppe der Thionine. Sie ähneln in ihrer chemischen Struktur den Cardiotoxinen von Schlangen und weisen einen stärkeren zytostatischen Effekt auf als beispielsweise das Zytostatikum Vincristin. Strukturell bestehen sie aus 46 Aminosäuren und 3 Disulfidbrücken. Die namensgebende Zytotoxizität schwankt innerhalb der unterschiedlichen Untergruppen der Viskotoxine, ebenso wie von Wirtsbaum zu Wirtsbaum (Paepke 2018; Schaller et al. 1996; Wilkens et al. 2016). Im Gegensatz zu den Mistellektinen ist der Gehalt an Viskotoxinen im Sommer am höchsten und befindet sich vor allem in den äußeren Bereichen der Pflanze, in sehr jungen Blättern, blütentragenden Kurztrieben, Beeren und Stengeln. Der zytolytische/zytostatische Effekt beruht auf der Auslösung des nekrotischen Zelltodes durch Lyse der Zellmembran. Ursächlich für die Lyse ist vermutlich eine Bindung der Thionine an Membranphospholipide, welche anschließend zur Porenbildung und somit zur Zellwandschädigung führt (Becker et al. 2005; Büssing 2000; Paepke 2018). Coulon et al. (2002) berichten in ihrer Studie über die zytotoxische Wirkungsweise von

Viskotoxinen, wobei es infolge der zytotoxischen Wirkung zu Leckstellen innerhalb der Doppelmembran der Zelle kommt, welche mit zunehmender Quantität folglich zu einem Aufbrechen der Doppelmembran führen und somit schlussendlich zum Untergang der Zelle. Wie auch Mistellektine dienen Viskotoxine der Immunmodulation, indem sie die Aktivität von Granulozyten und T-Zellen mittels respiratorischer Burst und Phagozytose stimulieren. Auch steigern sie die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, bewirken eine Freisetzung von IL-6 und hemmen die Proteinbiosynthese sowie die DNA- und RNA-Synthese (Bopp 2006; Büssing 2000; Fischer 2006; Giudici et al. 2005; Kienle Kiene 2003; Rostock 2000). Studien von Schaller et al. (1996) und Tabiasco et al. (2002) berichten ebenfalls über den immunogenen Effekt der Viskotoxine. Peptide, welche einige Eigenschaften der Viskotoxine aufweisen, sind die in der Mistel enthaltenen sogenannten Kuttan'schen Peptide. Kuttan et al. (1993) konnten in ihrer Studie sowohl zytotoxische als auch immunstimulierende Wirkungen feststellen. Im Rahmen von Tierversuchen zeigt sich zudem eine antitumorale Wirkung. Andere Stoffe wie Triterpene und Flavonoide dienen der Stabilisierung und der Modulierung der Wirkung von Viskotoxinen und Mistellektinen. Weitere Komponenten der Mistel und ihre entsprechenden Effekte sind im Anhang, in Tabelle 1, zusammengefasst.

Zahlreiche wissenschaftliche Studien belegen den Immunsystem verstärkenden Effekt der Mistel, ebenso wie den zytotoxischen Effekt, welcher die Tumorerstörung beziehungsweise Tumorreduzierung steigern kann. Sowohl in vitro als auch in vivo konnten immunstimulierende und zytotoxische Wirkungen der Mistel nachgewiesen werden (Büssing 2006; Büssing et al. 2005; Eggenschwiler et al. 2007; Hajto 1986; Heinzerling et al. 2006; Johansson et al. 2003; Yang et al. 2011; Yoon et al. 1999; Zhao et al. 2012). So lässt sich nach der Gabe von Mistelextrakt ein signifikanter Anstieg der Anzahl von Granulozyten, Monozyten und der gegen Krebszellen gerichteten NK-Zellen, T-Helferzellen und Pan-T-Zellen beobachten. Auch berichten Büssing et al. (2007) über eine T-Zell-Stabilisierung unter Misteltherapie, während bei Patienten ohne Misteltherapie eine deutliche Abnahme dieser feststellbar war. Somit induziert die Mistel also sowohl eine Stabilisierung als auch eine Zunahme jener Zellen, welche direkt an der Tumorabwehr beteiligt sind und verbessert zudem die zelluläre und auch die humorale Immunantwort (Büssing 2006; Büssing et al. 2007; Gardin 2009; Heiny et al. 1998; Kienle et al. 2009; Kienle Kiene 2003; Kienle et al. 2010; Marvibaigi et al. 2014; Matthes et al. 2005). Weiterhin zeigen beispielsweise Pae et al. (2000) in ihrer Studie, dass Mistellektine die Sensitivität von MCF-7 Zellen gegenüber einer TNF- α induzierten Apoptose erhöhen. Auch ist eine gesteigerte Aktivität von IL-2, IL-6 und IL-12 sowie eine Steigerung der Phagozytoseaktivität und der TNF- α und IFN- γ -Anzahl in verschiedenen Studien feststellbar (Friedel et al. 2009; Kienle 2009; Kovacs 2000; Son et al. 2010). Es

wird angenommen, dass der immunstimulierende/immunmodulierende Effekt der Mistel auf proinflammatorische Zytokine beruht, welche wiederum auf eine verstärkte Balance des unspezifischen Immunsystems hinweisen. Weiterhin konnten auch antiangiogene und proapoptische Effekte nachgewiesen werden (Bopp 2006; Hajto et al. 1990; Kienle et al. 2006). Aufgrund der Aktivierung von Granulozyten und Lymphozyten, der Induktion verschiedener Zytokine und der Fähigkeit zur Stimulation von Phagozyten, wird die Mistel als „biological response modifier“ eingestuft (Beuth et al. 1994; Kuttan et al. 1993; Pae et al. 2000).

In einer Vielzahl vorklinischer und klinischer Studien konnte der zytotoxische und antitumorale Effekt der Mistel und derer aktiven Verbindungen vor allem gegenüber Brustkrebs festgestellt werden (Beuth et al. 2006; Burger et al. 2001; Drees et al. 1996; Hugo et al. 2007; Kelter et al. 2007; Knöpfl-Sidler et al. 2005; Maier et al. 2002; Ramaekers et al. 2007). Jener mistelbedingte Effekt zeigt sich aber auch für zahlreiche andere Tumorzelllinien, wie zum Beispiel auf Leberkarzinom-, Pankreaskarzinom- und Lymphomzelllinien (Burger et al. 2001; Harmsma et al. 2006; Mabed et al. 2004; Maier et al. 2002; Matthes et al. 2005; Matthes et al. 2004). Laut Harmsma et al. (2006) und Ramaekers et al. (2007) beruht diese antitumorale Wirkung auf einer mistelbedingten induzierten Apoptose.

5.3 Präparate, Anwendungsbereiche und Wirkungsspektrum

Mit dem Beginn der durch Rudolf Steiner und Ita Wegmann erfolgreich eingesetzten Misteltherapie bei Krebspatienten werden in Deutschland seit über 100 Jahren die unterschiedlichsten Krebserkrankungen ergänzend und unterstützend mit Mistelextrakten behandelt. Im deutschsprachigen Raum werden derzeit bei etwa 40%-50% der humanmedizinischen Tumorpatienten komplementärmedizinische Krebstherapien angewandt. *Viscum album* stellt hierbei das am meisten verwendete Mittel dar (Schwabe et al. 2004). Eine Studie von Melzer et al. (2009) gibt sogar eine Prävalenz von adjuvanten Misteltherapien zur Basistherapie von Tumoren mit zwischen 29% und 77% an.

Das Anwendungsspektrum der Mistel ist weit gefächert und ist je nach Wirtsbaum unterschiedlich. Derzeit gibt es in Deutschland 4 zur Krebsbehandlung zugelassene anthroposophische Mistelpräparate, Abnobaviscum®, Helixor®, Iscador® und Iscucin®. Neben den unterschiedlichen Herstellern unterscheiden sich die 4 Präparate auch bezüglich ihres Herstellungsprozesses, ihres Lektin Gehaltes sowie hinsichtlich ihrer Wirtsbäume. Lediglich die Kiefer ist als Wirtsbaum in allen 4 Präparaten enthalten. Da das Präparat Iscador® im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, wird ausschließlich auf jenes Präparat genauer eingegangen. Iscador® enthält sowohl den Saft von

Winter- als auch von Sommermisteln. Die Mischung beider zu einem Extrakt findet in einer hochoberflächig rotierenden Maschine statt. Die Rohmischung wird anschließend verdünnt, sodass ein wässriges Mistelextrakt vorliegt, welches nach seiner Gewinnung einer Milchsäuregärung unterzogen wird. Zur Verfügung stehen 5 verschiedene Präparationen unterschiedlicher Wirtsbaummisteln (siehe Tabelle 1). Zudem gibt es zwei sogenannte Iscador® Spezial-Formulierungen, Iscador® M spezial und Iscador® Qu spezial. Im Gegensatz zu den anderen 5 Iscador® Präparaten sind die Spezial-Zubereitungen auf einen konstanten Mistellektin Gehalt eingestellt. Die Applikation des Präparates erfolgt grundsätzlich subkutan (Iscador 2019; Rippe 2017; Wilkens et al. 2016). Im Rahmen von Studien und Experimenten werden aber auch Applikationsformen wie intramuskulär, oral, intratumoral, intraperitoneal und intrapleurale beschrieben (Berger et al. 1983; Beuth et al. 2006; Drees et al. 1996).

Tabelle 1: Iscador® Präparate und deren Wirtsbäume der Rohsubstanz (Iscador 2019)

Iscador® M	Viscum Mali (Apfelbaummistel)
Iscador® Qu	Viscum Quercus (Eichenmistel)
Iscador® A	Viscum Abietes (Tannenmistel)
Iscador® U	Viscum Ulmi (Ulmenmistel)
Iscador® P	Viscum Pini (Kiefernmistel)
Iscador® Qu 5 mg spezial	Gesamtlektin 375 ng/ml
Iscador® M 5 mg spezial	Gesamtlektin 250 ng/ml

Im Sinne einer homöopathischen Therapie findet die Mistel vielfachen Einsatz. Indikationen sind beispielsweise Schlafstörungen, Allergien, Epilepsie und Kopfschmerzen (Rippe 2017). Bewiesene und besser untersuchte Indikationen für die Misteltherapie sind Präkanzerosen zur Progressionsverhinderung, wie beispielsweise Zervixdysplasien, Dysplasien bei Colitis ulcerosa und proliferierende Mastopathien. Zudem wurde unter Behandlung von Iscador® bei Metastasen, inoperablen Tumoren oder Rezidiven, neben der Verbesserung des Allgemeinbefindens und der analgetischen Wirkung auch gelegentlich eine Regression von Tumoren, sowie ein Wachstumsstillstand nachgewiesen. Somit besteht auch insbesondere bei verschiedensten Tumorerkrankungen, Metastasen und inoperablen Tumoren eine Indikation für eine Misteltherapie. Die Misteltherapie soll dabei vor allem im Rahmen der Nachsorge, Nebenwirkungen einer Chemo- und/oder Strahlentherapie vermindern, die

rezidiv- und metastasenfreie Überlebenszeit verlängern und primär die Lebensqualität verbessern (Matthiessen et al. 1995; Rippe 2017; Wilkens et al. 2016). So zeigt sich im Rahmen der Behandlung des B-Non-Hodgkin-Lymphoms nach subkutan applizierter Mistel-Monotherapie in einer Studie von Kühn (2005) in 42% der Fälle eine partielle oder sogar komplette Remission. Auch lässt sich nach subkutan applizierter Misteltherapie bei der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) bei 8,1% der Patienten ebenfalls eine partielle und bei 13,1% der Patienten eine komplette Remission feststellen (Mabed et al. 2004). Neben der subkutanen Mistelapplikation demonstrieren auch die intraläsionale und intratumorale Applikation insbesondere bei der Behandlung des HCC und des duktales Mammakarzinoms in vivo eine gute Ansprechbarkeit. So wurde bei nicht operablen HCCs sowohl eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität als auch eine komplette Tumorremission beobachtet (Matthes et al. 2004). Auch für das duktales Mammakarzinom ist eine deutliche Reduzierung des Zellwachstums sowie eine Abnahme der Tumormasse erkennbar (Beuth et al. 2006). Neben *Viscum album* gibt es noch zahlreiche weitere Mistelarten deren zytotoxischer Effekt spezifisch auf die in dieser Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinie MCF-7 nachgewiesen werden konnte. So weisen die Triterpenoide und die triterpenoidischen Saponine der Koreanischen Mistel zytotoxische Effekte gegen MCF-7 auf, ebenso wie die Flavonoide der Chinesischen Mistel. Auch die Iranische Mistel, die Kalifornische Mistel und die Indische Mistel demonstrieren innerhalb verschiedener Studien ihre zytotoxische Wirkung gegen jene Brustkrebszelllinie. Weitere Mistelarten wie beispielsweise die Kamerunische Mistel und die Kalifornische Mistel zeigen jenen Effekt auch gegenüber anderen Tumorzelllinien (Dashora et al. 2011; Hojjat et al. 2006; Jacobo-Salcedo et al. 2011; Johansson et al. 2003; Pieme et al. 2012; Yang et al. 2011; Zhao et al. 2012). Präparate der Europäischen Mistel und deren Wirkung sind jedoch am besten erforscht. So ist für Iscador® Qu und Iscador® M in einer Studie von Knöpfel-Sidler et al. (2005) eine Inhibierung der Krebszellproliferation erkennbar. Auch in einer anderen Studie mit der HER2-Brustkrebszelllinie als Modelzelllinie wurde beobachtet, dass Iscador® M, die durch den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) -bedingte Tumorproliferation, inhibiert (Hugo et al. 2007). Burger et al. (2001) beispielweise berichten in ihrer Studie auch über den zytotoxischen Effekt der Europäischen Mistel auf zahlreiche verschiedene humane Tumorzelllinien. Zudem verglichen sie die antiproliferative Wirkung der Mistel mit einem klassischen Zytostatikum und gaben an, dass die Wirkung beider Therapieansätze in vitro gleich ist. Eggenschwiler et al. (2007) demonstrieren in ihrer Studie den unterschiedlichen zytotoxischen Effekt verschiedener Iscador®-Zubereitungen auf mehrere Brustkrebs-

zelllinien, wobei sich auch hier für alle Iscador®-Präparate eine Inhibierung der Tumorzellproliferation feststellen lässt, wobei das Ausmaß der Wachstumshemmung je nach Zelllinie und Präparat differenziert. Wie auch die Studie von Hugo et al. (2007) dient jene Studie als direkter Beweis für die antitumoralen Eigenschaften der unterschiedlichen Iscador®-Zubereitungen auf verschiedene Brustkrebs- und weitere Tumorzelllinien. Neben in vitro-Studien wurde die zytotoxische und antitumorale Wirkung von Mistelextrakten auch im Rahmen von Tierexperimenten untersucht. Bestandteil der meisten Studien war auch hierbei die Europäische Mistel und deren Wirkung in Mäusen und Ratten. In den in vivo Studien von Beuth et al. (2006) und Drees et al. (1996) lässt sich sowohl eine Reduzierung des Tumorwachstums als auch eine Reduzierung der Tumorgröße erkennen. Darüber hinaus ist auch eine Steigerung der Apoptose zu beobachten.

Der zusätzliche Gebrauch von Mistelpräparaten parallel zu einer adjuvanten und/oder palliativen Chemotherapie ist am besten untersucht. Der Gebrauch geht mit einer belegten Reduktion von Chemotherapie assoziierten Nebenwirkungen, einer Senkung der Toxizität der Chemotherapeutika sowie mit einer positiven Auswirkung auf die Remissionsrate und einer Rezidivprophylaxe einher. Auch ist eine Verbesserung der Lebensqualität und des Wohlbefindens feststellbar. Das Ziel ist zudem eine partielle oder komplette Tumorregression, bedingt durch den Apoptose induzierenden, den Proteinbiosynthese inhibierenden und den zytolytischen/zytotoxischen Effekt der Mistellektine und Viskotoxine auf die Tumorzellen. Eine damit einhergehende Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit und eine Verbesserung der Lebensqualität sind weitere Ziele einer Misteltherapie. Insbesondere die mistelbedingte Verringerung der tumorassoziierten Fatigue und die Verbesserung der Lebensqualität zeigen dabei eine sehr gute Evidenz (Brandenberger et al. 2011; Horneber et al. 2008; Kienle et al. 2007; Kröz et al. 2002; Schumacher et al. 2003; Semiglasov et al. 2004; Werner et al. 2011; Wode et al. 2009; Ziegler et al. 2010). In einer systemischen Übersichtsarbeit von Kienle et al. (2010) untersuchten die Autoren 10 nicht-randomisierte klinische Studien und 26 randomisierte Studien. Dabei ist eine Verbesserung der Lebensqualität in 22 der 26 randomisierten Studien sowie in allen 10 nicht-randomisierten Studien erkennbar. Auch eine von Büssing et al. (2012) durchgeführte Metaanalyse, bestehend aus 9 randomisierten und 4 nicht-randomisierten klinischen Studien, berichtet hinsichtlich der Lebensqualität bei verschiedenen Tumorentitäten über eine positive Tendenz. Weiter stellt auch Beuth et al. (2008) für 741 Mammakarzinompatientinnen unter Misteltherapie eine deutliche Steigerung der Lebensqualität fest. Zu demselben Ergebnis kamen auch Semiglasov et al. (2006) in einer ähnlich angelegten Studie. In der systemischen Übersichtsarbeit von Kienle et al. (2010) wurde neben einer Verbesserung der

Lebensqualität auch ein besseres psychosomatisches Wohlbefinden und eine Linderung von Erbrechen, Übelkeit und Fatigue beobachtet. In der von Werner et al. (2011) durchgeführten multizentrischen, kontrollierten Studie wurde Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen verschiedene Iscador®-Präparate verabreicht. Eine signifikante Verbesserung der tumorassoziierten Symptome präsentiert sich auch hier für alle verwendeten Präparate, unter anderem auch für Iscador® M. Über jene mistelbedingte verbesserte Verträglichkeit onkologischer Therapien berichten zudem zahlreiche weitere Studien (Beuth et al. 2008; Bock et al. 2004; Büssing et al. 2008; Eisenbraun et al. 2011; Loewe-Mesch et al. 2008; Piao et al. 2004).

Neben zahlreichen Studien, welche die durch Mistel verbesserte Lebensqualität untersuchen und auch belegen, gibt es ebenso viele Studien, welche mögliche Wechselwirkungen und Nebenwirkungen erforschen, ebenso wie Studien, welche eine mögliche mistelbedingte verlängerte Gesamtüberlebenszeit demonstrieren. Wechselwirkungen durch die Misteltherapie im Sinne einer Stimulation des Tumorwachstums oder einer Abschwächung von Chemotherapeutika und deren Therapieeffekt konnte bisher weder in vitro noch in vivo gezeigt werden (Burger et al. 2003; Burkhart et al. 2010; Kienle et al. 2006; Kleeberg et al. 2004; Tröger et al. 2013). Kelter et al. (2007) berichten in ihrer Studie beispielsweise über den Effekt verschiedener Helixor-Mistelextrakte und konnten im Rahmen von 38 humanen Zelllinien keine Proliferation und auch keine Wachstumsstimulation feststellen. Eine ähnliche Studie mit Iscador®-Mistelextrakten wurde von Maier et al. (2002) durchgeführt und auch hier ist keine Wachstumsstimulation und keine Tumorpheriferation erkennbar. Weissenstein et al. (2016) zeigen in ihrer Studie die Interaktion von Mistelextrakt mit dem Antikörper Trastuzumab im Rahmen der Behandlung von HER2-positiven Mammakarzinomen. Eine Abschwächung der Wirkung von Trastuzumab ist nicht nachweisbar. Vielmehr präsentiert sich ein synergistischer antitumoraler Effekt des Mistelextraktes gemeinsam mit dem monoklonalen Antikörper. In der randomisierten Phase-II-Studie von Bar-Sela (2011) ist bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom unter Misteltherapie zu beobachten, dass es deutlich seltener zu einer nebenwirkungsbedingten Dosisreduktion des Chemotherapeutikums kommt. Auch eine intraläsionale Applikation eines Mistelextraktes in Kombination mit Gemcitabin bei Pankreaskarzinompatienten senkt die chemotherapeutischen Nebenwirkungen, verbessert somit die Lebensqualität und erzielt in der Studie von Matthes et al. (2005) sogar eine Tumorremission.

Nebenwirkungen sind gleichermaßen wie Wechselwirkungen verschwindet gering und beschränken sich hauptsächlich auf grippeartige Symptome wie Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Fieber und leichte gastrointestinale Beschwerden sowie lokale Reaktionen an der Injektionsstelle infolge einer gemischtzelligen Leukozyteninfiltration (Axtner et al.

2016). Eine leichte Temperaturerhöhung und eine leichte lokale Reaktion signalisieren jedoch eine gewünschte gute Immunstimulation. In einer Studie von Bock et al. (2004) mit 1.442 Mammakarzinompatientinnen zeigen sich innerhalb der Mistelgruppe signifikant weniger therapiebedingte Nebenwirkungen als in der Kontrollgruppe (16% vs. 54%, $p < 0,001$). Lediglich 6 von 710 Patientinnen entwickelten leichte bis moderate systemische Nebenwirkungen. 123 Patientinnen wiesen lokale Reaktionen wie Schwellungen, Rötungen und Juckreiz auf. Somit wurde die Misteltherapie insgesamt gut vertragen.

Im Rahmen einer Vielzahl von kasuistischen und retrospektiven Untersuchungen präsentiert sich bisher eine mistelbedingte positive Auswirkung auf das Gesamtüberleben, wobei sich die beste Evidenz für epidemiologische Untersuchungen ergibt (Bock et al. 2004; Grossarth-Maticsek et al. 2006; Konrad et al. 2006; Ostermann et al. 2009; Semiglazov et al. 2006; Werner et al. 2011; Ziegler et al. 2010). 2009 wurden 11 Kohortenstudien, 19 randomisierte klinische Studien und 16 nicht-randomisierte klinische Studien im Rahmen einer systematischen Übersichtsarbeit, unter anderem auf Tumoransprechen und Überleben untersucht, dabei ergibt sich für den Großteil der Studien eine günstige Tendenz für das Gesamtüberleben (Kienle et al. 2009).

Publikationen zur Misteltherapie bei Pankreaskarzinompatienten lieferten bisher jedoch die spektakulärsten und signifikantesten Daten. Wie bereits in dem Kapitel 'Therapie' des humanen Pankreaskarzinoms erwähnt, zeigen Stadium IV erkrankte Pankreaskarzinompatienten in der multizentrischen Beobachtungsstudie von Axtner et al. (2016) unter einer Kombinationstherapie, bestehend aus Mistelextrakt und Chemotherapeutikum, ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben gegenüber der Gruppe mit alleiniger Chemotherapie (12,1 vs. 7,3 Monate). Auch Tröger et al. (2013) und Tröger et al. (2014) stellen für Pankreaskarzinompatienten unter Misteltherapie, bei einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität, einen statistisch signifikanten Vorteil für das Gesamtüberleben fest. Innerhalb der Mistelgruppe ergibt sich nahezu eine Verdoppelung des medianen Überlebens. Somit präsentiert die aktuelle Studienlage bezüglich einer mistelbedingten adjuvanten Therapie von Mamma- und Pankreaskarzinomen eindeutig positive Ergebnisse und Tendenzen und sollte dementsprechend weiterverfolgt und in zukünftigen, qualitativ hochwertigen Studien weiter erforscht werden.

6. Das Immunsystem

Das Immunsystem dient sowohl Mensch als auch Tier als Schutzmechanismus und der Abwehr verschiedenster Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilzen. Es erkennt und entfernt sterbende körpereigene Zellen, ebenso wie körperfremde Substanzen (Göbel et al. 2010). Eine weitere wichtige Funktion des Immunsystems ist die Zerstörung fehlerhafter, entarteter Zellen, weshalb die Immunologie als moderner Therapieansatz in der Onkologie gilt. Ziel ist es hierbei, das körpereigene Immunsystem zielgerichtet gegen maligne Tumore zu mobilisieren beziehungsweise die Zellen des Immunsystems, welche direkt an der Tumorabwehr beteiligt sind, zu vermehren und sie somit in ihrer Wirkung zu verstärken (Rink et al. 2015). Jenen immunmodulierenden/immunstimulierenden Effekt zeigt im Rahmen der komplementären Medizin vor allem die Mistel und deren aktiven Verbindungen in verschieden in vitro und in vivo Studien (Beuth et al. 1992; Büssing 2006; Büssing et al. 2007; Gardin 2009; Heinzerling et al. 2006; Pae et al. 2000; Son et al. 2010).

Klassischerweise wird das Immunsystem in das angeborene und das erworbene Immunsystem unterteilt. Innerhalb dieser Aufteilung werden jeweils zellvermittelte und lösliche (humorale) Abwehrmechanismen unterschieden (Göbel et al. 2010; Rink et al. 2015). Die folgenden Kapitel sollen das Immunsystem und dessen Einteilung genauer erläutern.

6.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem wird bereits pränatal ausgebildet und dient somit ab der Geburt der Immunabwehr. Bestandteil der innaten Immunabwehr sind verschiedenste unspezifische Abwehrmechanismen, welche unabhängig von einem vorausgegangenen Kontakt mit einem Pathogen, jederzeit und in erster Instanz wirksam sind. Unterschieden werden dabei mikrobiologische, chemische und mechanische Abwehrmechanismen. Eine der wichtigsten Schutzbarrieren bildet die natürliche Bakterienflora der Haut, welche in ständiger Nahrungskonkurrenz mit Krankheitserregern steht und diese so verdrängen kann. Die natürlichen chemischen Abwehrmechanismen umfassen zahlreiche gastrointestinale Enzyme, den sauren pH-Wert des Magens, Fettsäuren der Haut und den zähen Schleim der Schleimhäute. Als mechanische Abwehrmechanismen dienen zum einen die permanente Abschilferung der Epithelzellen, deren dichter Zellverband bedingt durch „Tight Junctions“ und zum anderen der retrograde Transport von Pathogenen durch Zilienbewegung. Das Ziel all jener Abwehrmechanismen besteht darin, die äußeren und inneren Körperoberflächen vor der Penetration von Pathogenen zu schützen und diese zu verhindern. Ein anderes Ziel ist die Inaktivierung und der

Abbau von Krankheitserregern (Bröker et al. 2019; Christen et al. 2016; Göbel et al. 2010; Kaufmann 2012).

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems gemeinsam mit seinen Abwehrmechanismen erfolgt durch die Erkennung von molekularen Strukturen, welche nur auf Pathogenen, also körperfremden Zellen vorkommen. Zwar erfolgt die Aktivierung der angeborenen Abwehrmechanismen und die damit einhergehende Zerstörung von Pathogenen innerhalb weniger Stunden, eine vollständige Eliminierung aller Krankheitserreger ist meistens jedoch nicht möglich. Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem bildet sich kein immunologisches Gedächtnis aus, was dazu führt, dass sich auch nach wiederholter Infektion mit dem gleichen Pathogen die Immunreaktion nicht ändert (Göbel et al. 2010; Kaufmann 2012). Wie bereits erwähnt, gliedert sich das unspezifische Immunsystem, wie auch das erworbene Immunsystem, in zelluläre und lösliche Faktoren. Die wichtigsten zellulären Komponenten sind dabei Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen, folliculäre dendritische Zellen und innate lymphoide Zellen. Aufgabe all jener Zellen ist die Phagozytose von Krankheitserregern oder eine zytotoxische Wirkung auf diese, ausgelöst durch verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Immunzellen. Granulozyten beispielsweise binden mit dem Komplementrezeptor 1 (CR1) an das Komplementfragment C3b auf der Membran des Bakteriums und aktivieren so die Phagozytose. Auch Makrophagen und dendritische Zellen werden durch Bindung von Krankheitserregern an die Toll-like-Rezeptoren (TLR) aktiviert, phagozytieren diese und schütten Zytokine als Signalstoffe aus. Neben Makrophagen und dendritischen Zellen werden auch Mastzellen über TLR aktiviert. Nach der Aktivierung von Mastzellen über TLR schütten diese ihre zytoplasmatische Granula, bestehend aus Enzymen, toxischen Substanzen und Entzündungsmediatoren, auf die Erreger und zerstören diese so. Eine weitere wichtige zelluläre Komponente stellen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar. Sie gehören zu den innate lymphoiden Zellen und lysieren mittels zytotoxischer Wirkung infizierte und Antikörper-markierte Zellen sowie Tumorzellen. Neben der Eliminierung von Krankheitserregern spielen sie somit auch eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen. NK-Zellen tragen sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren. Ebenso tragen alle kernhaltigen Körperzellen, wie auch die NK-Zellen, Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I-Moleküle (MHC-Klasse-I-Moleküle). Jene MHC-Klasse-I-Moleküle binden im Normalfall an die inhibierenden Rezeptoren und unterbinden so den Abtötungsmechanismus der NK-Zelle. Einige Viren und auch Tumorzellen können sich durch Herunterregulation der MHC-Klasse-I-Molekül-Expression dem erworbenen Immunsystem entziehen, werden dadurch aber gegenüber NK-Zellen anfällig, da sie deren Abtötungsmechanismus nicht

mehr inhibieren können und werden letztendlich lysiert. Jene verminderte Expression beziehungsweise jener Verlust von einzelnen MHC-I-Allelen wird als missing self bezeichnet. Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren aus der Immunglobulinsuperfamilie sind beispielsweise die zwei natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (NCR) NKp30 und NKp46, deren Anzahl und Aktivität im Rahmen dieser Dissertation per Durchflusszytometrie erfasst wurden. Auch NKG2D, als der einzige lektinähnliche aktivierende NK-Zellrezeptor, ist Gegenstand dieser Arbeit und wurde ebenfalls per Durchflusszytometrie erfasst. Ein anderes zelluläres Oberflächenprotein, welches in hoher Dichte auf NK-Zellen exprimiert wird und ebenfalls ein bedeutender aktivierender NK-Zell-Rezeptor ist, ist der Differenzierungsmarker (CD) 16. Durch die Bindung von CD16 an den Fc-Teil eines an der Zelloberfläche gebundenen IgG-Antikörpers, wird die NK-Zelle zur Lyse der IgG-gebundenen Zielzelle aktiviert. Bezeichnet wird dieser Prozess als Antikörper-gebundene zelluläre Zytotoxizität (ADCC) (Bröker et al. 2019; Göbel et al. 2010; Rink et al. 2015). Ebenso wie NKp30, NKp46 und NKG2D wurde auch der Differenzierungsmarker CD16 im Rahmen dieser Dissertation per Durchflusszytometrie gemessen. Eine weitere wichtige Funktion der NK-Zellen besteht in der Regulation der Immunantwort über sogenannte Zytokine. Wie bereits erwähnt schütten beispielsweise Makrophagen und dendritische Zellen nach Aktivierung Zytokine aus. Es handelt sich dabei um lösliche Botenstoffe, welche vor allem von Immunzellen nach dessen Aktivierung freigesetzt werden und gehören somit zu den humoralen Komponenten des angeborenen Immunsystems. Strukturell handelt es sich dabei um Glykoproteine, die über eine Bindung an den Rezeptor an der Zelloberfläche der Zielzelle ihr Signal vermitteln. Sie ermöglichen die Zusammenarbeit und die Koordination zwischen unspezifischen und adaptiven Immunsystem. Nur mithilfe von Zytokinen ist eine Überwachung des Körpers, ein Aufbau und Beenden einer Immunantwort sowie eine schlussendliche Auslösung von Heilungsprozessen möglich. Zytokine unterscheiden sich hinsichtlich ihres Wirkungsbereiches. So wirken sie entweder auf die Produzentenzelle selbst (autokrin), auf die benachbarten Zellen (parakrin) oder auf weit entfernt liegende Zellen (endokrin). Zytokine werden weiter unterteilt in Interleukine (zum Beispiel IL-2), Interferone (zum Beispiel IFN- γ), Tumornekrosefaktoren (zum Beispiel TNF- α), Chemokine (zum Beispiel CCL-1) und koloniestimulierende Faktoren (zum Beispiel GM-CSF). Je nach Gruppenzugehörigkeit induzieren, steigern oder beenden Zytokine Immunreaktionen, regulieren die Hämatopoese, kontrollieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen, steuern die Kommunikation zwischen den Leukozyten und anderen Zellen oder wirken im Falle der Interferone antiviral. Das autokrine Zytokin Interleukin IL-2, welches ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit als Stimulanz verwendet wurde, fungiert beispielsweise als

wesentlicher Faktor für die T-Zellen-Stimulation (Göbel et al. 2010; Kaufmann 2012; Rink et al. 2015). Neben den zahlreichen Zytokinen bildet das Komplementsystem einen weiteren bedeutsamen Bestandteil der humoralen Abwehr. Es besteht aus ca. 20 verschiedenen Plasmaproteinen, den sogenannten Komplementfaktoren, welche sich zunächst inaktiv im Blutplasma und der extrazellulären Flüssigkeit befinden. Erst nach Kontakt mit mikrobiellen Keimen oder mit Antikörper, werden die inaktiven Pro-Enzyme durch proteolytische Spaltung kaskadenartig aktiviert. Es kommt zur Spaltung und Aktivierung weiterer Komplementfaktoren bis sich letztendlich ein aus Komplementfaktoren bestehender Membranangriffskomplex gebildet hat, welcher Poren in der Membran des Pathogens bildet und somit zu dessen Lyse führt (Bakteriolyse). Die entstandenen Spaltprodukte locken weitere Immunzellen an (Chemotaxis), aktivieren diese und verstärken die Abwehrfunktion durch eine Steigerung der Phagozytose (Opsonisierung). Weitere humorale Komponenten sind beispielsweise Defensine, das antibakterielle Enzym Lysozym und sogenannte Akut-Phase-Proteine. Zu ihnen gehören unter anderem einige Gerinnungsfaktoren sowie Komplementfaktoren (Göbel et al. 2010; Rink et al. 2015).

Anhand verschiedener Studien ist feststellbar, dass die Mistel und ihre Komponenten eine Vielzahl zellulärer und auch humoraler Komponenten des angeborenen Immunsystems induziert, stimuliert, verstärkt und erhöht. Die Mistel induziert demnach sowohl eine Stabilisierung als auch eine Zunahme jener Zellen, welche direkt an der Tumorabwehr beteiligt sind und verbessert sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort (Gardin 2009; Kienle et al. 2009; Kienle Kiene 2003; Kienle et al. 2010; Marvibaigi et al. 2014; Matthes et al. 2005). So resultiert beispielsweise die Aktivierung von Monozyten aus einer Aktivierung von CD14, welche wiederum das angeborene Immunsystem aktivieren und so möglicherweise für die Verringerung von chemotherapeutischen Nebenwirkungen ursächlich sind (Heinzerling et al. 2006). Auch eine gesteigerte Aktivität von IL-2, IL-6 und IL-12 sowie eine Steigerung der Phagozytoseaktivität und der TNF- α - und IFN- γ -Anzahl ist in weiteren Studien ebenfalls erkennbar (Friedel et al. 2009; Kienle 2009; Kovacs 2000; Son et al. 2010). Beruhend auf der Aktivierung von Granulozyten und Lymphozyten, der Induktion verschiedener Zytokine und der Fähigkeit zur Stimulation von Phagozyten, wird die Mistel als sogenannter „biological response modifier“ eingestuft (Beuth et al. 1994; Kuttan et al. 1993; Pae et al. 2000).

6.2 Das erworbene Immunsystem

Dem angeboren Immunsystem gegenüber steht das erworbene Immunsystem. Nicht immer ist es dem angeborenen Immunsystem möglich alle Krankheitserreger abzuwehren und vollständig zu eliminieren. So besitzen beispielsweise einige Bakterien eine Schleimkapsel durch die sie der Erkennung durch Fresszellen, wie Granulozyten und Makrophagen, entgehen können. Auch dem humoralen Anteil der angeborenen Immunabwehr, wie zum Beispiel dem Komplementsystem, können sich Bakterien so entziehen. Des Weiteren besitzen auch Tumorzellen und Viren die Fähigkeit unter anderem durch fehlende Herunterregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen NK-Zellen mittels jener Moleküle zu inhibieren und somit einer Lyse durch diese zu umgehen.

Im Gegensatz zum unspezifischen Immunsystem reagiert das erworbene Immunsystem spezifisch gegen eine Antikörper regenerierende Substanz, einem sogenannten Antigen. Die Reaktion des adaptiven Immunsystems erfolgt verzögert. Zunächst erkennt das unspezifische Immunsystem körperfremde Stoffe und regt anschließend das adaptive Immunsystem an. Die durch das erworbene Immunsystem hervorgerufene Immunreaktion resultiert in ein Zellgedächtnis. Bei einer Reinfektion erfolgt somit eine sekundäre Immunantwort. Mithilfe von sogenannten Gedächtniszellen erinnert sich das Immunsystem an das Antigen und geht nun spezifisch gegen dieses vor (Christen et al. 2016; Göbel et al. 2010; Rink et al. 2015).

Das erworbene Immunsystem beruht auf den T- und den B-Lymphozyten. Sie besitzen hoch variable Antigenrezeptoren, wodurch jeder Lymphozyt eine individuelle Antigenspezifität aufweist und eine bestimmte molekulare Struktur erkennt. Mittels Makrophagen und dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems werden die Antigene in die lymphoiden Organe (Milz, Tonsillen, Lymphknoten) transportiert. In den lymphoiden Organen liegt eine besonders hohe Konzentration an Entzündungszellen, Antigenen und Lymphozyten vor. Somit kommt es dort zu einem Aufeinandertreffen zwischen Antigenen und Lymphozyten (Göbel et al. 2010; Rink et al. 2015). Bei Antigenkontakt erfolgt die selektive Aktivierung und die Proliferation antigenspezifischer Zellen. Nach anschließender klonaler Expansion liegt eine Vielzahl identischer Lymphozyten vor. Die lymphoid aktivierten und differenzierten T-Zellen verlassen die Lymphknoten, gelangen in die Blutzirkulation, erkennen die spezifischen Antigene in der Peripherie und greifen diese an. Die Differenzierung von T- und B-Zellen erfolgt entweder zu Effektorzellen mit unterschiedlichen Aufgaben oder zu langlebigen Gedächtniszellen, welche bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine sekundäre Immunantwort auslösen und dadurch bedingt sofort zur Verfügung stehen und den Infektionserreger noch vor Auslösung einer Erkrankung eliminieren oder abschwächen (Christen et al. 2016; Göbel et al. 2010). Die Effektorzellen der

T-Lymphozyten sind die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helferzellen. Im Gegensatz zu B-Lymphozyten erkennen T-Lymphozyten nicht die dreidimensionale Struktur von Antigenen. Für eine Erkennung durch T-Lymphozyten müssen Antigene im Inneren von Körperzellen in kleine Peptidfragmente zerlegt werden, was als Antigenprozessierung bezeichnet wird. Entsprechende Fragmente werden dann von spezialisierten Glykoproteinen, den sogenannten MHC-Molekülen, an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. So werden Peptidfragmente, die in MHC-Klasse-I-Molekülen eingebaut sind, zytotoxischen CD8+-T-Zellen präsentiert. Sie dienen der Tötung von infizierten und entarteten Zellen. In MHC-Klasse-II-Moleküle eingebaute Peptidfragmente werden CD4+-T-Helferzellen präsentiert und von diesen erkannt. Dabei werden unterschiedliche Untergruppen von T-Helferzellen (Th1-, Th2-, Th17-Zellen) unterschieden. Durch die je nach Untergruppe unterschiedlich abgegebenen Zytokine koordinieren sie die Immunantwort im entzündeten Gewebe und aktivieren oder unterdrücken die Funktion anderer Zellen des Immunsystems. Die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, natürlicher Killerzellen und von Phagozyten sowie das Induzieren einer zellvermittelten Immunantwort gegen intrazellulär lebende Erreger wie bestimmte Bakterien, Viren, aber auch gegen Tumore, ist Aufgabe der Th1-Zellen. Das Aktivieren von B-Zellen und deren Anregung zur Bildung verschiedener Antikörperklassen (Immunglobuline) ist gemeinsame Aufgabe von Th1- und Th2-Zellen. Beide Zelltypen koordinieren somit also die antikörpervermittelte humorale Immunantwort des erworbenen Immunsystems. Auch dienen sie der Neutralisation von Bakterientoxinen. Zudem differenzieren wenige Th1- und Th2-Zellen nach erfolgter Immunreaktion in die sogenannten T-Gedächtniszellen, welche bei einer erneuten Infektion sofort spezifisch zur Verfügung stehen. Die dritte Untergruppe von T-Helferzellen, die Th17-Zellen, regen lokale Gewebezellen zur Produktion von chemotaktischen Molekülen an, um so Granulozyten an den entzündeten Ort zu locken (Bröker et al. 2019; Rink et al. 2015). Wie auch die T-Lymphozyten differenzieren die B-Lymphozyten nach Antigenkontakt in den lymphoiden Organen entweder zu Effektorzellen oder zu Gedächtniszellen und ermöglichen somit eine sekundäre Immunantwort. Die Effektorzellen der B-Lymphozyten sind die sogenannten Plasmazellen, welche eine große Anzahl an löslichen Antikörpermolekülen (Immunglobuline) in das Blut sezernieren und somit im Gegensatz zu T-Lymphozyten, welche ausschließlich vor Ort wirksam sind, einen Ferneffekt erzielen. Die von den Plasmazellen gebildeten Antikörpermoleküle stellen den humoralen Teil des erworbenen Immunsystems dar. Sie binden antigenspezifisch und verhindern so eine potenzielle Bindung von Viren oder Toxinen an eine Wirtszelle. Jene Immunglobuline werden in 5 Isotypen unterteilt: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE, wobei IgD ausschließlich bei Nagern und Primaten vorkommt. Die

IgG-, IgM- und IgA-Isotypen erfüllen innerhalb des Immunsystems verschiedene Effektorfunktionen. So gilt IgG als das wichtigste Immunglobulin, welches vor allem nach erneuten Antigenkontakt gebildet wird. Das Immunglobulin IgM wird jedoch nach Antigenkontakt als erstes gebildet. Gemeinsam mit IgG dient es der Aktivierung des klassischen Weges der Komplementkaskade, der Neutralisation von Bakterientoxinen sowie der Verhinderung einer Rezeptoranheftung von Viren. Auch IgA kommt eine wichtige Aufgabe zu, so ist es das wichtigste Immunglobulin auf allen mucosalen Oberflächen und verhindert im Darm die Anheftung von Pathogenen an das Epithel. Kommt es dennoch zu einem Durchdringen des Epithels, wird der jeweilige Krankheitserreger in der Lamina propria des Darms an IgA gebunden und wieder retrograd in das Lumen transportiert (Bröker et al. 2019; Christen et al. 2016; Göbel et al. 2010; Rink et al. 2015).

Wie bereits kurz in dem Kapitel 'Das angeborene Immunsystem' angesprochen, existiert eine Gruppe von immunphänotypischen Zelloberflächenmerkmalen. Bei diesen Differenzierungsmarkern handelt es sich um zellspezifische exprimierte, meist membranständige Glykoproteine, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Zum einen dienen sie als Rezeptor, der Signalübertragung und der intrazellulären Kommunikation, zum anderen zeigen sie einige Enzymaktivitäten. Im Folgenden soll nun kurz spezifisch auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten CDs eingegangen werden. So ist CD3 T-Zell-spezifisch und nützt der Membranexpression und der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors (TCR). Auch CD45 dient der Signaltransduktion, wird aber im Gegensatz zu CD3 auf allen Leukozyten exprimiert. Es handelt sich somit um einen Pan-Leukozytenmarker. Weitere gemessene CDs sind CD4+ und CD8+. CD4+ ist, wie bereits erwähnt, ein spezifischer T-Helferzellen-Marker, wird aber auch auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und fungiert als costimulierendes Molekül der T-Zellaktivierung. Auch CD8+ ist ein spezifischer T-Zell-Subpopulationsmarker. Er wird auf den zytotoxischen T-Zellen exprimiert und dient ebenfalls als costimulierendes Molekül der T-Zellaktivierung. CD19 ist ein spezifischer B-Lymphozyten-Marker und fungiert als Corezeptor zur Aktivierung dieser. Ein weiterer Aktivierungsmarker ist CD69 und nützt als Aktivierungsmarker für alle Lymphozyten. CD56 und CD94 werden spezifisch von NK-Zellen exprimiert, wobei CD56 als Rezeptor zur gegenseitigen Erkennung von NK-Zellen und CD94 als einfacher NK-Rezeptor dient (Bröker et al. 2019; Rink et al. 2015).

Im Bezug auf das erworbene Immunsystem zeigt Mistelextrakt, laut Heinzerling et al. (2006), eine spezifische T-Helferzellen-Antwort, die in eine Induktion von T-Gedächtniszellen resultiert, welche eine antiinfektiöse und antitumorale Wirkung haben könnte.

6.3 Tumormunologie

Unter einem Tumor versteht man eine Anhäufung entarteter Zellen, welche nicht mehr der Homöostase des Körpers unterliegen, ungestört wachsen, umgebendes Gewebe penetrieren und zerstören und sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf an andere Orte absiedeln und dort Tochtergeschwülste, sogenannte Metastasen, bilden. Auslöser hierfür sind die Zellphysiologie verändernde Mutationen. Körpereigene Mechanismen dienen der Verhinderung solcher Mutationen und der Reparatur geschädigter DNA, um so einer Krebsentstehung entgegenzuwirken. Ziel ist die Sicherstellung unveränderter, die Zellproliferation steuernde Gene, um so ein unkontrolliertes Wachstum zu verhindern. Trotz entsprechender Mechanismen kommt es zur Entstehung entarteter Zellen, welche im Idealfall vom Immunsystem erkannt und vernichtet werden. Schon 1909 ging Paul Ehrlich davon aus, dass das Immunsystem permanent nach veränderten Zellen sucht und diese auch unschädlich macht bevor es zu einer Krankheitsentstehung kommt. Frank Macfarlane Burnet war es dann, der in den 1950er Jahren diese Theorie aufgriff und erweiterte, indem er davon ausging, dass T-Lymphozyten im Rahmen einer Immunantwort gegen Krebszellen die Wächter des Immunsystems darstellen und schuf den Begriff der immunologischen Tumorüberwachung (Bröker et al. 2019; Donnez et al. 2011; Rink et al. 2015). Hinweisend, dass das Immunsystem maßgeblich an der Tumorüberwachung beteiligt ist, ist die Tatsache, dass immunsupprimierte Menschen häufiger und schwerer an Krebs erkranken als immunkompetente Menschen. Auch zeigen Tumore, die dicht mit T-Zellen infiltriert sind, eine bessere Prognose als solche ohne entsprechende Filtrate. Die Immunologie als Behandlungsoption von Krebserkrankungen gilt also forthin als vielversprechender Ansatz. So erzielen immunologische Therapieansätze weiterhin gute Fortschritte. James P. Allison und Tasuku Honjo erhielten erst 2018 einen Nobelpreis für ihre erfolgreiche Forschung an monoklonalen Antikörper gegen das Immunsystem abschwächende Proteine (Programmiertes Zelltod Protein-1 (PD-1) und zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4 (CTLA-4)). Eine Blockade beider resultiert dabei in eine starke Aktivierung des Immunsystems und in der Auslösung antitumorale Effekte (Bröker et al. 2019; Shi et al. 2019).

Die an der Tumorerkennung und Tumorabwehr beteiligten Zellen sind die NK-Zellen, die zytotoxischen Zellen, die zytotoxischen T-Zellen und die inflammatorischen Makrophagen mittels zytotoxischer Zytokine. Die Tumorabwehr durch zytotoxische T-Zellen ist komplex und beruht auf zahlreichen Mechanismen. So werden Tumorantigene entweder direkt oder indirekt präsentiert. Tumorspezifische Epitope werden so von naiven CD8+-T-Zellen erkannt und differenzieren nach Antigenkontakt zu reifen zytotoxischen T-Zellen. Dabei handelt es sich bei den Tumorantigenen um

onkovirale Proteine, anormale posttranslationale Modifikationen, überexprimierte Differenzierungsantigene, aberrant exprimierte embryonale Antigene und um mutierte zelluläre Proteine. Neben zytotoxischen T-Zellen sind auch NK-Zellen maßgeblich an der Tumorabwehr beteiligt. NK-Zellen erkennen den bei vielen Tumorzellen vorkommenden Verlust von MHC-I-Molekülen und töten diese nach deren Erkennung. Durch eine maligne Transformation werden die Stressproteine MICA (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-1-kettengebundenes Protein A) und MICB (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-1-kettengebundenes Protein B) hochreguliert und dienen ebenfalls der Erkennung von Tumorzellen. Auch zytolytische Reaktionen sind an der Tumorabwehr beteiligt. So dienen beispielsweise Perforin und Granzyme, welche sich in der intrazellulären Granula von NK- und T-Zellen befinden, dem apoptotischen Abbau von Tumorzellen. Daneben nützen auch die von zytolytischen T-Zellen und NK-Zellen produzierten Zytokine IFN- γ und FasLigand einer gesteigerten Antigenexpression und einer damit einhergehenden verstärkten Tumorantigenerkennung (Bröker et al. 2019; Rink et al. 2015; Shi et al. 2019).

Nur in den Fällen, in denen es den Tumorzellen gelingt, sich allen genannten Abwehrmechanismen zu entziehen, kann sich eine Krebserkrankung entwickeln. Diese von Tumorzellen praktizierte Entziehung vor dem Immunsystem wird als Tumorescape bezeichnet. Verantwortlich dafür sind eine Reihe verschiedener Mechanismen. So ist es infolge des Verlustes von Tumorantigenen und einer Verhinderung der Antigenpräsentation durch Modulation von MHC-Molekülen und Antigenpeptid-Transportern (TAP) den Tumorzellen möglich, sich den zytolytischen T-Zellen zu entziehen. Weitere Mechanismen sind eine mögliche Hemmung und Eliminierung von T-Zellen beispielsweise durch die tumorbedingte Bildung von den Programmieren Zelltod-Liganden 1 und 2 (PD-L1, PD-L2), welche zu einer Abschwächung des Immunsystems führen, ebenso wie die tumorbedingte Herunterregulation von FasL. Darüber hinaus zeigen viele Tumorzellen sowohl aktive als auch passive Toleranzmechanismen. So zählen die Induktion von inhibitorischen T-Zellrezeptoren, wie CTL-4 und die Induktion von regulatorischen T-Zellen, zu den aktiven Abwehrmechanismen. Weitere aktive Toleranzmechanismen sind die Sekretion von TGF- β und IL-10. Beide antientzündlichen Zytokine dienen der Ausschaltung von tumorsuppressiven Faktoren und bedingen so die Tumorpheriferation. Das Ausbleiben einer Entzündung, ebenso wie die fehlende Aktivierung von CD4+ T-Helferzellen zählen zu den passiven Toleranzmechanismen. Eine Induktion antiapoptotischer Proteine und eine IFN- γ -Resistenz sowie Funktionsverlust-Mutationen von proapoptotischen Genen, ermöglicht Tumorzellen die Ausbildung einer Apoptoseresistenz. Jene Apoptoseresistenz, bedingt durch dieselben Mechanismen, zeigt sich auch gegenüber

NK-Zellen. Ein weiterer Mechanismus um einer Erkennung durch NK-Zellen zu entgehen, ist ebenfalls die Sekretion löslicher MICA und MICB, welche den Abtötungsmechanismus der NK-Zellen inhibieren, wobei die NK-Zelleninhibierung durch eine tumorbedingte MHC-I-Induktion erfolgt (Bröker et al. 2019; Kaufmann 2012; Rink et al. 2015).

Trotz zahlreicher Tumorescape-Mechanismen gibt es eine Vielzahl immunologischer Abwehrmechanismen, an welchen die Immunonkologie ansetzt. Mögliche Therapieansätze sind hierbei, wie bereits erwähnt, der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, welche sich gegen sogenannte physiologische Checkpoints richten, an denen Lymphozyten in ihrer Aktivität gehemmt werden und somit das Immunsystem abschwächen. Beispiele hierfür sind CTL-4 und PD-1. Beide Proteine hemmen im aktiven Zustand T-Lymphozyten. Durch eine Hemmung beider Proteine mittels monoklonaler Antikörper wird so eine Immunverstärkung erzielt, da die T-Lymphozyten in ihrer Aktivität nicht mehr gehemmt werden. Andere immunologische Therapieansätze sind sogenannte Chimerische Antigen-Rezeptoren (CAR) der T-Zellen und Bispezifische T-Zell-Einrückelemente (BiTE). Dabei beruht das Prinzip von CAR-T-Zellen auf der Isolierung von T-Zellen aus dem Blut, welche mit einem spezifischen Rezeptorkonstrukt, bestehend aus einer Antigenbindungsstelle eines Antikörpers und einem intrazellulären Signaltransduktionsmodul, versetzt werden. Die Bindungsstelle ist spezifisch gegen ein, bei bestimmten Tumorarten vorkommendes Antigen gerichtet. Nach Rückübertragung der modifizierten T-Zellen in das Blut des Patienten erfolgt nach Antigenkontakt eine zielzellspezifische T-Zellreaktion. Ein ähnliches Prinzip liegt dem BiTE zugrunde. Hierbei wird das Tumorantigen über einen bispezifischen Antikörper mit dem T-Zell-Rezeptorkomplex vernetzt und aktiviert antigenunspezifisch alle T-Zellen. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist der der Tumorstimulation. Dieser Ansatz beruht darauf dendritische Zellen eines Patienten zu gewinnen, diese zu aktivieren und mit dem spezifischen Tumorantigen zu versetzen. Die spezifischen Tumorantigene werden mit inflammatorischen Zytokinen und costimulierenden Oberflächenrezeptoren präsentiert und sollen so im Körper schließlich eine primäre Immunantwort auslösen (Bröker et al. 2019; Rink et al. 2015; Shi et al. 2019).

Aufgrund der immunstimulierenden Effekte der Mistel auch auf die direkt an der Tumorabwehr beteiligten NK- und T-Zellen und der damit einhergehenden Stimulierung und Steigerung der Anzahl dieser Zellen, zeigt sich ein Immunsystem verstärkender Effekt, welcher die Tumorerstörung beziehungsweise Tumorreduzierung steigern kann (Beuth et al. 2008; Gardin 2009; Heinzerling et al. 2006; Kienle et al. 2009; Kienle Kiene 2003; Kienle et al. 2010; Marvibaigi et al. 2014; Matthes et al. 2005). Im Rahmen zahlreicher Studien ist jener antitumorale Effekt der Mistel festgestellt worden, weshalb

die Mistel als aussichtsreicher immunologischer Therapieansatz in der Behandlung von Krebserkrankungen gilt und weiter verfolgt werden sollte (Beuth et al. 2006; Drees et al. 1996; Kühn 2005; Kuttan et al. 1993; Mabed et al. 2004; Matthes et al. 2005; Matthes et al. 2004).

7. Materialien und Methodik

7.1 Materialien

Effektorzellen

KHYG-1	Natürliche Killerzellen aus NK-Leukämie-Zelllinie
MOLT-4	T-Lymphoblasten aus akuter lymphoblastischer Leukämie-Zelllinie
periphere Blutzellen	aus dem Blut eines gesunden Menschen

Targetzellen

MCF-7	humane Mammakarzinomzellen
Panc-1	humane Pankreaskarzinomzellen

Stimulierende Substanzen

Rekombinantes humanes IL-2	Interleukin-2, Zytokin	VWR International GmbH, Darmstadt
PHA	Phytohämagglutinin, Lektin	Biochrom GmbH, Berlin
Iscador® M	Mistelextrakt	Iscador AG, Lörrach

Zellkulturmedien

MCF-7/Pan-1	500 ml DMEM, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml L-Glutamin
KHYG-1/PBZ	10%iges BZM= 500 ml RPMI, 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Natriumpyruvat
MOLT-4	20%iges BZM= 500 ml RPMI, 100 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Natriumpyruvat

Pufferlösungen

fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Puffer (FCS+PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Antikörper

IgG1-FITC	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
IgG1-PE	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
IgG1-APC	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
IgG1-PerCP	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD3-PerCP	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD4-FITC	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD8-PE	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD16-PE	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD19-PE	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD45-APC	Life Technologies Corp, Frederick, USA
CD56-APC	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD69-APC	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD56-FITC	BD Biosciences, Dún Laoghaire, Irland
CD94-FITC	Life Technologies Corp, Frederick, USA
NKG2D-PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
NKp30-PE	Immunotech SAS, Marseille, Frankreich
NKp46-PE	Immunotech SAS, Marseille, Frankreich

Kits

Pierce LDH Cytotoxicity Assay	Substrat-Mix, Assay Puffer, LDH, Lyse Puffer, Stop-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
-------------------------------	---	---

Sonstige Chemikalien

Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biocoll-Trennlösung	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
ultrasteriles Aqua	Braun, Melsungen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640 Medium)	gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Behältnisse

T25 Flaschen	greiner bio-one, Frickenhausen
T75 Flaschen	greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturtestplatte 96-Well (V-Form)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte 96-Well (flach)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte 6-Well (flach)	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Falcon 15 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Falcon 50 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorf-Röhrchen (Mikro Tubes, Reagiergefäß)	SARSTEDT, Nürnbrecht
FACS Tube	SARSTEDT, Nürnbrecht

Geräte

FACSCalibur	Becton Dickinson
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Heraeus Multifug 3SR+
Spektrophotometer	Biotek, ET 808

Software

FACSCalibur (Becton Dickinson)	CellQuest Pro
Spektrophotometer (Biotek, ET 808)	Gen5

7.2 Methodik7.2.1 Zellkulturen

Sowohl die Effektorzellen (KHYG-1, MOLT-4) als auch die Targetzellen (MCF-7, Pan-1) befanden sich zunächst in der flüssigen Stickstoffkühlung und mussten vor dessen Gebrauch aufgetaut werden. Hierfür mussten die in Kryoröhrchen weggefrorenen Zellkulturen aus dem, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter, entnommen und mittels Körperwärme in der Hand aufgetaut werden, wobei jedes Kryoröhrchen ca. 1.200.000 Zellen enthielt. Bevor die Zellen jedoch vollständig aufgetaut waren, wurden sie in ein mit 5 ml fetalen Kälberserum (FCS) befüllten 15 ml-Falcon Röhrchen überführt. Danach wurde das Kryoröhrchen mit 0,5 ml FCS ausgespült, um sicher zu gehen, dass sich keine weiteren Zellen mehr in diesem befinden. Anschließend wurde das Falcon Röhrchen mit den 5 ml FCS und den darin enthaltenden Zellen bei 1.200 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei 4 Grad Celsius für 5 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde anschließend abgeschüttet und das zurückbleibende Zellpellet wurde je nach Zelllinie mit 5 ml oder mit 15 ml des entsprechenden Zellmediums versetzt. Die Zellkultur wurde zusammen mit dem Medium in eine T25 oder T75 Zellkultur-Flasche umgefüllt und schlussendlich in einen Inkubator abgelegt. Hier wurden die Zellen bis zum nächsten Mediumwechsel beziehungsweise bis zum nächsten Passagieren nach drei Tagen, bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂, bebrütet.

Nach drei Tagen wurden die Zellkulturen ausgezählt, passagiert, anschließend neu ausgesät und zurück in den Inkubator verbracht.

7.2.2 Zellkultur von peripheren Zellen aus frischem Blut

Von einem gesunden Spender wurde mehrmalig 60 ml frisches Blut abgenommen, um aus diesem periphere Blutzellen (PBZ) zu gewinnen. Mehrere Schritte waren dafür notwendig. Die 60 ml Blut wurden zunächst zu vier gleichen Anteilen von a 15 ml auf vier 50 ml-Falcon Röhrchen aufgeteilt. Im Verhältnis 1:1 wurde dann zu allen vier Falcon Röhrchen jeweils 15 ml Biocoll als Trennlösung hinzugeben und wurde anschließend mit Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI) auf 45 ml aufgefüllt. Danach wurden alle 4 Falcon Röhrchen für 20 Minuten bei 2.000 rpm und 20 Grad Celcius zentrifugiert, um so alle Erythrozyten aufgrund ihres Gewichtes auf den Boden des Falcons zu zentrifugieren. Nach erfolgter Zentrifugierung wurden die durch Biocoll separierten peripheren Blutzellen samt RPMI-Medium per Pipette gewonnen und in ein weiteres Falcon Röhrchen pipettiert, welches anschließend für weitere 7 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert wurde. Der flüssige Überstand wurde anschließend abgegossen und das am Boden befindliche Zellpellet wurde mit 40 ml RPMI-Medium resuspendiert und auf zwei T75-Flaschen mit a 20 ml aufgeteilt. Beide T75-Flaschen wurden ebenfalls abschließend in den Inkubator verbracht und verblieben dort für drei Tage. Wie auch die KHYG-1- und die MOLT-4-Zelllinien, diente auch die Zellkultur der peripheren Blutzellen als Effektorzelllinie.

7.2.3 Passagieren und Aussäen am Beispiel der MCF-7 Zellkultur

Nach Herausnahme aus dem Brutschrank erfolgte zunächst eine Adspektion der Zellen unter dem Mikroskop. Bei einem adspektorisch ausreichenden flächendeckenden Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop erfolgte das eigentliche Passagieren. Dazu wurde der Überstand der T25-Flasche abgeschüttet und die Zellen mit 2 ml Phospat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um so sämtliche Mediumreste zu beseitigen. Aufgrund der adhärenen Eigenschaft der MCF-7-Zellen wurde 1 ml Trypsin hinzugefügt, um so die Zellen von der Flaschenwand zu lösen. Nach Zugabe beider Chemikalien erfolgte eine Inkubation von zwei Minuten im Brutschrank. Nach erfolgreicher Ablösung der Zellen von der Flaschenwand wurden 5 ml des Mediums Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung mit dem anionischen Diazofarbstoff Trypanblau ausgezählt. Trypanblau dient der Bestimmung der Zellviabilität, da jener Farbstoff nur von abgestorbenen und perforierten Zellen aufgenommen werden kann. Somit konnten dunkelblau gefärbte Zellen bei der Zählung vernachlässigt werden.

Ziel für die MCF-7- und Pan-1-Zellkulturen waren 100.000 Zellen pro ml und somit 500.000 Zellen pro 5 ml. Das kalkulierte Volumen der Zellsuspension wurde anschließend in einer neuen T25-Flasche ausgesät und mit DMEM-Medium auf 5 ml aufgefüllt. Die neue beschriftete T25-Flasche wurde abschließend wieder für die nächsten drei Tagen in den Inkubator verbracht. Danach wiederholten sich alle oben genannten Schritte regelmäßig.

Beispiel: Es wurden 600.000 Zellen pro ml gezählt, das heißt, dass sich in 0,8 ml 500.000 Zellen befinden. Somit ergeben sich für die neue Passage: 0,8 ml Zellsuspension + 4,2 ml DMEM.

Die Schritte für das Passagieren und Aussäen von Panc-1-Zellen ist zu den oben genannten Schritten komplett identisch.

Die Schritte für das Passagieren und Aussäen von KHYG-1-, MOLT-4- und PB-Zellen ist zu den oben genannten Schritten ebenfalls äquivalent, unterscheidet sich aber in der notwendigen Zellzahl pro Milliliter, in der Behältnisgröße und in dem zu verwendenden Medium. So wurden für KHYG-1-, MOLT-4- und PB-Zellen 300.000 Zellen pro ml veranschlagt. Aufgrund der sehr guten und schnellen Vermehrung dieser Zelllinien wurden T75-Flaschen verwendet, mit je 15 ml enthaltener Zellsuspension. Somit wurden pro T75-Flasche 4.500.000 Zellen benötigt. Für die Zelllinie KHYG-1 und die PBZ wurde das 10%ige BZM-Medium und für die Zelllinie MOLT-4 das 20%ige BZM-Medium verwendet. Der KHYG-1-Zelllinie wurde aus Stimulationszwecken noch zusätzlich 150 µl IL-2 hinzugefügt.

7.2.4 Zytotoxizitätassay

Für ein Zytotoxizitätassay mussten zunächst die dafür benötigten Effektorzellen, wie auch die Targetzellen, in einer Zellkultur angelegt und bebrütet werden.

Das Vorgehen für die Targetzellen (MCF-7, Panc-1) war hierbei dasselbe wie bereits unter "Zellkulturen" beschrieben.

Für die Effektorzellen (KHYG-1, MOLT-4, periphere Blutzellen) wurde extra eine 6-Well-Zellkulturplatte angelegt. In den oberen drei Wells befanden sich zu je 2 ml die jeweilige Effektorzellsuspension und in den unteren drei Wells je 2 ml PBS, um den durch Inkubation stattfindenden Verdunstungsverlust auf ein Minimum zu reduzieren.

In den 2 ml der Effektorzellsuspension mussten jeweils mindestens 1.200.000 Zellen enthalten sein. Grundlage hierfür waren die oben beschriebenen angelegten Zellkulturen der KHYG-1-, MOLT-4- und PB-Zellen, welche zunächst ausgezählt wurden. Anschließend wurde die notwendige Zellzahl gewonnen, zentrifugiert, mit jeweils 6 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und zu drei gleichen Anteilen von je 2 ml in

die drei Wells aufgeteilt. Darauffolgend wurden den Effektorzelllinien Stimulanzen hinzugefügt, wobei das erste Well mit Effektorzellen als Referenzwert unstimuliert blieb. Das zweite Well mit Effektorzellen wurde mit 20 µl IL-2 und das dritte Well, im Falle von MCF-7, wurde zunächst mit 2 µl PHA und später mit 5 µl Mistelextrakt Iscador® M versetzt. Die Effektorzellen für das Zytotoxizitätassay mit Panc-1-Zellen wurden in gleicher Dosierung mit IL-2 und Iscador® M stimuliert (siehe Abbildung 1). Abschließend wurde auch die 6-Well-Zellkulturplatte für drei Tage in einem Inkubator bebrütet.

Beispiel: Bei der Zählung der KHYG-1-Zellen ergaben sich 1.170.000 Zellen pro ml. So sind in 1,2 ml 1.404.000 Zellen enthalten. Da es sich um drei Wells mit je mindestens 1.200.000 Zellen handelte, wurden also 3,6 ml der Zellsuspension benötigt.

Jene 3,6 ml wurden zunächst bei 1.500 rpm und bei 4 Grad Celsius für 4 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde dann anschließend mit 6 ml 10%igen BZM-Medium resuspendiert und zu je 2 ml in die entsprechenden 3 Wells aufgeteilt.

KHYG-1 unstimuliert 2 ml	KHYG-1 IL-2 stimuliert 2 ml	KHYG-1 PHA/ME stimuliert 2 ml
PBS 2 ml	PBS 2 ml	PBS 2 ml

MOLT-4/PBZ unstimuliert 2 ml	MOLT-4/PBZ IL-2 stimuliert 2 ml	MOLT-4/PBZ ME stimuliert 2 ml
PBS 2 ml	PBS 2 ml	PBS 2 ml

Abbildung 1: Angelegte 6-Well-Zellkulturplatten mit den unterschiedlichen Effektorzellen und Stimulanzen in Vorbereitung auf das Zytotoxizitätassay;
KHYG-1/MOLT-4/PBZ= Effektorzellen, IL-2= Interleukin-2, ME= Mistelextrakt,
PHA= Phytohämagglutinin, PBS= Phosphat-gepufferte Salzlösung

Nach dreitägiger Bebrütung bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ wurde die 6-Well-Zellkulturplatte aus dem Inkubator entnommen und die Effektorzellen in den drei oberen Wells wurden, wie bereits beschrieben, mittels Trypanblau-Anfärbung und Neubauer-Zählkammer jeweils ausgezählt. Mit den nun ausgezählten Zellen wurde anschließend auf einer V-förmigen 96-Well-Zellkulturplatte eine E:T Ratioreihe von 80:1 bis 1,25:1,

angelegt (siehe Abbildung 2). Vorbereitet wurden die Effektorzellenkonzentrationen in Mikro Tubes. Als Ausgangswert wurden in der 80:1 E:T Ratio 1.200.000 Effektorzellen benötigt, welche für die erste Ratio immer mit 650 µl RPMI in einem Mikro Tube verdünnt wurden. Die folgenden sechs Mikro Tubes einer E:T Ratioreihe wurden jeweils mit 200 µl RPMI befüllt. Das Gemisch der 80:1 Ratio mit Effektorzellen und 650 µl RPMI wurde für ein gutes Mischverhältnis mehrfach auf und abpipettiert. Anschließend wurden mit der Pipette 220 µl aus dem ersten Mikro Tube entnommen und in das zweite Mikro Tube hineinpipettiert. Hier lag am Ende der Vorbereitung eine E:T Ratio von 40:1 vor. Bis zur letzten Ratio, 1,25:1, wurden immer wieder 220 µl des Effektorzellen/RPMI-Gemisches der vorherigen Ratio entnommen und in das darauffolgende Mikro Tube gegeben. Dieser Vorgang erfolgte sowohl für die unstimulierten, die IL-2 stimulierten als auch für die PHA/ME stimulierten Zellen. Die nun hergestellte Ratioreihe wurde dann auf eine bereits beschriftete V-förmige 96-Well-Zellkulturplatte übertragen. Dafür wurden aus jedem einzelnen Mikro Tube 100 µl entnommen und in die dafür vorgesehene Vertiefung der 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Neben den Effektorzellen wurden auch die Targetzellen (MCF-7, Pan-1) gebraucht, welche wie bereits unter "Zellkultur" beschrieben, ebenfalls ausgesät, bebrütet und gezählt wurden. Insgesamt wurden ca. 12 ml der Targetzellsuspension benötigt, welche pro Milliliter mindestens 30.000 Zellen enthalten sollte. Als Medium wurde ebenfalls RPMI verwendet. In jedes Well, in dem sich 100 µl Effektorzellensuspension befanden, wurden 100 µl Targetzellensuspension hinzugegeben, womit die unterschiedlichen E:T-Ratios nun vollständig angelegt worden. Letztendlich befanden sich in jedem verwendeten Well 200 µl, bestehend aus 100 µl Effektor- und 100 µl Targetzellensuspension. Zusätzlich wurden die ersten sechs Vertiefungen der letzten Zellkulturplatten-Reihe mit jeweils 100 µl Targetzellensuspension befüllt. Neben den Wells, welche das Effektorzellen/Targetzellen-Gemisch enthielten, wurden zwei zusätzliche Kontrollreihen angelegt. In den oberen drei Wells jener Kontrollreihen befanden sich die Kontrollen für spontane von Effektorzellen freigesetzte Lactatdehydrogenase (LDH) (spontane von Effektorzellen freigesetzte LDH-Kontrolle), mit je 100 µl der 80:1 E:T-Ratio von unstimulierten, IL-2 stimulierten und PHA/ME stimulierten Zellen, plus 100 µl RPMI. In den mit MAX beschrifteten Vertiefungen befanden sich, wie auch innerhalb der experimentellen Wells, jeweils 100 µl der Targetzellensuspension, zu denen später zusätzlich 10 µl Lyse Puffer hinzugefügt wurden. Die Notwendigkeit der beiden MAX-Kontroll-Wells bestand darin, eine 100%ige Freisetzung von LDH durch Targetzellen festzustellen zu können (maximale von Targetzellen freigesetzte LDH). Die mit VOL beschrifteten Wells enthielten jeweils 100 µl RPMI, plus die ebenfalls später hinzugefügten 10 µl Lyse Puffer und dienten der Korrektur der durch den Lyse Puffer bedingten Volumenzunahme

(Volumen Korrektur Kontrolle). Auch die mit MED beschrifteten Wells enthielten jeweils 100 µl RPMI und nützten der notwendigen Korrektur der durch die LDH-Aktivität möglicherweise veränderten Werte im Kulturmedium. Die LDH-Wells wurden später mit jeweils 1 µl purer LDH versetzt, um deren Aktivität festzustellen. Nach erfolgter Befüllung aller entsprechender Wells, folgte eine vierstündige Inkubation der 96-Well-Zellkulturplatte. 45 Minuten vor Beendigung der Bebrütung wurden jeweils 10 µl Lyse Puffer in die Volumen- und in die Maximal-Wells hinzugefügt. Nach der abgeschlossenen vierstündigen Inkubation wurde die gesamte Platte bei 1.500 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Danach wurden jeweils 50 µl aus jedem befüllten Well in das äquivalente Well auf einer flachen 96-Well-Zellkulturplatte übertragen und dort mit jeweils 50 µl Reaktion-Mixtur versetzt. Jene Reaktion-Mixtur ist Bestandteil des Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kits und besteht aus einem fertigen Substrat-Mix, welcher mit 11,4 ml ultrareinem Wasser und 0,6 ml Assay Puffer angemischt wurde. Anschließend wurde die flache 96-Well-Zellkulturplatte für weitere 30 Minuten inkubiert. Um die, durch die Reaktion-Mixtur induzierte chemische Reaktion wieder zu beenden, wurden letztendlich jeder Vertiefung 50 µl einer Stop-Lösung hinzupipettiert. Die LDH-Aktivität konnte nun per Messung der Formazan-Formation mittels Spektrophotometer bei 490 nm und 680 nm ermittelt werden.

KHYG-1/ MOLT-4/			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	KO	KO		
80:1			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	U	U		
40:1			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	IL-2	IL-2		
20:1			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	PHA	PHA		
10:1			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	MAX	MAX		
5:1			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	VOL	VOL		
2,5:1			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	MED	MED		
1,25:1			U	U	IL-2	IL-2	PHA	PHA	LDH	LDH		
MCF-7			T	T	T	T	T	T				

KHYG-1/ MOLT-4/ PBZ			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	KO	KO		
80:1			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	U	U		
40:1			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	IL-2	IL-2		
20:1			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	ME	ME		
10:1			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	MAX	MAX		
5:1			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	VOL	VOL		
2,5:1			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	MED	MED		
1,25:1			U	U	IL-2	IL-2	ME	ME	LDH	LDH		
MCF-7/ Panc-1			T	T	T	T	T	T				

Abbildung 2: Angelegte Zytotoxizitätassays auf 96-Well-Zellkulturplatten mit den unterschiedlichen E:T Ratios;

KHYG-1/MOLT-4/PBZ= Effektorzellen, MCF-7/Panc-1= Targetzellen,

U= unstimuliert, IL-2= IL-2 stimuliert, PHA= Phytohämagglutinin stimuliert,

ME= Mistelextrakt stimuliert, KO= Kontrolle, MAX= Maximum, VOL= Volumen,

MED= Medium, LDH= Lactatdehydrogenase, T= Targetzellen

7.2.5 Spektrophotometer

Im letzten Schritt des Zytotoxizitätassays wurde mittels plattenlesenden Spektrophotometer die LDH-Aktivität bei 490 nm und bei 680 nm gemessen. Lactatdehydrogenase ist ein zytosolisches Enzym, welches in zahlreichen verschiedenen Zelltypen vorkommt. Erfährt eine Zelle einen Plasmaschaden, so wird LDH in das Zellmedium freigelassen. Das nun extrazelluläre LDH kann mittels gekoppelter Enzymreaktion, bei welcher LDH via NAD⁺ Reduktion zu NADH, die Umwandlung von Lactat in Pyruvat katalysiert, quantifiziert werden. Hierfür nutzt das wasserstoffübertragende Enzym Diaphorase wiederum das entstandene NADH um Tetrazolium Salz (INT) zu roten Formazan zu reduzieren, welches dann bei 490 nm und 680 nm mittels Adsorption gemessen werden kann. Da das Level der Formazan-Formation direkt proportional zu der Menge freigelassener LDH ist, dient es dadurch als Indikator für die Zellzytotoxizität. Somit ergaben sich aus den ermittelten Messwerten die unterschiedlichen Zytotoxizitäten, welche mit der Größe der spezifischen Zelllyse ausgedrückt werden. Die berechneten Werte sind prozentuale Werte und geben die

zytolytische/zytotoxische Wirkung der unstimulierten und unterschiedlich stimulierten Effektorzellen (KHYG-1, MOLT-4, PBZ) auf die Zielzellen (MCF-7, Panc-1) an. Der Zytotoxizitätswert wurde für jede Ratio des Effektor-/Targetzellen-Gemisches mithilfe des Computerprogrammes Gen5 ermittelt, tabellarisch aufgelistet und vergleichend graphisch dargestellt. Folglich resultierte jeder Stimulationszustand in einem Diagramm, durch Auftragung der E:T Ratio auf der x-Achse und der Zytotoxizitätswerte auf der y-Achse.

7.2.6 Durchflusszytometrie

Als Grundlage für die Durchflusszytometrie diente der Rest der Effektorzellensuspensionen in den oberen drei Wells der 6-Well-Zellkulturplatte für das Zytotoxizitätassay.

Zunächst wurden 4 bis 15 beschriftete Eppendorf-Röhrchen vorbereitet, welche auf Eis gelegt wurden. Es wurden je 2 bis 5 Röhrchen für die unstimulierten, die IL-2 stimulierten und die PHA/ME stimulierten Zellen vorbereitet. Jedes der Eppendorf-Röhrchen musste dabei 100.000 Zellen enthalten. Nach erfolgter Umfüllung der Effektorzellensuspensionen aus den Wells der 6-Well-Zellkulturplatte in die Eppendorf-Röhrchen mussten diese für 5 Minuten bei 4 Grad Celsius und bei 1.500 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde nach erfolgter Zentrifugierung abgesaugt und das Röhrchen wurde geratscht. Danach wurde in jedes Röhrchen 1 ml kalter FACS Puffer hinzugegeben. Nun wurden alle Röhrchen ein zweites Mal unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend erneut abgeschüttelt. Zu den Zellen wurden nun die entsprechenden Antikörper hinzugegeben. Jedes Röhrchen wurde somit mit 3 bis 4 verschiedenen Antikörper versetzt.

Für die Zelllinie KHYG-1 wurden 15 Eppendorf-Röhrchen angelegt. Jeweils 5 Röhrchen für unstimulierte, IL-2 stimulierte und PHA/ME stimulierte KHYG-1-Zellen, welche mit folgenden Antikörpern versetzt wurden:

Röhrchen 1	IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-APC
Röhrchen 2	CD94-FITC, CD16-PE, CD56-APC
Röhrchen 3	CD94-FITC, NKG2D-PE, CD56-APC
Röhrchen 4	CD94-FITC, NKp30-PE, CD56-APC
Röhrchen 5	CD94-FITC, NKp46-PE, CD56-APC

Für die Zelllinie MOLT-4 wurden 4 Eppendorf-Röhrchen angelegt. Jeweils 2 Röhrchen für unstimulierte MOLT-4-Zellen und jeweils 2 Röhrchen für PHA/ME stimulierte MOLT-4-Zellen, mit jeweils 4 entsprechenden Antikörper:

Röhrchen 1	IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PerCP, IgG1-APC
Röhrchen 2	CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP, CD45-APC

Für die peripheren Blutzellen wurden 12 Eppendorf-Röhrchen angelegt. Jeweils 4 Röhrchen für unstimulierte, IL-2 stimulierte und ME stimulierte PBZ. Die Antikörperaufteilung erfolgte wie folgt:

Röhrchen 1	IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PerCP, IgG1-APC
Röhrchen 2	CD56-FITC, CD19-PE, CD3-PerCP, CD45-APC
Röhrchen 3	CD56-FITC, NKG2D-PE, CD3-PerCP, CD69-APC
Röhrchen 4	CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP, CD45-APC

Nachdem die Antikörper hinzugefügt wurden, mussten die Röhrchen für 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert werden. Anschließend erfolgte eine weitere Waschung mit 1 ml kalten FACS Puffer und eine weitere Zentrifugierung für 5 Minuten bei 1.500 rpm und 4 Grad Celsius. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und alle Röhrchen wurden ein weiteres Mal geratscht. Danach wurden alle Zellpellets mit 500 µl FACS Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen übertragen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Zellaktivität per Analyse der Menge aktivierter und inhibierter Rezeptoren an der Zelloberfläche erfasst. Auch wurde der Prozentsatz positiv gefärbter Zellen und der Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität (MFI) analysiert, welcher als Maß für die Menge gebundener Fluoreszenzfarbstoffe pro Partikel dient.

Als optisches Messverfahren dient die Durchflusszytometrie der Analyse von Partikeln beziehungsweise der Analyse von Zellen in Suspension. Die Zellen werden einzeln an einer Lichtquelle in einem Flüssigkeitsstrom vorbeigeleitet, wodurch eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit untersucht werden kann. Gemessen werden dabei die interne Komplexität anhand der Seitwärtsstreuung des Lichtes (SSC), die Größe der Zellen

anhand der Vorwärtsbewegung des Lichtes (FSC) sowie unterschiedliche potenzielle Zelleigenschaften mittels Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper. Jene Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper nützen der Markierung von Zellstrukturen, von intrazellulären Zielen und einer Immunphänotypisierung. In Rahmen dieser Arbeit wurde eine Mehrfarbendurchflusszytometrie durchgeführt, bei welcher parallel mehrere Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper Anwendung fanden und gemessen wurden. Die parallele Messung mehrerer Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper beruht dabei auf den unterschiedlichen Emissions- und Absorptionspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe.

Mittels dem Computerprogramm CellQuest Pro wurden anschließend alle Messwerte graphisch dargestellt.

III. Ergebnisse

1. Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und PHA stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Brustkrebszelllinie MCF-7

1.1 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Um die Zytotoxizität bestimmter Effektorzellen gegenüber spezifischer Zielzellen zu bestimmen, dient das Zytotoxizitätassay. Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit die zytotoxische Wirkung der NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 im unstimulierten, IL-2 stimulierten und PHA stimulierten Zustand mittels Zytotoxizitätassay gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 getestet. Hierfür wurde die LDH-Aktivität der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der KHYG-1-Zellen per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm zeigt sich dabei ein Vorteil für die IL-2 stimulierten KHYG-1-Zellen (Abbildung 1.0). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse liegen dabei für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 24% und 100%, für PHA stimulierte Zellen zwischen 24% und 83% und für die der unstimulierten Zellen zwischen 18% und 62%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse befindet sich für alle drei KHYG-1-Zellgruppen bei einer E:T Ratio von 80:1 und beträgt für IL-2 stimulierte KHYG-1-Zellen 100%, für PHA stimulierte KHYG-1-Zellen 83% und für unstimulierte KHYG-1-Zellen 62%. Die Standardabweichungen für unstimulierte KHYG-1-Zellen bewegen sich dabei zwischen 4% und 14%, für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 1,5% und 16% und für PHA stimulierte Zellen zwischen 3% und 14%, womit sich die Standardabweichungen für alle drei unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellen in einem einheitlichen Bereich befinden.

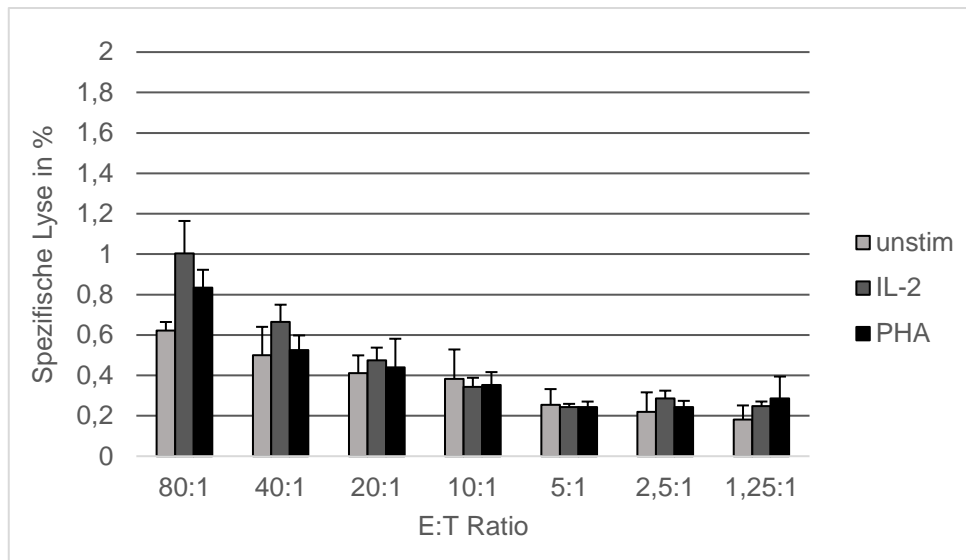


Abbildung 1.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten, IL-2 stimulierten und PHA stimulierten KHYG-1-Zellen gegenüber MCF-7 Mammakarzinomzellen, $n=8$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Um festzustellen, ob ein prägnanter Unterschied zwischen der zytotoxischen Wirkung der drei unterschiedlichen Zustände der KHYG-1-Zellen besteht, wurden hierfür jeweils zwei der drei unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Testes miteinander verglichen. Bei dem Zweistichproben-t-Test handelt es sich um einen sogenannten Signifikanztest, welcher auf der Prüfung der Mittelwerte zweier Stichproben beruht und diese miteinander auf ihre Gleichheit oder Verschiedenheit prüft. Somit ist es möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die Mittelwerte zweier Grundgesamtheiten gleich oder verschieden voneinander sind. Im Rahmen der Auswertung des Zytotoxizitätassays handelt es sich um die Mittelwerte der spezifischen Lyse, welche sich in diesem Fall aus der zytotoxischen Wirkung der Effektorzellen KHYG-1 gegen die Zielzellen MCF-7 ergeben. Die allgemeingültige und auch hier verwendete Einteilung der Signifikanz erfolgt dabei wie folgt: p -Wert $>0,05$ = keine Signifikanz, p -Wert $<0,05$ = geringe Signifikanz (*), p -Wert $<0,01$ = moderate Signifikanz (**), p -Wert $<0,001$ = deutliche Signifikanz (***)

Basierend auf dieser Einteilung präsentiert sich somit weder im Vergleich zwischen den unstimulierten und IL-2 stimulierten KHYG-1-Mittelwerten ($p=0,11$, $p >0,05$), noch im Vergleich zwischen den unstimulierten und PHA stimulierten KHYG-1-Mittelwerten ($p=0,15$, $p >0,05$), eine Signifikanz. Auch der Vergleich zwischen den Mittelwerten IL-2 und PHA stimulierter KHYG-1-Zellen ($p=0,15$, $p >0,05$) blieb ohne prägnante

Signifikanz. Die höchste Signifikanz lässt sich insgesamt jedoch zwischen den unstimulierten und IL-2 stimulierten KHYG-1-Mittelwerten erkennen ($p= 0,11$, $p >0,05$) (Abbildung 1.1).

Mit p-Werten von 0,11 bis 0,15 lässt sich zudem feststellen, dass die Signifikanz der unterschiedlichen KHYG-1-Zellgruppen nahezu gleich ist.

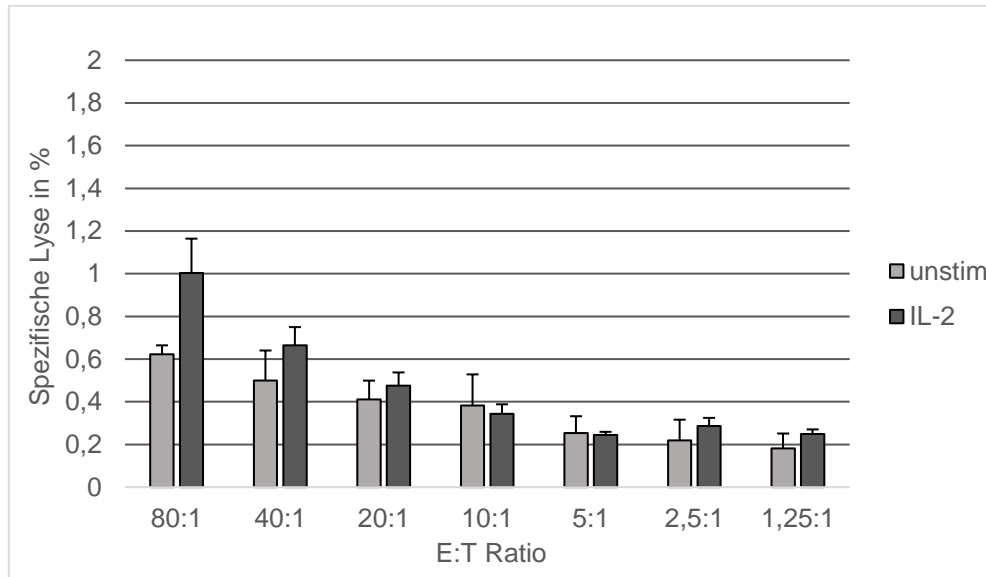
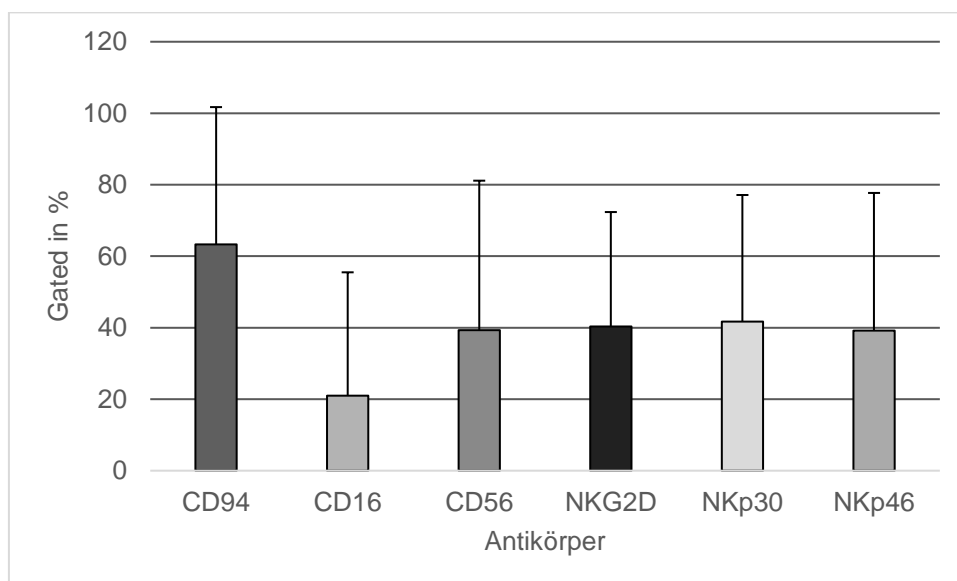


Abbildung 1.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse zwischen unstimulierten und IL-2 stimulierten KHYG-1-Zellen gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels Zweistichproben-t-Test, $n= 8$ ($n=$ Anzahl unabhängiger Experimente)

1.2 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Um nachvollziehen zu können, wie stark die NK-Zellen der NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 in ihrer Aktivität unter den unterschiedlichen Stimulationszuständen stimuliert und in ihrer Wirkung verstärkt wurden, wurden diese mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und deren unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte, IL-2 stimulierte und PHA stimulierte KHYG-1-Zellen, in welcher die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD94-FITC, CD16-PE, CD56-APC, NKG2D-PE, NKp30-PE und NKp46-PE miteinander verglichen wurden, ist für alle drei KHYG-1-Zellgruppen erkennbar, dass der Antikörper CD94-FITC, in einer vorher festgelegten Region, am stärksten und der Antikörper CD16-PE am schwächsten von den KHYG-1-Zellen gebunden wurde. Mit 67% wurde CD94-FITC am stärksten unter IL-2 Stimulation gebunden, gefolgt von 63% unter unstimulierten Bedingungen und 51% unter PHA Stimulation. CD16-PE wurde mit 10% am schwächsten unter PHA Stimulation detektiert, gefolgt von 13% unter IL-2 Stimulation und 21% unter unstimulierten Bedingungen. Bis auf CD94-FITC zeigen insgesamt alle weiteren Antikörper ihre stärkste Detektion unter unstimulierten Bedingungen mit Werten zwischen 21% und 42%.

Die Standardabweichungen bewegen sich dabei für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 32% und 42%, für die IL-2 stimulierte Zellgruppe zwischen 27% und 41% und für die PHA stimulierte Zellgruppe zwischen 17% und 38% und liegen somit in einem einheitlichen Bereich (Abbildung 1.2).



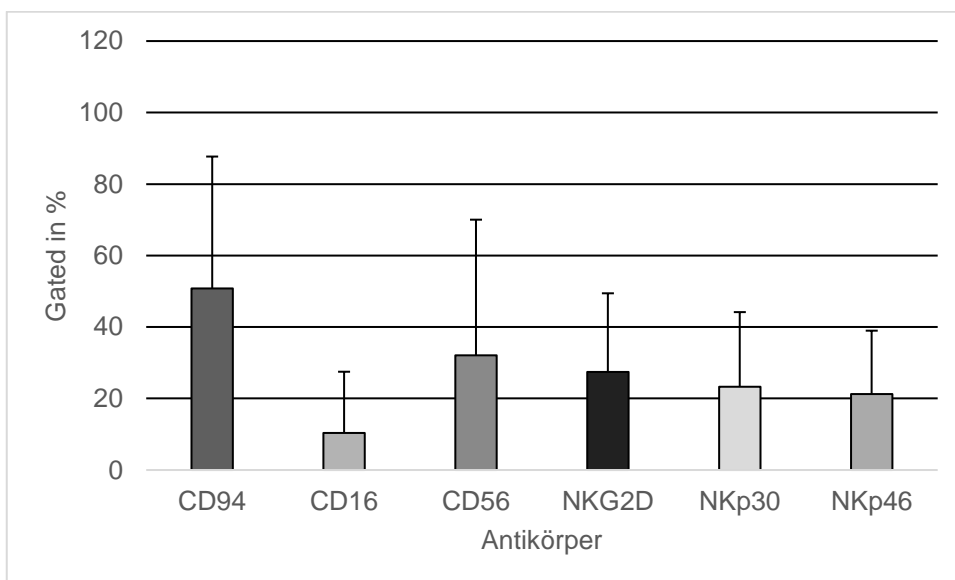
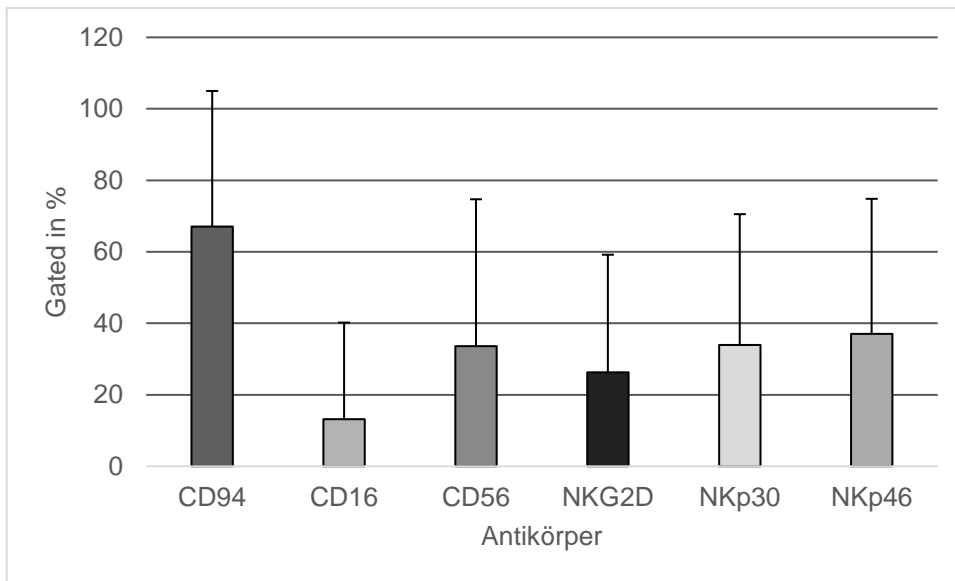
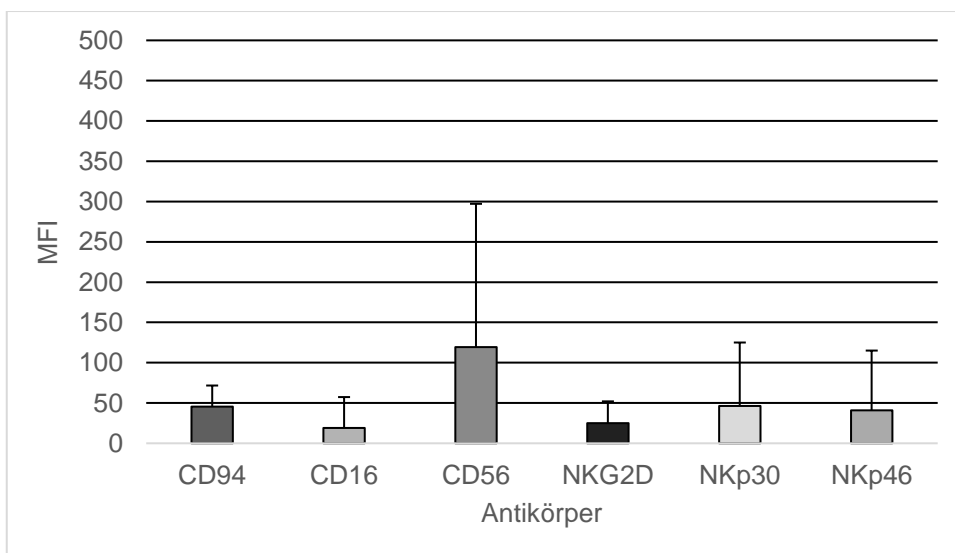
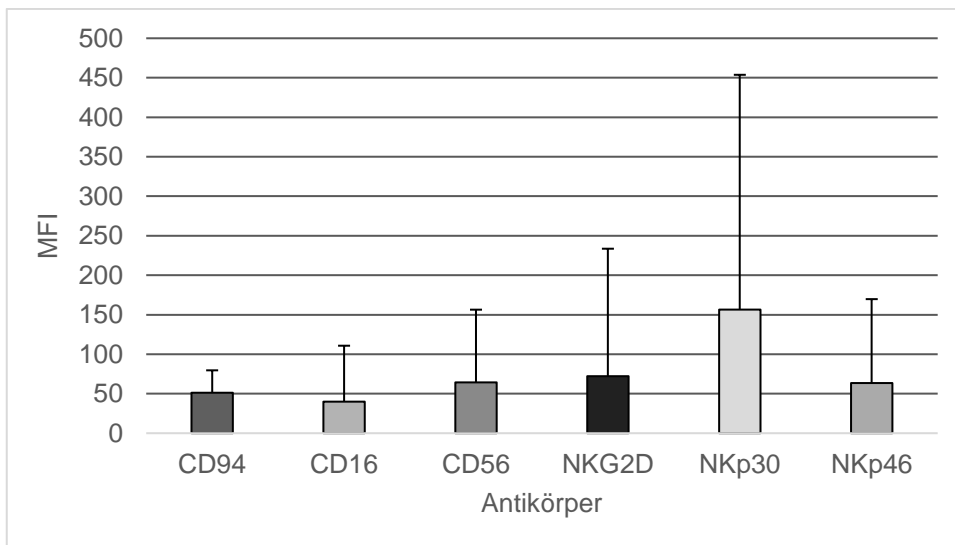


Abbildung 1.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und PHA (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=8$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Abbildung 1.3 präsentiert für jeweils alle drei KHYG-1 Zellgruppen eine Übersicht über den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität (MFI), welcher als Maß für die Menge gebundener Fluoreszenzfarbstoffe pro Partikel dient. So ist für unstimulierte KHYG-1-Zellen der höchste MFI für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper NKp30-PE mit einem Wert von 156,5 feststellbar. Mit einem Wert von 119 unter IL-2 Stimulation und einem Wert von 69 unter PHA Stimulation lässt sich hier der höchste MFI jeweils für CD56-APC nachweisen. Unter unstimulierten Bedingungen mit einem Wert von 40 und

19 unter IL-2 Stimulation zeigt sich der schwächste MFI-Wert für den Antikörper CD16-PE. Als der schwächste MFI-Wert unter PHA Stimulation erweist sich der Antikörper NKp46-PE mit 28.

Für die unstimulierten MFI-Werte liegen die Standardabweichungen zwischen 28 und 297, für die IL-2 stimulierten MFI-Werte zwischen 26 und 178 und für die PHA stimulierten MFI-Werte zwischen 18 und 89. Die Standardabweichungen variieren somit deutlich.



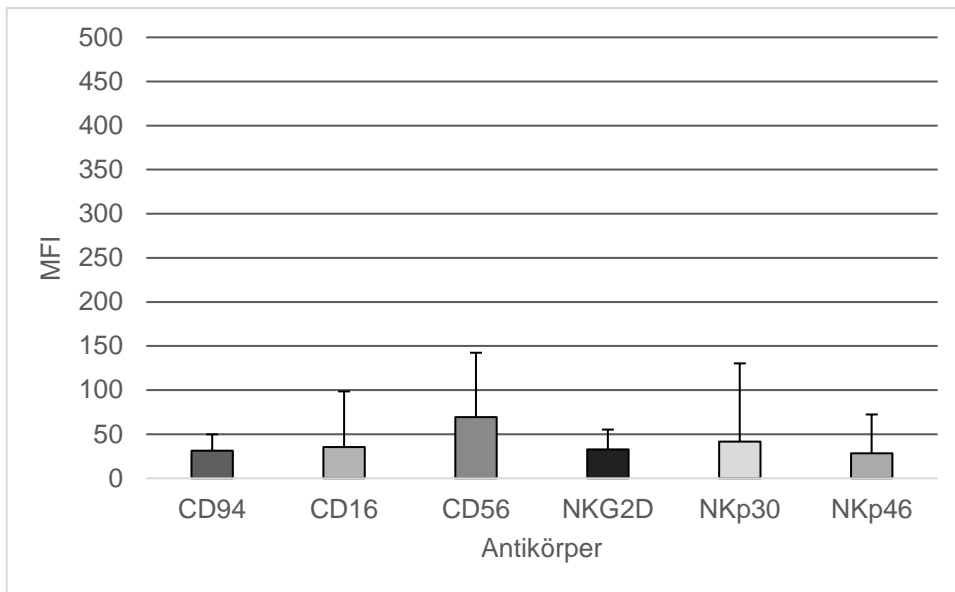


Abbildung 1.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und PHA (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=8$ ($n=$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Um eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper treffen zu können, wurden alle hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper jeweils für ihre unterschiedlichen Stimulationszustände per Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen.

Mit p-Werten zwischen 0,05 und 0,89 präsentiert sich für keinen der hier verwendeten Antikörper eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der unterschiedlich stimulierten Zellgruppen.

Die insgesamt höchste Signifikanz ergibt sich jedoch für den Antikörper CD94-FITC zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter Mittelwerte mit $p=0,05$ (Abbildung 1.4). Die höchste Signifikanz für alle weiteren Antikörper ist insgesamt zwischen den Mittelwerten unstimulierter und PHA stimulierter KHYG-1-Zellen mit p-Werten zwischen 0,12 und 0,45 erkennbar.

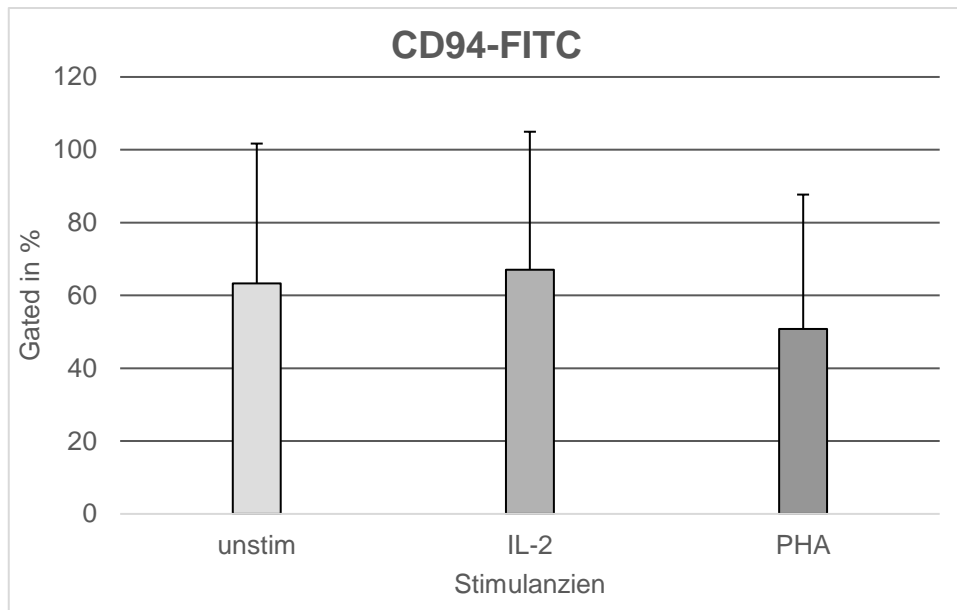


Abbildung 1.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz des Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers CD94-FITC zwischen den unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, $n=8$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

1.3 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Neben den NK-Zellen spielen auch insbesondere die T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Tumorbabwehr, weshalb auch die T-lymphoblastische Leukämie-Zelllinie MOLT-4 im Rahmen dieser Arbeit als Effektorzelllinie dient. Dabei wurden die MOLT-4-Zellen, wie auch die KHYG-1-Zellen, in ihrer zytotoxischen Wirkung gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 getestet. Die MOLT-4-Zellen waren dafür unstimuliert und PHA stimuliert. Auch hier wurde die LDH-Aktivität für beide unterschiedlichen Stimulationszustände der MOLT-4-Zellen per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm zeichnet sich ein Vorteil der unstimulierten Zellen gegenüber der PHA stimulierten Zellen ab (Abbildung 1.5). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse befinden sich bezüglich der unstimulierten Zellen zwischen 26% und 121% und die der PHA stimulierten Zellen zwischen 28% und 115%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse liegt bei beiden MOLT-4-Zellgruppen bei einer E:T Ratio von 80:1 und beträgt für die unstimulierten MOLT-4-Zellen 121% und für die PHA stimulierten MOLT-4-Zellen 115%. Die Standardabweichungen für unstimulierte MOLT-4 bewegen sich dabei zwischen 3% und 10% und für PHA stimulierte Zellen zwischen 2% und 15%, womit sich auch hier die Standardabweichungen für beide unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Zellen in einem nahezu einheitlichen Bereich befinden.

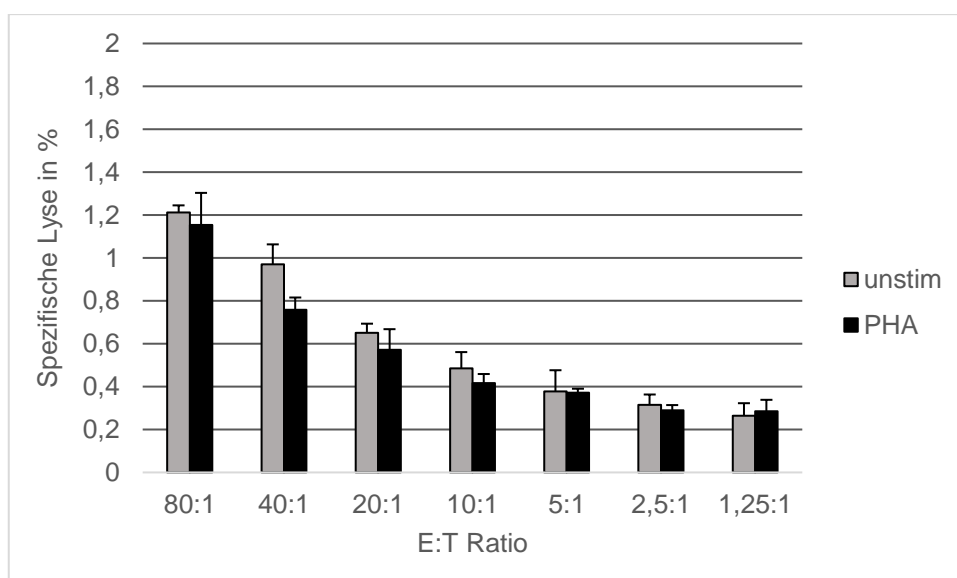


Abbildung 1.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten und PHA stimulierten MOLT-4-Zellen gegenüber MCF-7 Mammakarzinomzellen, $n = 7$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Auch für die Mittelwerte der spezifischen Lyse beider MOLT-4-Zellgruppen wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt.

So ist auch im Vergleich zwischen unstimulierten und PHA stimulierten MOLT-4-Zellen ($p = 0,075$, $p > 0,05$) keine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der spezifischen Lyse beider Zellgruppen erkennbar (Abbildung 1.6). Im Vergleich zu den drei Zellgruppen der KHYG-1-Zelllinie (Abbildung 1.1) präsentiert sich hier jedoch insgesamt die höchste Signifikanz.

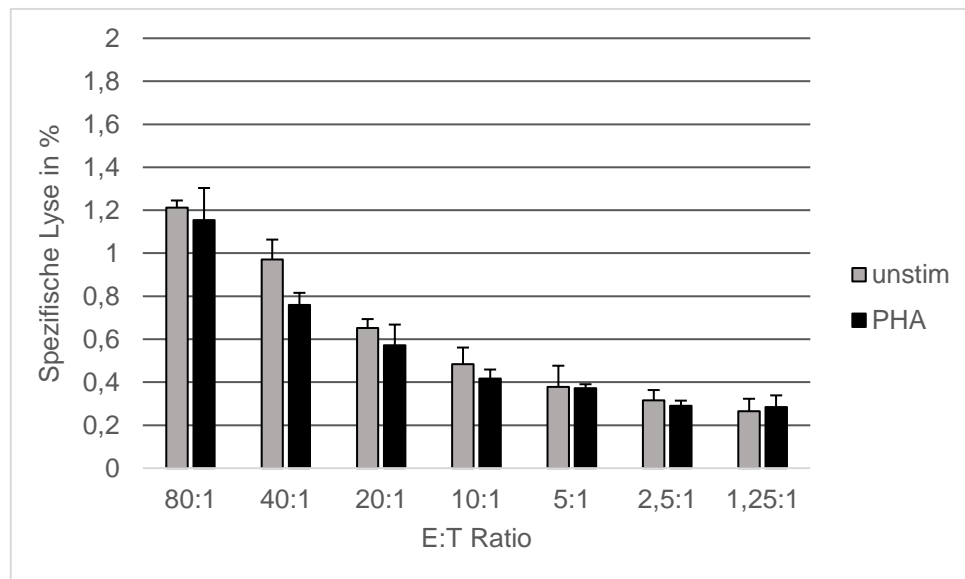
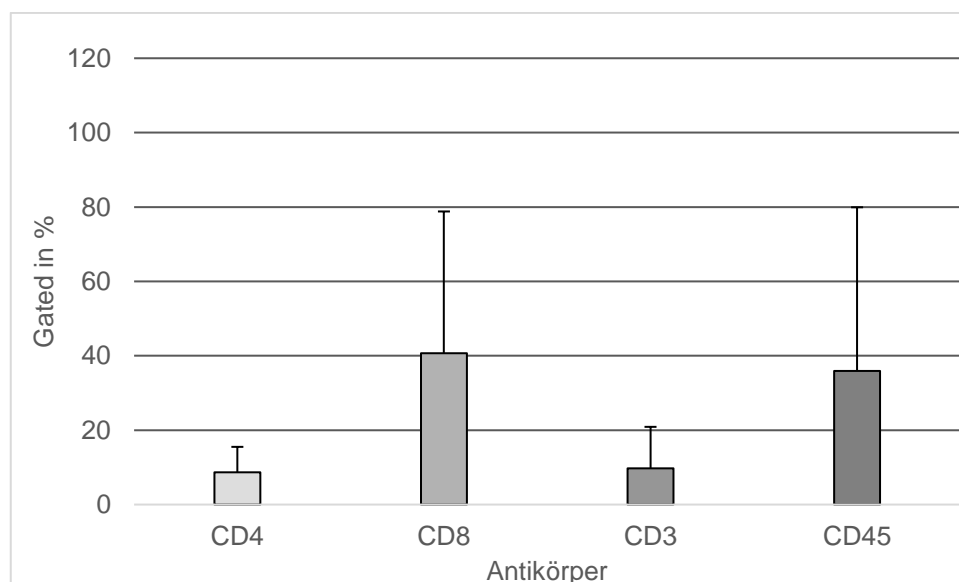


Abbildung 1.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse zwischen unstimulierten und PHA stimulierten MOLT-4-Zellen gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels Zweistichproben-t-Test, $n = 7$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

1.4 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Auch die unterschiedlich stimulierten Zellen der T-lymphoblastischen Leukämie-Zelllinie MOLT-4 wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und deren unterschiedlichen Emmissions- und Absorptionspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst, um so eine Aussage über ihre Aktivität treffen zu können. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte und PHA stimulierte MOLT-4-Zellen, in welcher die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP und CD45-APC miteinander verglichen wurden, erweist sich für die unstimulierten MOLT-4-Zellen der Antikörper CD8-PE mit 41%, in einer vorher festgelegten Region, als am stärksten und der Antikörper CD4-FITC mit 9% als am schwächsten von den MOLT-4-Zellen gebunden. Für PHA stimulierte MOLT-4-Zellen zeigt sich mit 40% die stärkste Bindung für CD45-APC und mit 5% die schwächste Bindung, wie auch bei der unstimulierten MOLT-4-Zellgruppe, für CD4-FITC.

Die Standardabweichungen bewegen sich dabei für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 7% und 44% und für die PHA stimulierte Zellgruppe zwischen 5% und 49% und befinden sich somit auch hier in einem einheitlichen Bereich (Abbildung 1.7).



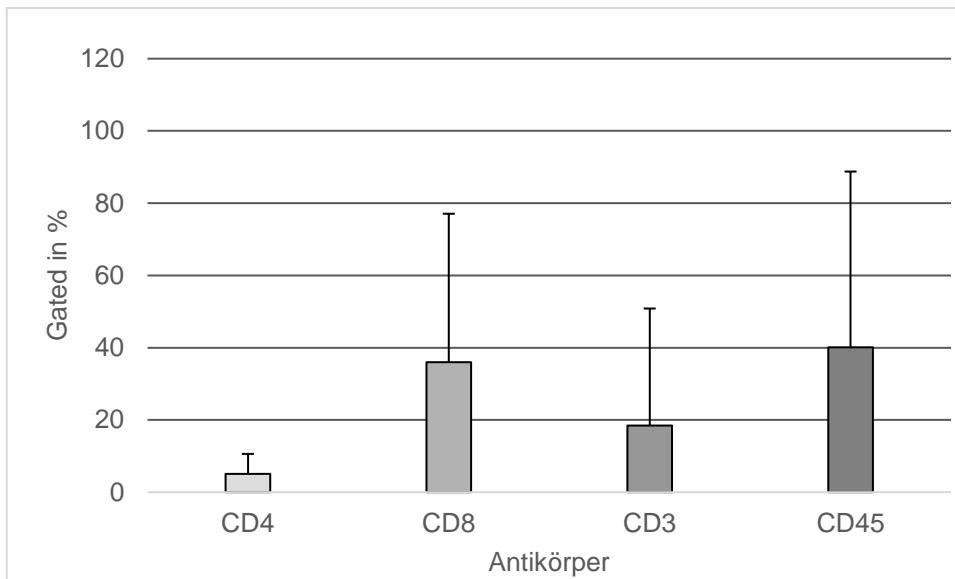


Abbildung 1.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben) und PHA (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n=7$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Abbildung 1.8 stellt jeweils für die beiden MOLT-4-Zellgruppen eine Übersicht über den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität dar. So präsentiert sich für unstimulierte und für PHA stimulierte MOLT-4-Zellen der höchste MFI jeweils für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD45-APC mit einem Wert von 183 für unstimulierte und einem Wert von 217 für PHA stimulierte MOLT-4-Zellen.

Mit Werten von 6 für unstimulierte und 5 für PHA stimulierte MOLT-4-Zellen lässt sich der schwächste MFI für den Antikörper CD4-FITC feststellen.

Die Standardabweichungen für die unstimulierten MFI-Werte liegen hier zwischen 4 und 297 und für die PHA stimulierten MFI-Werte zwischen 4 und 266, womit sich auch hier die Standardabweichungen in einem nahezu ähnlichen Bereich bewegen.

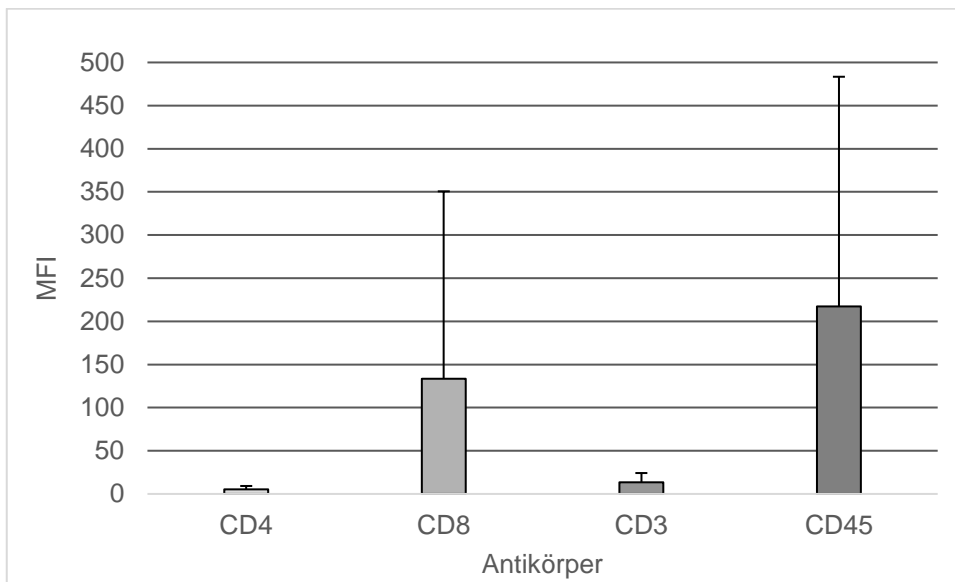
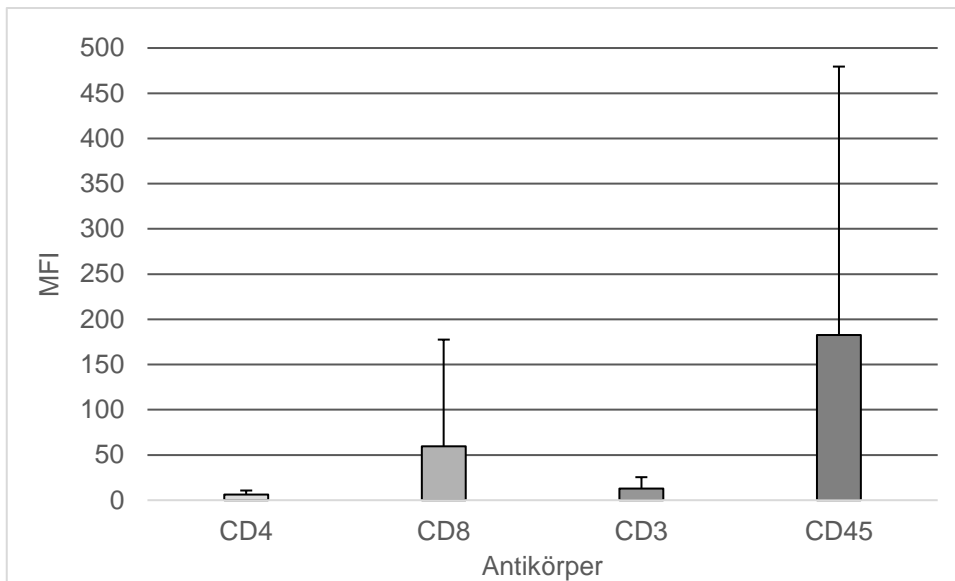


Abbildung 1.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben) und PHA (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n = 7$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Um eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper treffen zu können, wurden auch für die MOLT-4-Zellen alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper jeweils für ihre unterschiedlichen Stimulationszustände per Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen.

So ist auch hier für keinen der verwendeten Antikörper eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der unstimulierten und PHA stimulierten Zellgruppen feststellbar.

Die p-Werte befinden sich zwischen 0,13 und 0,63 ($p > 0,05$). Eine Signifikanz zeichnet sich somit nicht ab. Die höchste Signifikanz präsentiert sich jedoch insgesamt für den Antikörper CD4-FITC mit einem p-Wert von 0,1 (Abbildung 1.9).

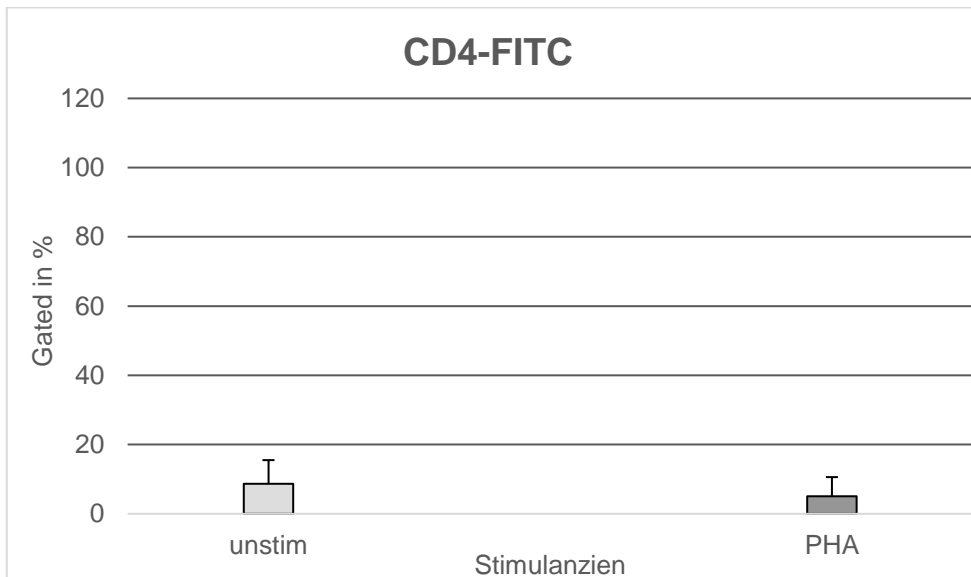


Abbildung 1.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz des Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers CD4-FITC zwischen den unstimulierten und PHA stimulierten MOLT-4-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, $n = 7$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

2. Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und IL-2+Mistelextrakt stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Brustkrebszelllinie MCF-7

2.1 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Das Lektin PHA wurde als Stimulanz nun durch eine gemeinsame Zellstimulation mittels IL-2 und Iscador® M ersetzt. Der Aufbau und der Ablauf der Experimente war derselbe. Somit wurde auch hier die zytotoxische Wirkung der NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 im unstimulierten, IL-2 stimulierten und IL-2+ME stimulierten Zustand mittels Zytotoxizitätassay gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 getestet. Ebenfalls wurde auch hier die LDH-Aktivität der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der KHYG-1-Zellen per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm präsentiert sich im Rahmen dieses Experimentes ein Vorteil für IL-2+ME stimulierte KHYG-1-Zellen (Abbildung 2.0). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse bewegen sich dabei für IL-2+ME stimulierte Zellen zwischen 60% und 150%, für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 57% und 130% und für die der unstimulierten Zellen zwischen 48% und 94%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse liegt für alle drei KHYG-1-Zellgruppen erneut bei einer E:T Ratio von 80:1 und beträgt für IL-2+ME stimulierte KHYG-1-Zellen 150%, für IL-2 stimulierte KHYG-1-Zellen 130% und für unstimulierte KHYG-1-Zellen 94%. Bereits hier lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Werten PHA und IL-2+ME stimulierter Zellen demonstrieren, mit einem deutlichem Vorteil gegenüber der Stimulation mit IL-2+ME (max. 83% vs. max. 150%).

Die Standardabweichungen für unstimulierte KHYG-1-Zellen befinden sich dabei zwischen 2% und 7%, für IL-2 stimulierte KHYG-1-Zellen zwischen 0,2% und 18% und für IL-2+ME stimulierte Zellen zwischen 1% und 8%, womit sich die Standardabweichungen für unstimulierte und IL-2+ME stimulierte Zellen in einem einheitlichen Bereich bewegen. Die Standardabweichungen für IL-2 stimulierte Zellen liegen etwas darüber.

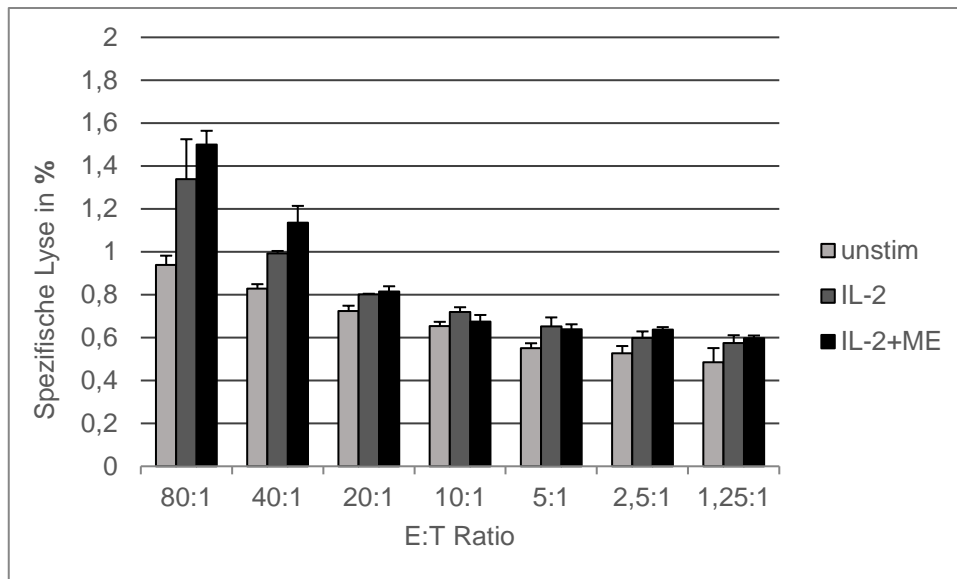


Abbildung 2.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten, IL-2 und IL-2+ME stimulierten KHYG-1-Zellen gegenüber MCF-7 Mammakarzinomzellen, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Ebenso wurde zur Feststellung, ob ein prägnanter Unterschied in der zytotoxischen Wirkung der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der KHYG-1-Zellen besteht, jeweils zwei der drei unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels des Zweistichproben-t-Testes miteinander verglichen.

Anhand der bereits genannten allgemeingültigen Einteilung der p-Werte ergibt sich mit einem p-Wert von 0,02 zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter KHYG-1-Zellen eine leichte Signifikanz ($p < 0,05$). Eine deutliche Signifikanz wird deutlich bei dem Vergleich zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2+ME stimulierter KHYG-1-Zellen ($p = 0,0007$, $p < 0,001$) (Abbildung 2.1). Nur der Vergleich zwischen den Mittelwerten IL-2 und IL-2+ME stimulierter KHYG-1-Zellen blieb ohne prägnante Signifikanz ($p = 0,2$, $p > 0,05$).

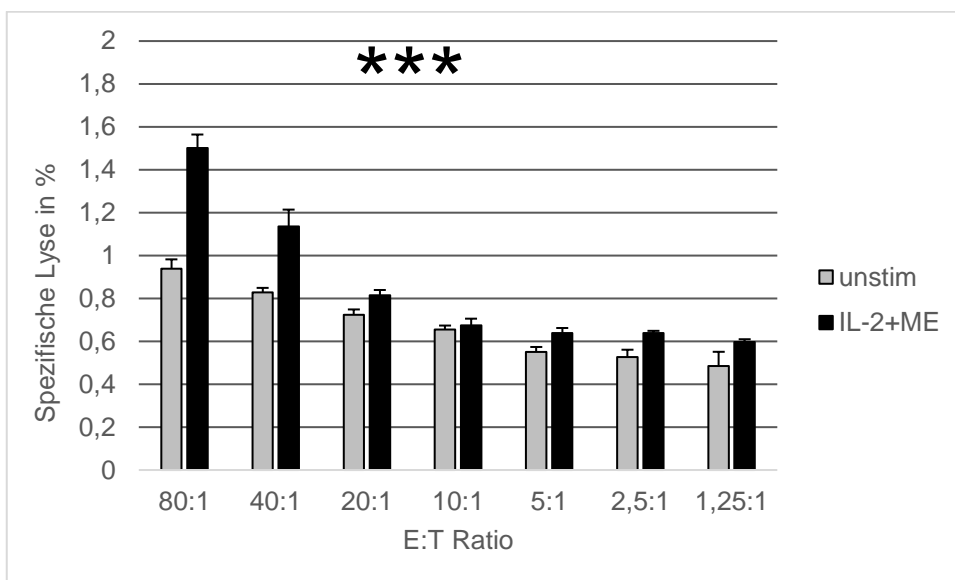
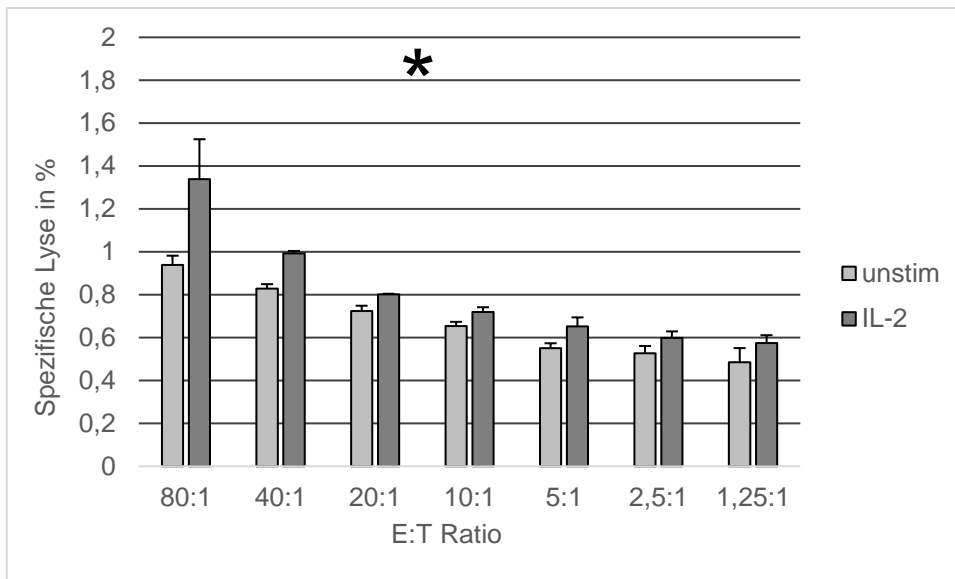
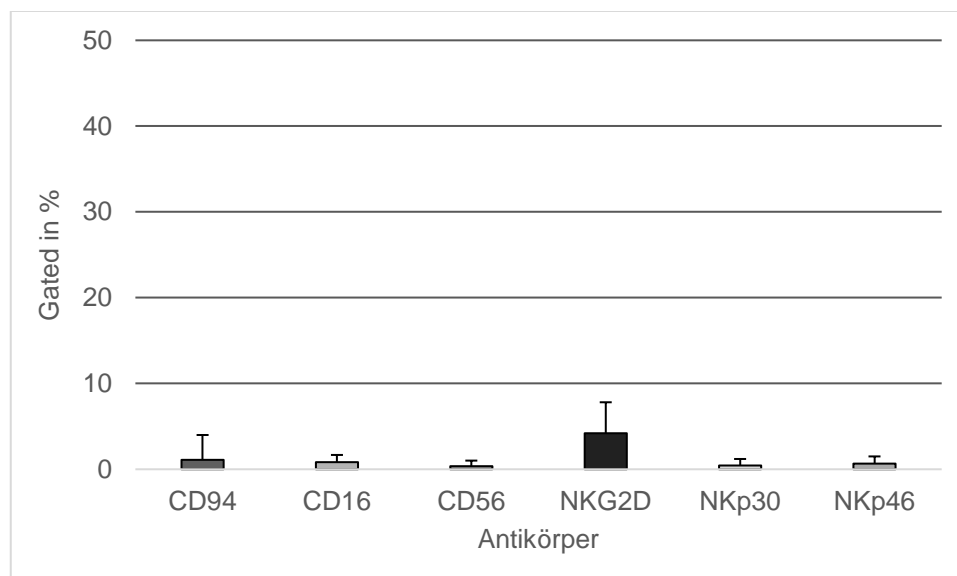


Abbildung 2.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse für unstimulierte, IL-2 und IL-2+ME stimulierte KHY-1-Zellen gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels Zweistichproben-t-Test, *p= geringe Signifikanz ($p < 0,05$), ***p= deutliche Signifikanz ($p < 0,001$), $n= 4$ ($n=$ Anzahl unabhängiger Experimente)

2.2 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Um nachvollziehen zu können, wie stark die NK-Zellen der NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 in ihrer Aktivität unter den unterschiedlichen Stimulationszuständen stimuliert und in ihrer Wirkung verstärkt wurden, wurden auch diese mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und deren unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte, IL-2 stimulierte und IL-2+ME stimulierte KHYG-1-Zellen, in welcher die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD94-FITC, CD16-PE, CD56-APC, NKG2D-PE, NKp30-PE und NKp46-PE miteinander verglichen wurden, lässt sich für alle drei KHYG-1-Zellgruppen feststellen, dass der Antikörper NKG2D-PE, in einer vorher festgelegten Region, am stärksten von den KHYG-1-Zellen gebunden wurde. Mit 9% wurde NKG2D-PE am stärksten unter IL-2+ME Stimulation gebunden, gefolgt von 7% unter IL-2 Stimulation und 4% unter unstimulierten Bedingungen. Der schwächste gebundene Antikörper ist unter unstimulierten und IL-2+ME stimulierten Bedingungen CD56-APC mit jeweils 0,4% und mit 0% unter IL-2 stimulierten Bedingungen, der Antikörper NKp30-PE. Die höchste Antikörperbindung für alle verwendeten Antikörper ist insgesamt für die IL-2+ME stimulierten KHYG-1-Zellen erkennbar.

Die Standardabweichungen bewegen sich für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 0,65% und 4%, für die IL-2 stimulierte Zellgruppe zwischen 0% und 7% und für die IL-2+ME stimulierte Zellgruppe zwischen 0,4% und 8,5% und befinden sich somit in einem relativ einheitlichen Bereich (Abbildung 2.2).



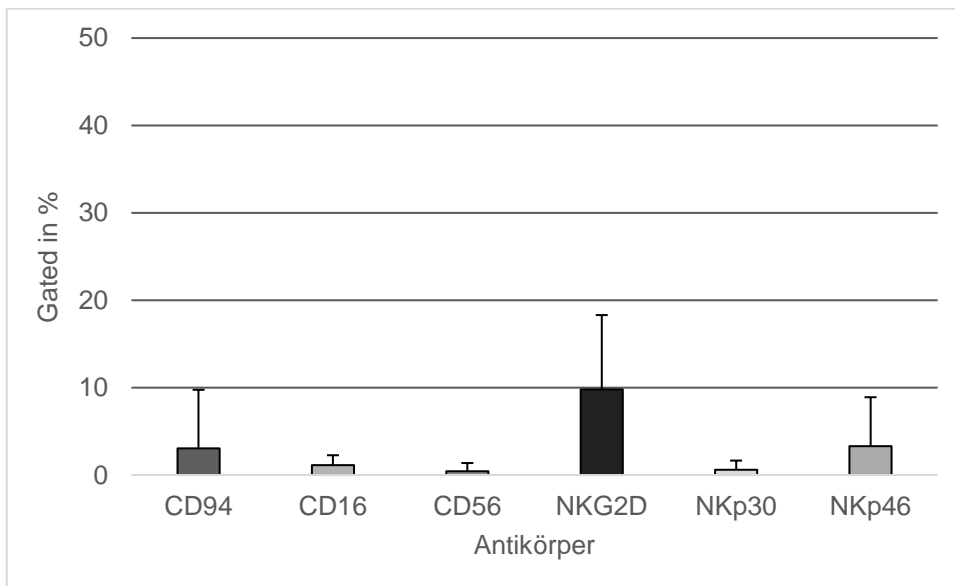
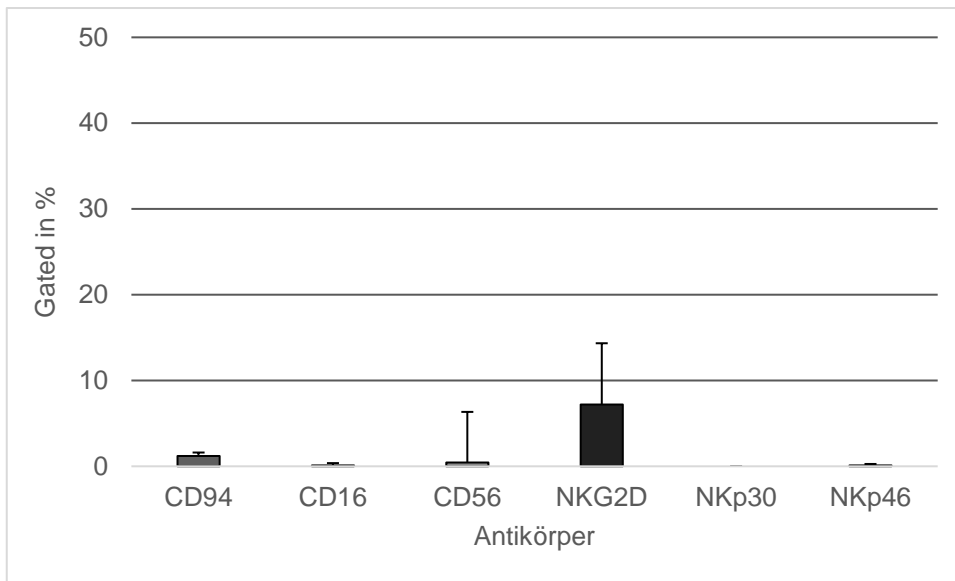
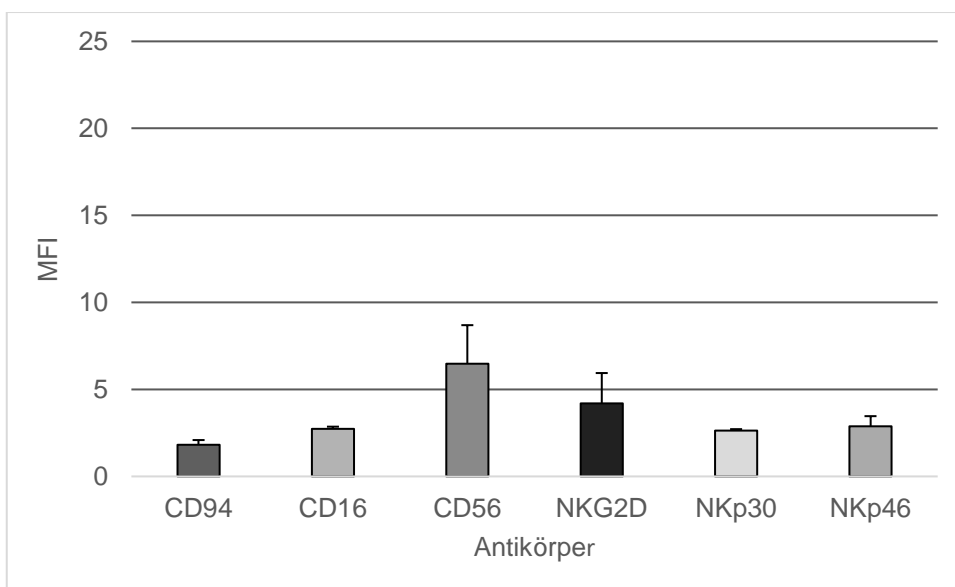
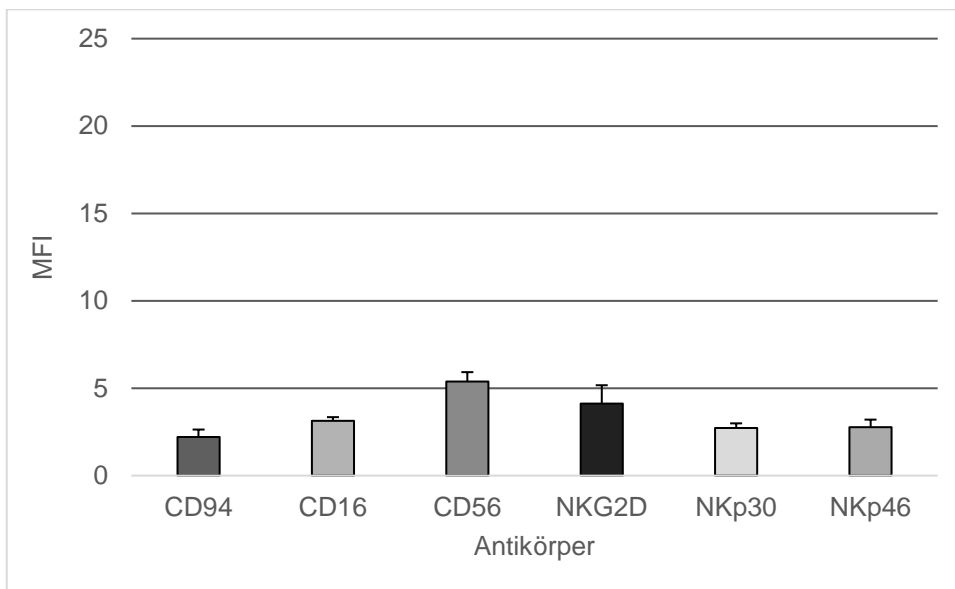


Abbildung 2.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und IL-2+ME (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=4$ ($n=$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Abbildung 2.3 stellt für jeweils alle drei KHYG-1 Zellgruppen eine Übersicht über den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität dar. So ergibt sich für unstimulierte, für IL-2 stimulierte und auch für IL-2+ME stimulierte KHYG-1-Zellen der höchste MFI für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD56-APC, mit einem Wert von 5 unter unstimulierten Bedingungen, mit einem Wert von 6 unter IL-2 Stimulation und einem Wert von 6,5 unter IL-2+ME Stimulation. Mit einem Wert von jeweils 2 für unstimulierte

Bedingungen, für IL-2 Stimulation und für IL-2+ME Stimulation ist der schwächste MFI-Wert für den Antikörper CD94-FITC erkennbar.

Für die unstimulierten MFI-Werte liegen die Standardabweichungen zwischen 0,2 und 1, für die IL-2 stimulierten MFI-Werte zwischen 0,05 und 1,6 und für die IL-2+ME stimulierten MFI-Werte zwischen 0,08 und 2,22. Auch hier befinden sich die Standardabweichungen in einem einheitlichen Bereich.



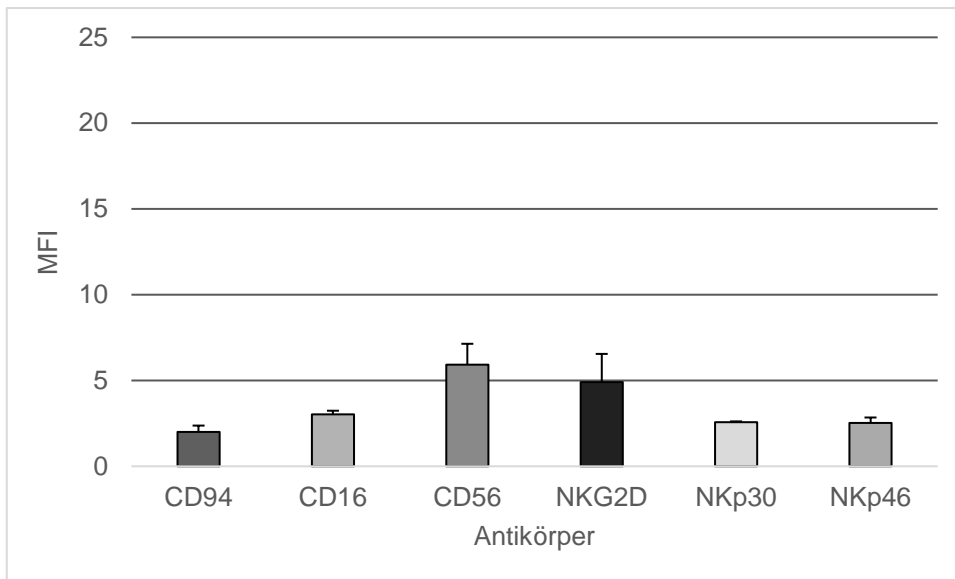


Abbildung 2.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und IL-2+ME (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Um eine Aussage über die Signifikanz, zwischen den unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper treffen zu können, wurden ebenfalls alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper jeweils für ihre unterschiedlichen Stimulationszustände per Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen.

Mit p-Werten zwischen 0,235 und 1,0 ist auch hier für alle Antikörper keine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der unterschiedlichen Stimulationszustände feststellbar. Dennoch präsentiert sich insgesamt die höchste Signifikanz für die beiden Antikörper CD94-FITC und CD16-PE, mit p-Werten zwischen 0,2 und 0,8 (Abbildung 2.4).

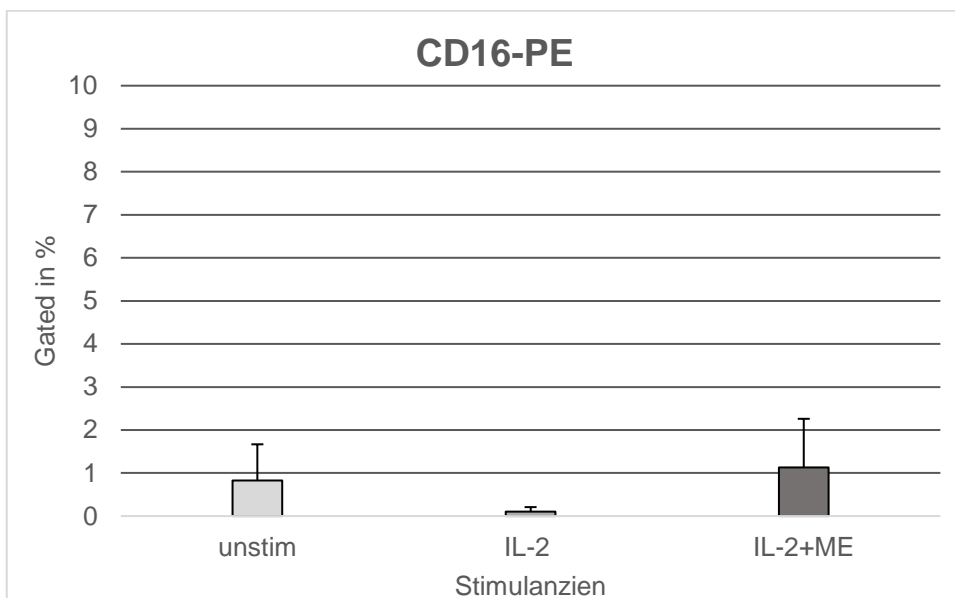
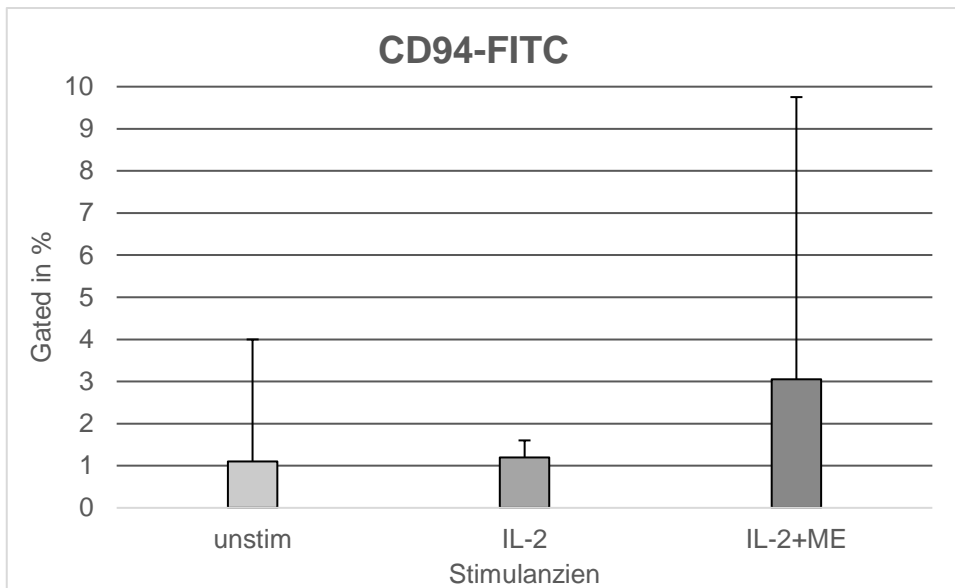


Abbildung 2.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD94-FITC und CD16-PE zwischen den unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

2.3 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Die MOLT-4-Zellen wurden nun, wie auch die KHYG-1-Zellen, mit IL-2+Iscador® M, statt mit PHA stimuliert und in ihrer zytotoxischen Wirkung gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 getestet. Die MOLT-4-Zellen waren dafür unstimuliert und IL-2+ME stimuliert. Dabei wurde die LDH-Aktivität der unterschiedlichen Stimulationszustände der MOLT-4-Zellen erneut per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm zeichnet sich, wie auch für die KHYG-1-Zellen, ein Vorteil für die IL-2+ME stimulierten Zellen gegenüber der unstimulierten Zellen ab (Abbildung 2.5). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse liegen bezüglich der unstimulierten Zellen zwischen 64% und 149% und die der IL-2+ME stimulierten Zellen zwischen 63% und 158%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse präsentiert sich erneut bei beiden MOLT-4-Zellgruppen bei einer E:T Ratio von 80:1 und beträgt für die unstimulierten MOLT-4-Zellen 149% und für die IL-2+ME stimulierten MOLT-4-Zellen 158%. Somit lässt sich auch für die Mittelwerte der spezifischen Lyse ein deutlicher Unterschied zwischen IL-2+ME und PHA stimulierte MOLT-4-Zellen erkennen (max. 158 vs. max. 115%).

Die Standardabweichungen für unstimulierte MOLT-4 befinden sich zwischen 1% und 12% und für IL-2+ME stimulierte Zellen zwischen 2% und 10%, womit sich auch hier die Standardabweichungen für beide unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Zellen in einem einheitlichen Bereich bewegen.

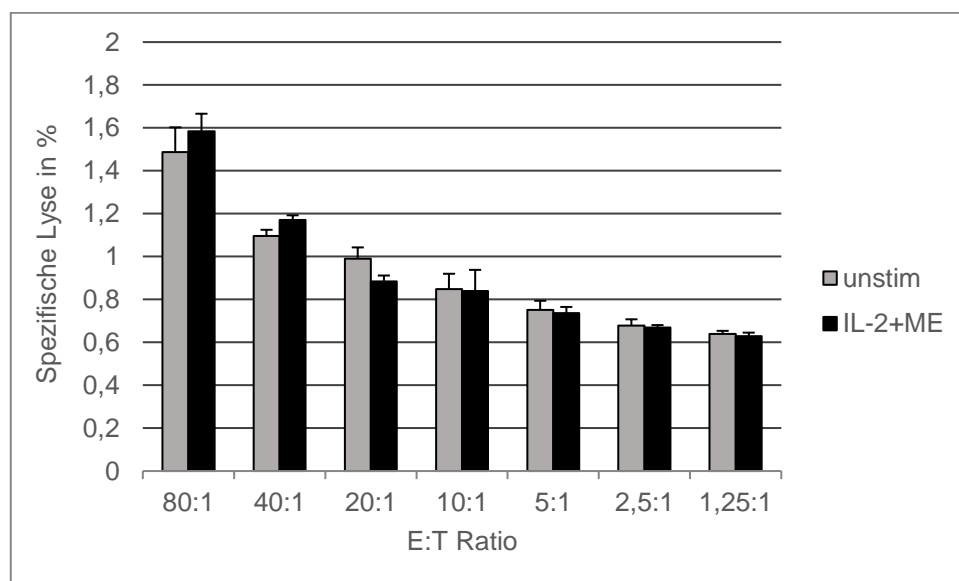


Abbildung 2.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten und IL-2+ME stimulierten MOLT-4-Zellen gegenüber MCF-7 Mammakarzinomzellen, $n = 4$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Für die beiden MOLT-4-Zellgruppen und deren Mittelwerte spezifischer Lyse wurde ebenfalls ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt.

Im Vergleich zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2+ME stimulierter MOLT-4-Zellen ($p= 0,9$, $p >0,05$) liegt keine Signifikanz zwischen den beiden Zellgruppen vor (Abbildung 2.6). Gegenüber dem p-Wert für unstimulierte und PHA stimulierte MOLT-4-Zellen (Abbildung 1.6) zeigt sich somit eine deutlich geringere Signifikanz (0,9 vs. 0,075).

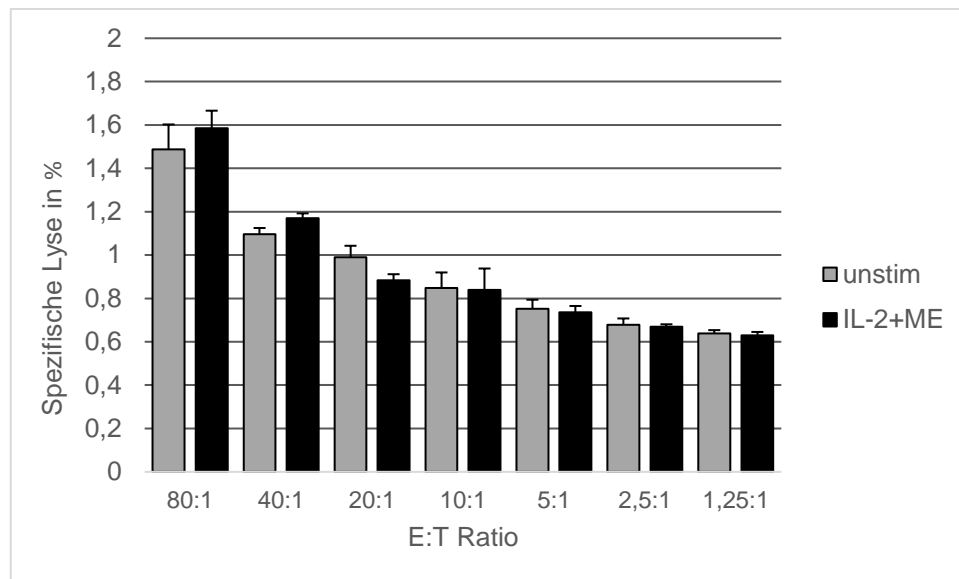
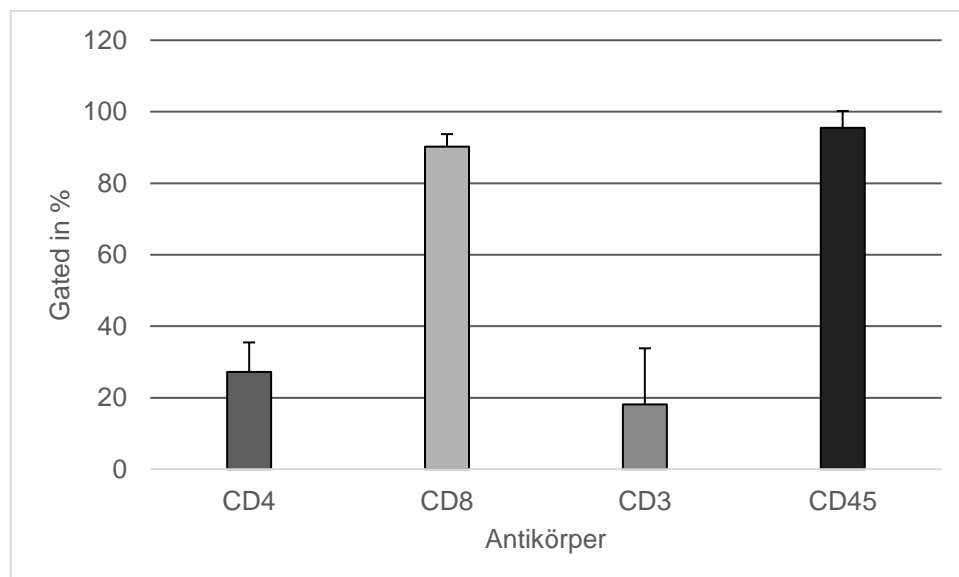


Abbildung 2.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse für unstimulierte und IL-2+ME stimulierte MOLT-4-Zellen gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels Zweistichproben-t-Test, $n= 4$ ($n=$ Anzahl unabhängiger Experimente)

2.4 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Die unterschiedlich stimulierten Zellen der T-lymphoblastischen Leukämie-Zelllinie MOLT-4 wurden dafür erneut mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und deren unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst, um so eine Aussage über ihre Aktivität treffen zu können. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte und IL-2+ME stimulierte MOLT-4-Zellen, in welcher erneut die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP und CD45-APC miteinander verglichen wurden, erweist sich für die unstimulierten MOLT-4-Zellen der Antikörper CD45-APC mit 95,5%, in einer vorher festgelegten Region, als am stärksten und der Antikörper CD3-FITC mit 18%, als am schwächsten von den MOLT-4-Zellen gebunden. Für IL-2+ME stimulierte MOLT-4-Zellen präsentiert sich mit 84% die stärkste Bindung für CD8-PE und mit 31% die schwächste Bindung, wie auch für die beiden MOLT-4-Zellgruppen in Abbildung 1.7, für CD4-FITC.

Die Standardabweichungen bewegen sich dabei für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 5% und 16% und für die IL-2+ME stimulierte Zellgruppe zwischen 8% und 39%. Sie befinden sich somit in unterschiedlichen Bereichen (Abbildung 2.7).



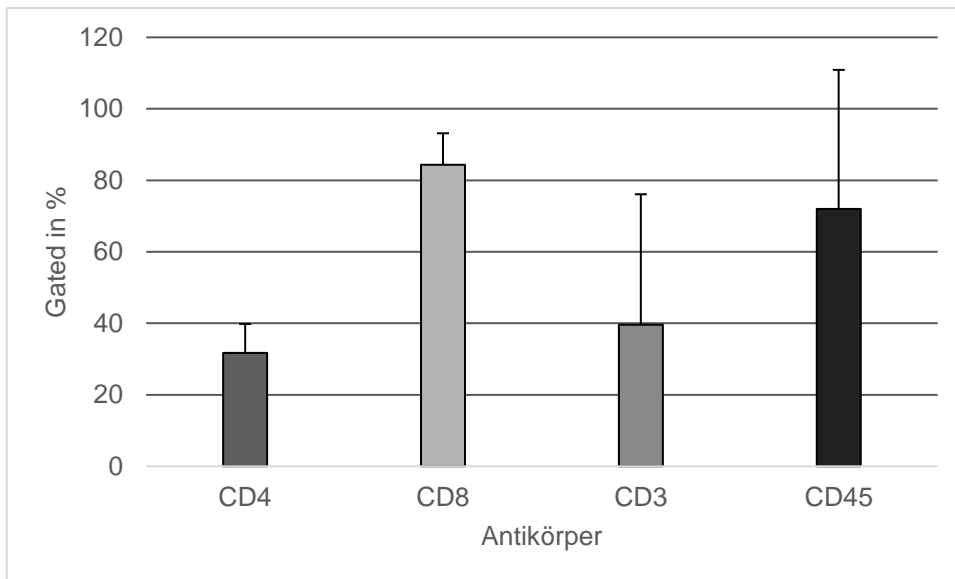


Abbildung 2.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben) und IL-2+ME (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n = 4$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Abbildung 2.8 zeigt jeweils für die beiden MOLT-4-Zellgruppen eine Übersicht über den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität. So lässt sich für unstimulierte und für IL-2+ME stimulierte MOLT-4-Zellen der höchste MFI, wie auch für die beiden MOLT-4-Zellgruppen in Abbildung 1.8, jeweils für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD45-APC, mit einem Wert von 254 für unstimulierte und einem Wert von 236 für IL-2+ME stimulierte MOLT-4-Zellen, feststellen. Mit Werten von jeweils 4 für unstimulierte und IL-2+ME stimulierte MOLT-4-Zellen präsentiert sich der schwächste MFI, wie auch wieder für die beiden MOLT-4-Zellgruppen in Abbildung 1.8, für den Antikörper CD4-FITC. Die Standardabweichungen für die unstimulierten MFI-Werte liegen hier zwischen 1 und 59 und für die IL-2+ME stimulierten MFI-Werte zwischen 1 und 316, womit sich die Standardabweichungen auch hier in unterschiedlichen Bereichen bewegen.

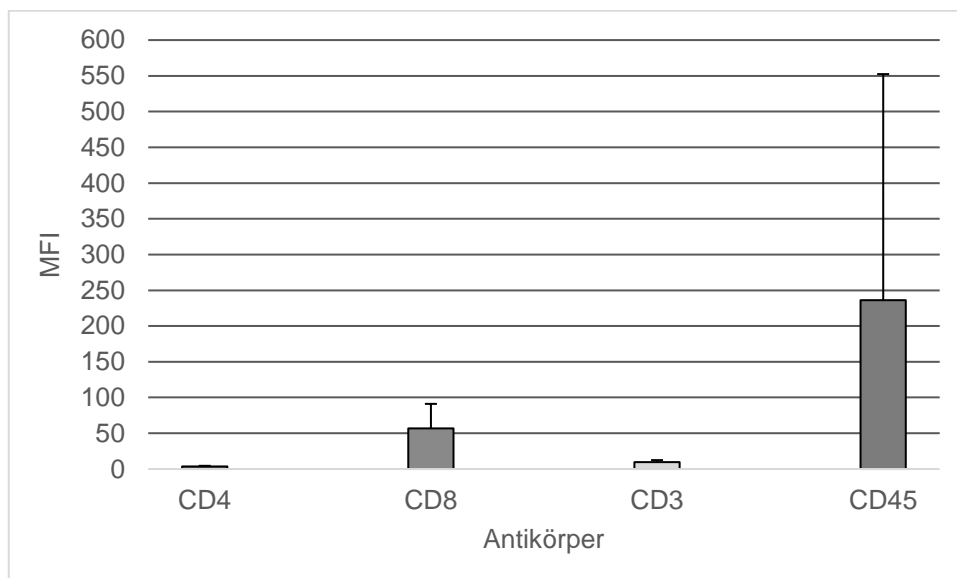
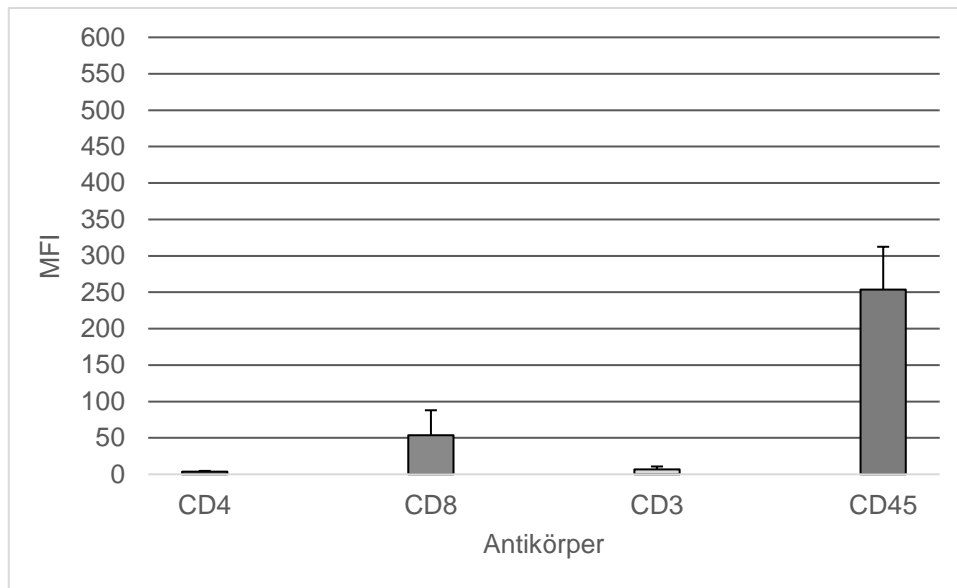


Abbildung 2.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben) und IL-2+ME (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Um eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper treffen zu können, wurden für die MOLT-4-Zellen erneut alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper jeweils für ihre unterschiedlichen Stimulationszustände per Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen (Abbildung 2.9).

Wie auch für die KHYG-1-Zellen in Abbildung 2.4, lässt sich für keinen der hier verwendeten Antikörper eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der unstimulierten und IL-2+ME stimulierten Zellgruppen aufzeigen.

Die p-Werte liegen zwischen 0,2 und 0,45, sind damit $p > 0,05$ und weisen somit keine Signifikanz auf. Die höchste Signifikanz scheint jedoch insgesamt für den Antikörper CD8-PE feststellbar, mit einem p-Wert von 0,2.

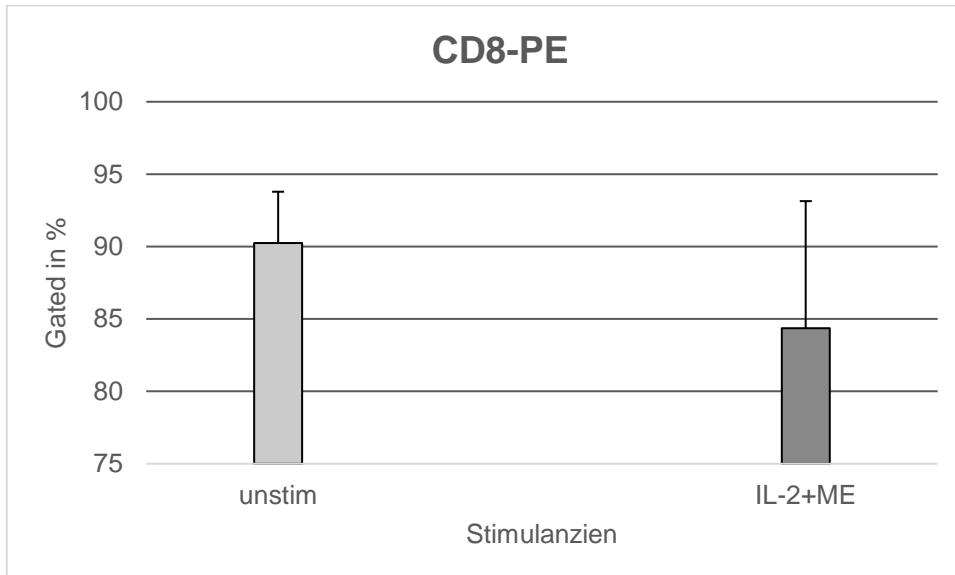


Abbildung 2.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz des Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers CD8-PE zwischen den unstimulierten und IL-2+ME stimulierten MOLT-4-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, $n = 4$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

3. Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und Mistelextrakt stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Brustkrebszelllinie MCF-7

3.1 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Nach effektiver gemeinsamer Stimulation der KHYG-1-Zellen mit IL-2+Iscador® M, wurde die alleinige Wirkung des Mistelextraktes Iscador® M in weiteren Experimenten getestet. Die durchgeführten Experimente waren wieder dieselben. Es wurde erneut die zytotoxische Wirkung der NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 im unstimulierten, IL-2 stimulierten und ME stimulierten Zustand mittels Zytotoxizitätassay gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 getestet. Ebenfalls wurde hierfür die LDH-Aktivität der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der KHYG-1-Zellen per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm lässt sich im Rahmen dieses Experimentes ein Vorteil für die ME stimulierten KHYG-1-Zellen demonstrieren (Abbildung 3.0). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse liegen dabei für ME stimulierte Zellen zwischen 56% und 153%, für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 38% und 150% und die der unstimulierten Zellen zwischen 37% und 164%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse befindet sich für alle drei KHYG-1-Zellgruppen bei einer E:T Ratio von 80:1 und beträgt für unstimulierte KHYG-1-Zellen 164%, für ME stimulierte KHYG-1-Zellen 153% und für IL-2 stimulierte KHYG-1-Zellen 150%. Für die E:T Ratio 80:1 lässt sich ein Vorteil für unstimulierte KHYG-1-Zellen gegenüber IL-2 und ME stimulierter KHYG-1-Zellen feststellen. Ab einer E:T Ratio von 40:1 ist jedoch ein deutlicher Vorteil für ME stimulierte KHYG-1-Zellen erkennbar und ab einer E:T Ratio von 20:1 sind die Werte unstimulierter und IL-2 stimulierter KHYG-1-Zellen nahezu deckungsgleich. Die höchsten Werte der spezifischen Lyse für IL-2+ME stimulierte und nur für ME stimulierte KHYG-1-Zellen sind nahezu identisch. Es lässt sich somit kein Vorteil für eine der beiden Gruppen aufzeigen (max. 150% vs. max. 153%). Die Standardabweichungen für unstimulierte KHYG-1-Zellen liegen dabei zwischen 0,3% und 18%, für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 2% und 11% und für ME stimulierte Zellen zwischen 5% und 27%, womit sich die Standardabweichungen für unstimulierte und IL-2 stimulierte Zellen in einem einheitlichen Bereich bewegen. Die Standardabweichungen für ME stimulierte Zellen befinden sich etwas darüber.

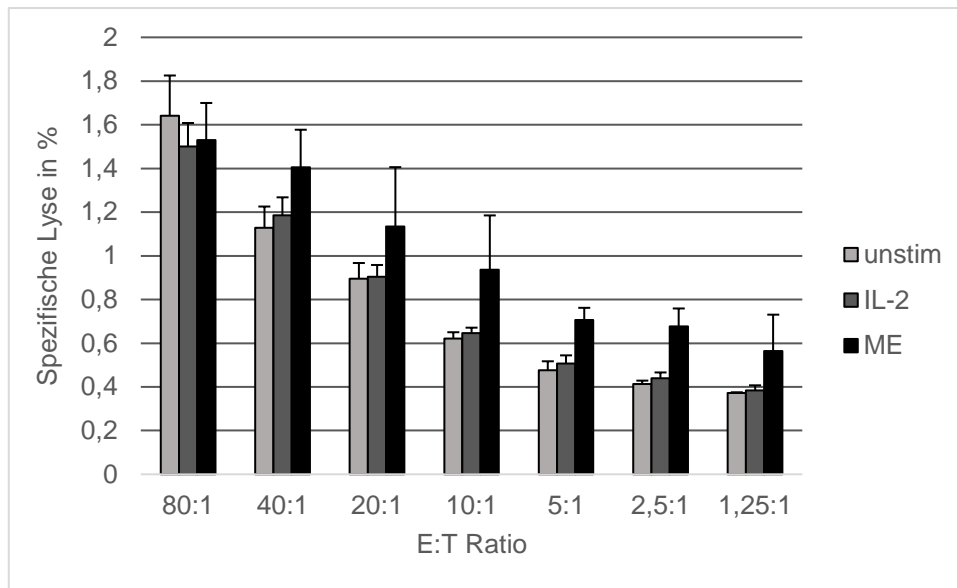


Abbildung 3.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten, IL-2 stimulierten und ME stimulierten KHYG-1-Zellen gegenüber MCF-7 Mammakarzinomzellen, $n=5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Zur Feststellung, ob ein prägnanter Unterschied in der zytotoxischen Wirkung der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der KHYG-1-Zellen besteht, wurden erneut jeweils zwei der drei unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen.

Anhand der bereits genannten allgemeingültigen Einteilung der p-Werte zeigt sich mit einem p-Wert von 0,9 zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter KHYG-1-Zellen ($p > 0,05$) keine Signifikanz. So lässt sich aber eine geringe Signifikanz im Vergleich zwischen den Mittelwerten unstimulierter und ME stimulierter KHYG-1-Zellen nachweisen ($p= 0,01$, $p < 0,05$). Der Vergleich zwischen den Mittelwerten von IL-2 und ME stimulierten KHYG-1-Zellen weist sogar eine deutliche Signifikanz, mit $p= 0,0007$ ($p < 0,001$), auf (Abbildung 3.1).

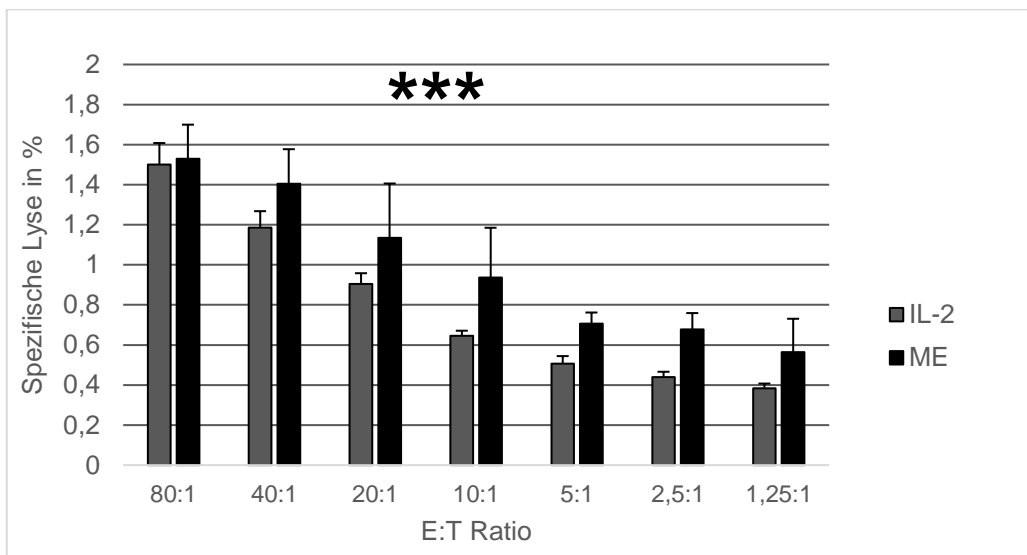
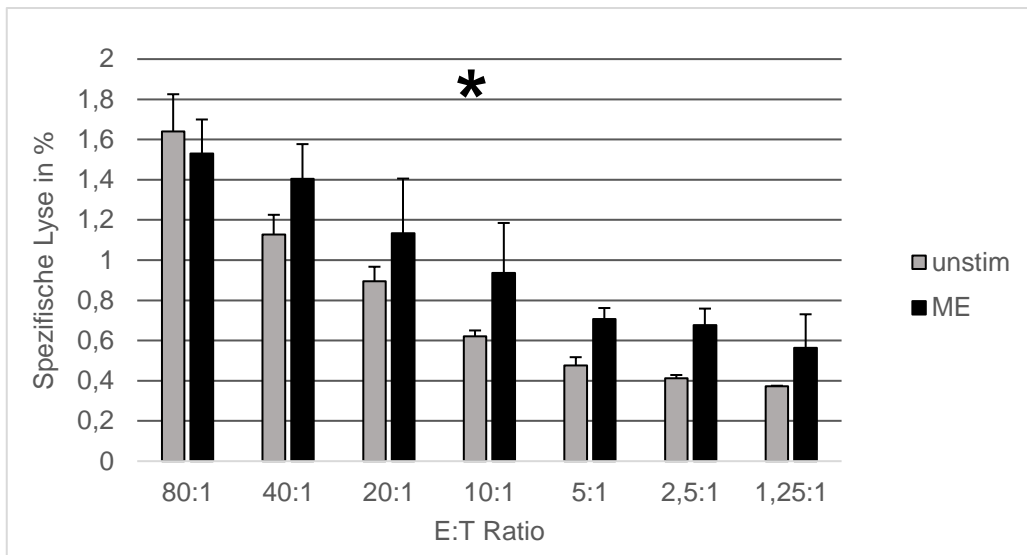
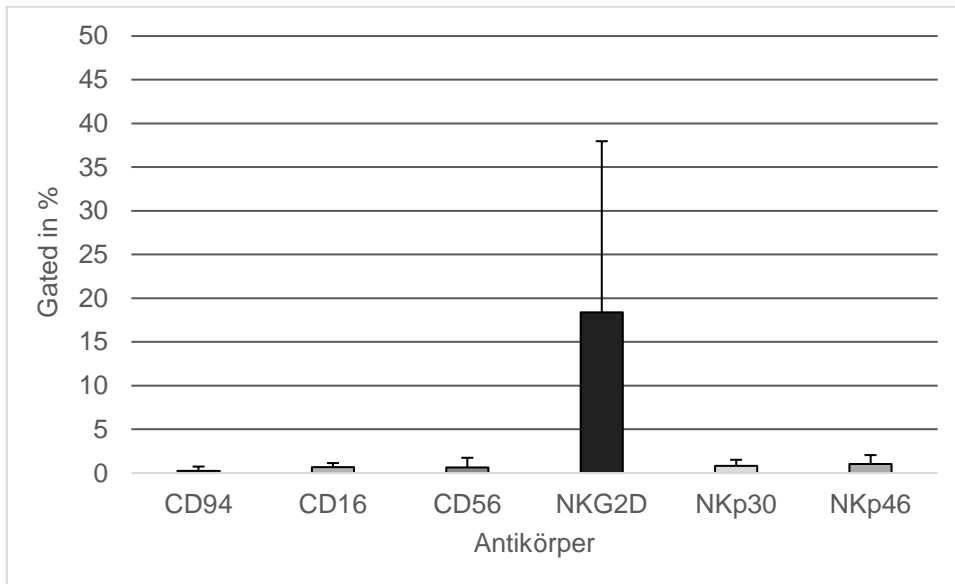
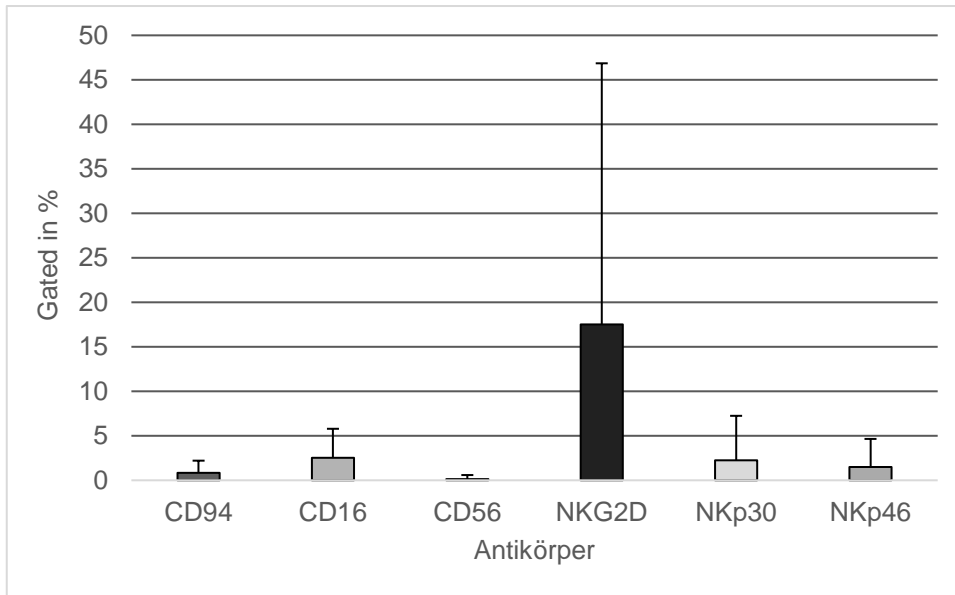


Abbildung 3.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse für unstimulierte, IL-2 stimulierte und ME stimulierte KHYG-1-Zellen gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels Zweistichproben-t-Test, * p = geringe Signifikanz ($p < 0,05$), *** p = deutliche Signifikanz ($p < 0,001$), $n = 5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

3.2 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Um auch hier nachvollziehen zu können wie stark die NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 in ihrer Aktivität unter den unterschiedlichen Stimulationszuständen stimuliert und in ihrer Wirkung verstärkt wurde, wurde auch diese mittels Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper versetzt und deren unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte, IL-2 stimulierte und ME stimulierte KHYG-1-Zellen, in welcher die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD94-FITC, CD16-PE, CD56-APC, NKG2D-PE, NKp30-PE und NKp46-PE miteinander verglichen wurden, lässt sich für alle drei KHYG-1-Zellgruppen, wie auch bei dem vorherigen Experiment mit IL-2+ME (Abbildung 2.2), demonstrieren, dass der Antikörper NKG2D-PE die stärkste Bindung für KHYG-1-Zellen aufweist. Mit 22% wurde NKG2D-PE am stärksten unter ME Stimulation gebunden, gefolgt von 18% unter IL-2 Stimulation und 17,5% unter unstimulierten Bedingungen. Als der schwächste gebundene Antikörper unter unstimulierten Bedingungen lässt sich CD56-APC mit 0,13% feststellen. Unter IL-2 stimulierten und ME stimulierten Bedingungen präsentiert sich der Antikörper CD94-FITC als am schwächsten gebundener Antikörper. Die beiden Antikörper CD56-APC und NKG2D-PE ausgeschlossen, weisen alle weiteren Antikörper ihre höchste Bindung jedoch unter unstimulierten Bedingungen auf.

Die Standardabweichungen bewegen sich hier für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 0,45% und 29%, für die IL-2 stimulierte Zellgruppe zwischen 0,46% und 19% und für die ME stimulierte Zellgruppe zwischen 0,7% und 22% und liegen damit in einem nahezu einheitlichen Bereich (Abbildung 3.2).



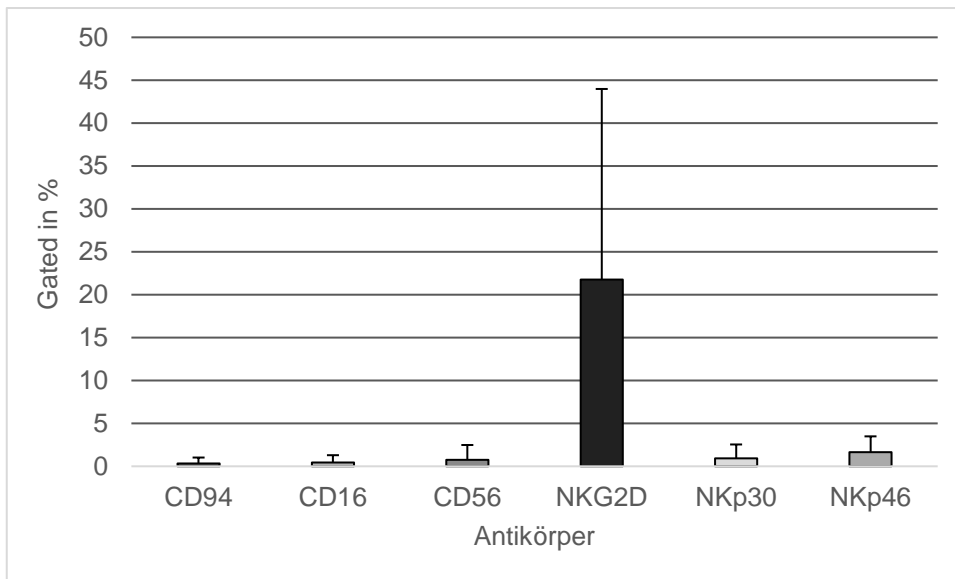
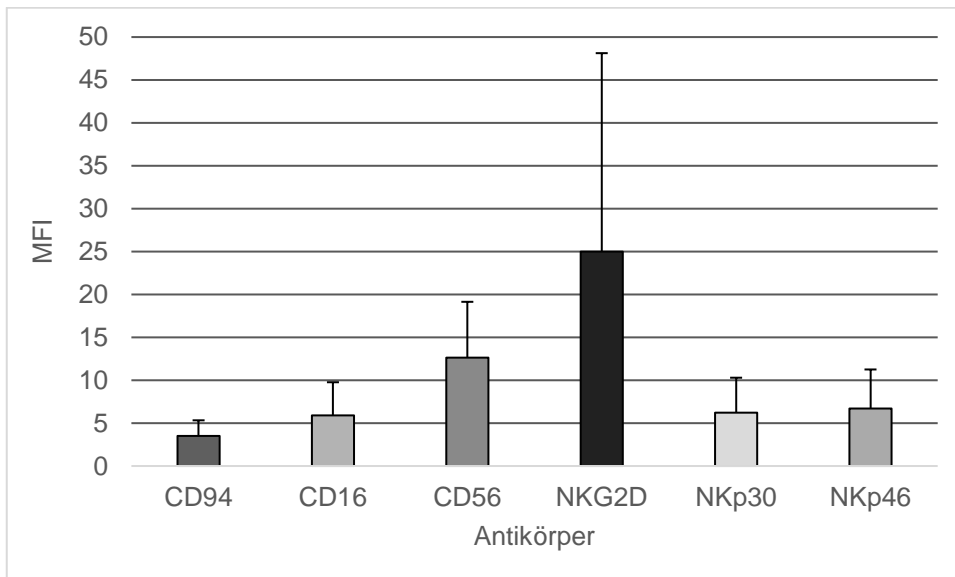
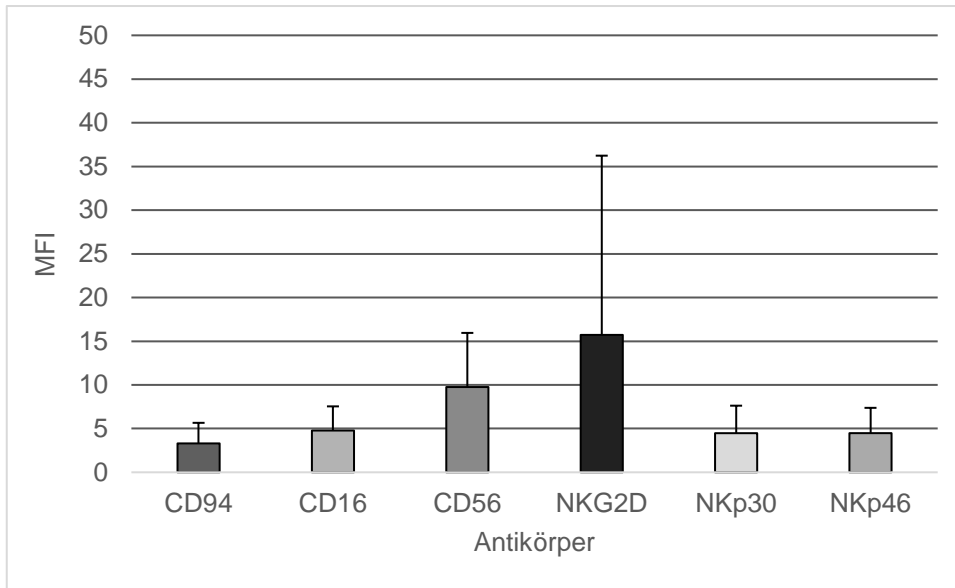


Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und ME (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Abbildung 3.3 stellt ebenfalls für jeweils alle drei KHYG-1 Zellgruppen eine Übersicht über den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität dar. So zeigt sich für unstimulierte, IL-2 stimulierte und auch für ME stimulierte KHYG-1-Zellen der höchste MFI für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper NKG2D-PE, mit einem Wert von 16 unter unstimulierten Bedingungen, mit einem Wert von 25 unter IL-2 Stimulation und einem Wert von 16,5 unter ME Stimulation. Mit Werten von 3 für unstimulierte Bedingungen, einem Wert von 3,5 unter IL-2 Stimulation und einem Wert von 2,6 unter ME Stimulation ergibt sich der schwächste MFI-Wert für den Antikörper CD94-FITC.

Für die unstimulierten MFI-Werte liegen die Standardabweichungen zwischen 2 und 20,5, für die IL-2 stimulierten MFI-Werte zwischen 2 und 23 und für die ME stimulierten MFI-Werte zwischen 1 und 21. Auch hier befinden sich die Standardabweichungen somit in einem einheitlichen Bereich.



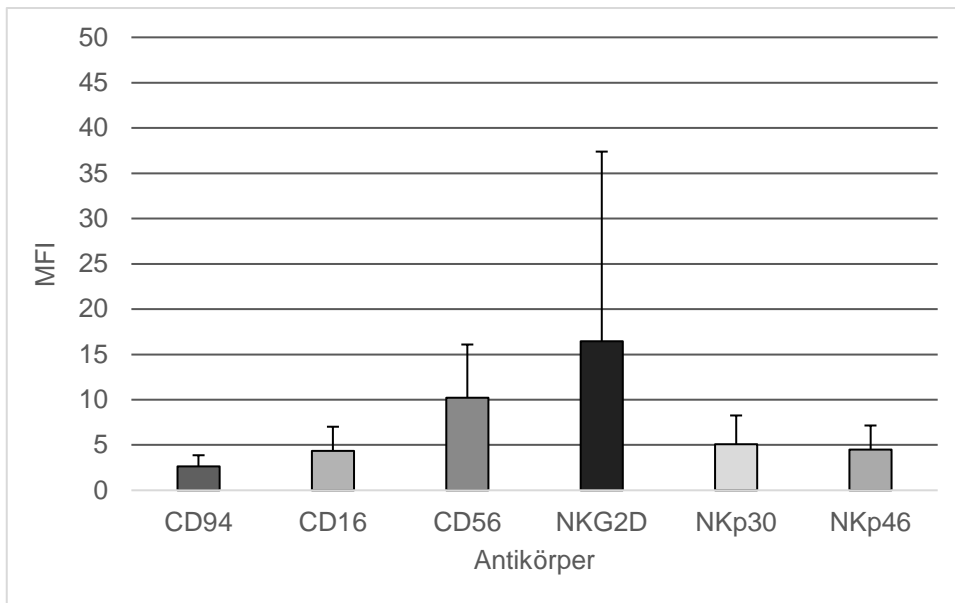


Abbildung 3.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und ME (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Um auch hier eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper treffen zu können, wurden wiederholt alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper jeweils für ihre unterschiedlichen Stimulationszustände per Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen (Abbildung 3.4).

Für den Antikörper CD94-FITC lässt sich mit einem p-Wert von 0,02 eine geringe Signifikanz zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter KHYG-1-Zellen nachweisen ($p < 0,05$). Mit einem p-Wert von 0,05 zeigt sich im Vergleich zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter KHYG-1-Zellen, für den Antikörper CD56-APC, keine eindeutige Signifikanz. Mit p-Werten zwischen 0,1 und 0,94 ist auch eine weitere Signifikanz nicht erkennbar.

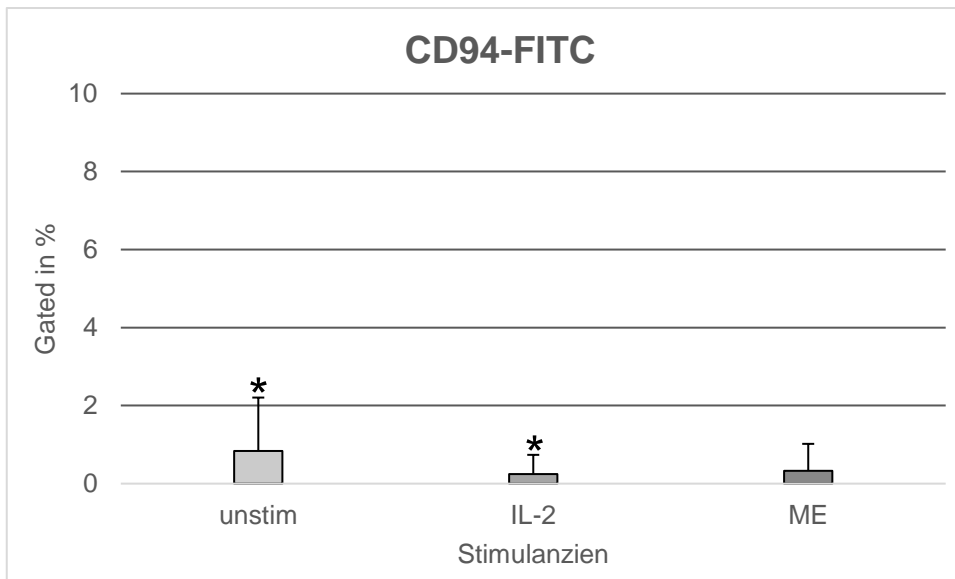


Abbildung 3.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz des Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers CD94-FITC zwischen den unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, * p = geringe Signifikanz ($p < 0,05$), $n = 5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

3.3 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Auch die MOLT-4-Zellen wurden nun, ebenso wie die KHYG-1-Zellen, mit Iscador® M, statt mit IL-2+ME stimuliert und anschließend in ihrer zytotoxischen Wirkung gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 getestet. Die MOLT-4-Zellen waren dafür unstimuliert und ME stimuliert. Die LDH-Aktivität beider Stimulationszustände per Spektrophotometer wurde erneut gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm präsentiert sich, wie auch bei den KHYG-1-Zellen (Abbildung 3.0), ein Vorteil für die ME stimulierten Zellen gegenüber den unstimulierten Zellen. Jedoch ist dieser hier dezent und nur in den höheren E:T Ratios feststellbar (Abbildung 3.5). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse liegen bezüglich der unstimulierten Zellen zwischen 38% und 176% und die der ME stimulierten Zellen zwischen 35% und 179%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse lässt sich bei beiden MOLT-4-Zellgruppen bei einer E:T Ratio von 80:1 feststellen und beträgt für die unstimulierten MOLT-4-Zellen 176% und für ME stimulierte MOLT-4-Zellen 179%. Zwischen den Mittelwerten der spezifischen Lyse für nur ME und IL-2+ME stimulierte MOLT-4-Zellen ist somit ein deutlicher Unterschied erkennbar, mit Vorteil für die ME stimulierten Zellen (max. 179 vs. max. 158%).

Die Standardabweichungen für unstimulierte MOLT-4-Zellen bewegen sich dabei zwischen 0,6% und 15% und für ME stimulierte Zellen zwischen 3% und 17%, womit sich auch hier die Standardabweichungen für beide Stimulationszustände in einem einheitlichen Bereich befinden.

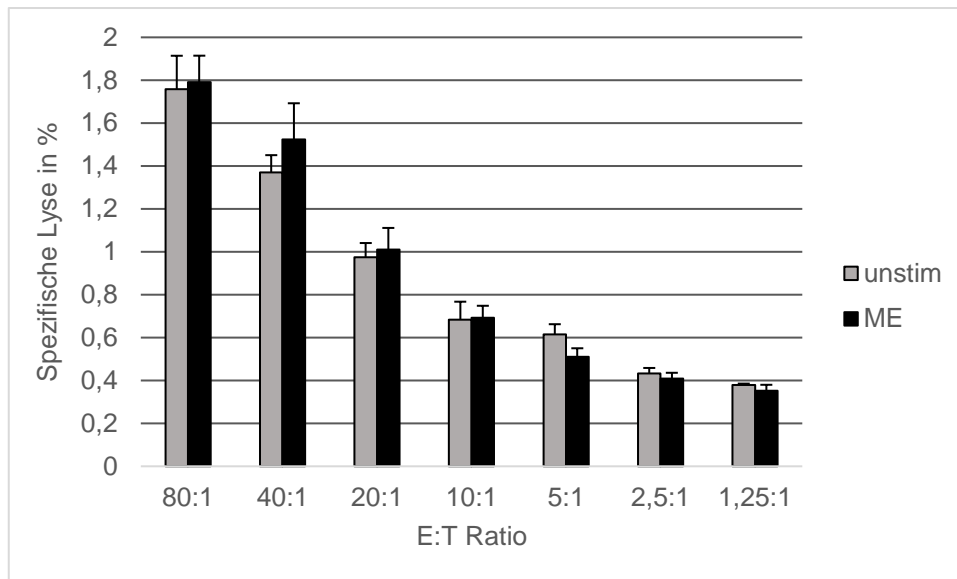


Abbildung 3.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten und ME stimulierten MOLT-4-Zellen gegenüber MCF-7 Mammakarzinomzellen, $n=5$ ($n=$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Für die beiden MOLT-4-Zellgruppen und deren Mittelwerte spezifischer Lyse wurde ebenfalls ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt.

Dabei ergibt sich auch hier keine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der spezifischen Lyse beider Zellgruppen ($p=0,7$, $p>0,05$). Im Vergleich zu dem p -Wert für die Mittelwerte unstimulierter und IL-2+ME stimulierter MOLT-4-Zellen (Abbildung 2.6) zeigt sich hier jedoch eine minimal höhere Signifikanz (0,7 vs. 0,9) (Abbildung 3.6).

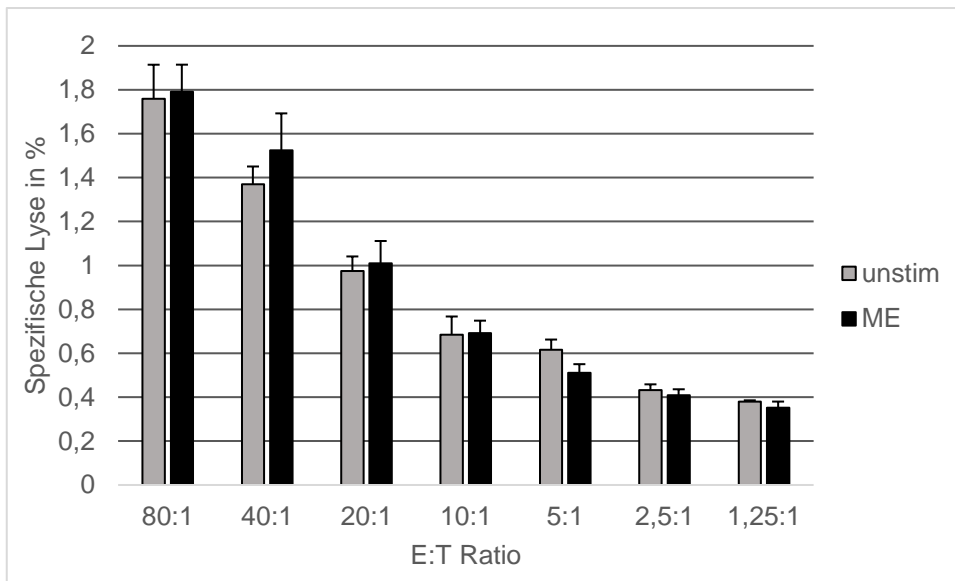
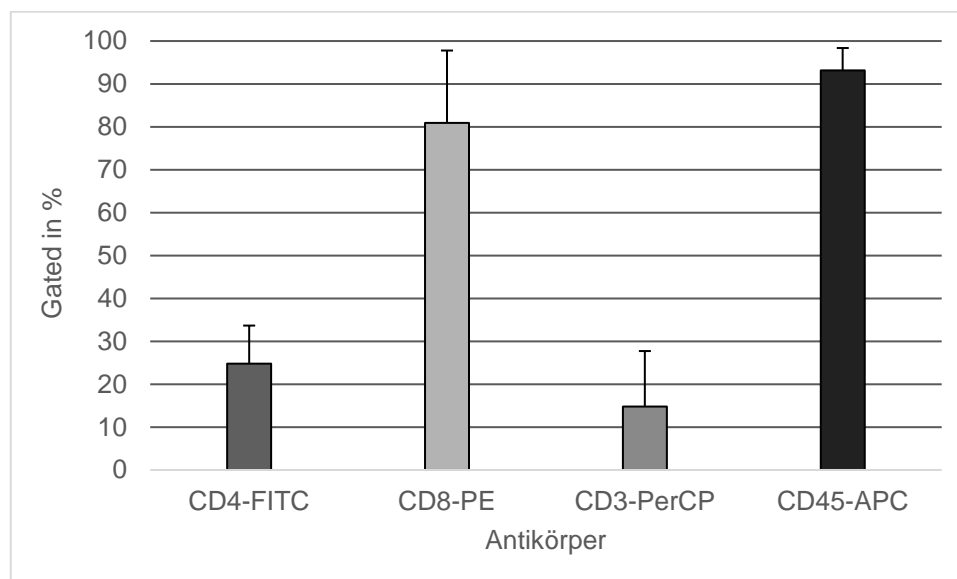


Abbildung 3.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse für unstimulierte und ME stimulierte MOLT-4-Zellen gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels Zweistichproben-t-Test, $n=5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

3.4 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Die unterschiedlich stimulierten Zellen der T-lymphoblastischen Leukämie-Zelllinie MOLT-4 wurden wiederholt mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und deren unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erneut erfasst, um so eine Aussage über ihre Aktivität treffen zu können. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte und ME stimulierte MOLT-4-Zellen, in welchen erneut die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP und CD45-APC miteinander verglichen wurden, ist sowohl für die unstimulierten als auch für die ME stimulierten MOLT-4-Zellen erkennbar, dass der Antikörper CD45-APC mit 93% für unstimulierte und mit 89% für ME stimulierte MOLT-4-Zellen, in einer vorher festgelegten Region, am stärksten und der Antikörper CD3-PerCP mit 15% und 20%, am schwächsten gebunden wurde.

Die Standardabweichungen bewegen sich dabei für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 5% und 17% und für die ME stimulierte Zellgruppe zwischen 10% und 33%. Die Standardabweichungen liegen somit in unterschiedlichen Bereichen (Abbildung 3.7).



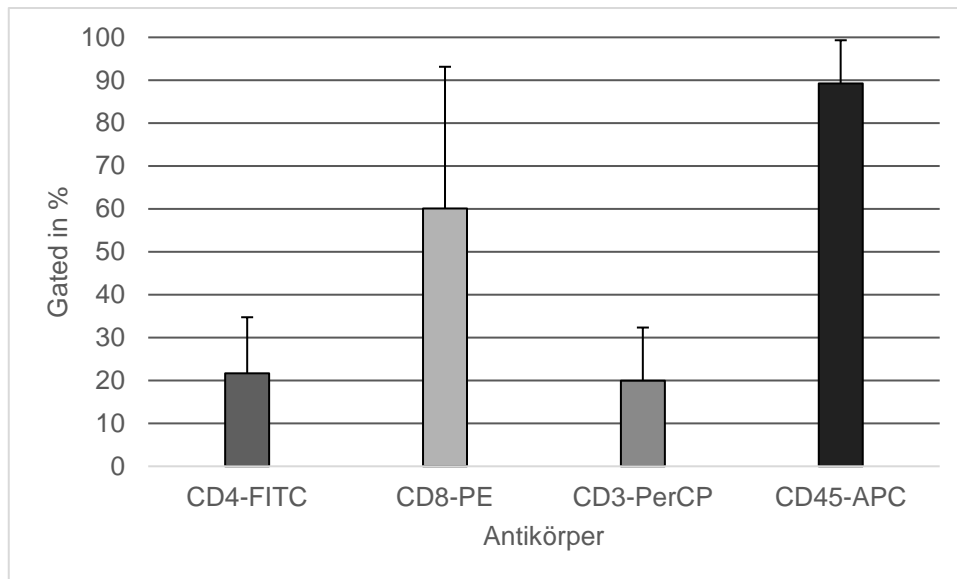


Abbildung 3.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben) und ME (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n=5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Abbildung 3.8 stellt jeweils für die beiden MOLT-4-Zellgruppen eine Übersicht über den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität dar. So ergibt sich für unstimulierte und für ME stimulierte MOLT-4-Zellen der höchste MFI, wie auch für die beiden MOLT-4-Zellgruppen in Abbildung 2.8, jeweils für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD45-APC, mit einem Wert von 576 für unstimulierte und einem Wert von 429 für ME stimulierte MOLT-4-Zellen. Mit Werten von 4 und 5 erweist sich der schwächste MFI für den Antikörper CD4-FITC.

Die Standardabweichungen für die unstimulierten MFI-Werte liegen hier zwischen 1 und 321 und für die ME stimulierten MFI-Werte zwischen 2,5 und 247, womit sich die Standardabweichungen in unterschiedlichen Bereichen bewegen.

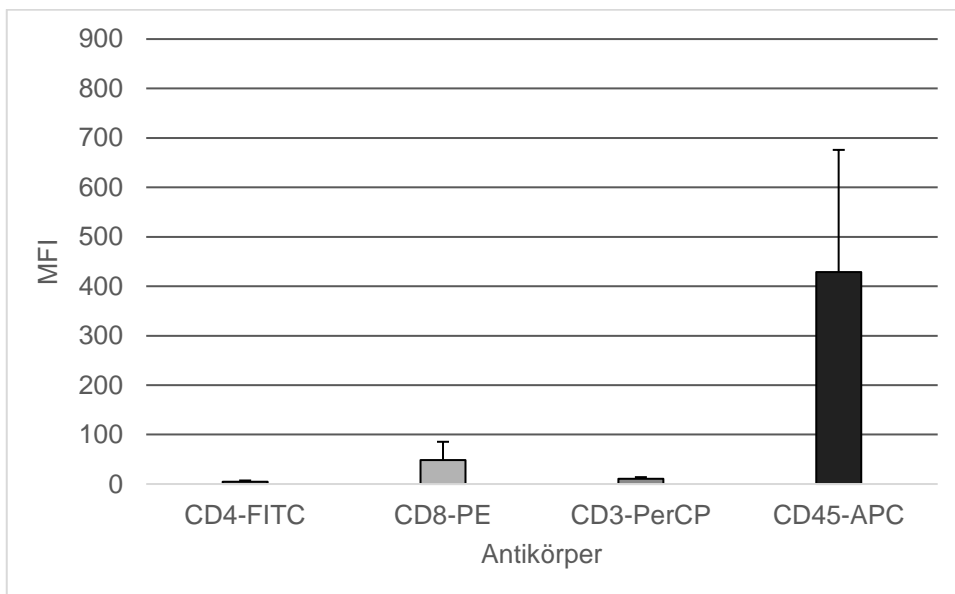
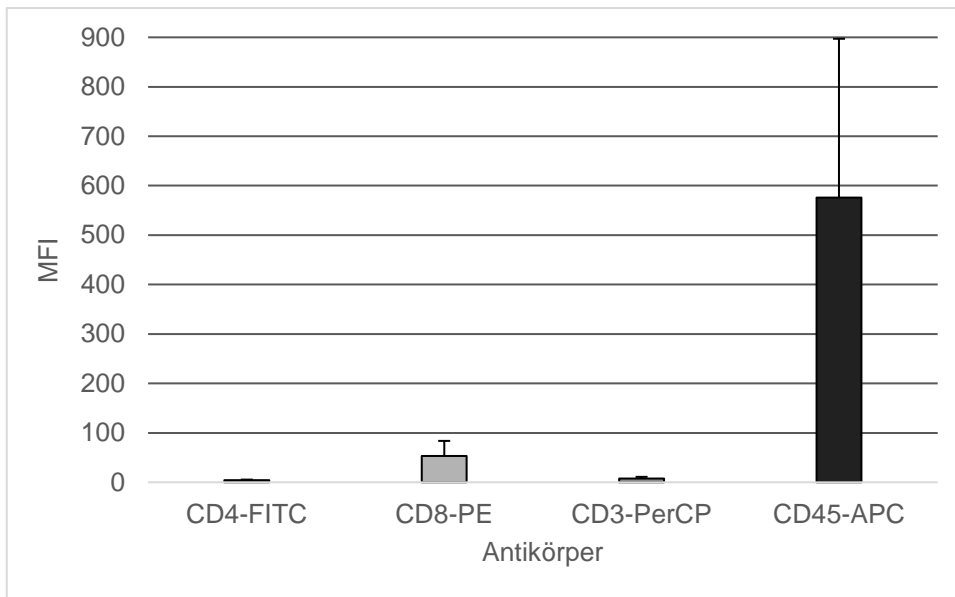


Abbildung 3.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben) und ME (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n=5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Per Zweistichproben-t-Test wurden alle für die MOLT-4-Zellen verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper miteinander verglichen, um ebenfalls eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper, treffen zu können. Dabei ist für keinen der hier verwendeten Antikörper eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der unstimulierten und ME stimulierten Zellgruppen feststellbar. Die p-Werte liegen zwischen 0,06 und 0,7, sind damit $p > 0,05$ und weisen somit keine Signifikanz auf. Die höchste Signifikanz insgesamt präsentiert sich jedoch für den

Antikörper CD8-PE mit einem p-Wert von 0,06. Auch der Antikörper CD3-PerCP zeigt mit einem p-Wert von 0,09 eine vergleichsweise höhere Signifikanz. Die schwächste Signifikanz weist wieder CD4-FITC, mit einem p-Wert von 0,7, auf (Abbildung 3.9).

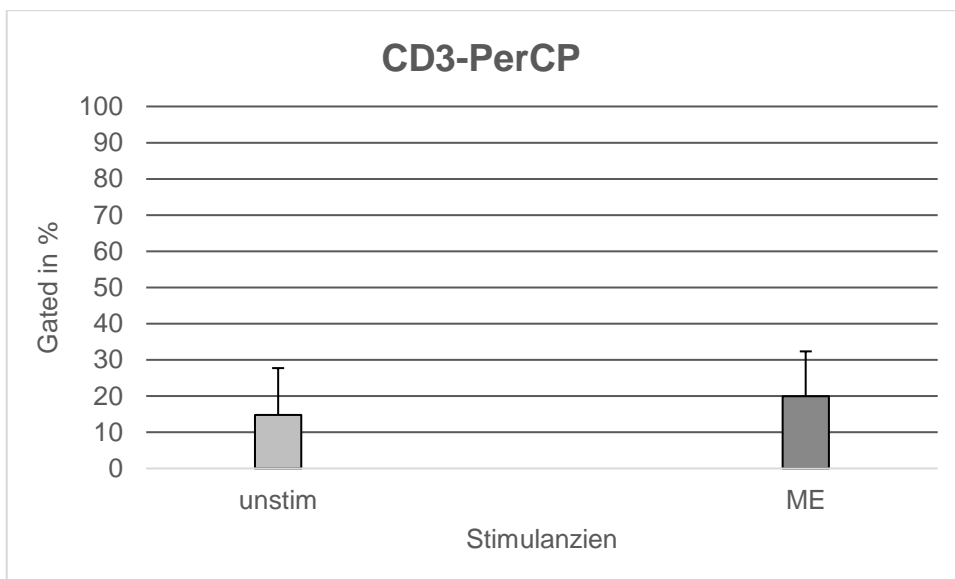
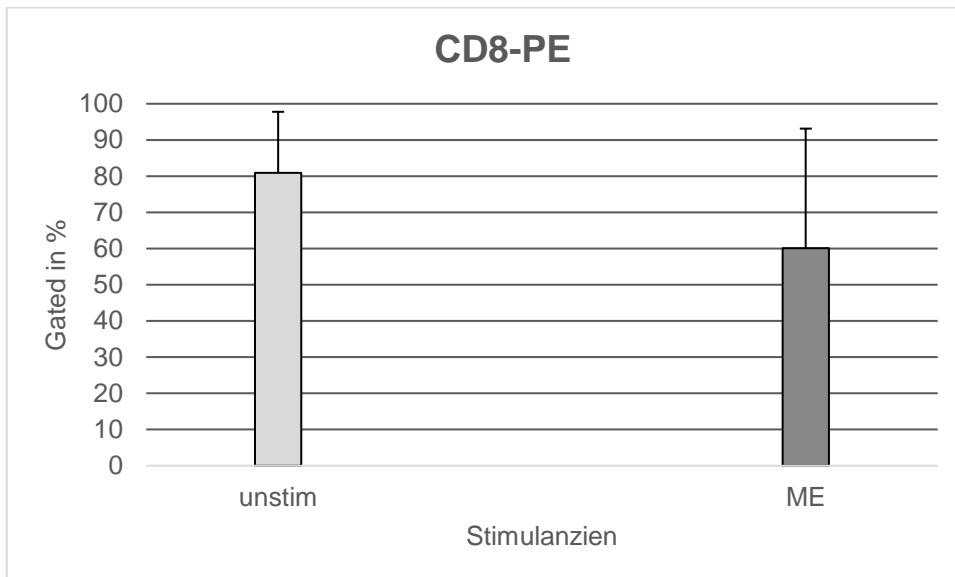


Abbildung 3.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD8-PE und CD3-PerCP zwischen den unstimulierten und ME stimulierten MOLT-4-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, $n=5$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

4. Auswertung der Wirkung unstimulierter, IL-2 stimulierter und Mistelextrakt stimulierter KHYG-1- und MOLT-4-Effektorzellen auf die Pankreaskrebszelllinie Panc-1

4.1 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Nach erfolgter Stimulation der KHYG-1-Zellen mit Mistelextrakt und anschließend durchgeführter Experimente zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, wurde diese nun gegen die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 ausgetauscht. Die bisher verwendeten Effektorzellen wurden beibehalten und die durchgeführten Experimente waren dieselben wie auch unter Verwendung der Brustkrebszellen MCF-7. Das Ziel war es auch hier die zytotoxische Wirkung der NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 im unstimulierten, IL-2 stimulierten und ME stimulierten Zustand mittels Zytotoxizitätassay auf die Pankreaskrebszelllinie Panc-1 zu testen. So wurde ebenfalls die LDH-Aktivität der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der KHYG-1-Zellen per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm präsentiert sich im Rahmen dieses Experimentes, wie auch bei der mistelextraktbedingten Stimulation der KHYG-1-Zellen gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 (Abbildung 3.0), ein Vorteil für die ME stimulierten KHYG-1-Zellen (Abbildung 4.0). Der jedoch vergleichsweise dezenter ausfällt als im gleich aufgebauten Experiment mit MCF-7 Zellen. Die Mittelwerte der spezifischen Lyse befinden sich bezüglich ME stimulierter Zellen zwischen 71% und 173%, für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 69% und 164% und die der unstimulierten Zellen zwischen 65% und 140%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse ist für alle drei KHYG-1-Zellgruppen bei einer E:T Ratio von 80:1 feststellbar und beträgt für unstimulierte KHYG-1-Zellen 140%, für IL-2 stimulierte KHYG-1-Zellen 164% und für ME stimulierte KHYG-1-Zellen 173%. Dabei verlaufen die Werte der spezifischen Lyse für IL-2 und ME stimulierte KHYG-1-Zellen eng beieinander. Vergleichsweise ist für die Mittelwerte der spezifischen Lyse für ME stimulierte KHYG-1-Zellen ein leichter Vorteil für die Panc-1- Krebszelllinie gegenüber der MCF-7-Krebszelllinie erkennbar (max. 173% vs. max. 153%). Eine Signifikanz zwischen den Werten beider ME stimulierter Zellgruppen lässt sich jedoch nicht nachweisen ($p=0,06$). Der höchste Wert für IL-2 stimulierte Zellen ist für beide Experimente 164% und ist somit identisch. Die Standardabweichungen für unstimulierte KHYG-1-Zellen bewegen sich dabei zwischen 2% und 13,5%, für IL-2 stimulierte KHYG-1-Zellen zwischen 0,8% und 7% und für ME stimulierte Zellen zwischen 1% und 11%, womit sich die Standardabweichungen

für unstimulierte und ME stimulierte Zellen in einem einheitlichen Bereich befinden. Die Standardabweichungen für IL-2 stimulierte Zellen liegen etwas darunter.

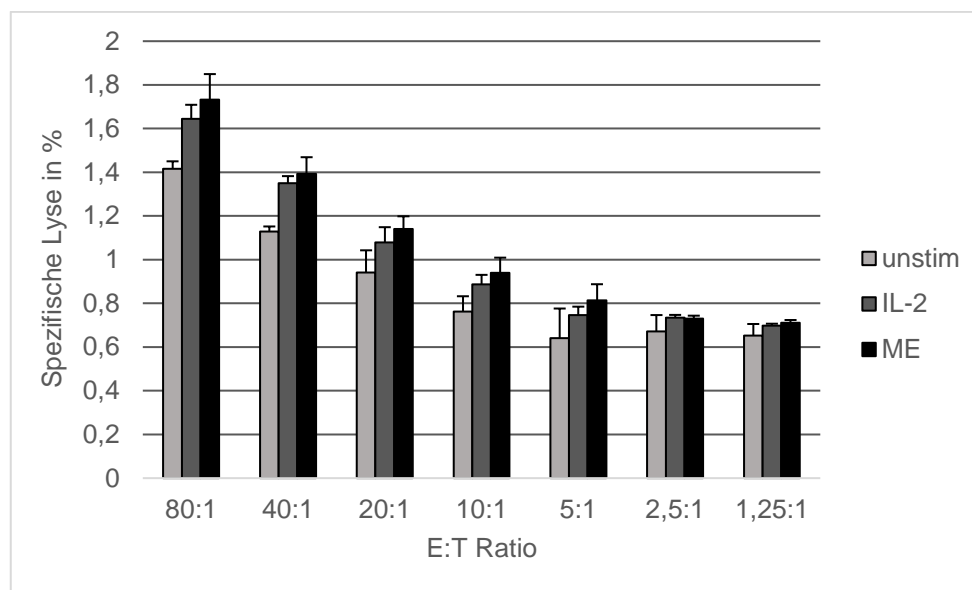
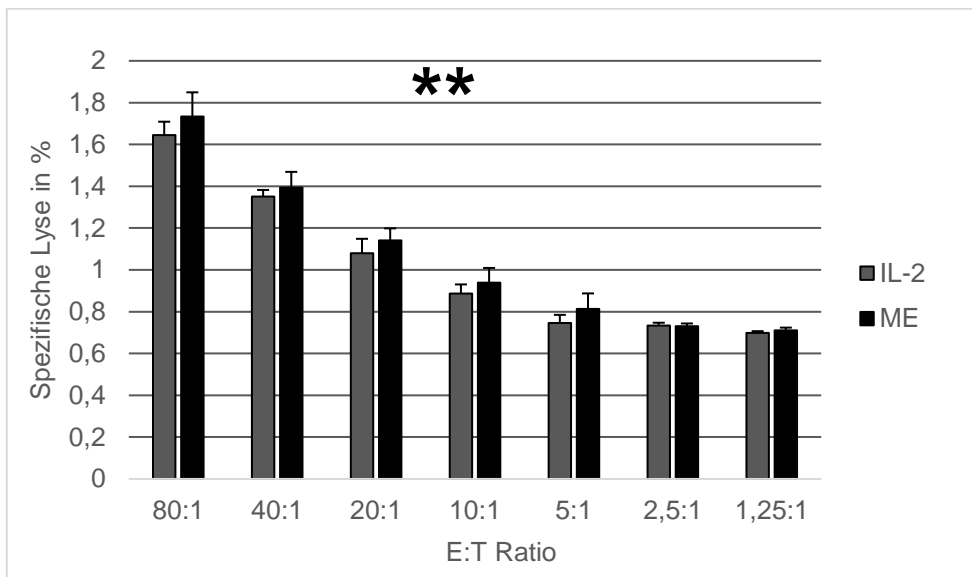
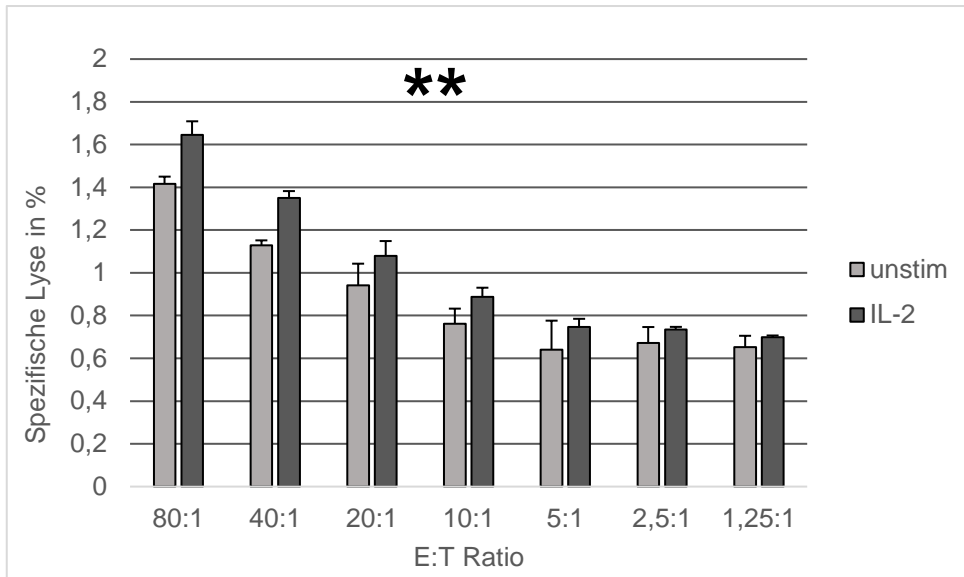


Abbildung 4.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten, IL-2 stimulierten und ME stimulierten KHYG-1-Zellen gegenüber Panc-1 Pankreaskarzinomzellen, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Zur erneuten Feststellung, ob ein prägnanter Unterschied in der zytotoxischen Wirkung der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der KHYG-1-Zellen besteht, wurden jeweils zwei der drei unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen.

Beruhend auf der allgemeingültigen Einteilung der p-Werte lässt sich mit einem p-Wert von 0,003 zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter KHYG-1-Zellen eine moderate Signifikanz ($p < 0,01$) nachweisen. Diese moderate Signifikanz ist ebenso zwischen den Mittelwerten unstimulierter und ME stimulierter KHYG-1-Zellen feststellbar, mit demselben p-Wert von 0,003. Auch der p-Wert von 0,009 zwischen den Mittelwerten IL-2 und ME stimulierter KHYG-1-Zellen weist auf eine moderate Signifikanz hin ($p < 0,01$) (Abbildung 4.1). Dieselben Experimente unter Verwendung der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zeigen ebenfalls eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten unstimulierter und ME stimulierter KHYG-1-Zellen (0,003 vs. 0,01) sowie zwischen den Mittelwerten IL-2 und ME stimulierter KHYG-1-Zellen (0,009 vs. 0,0007) (Abbildung 3.1). Eine eindeutige Signifikanz ist zwischen den beiden Krebszelllinien jedoch nicht ersichtlich.



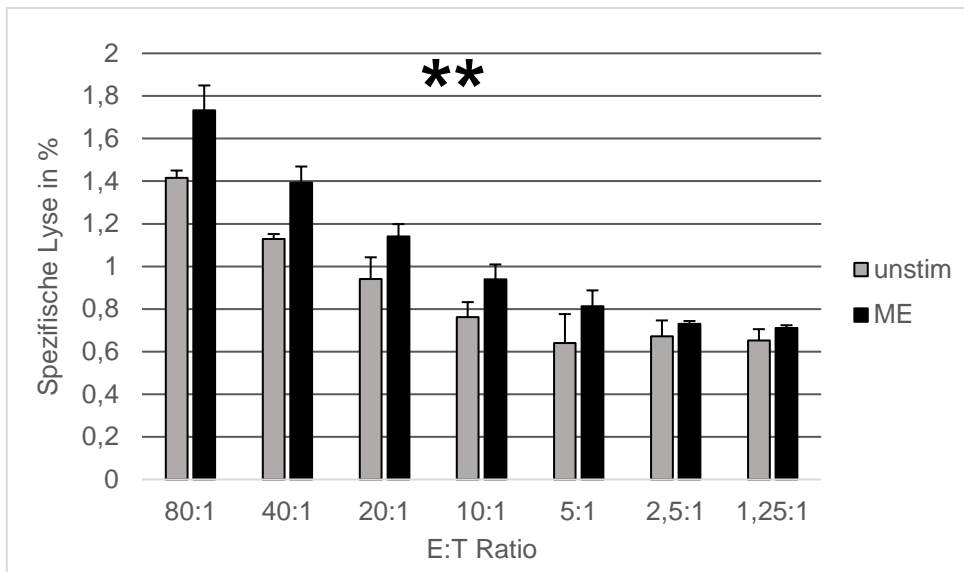
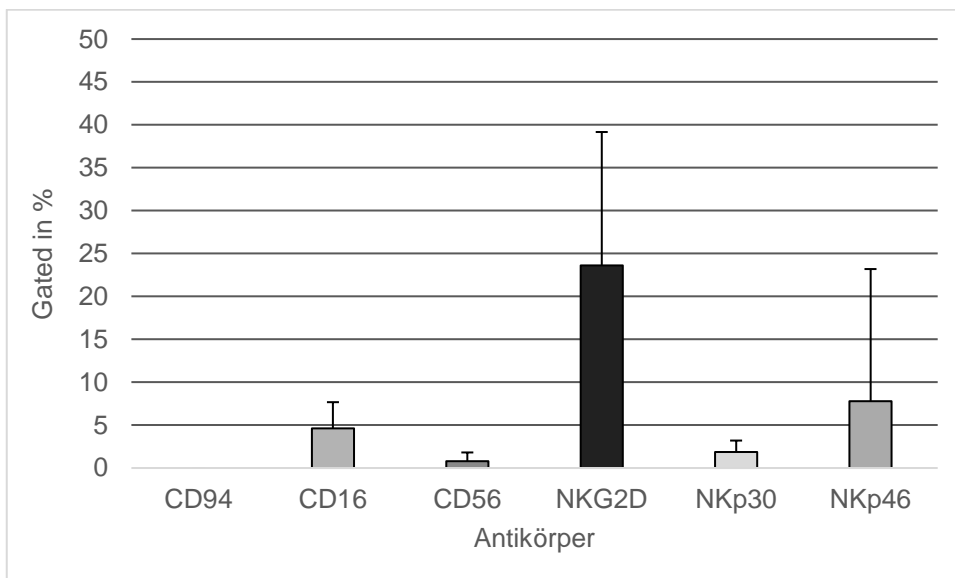
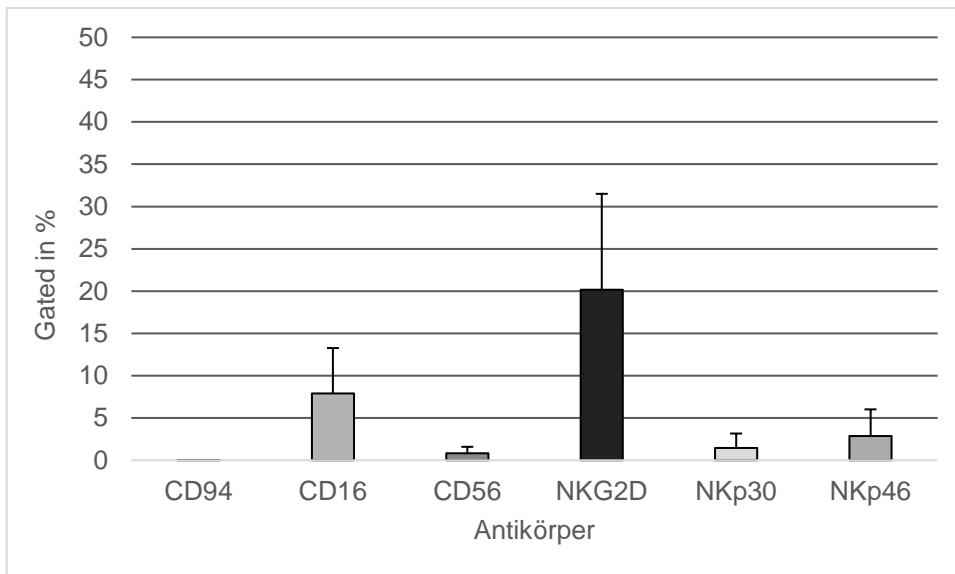


Abbildung 4.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse für unstimulierte, IL-2 stimulierte und ME stimulierte KHYG-1-Zellen gegen die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 mittels Zweistichproben-t-Test, ** p = moderate Signifikanz ($p < 0,01$), $n = 4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

4.2 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Effektorzellen

Um ebenfalls nachvollziehen zu können wie stark die NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1 in ihrer Aktivität unter den unterschiedlichen Stimulationszuständen stimuliert und in ihrer Wirkung verstärkt wurde, wurde diese ebenfalls mittels Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper versetzt und deren unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte, IL-2 stimulierte und ME stimulierte KHYG-1-Zellen, in welcher die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD94-FITC, CD16-PE, CD56-APC, NKG2D-PE, NKp30-PE und NKp46-PE miteinander verglichen wurden, lässt sich für alle drei KHYG-1-Zellgruppen, wie auch bei dem gleich aufgebauten MCF-7-Experiment (Abbildung 3.2), demonstrieren, dass der Antikörper NKG2D-PE am stärksten von den KHYG-1-Zellen gebunden wurde. Mit 34% wurde NKG2D-PE am stärksten unter unstimulierten Bedingungen gebunden, gefolgt von 24% unter IL-2 Stimulation und 20% unter ME Stimulation. Der schwächste gebundene Antikörper ist für alle drei KHYG-1-Zellgruppen CD94-FITC, mit 0,01% für stimulierte KHYG-1-Zellen, mit 0% für IL-2 stimulierte und mit 0,009% für ME stimulierte Zellen. Auch innerhalb des Experimentes mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ist CD94-FITC für IL-2 stimulierte und ME stimulierte KHYG-1-Zellen als schwächster gebundener Antikörper ersichtlich (Abbildung 3.2). Die insgesamt höchste Antikörperbindung präsentiert sich jedoch insgesamt für die unstimulierten KHYG-1-Zellen.

Die Standardabweichungen bewegen sich dabei für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 0,05% und 17%, für die IL-2 stimulierte Zellgruppe zwischen 0% und 15,5% und für die ME stimulierte Zellgruppe zwischen 0,02% und 11%. Sie befinden sich somit in einem einheitlichen Bereich (Abbildung 4.2).



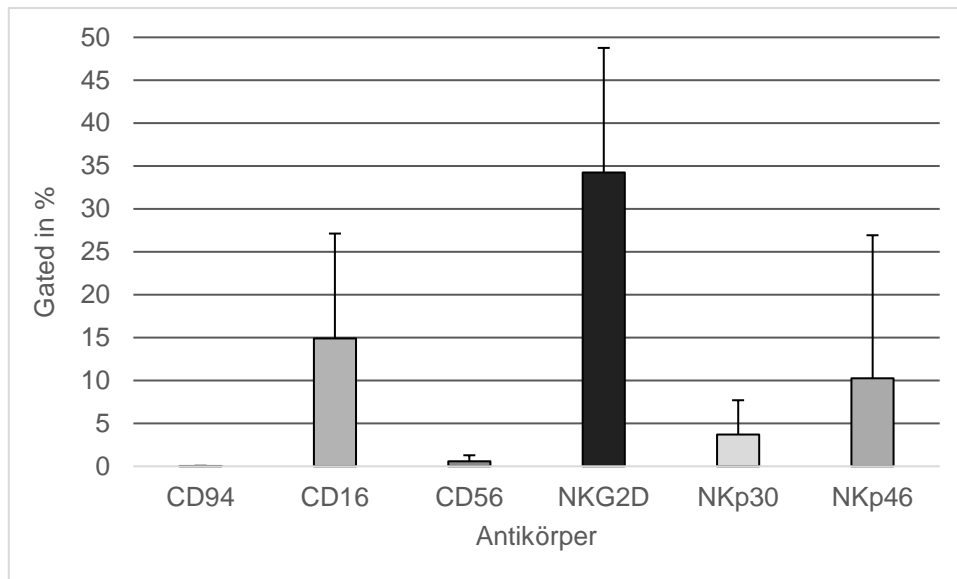
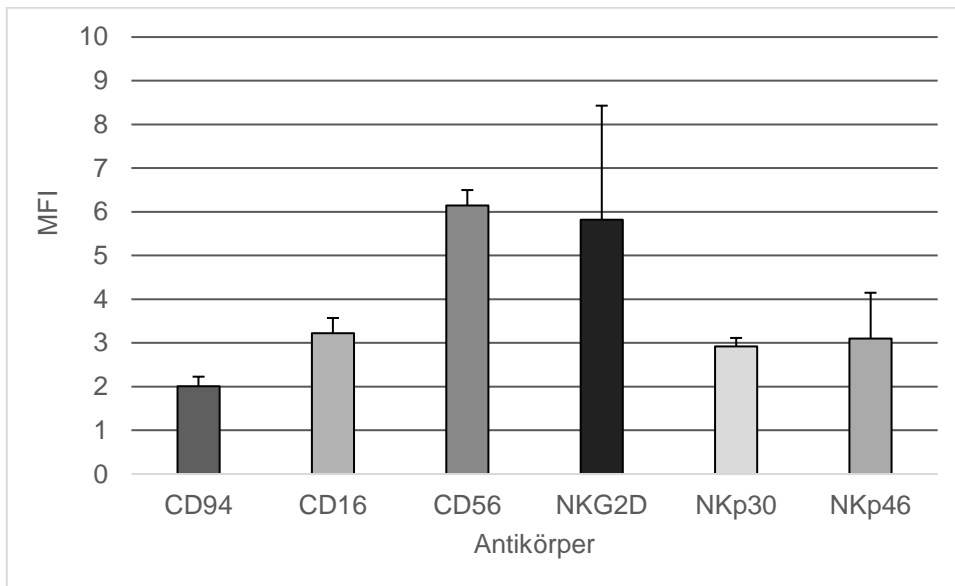
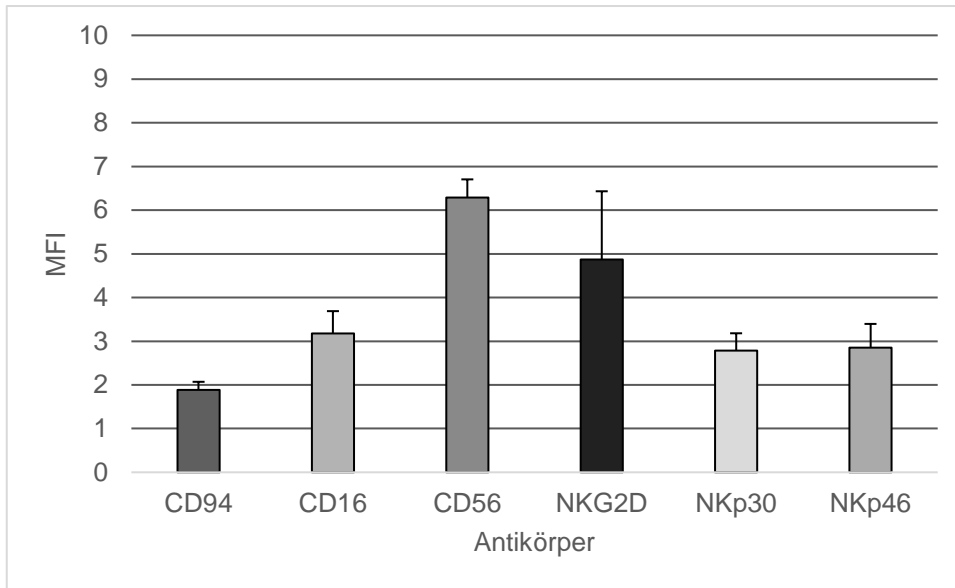


Abbildung 4.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und ME (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Die Übersicht in Abbildung 4.3 verdeutlicht für alle drei KHYG-1-Zellgruppen den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität. So ergibt sich für unstimulierte KHYG-1-Zellen der höchste MFI für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper NKG2D-PE, mit einem Wert von 7. Unter IL-2 Stimulation und ME Stimulation weist der Antikörper CD56-APC den höchsten MFI auf, mit Werten von jeweils 6. Der schwächste Antikörper für alle drei KHYG-1-Zellgruppen, mit einem Wert von jeweils 2, zeichnet sich für den Antikörper CD94-FITC ab.

Für die unstimulierten MFI-Werte liegen die Standardabweichungen zwischen 0,2 und 2, für die IL-2 stimulierten MFI-Werte zwischen 0,2 und 3 und für die ME stimulierten MFI-Werte zwischen 0,2 und 1,5. Auch hier befinden sich die Standardabweichungen in einem einheitlichen Bereich.



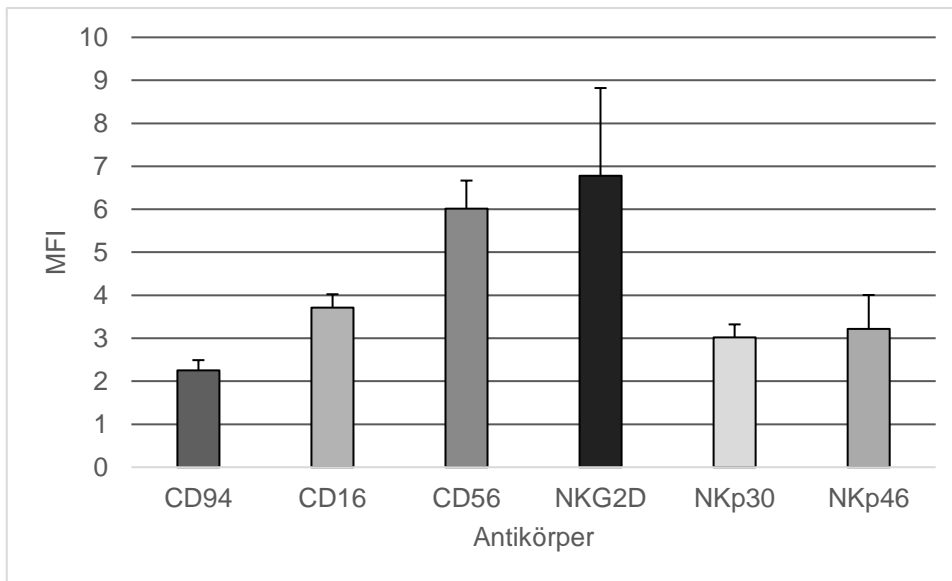


Abbildung 4.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und ME (unten) stimulierte KHYG-1-Zellen, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Um wiederholt eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper, treffen zu können, wurden auch hier wieder alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper jeweils für ihre unterschiedlichen Stimulationszustände per Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen (Abbildung 4.4).

Mit p-Werten zwischen 0,12 und 0,93 lässt sich für keinen der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper zwischen den Mittelwerten der unterschiedlichen KHYG-1-Zellgruppen eine Signifikanz nachweisen. Bis auf zwei abweichende Signifikanzen innerhalb des gleich aufgebauten MCF-7 Experimentes zeigt sich zwischen den beiden Experimenten eine nahezu gleiche Signifikanzverteilung der Antikörper für die verschiedenen Stimulationszustände (Abbildung 3.4). Dabei präsentiert sich, mit p-Werten zwischen 0,12 und 0,36, die höchste Signifikanz für den Antikörper CD16-PE.

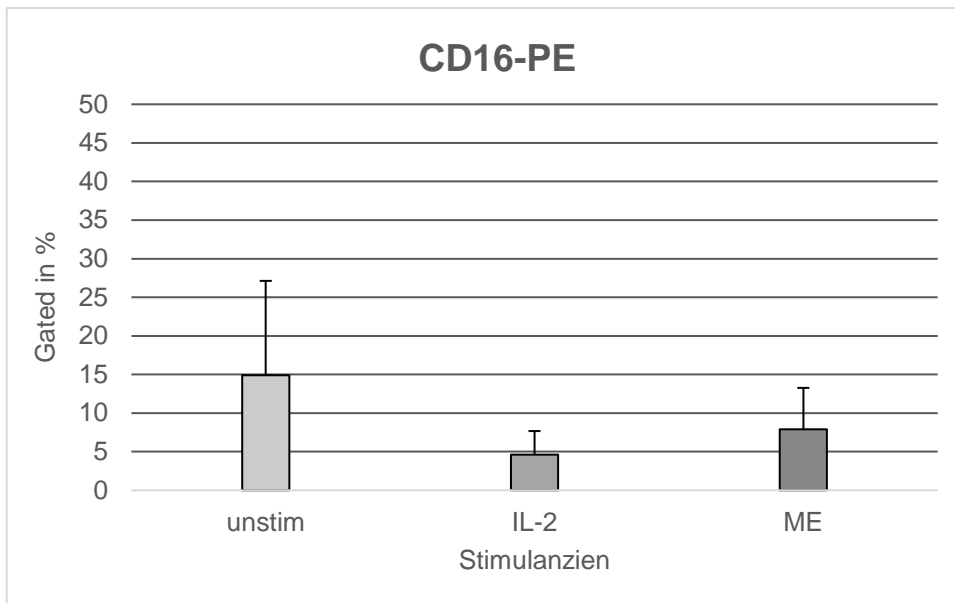


Abbildung 4.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz des Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers CD16-FITC zwischen den unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

4.3 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Für die MOLT-4-Zellen wurde nun, ebenso wie für die KHYG-1-Zellen, die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 gegen die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 ausgetauscht und unter denselben Bedingungen wie bisher getestet. Die MOLT-4-Zellen waren dafür unstimuliert und ME stimuliert. Die LDH-Aktivität für die beiden unterschiedlichen Stimulationszustände der MOLT-4-Zellen wurde wieder per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm präsentiert sich, wie auch bei den KHYG-1-Zellen (Abbildung 4.0), ein Vorteil für die ME stimulierten Zellen gegenüber der unstimulierten Zellen (Abbildung 4.5). Die Mittelwerte der spezifischen Lyse liegen bezüglich der unstimulierten Zellen zwischen 74% und 146% und die der ME stimulierten Zellen zwischen 65% und 166%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse ist bei beiden Zellgruppen bei einer E:T-Ratio von 80:1 feststellbar und beträgt für die unstimulierten Zellen 146% und für die ME stimulierten Zellen 166%. Ein Unterschied im Vergleich zu den mit MCF-7-Zellen durchgeführten Experimenten lässt sich auch hier aufzeigen, sodass sich ein Vorteil für die spezifische Lyse innerhalb des MCF-7-Experimentes abzeichnet (166% vs. 179%). Eine Signifikanz zwischen den beiden ME stimulierten Zellgruppen ist dennoch nicht nachweisbar ($p=0,13$).

Die Standardabweichungen für unstimulierte MOLT-4-Zellen liegen zwischen 2% und 13% und für ME stimulierte Zellen zwischen 1,5% und 14%, womit sich auch hier die Standardabweichungen für beide unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Zellen in einem einheitlichen Bereich befinden.

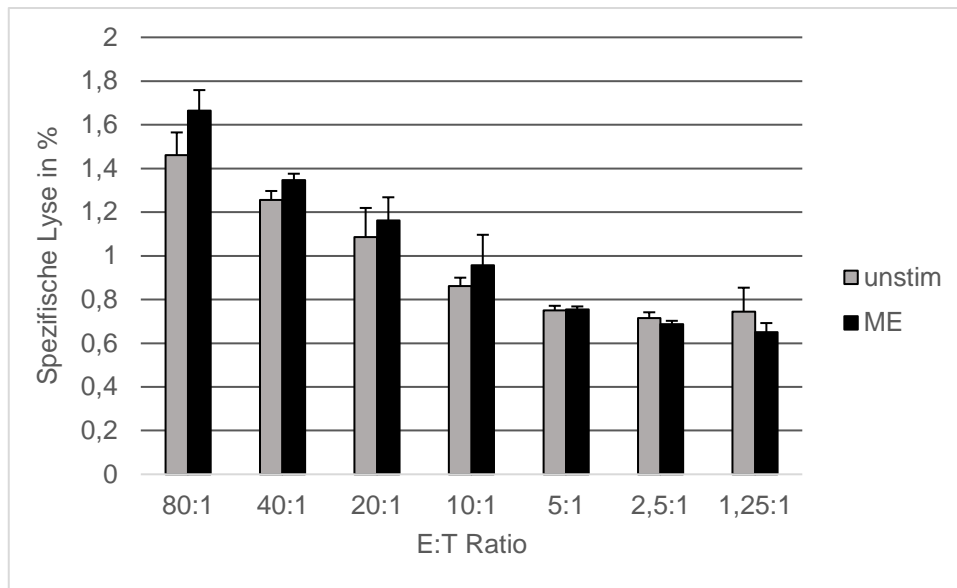


Abbildung 4.5: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten und ME stimulierten MOLT-4-Zellen gegenüber Panc-1-Pankreaskarzinomzellen, $n=4$ ($n=$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Für die beiden MOLT-4-Zellgruppen und deren Mittelwerte spezifischer Lyse wurde ebenfalls ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt.

Im Vergleich zwischen unstimulierten und ME stimulierten MOLT-4-Zellen ist eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der spezifischen Lyse beider Zellgruppen nicht erkennbar ($p=0,23$, $p > 0,05$) (Abbildung 4.6). Im Vergleich zu dem p-Wert für die Mittelwerte zwischen unstimulierter und ME stimulierter MOLT-4-Zellen im Rahmen des MCF-7 Experimentes, ist hier jedoch eine deutlich höhere Signifikanz ersichtlich ($0,23$ vs. $0,74$) (Abbildung 3.6). Eine Signifikanz zwischen den beiden Krebszelllinien ist jedoch auch hier nicht feststellbar.

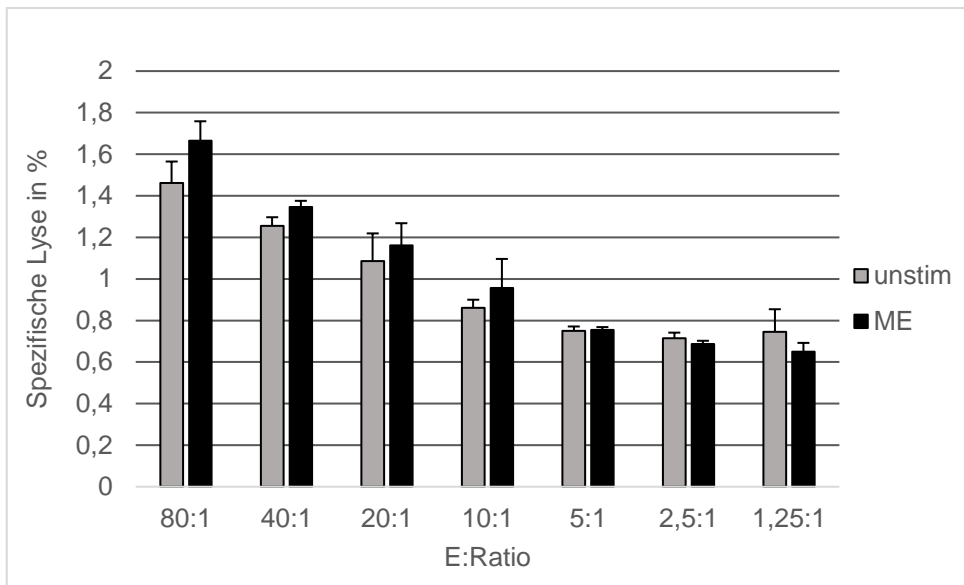
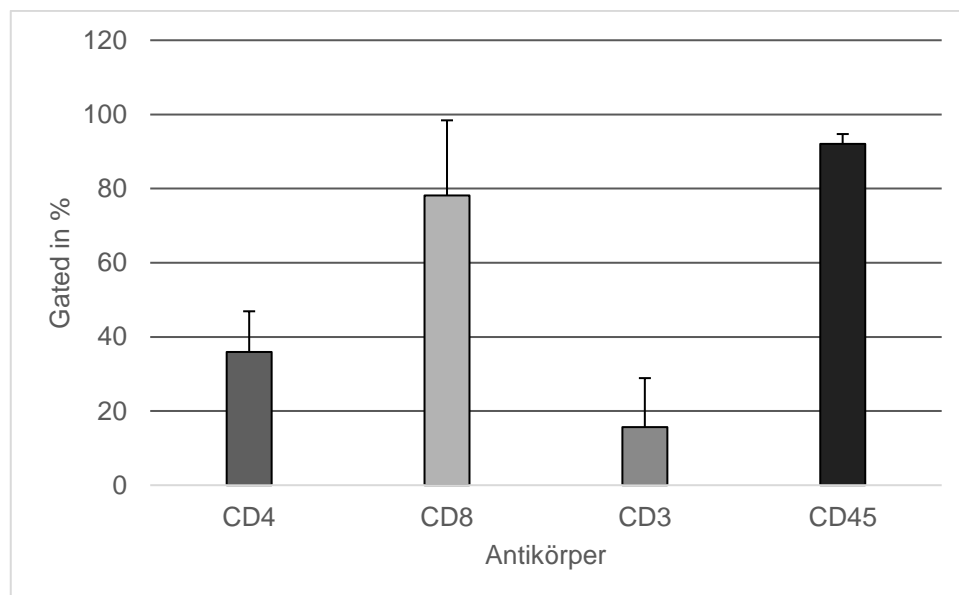


Abbildung 4.6: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse für unstimulierte und ME stimulierte MOLT-4-Zellen mittels Zweistichproben-t-Test, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

4.4 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten MOLT-4-Effektorzellen

Die unterschiedlich stimulierten Zellen der T-lymphoblastischen Leukämie-Zelllinie MOLT-4 wurden erneut mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und deren unterschiedlichen Emmissions- und Absorptionspektren wiederholt mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst, um so eine Aussage über ihre Aktivität treffen zu können. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte und ME stimulierte MOLT-4-Zellen, in welcher erneut die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP und CD45-APC miteinander verglichen wurden, präsentiert sich für die unstimulierten MOLT-4-Zellen der Antikörper CD45-APC, mit 92%, als am stärksten von den MOLT-4-Zellen gebunden. Mit 87% liegt für die ME stimulierten MOLT-4-Zellen die stärkste Bedingung für den Antikörper CD8-PE vor. Die niedrigste Bindung weisen beide MOLT-4-Zellgruppen für den CD3-PerCP-Antikörper, mit Werten von 16% und 9%, auf.

Die Standardabweichungen bewegen sich dabei für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 3% und 20% und für die ME stimulierte Zellgruppe zwischen 5% und 12%. Die Standardabweichungen befinden sich somit in nahezu ähnlichen Bereichen (Abbildung 4.7).



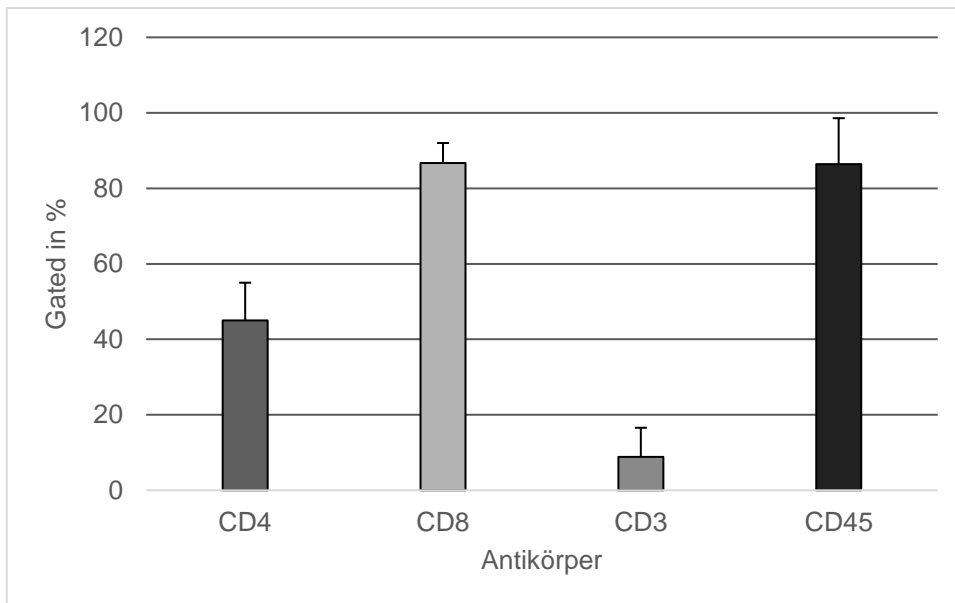


Abbildung 4.7: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben) und ME (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n = 4$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Abbildung 4.8 stellt wieder jeweils für die beiden MOLT-4-Zellgruppen eine Übersicht über den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität dar. So lässt sich für unstimulierte und ME stimulierte MOLT-4-Zellen der höchste MFI, wie auch für die beiden MOLT-4-Zellgruppen in Abbildung 3.8, erneut jeweils für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD45-APC nachweisen, mit einem Wert von 227 für unstimulierte und einem Wert von 353 für ME stimulierte MOLT-4-Zellen. Mit Werten von jeweils 4 zeigt sich der schwächste MFI auch hier erneut für den Antikörper CD4-FITC. Auch im äquivalent dazu abgelaufenen Experiment mit MCF-7-Tumorzellen erweist sich CD4-FITC als der Antikörper mit dem schwächsten MFI (Abbildung 3.8).

Die Standardabweichungen für die unstimulierten MFI-Werte liegen hier zwischen 1 und 256 und für die ME stimulierten MFI-Werte zwischen 1 und 236, womit sich die Standardabweichungen auch hier in ähnlichen Bereichen bewegen.

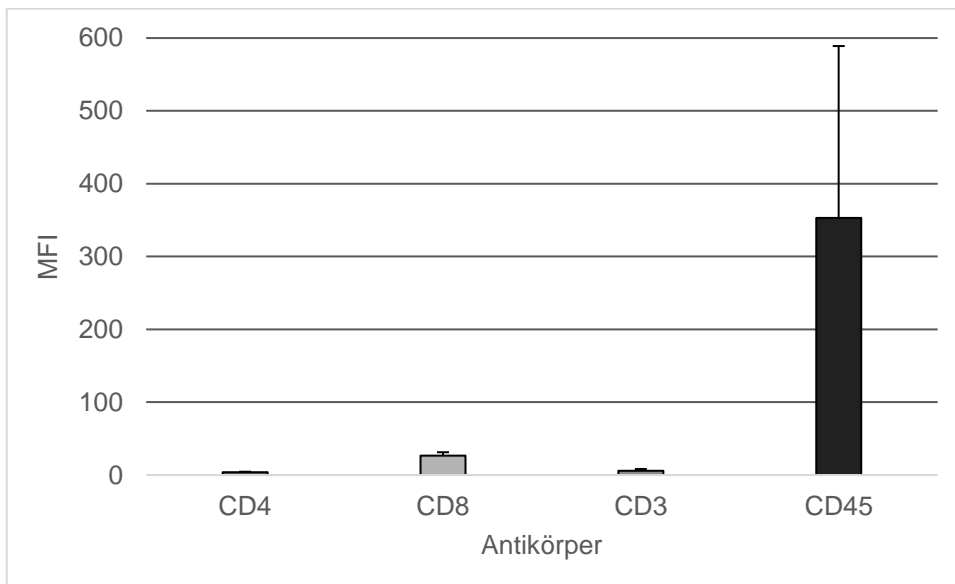
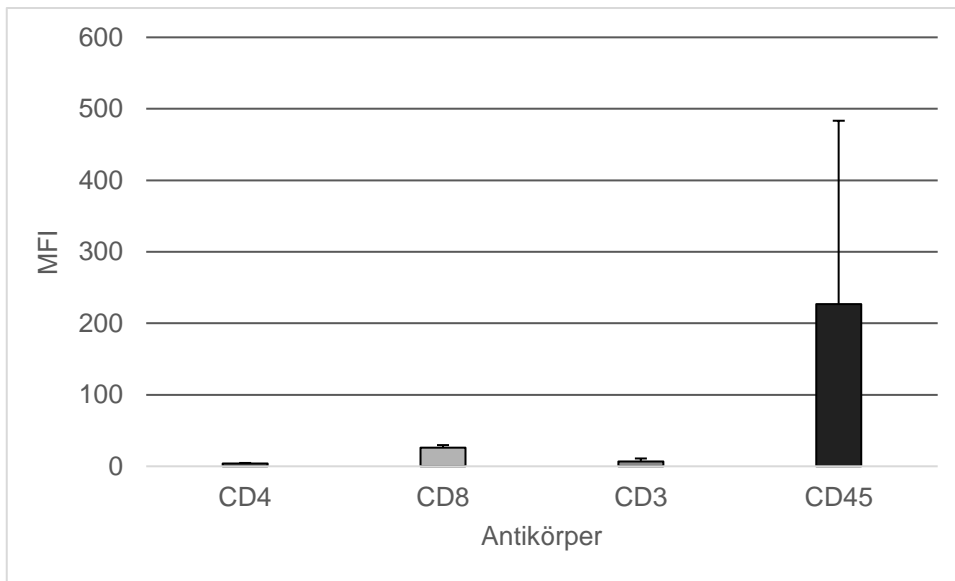


Abbildung 4.8: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben) und ME (unten) stimulierte MOLT-4-Zellen, $n = 4$ ($n =$ Anzahl unabhängiger Experimente)

Per Zweistichproben-t-Test wurden alle für die MOLT-4-Zellen verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper wiederholt miteinander verglichen, um ebenfalls eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper, treffen zu können (Abbildung 4.9).

Es lässt sich auch hier für keinen der verwendeten Antikörper, mit p-Werten zwischen 0,14 und 0,5, eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten der unstimulierten und ME stimulierten Zellgruppen feststellen. Die höchste Signifikanz findet sich jedoch insgesamt für den Antikörper CD3-PerCP, mit einem p-Wert von 0,14. Die schwächste Signifikanz

zeigt sich für CD8-PE, mit einem p-Wert von 0,5. Im äquivalenten Experiment mit den Mammakarzinomzellen MCF-7 lässt sich im Vergleich dazu die höchste Signifikanz für den Antikörper CD8-PE feststellen, mit einem p-Wert von 0,06. Eine gute Signifikanz ist dort auch bereits für CD3-PerCP erkennbar ($p=0,089$) (Abbildung 3.9).

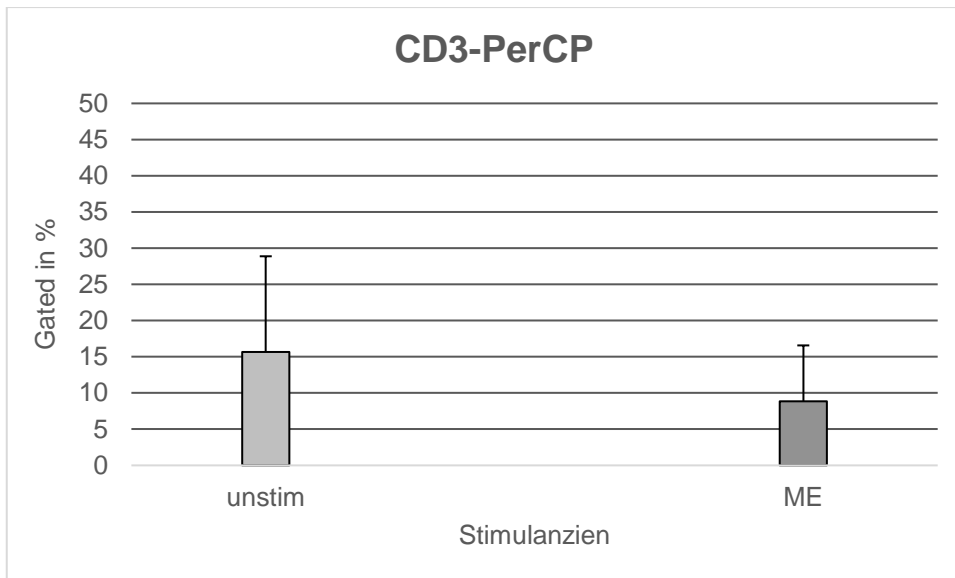


Abbildung 4.9: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz des Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers CD3-PerCP zwischen den unstimulierten und ME stimulierten MOLT-4-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, $n=4$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

5. Auswertung der Wirkung peripherer Blutzellen einer Spenderperson auf die Brustkrebszelllinie MCF-7

5.1 Zytotoxizitätassay-Auswertung der unterschiedlich stimulierten peripheren Blutzellen

Nach erfolgter Stimulation der gefrorenen KHYG-1- und MOLT-4-Zellen mittels PHA, IL-2, IL-2+ME und Iscador® M und dazu durchgeführter Experimente zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung sowohl gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7, als auch gegen die Pankreaskrebszelllinie Panc-1, wurde abschließend die zytotoxische Wirkung frischer peripherer Blutzellen in unstimulierten, IL-2 stimulierten und ME stimulierten Stimulationszustand gegen die Brustkrebszelllinie MCF-7 mittels Zytotoxizitätassay, getestet. Die durchgeführten Experimente waren dieselben wie bisher. Nach erfolgreichem Anlegen eines Zytotoxizitätassays wurde auch hier die LDH-Aktivität für die drei unterschiedlichen Stimulationszustände der PBZ per Spektrophotometer gemessen und erfasst. In einer ersten graphischen Übersicht mittels Säulendiagramm ist im Rahmen dieses Experimentes kein eindeutiger Vorteil für einen der unterschiedlichen Stimulationszustände ersichtlich (Abbildung 5.0). Die Verläufe der unterschiedlich stimulierten PBZ sind schwankend und variieren teilweise sehr stark. Die Mittelwerte der spezifischen Lyse bewegen sich dabei für unstimulierte Zellen zwischen 119% und 184%, für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 98% und 204% und für ME stimulierte PBZ zwischen 151% und 183%. Der höchste gemessene Mittelwert der spezifischen Lyse liegt in diesem Fall nur für die unstimulierte PBZ-Zellgruppe bei einer E:T Ratio von 80:1, mit einem Wert von 184%. Die IL-2 stimulierten PBZ zeigen ihren größten Wert von 204% bei einer E:T Ratio von 2,5:1 sowie die ME stimulierten PBZ bei einer E:T Ratio von 1,25:1, mit 183%. Trotz schwankenden Verlaufes weisen die Mittelwerte der spezifischen Lyse für PBZ vergleichsweise die höchsten Werte für alle verwendeten Effektorzellen auf. So beträgt beispielsweise die spezifische Lyse für unstimulierte KHYG-1-Zellen 164%, für IL-2 stimulierte KHYG-1-Zellen 150% und für ME stimulierte KHYG-1-Zellen 153% und sind somit deutlich niedriger (Abbildung 3.0).

Die Standardabweichungen für unstimulierte PBZ befinden sich dabei zwischen 21% und 126%, für IL-2 stimulierte Zellen zwischen 4% und 82% und für ME stimulierte Zellen zwischen 18% und 87%, womit sich die Standardabweichungen für IL-2 und ME stimulierte PBZ in einem einheitlichen Bereich bewegen. Die Standardabweichungen für unstimulierte PBZ liegen etwas darüber.

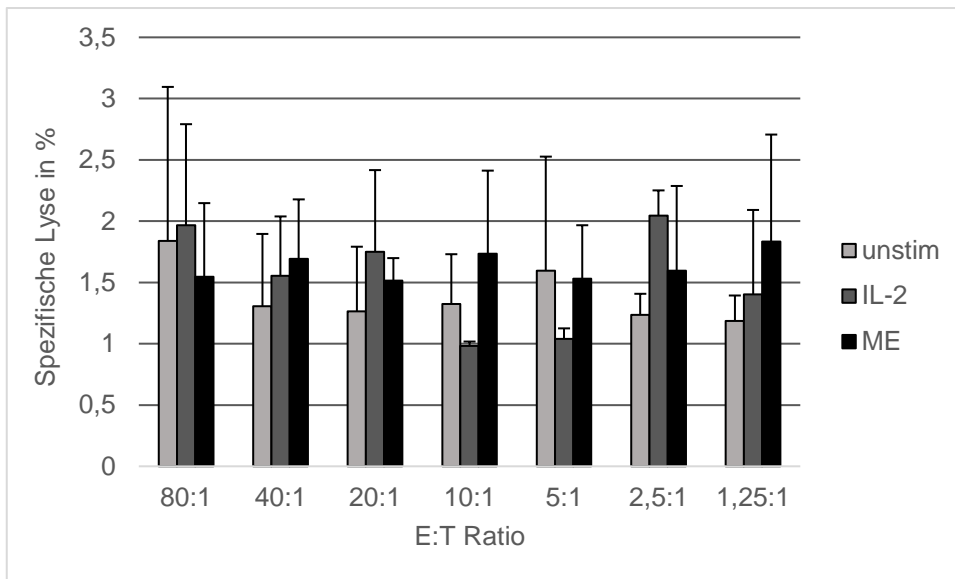


Abbildung 5.0: Graphische Übersichtsdarstellung mittels Säulendiagramm der per Spektrophotometer gemessenen LDH-Aktivität zur Bestimmung der spezifischen Lyse von unstimulierten, IL-2 stimulierten und ME stimulierten peripheren Blutzellen gegenüber MCF-7 Mammakarzinomzellen, $n=8$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Auch hier wurden zur Feststellung, ob ein prägnanter Unterschied in der zytotoxischen Wirkung der drei unterschiedlichen Stimulationszustände der PBZ besteht, jeweils zwei der drei unterschiedlich stimulierten PB-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen.

Mit p-Werten zwischen 0,09 und 0,60 ($p > 0,05$) lässt sich zwischen keinen der miteinander verglichen Mittelwerte eine Signifikanz feststellen. Die insgesamt höchste Signifikanz ergibt sich jedoch zwischen den Mittelwerten unstimulierter und ME stimulierter PBZ, mit einem p-Wert von 0,09 (Abbildung 5.1).

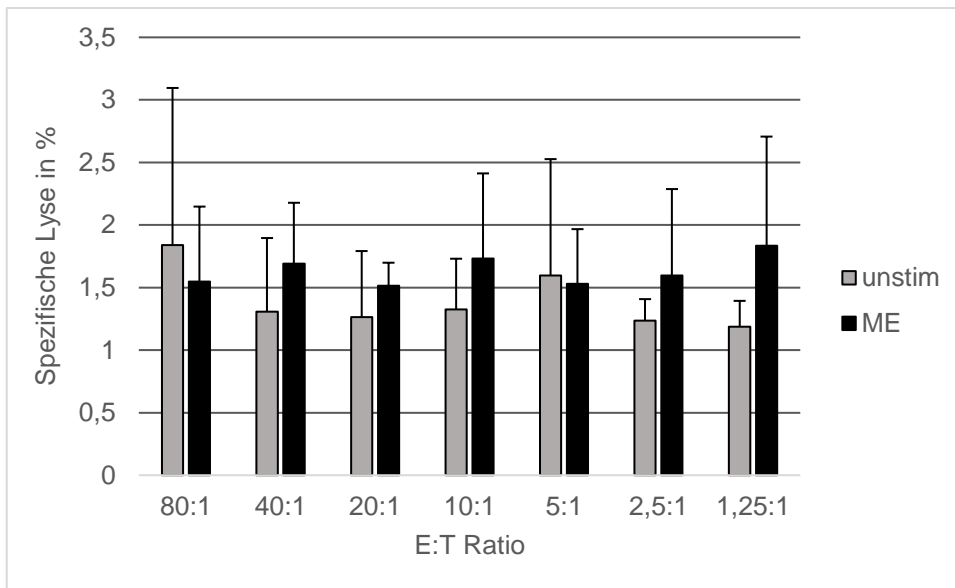
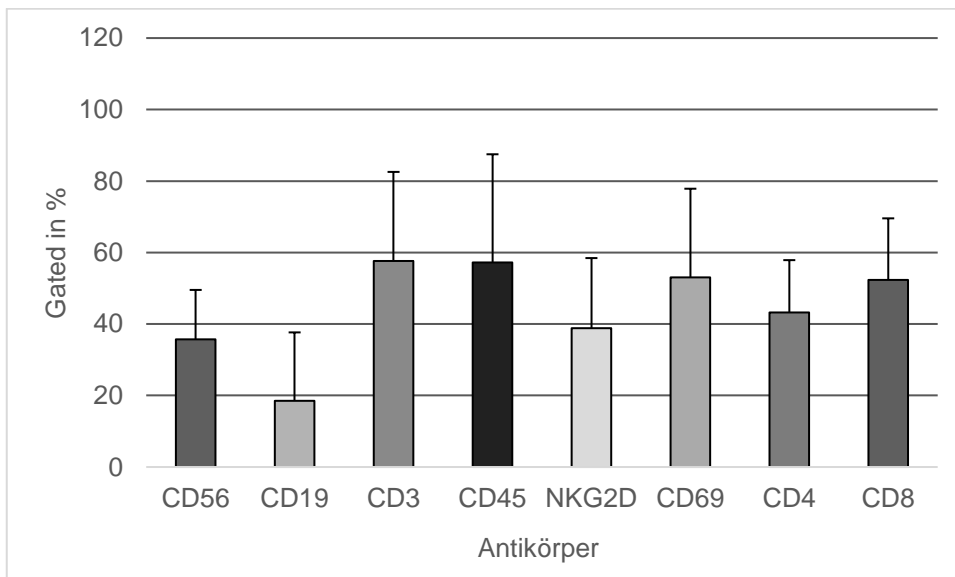
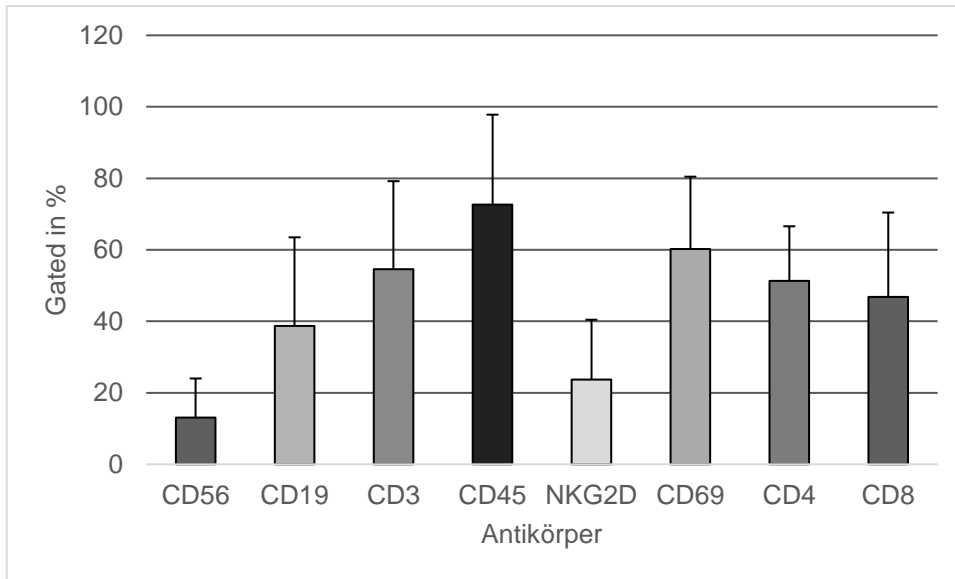


Abbildung 5.1: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Mittelwerte spezifischer Lyse für unstimulierte und ME stimulierte periphere Blutzellen gegen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels Zweistichproben-t-Test, $n=8$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

5.2 FACS-Auswertung der unterschiedlich stimulierten peripheren Blutzellen

Um auch hier nachvollziehen zu können wie stark die peripheren Blutzellen in ihrer Aktivität unter den unterschiedlichen Stimulationszuständen stimuliert und in ihrer Wirkung verstärkt wurden, wurden diese ebenfalls mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und deren unterschiedlichen Emmissions- und Absorptionspektren mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie erfasst. In einer ersten Übersicht für jeweils unstimulierte, IL-2 stimulierte und ME stimulierte PBZ, in welchen die verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD56-FITC, CD19-PE, CD3-PerCP, CD45-APC, NKG2D-PE, CD69-APC, CD4-FITC und CD8-PE miteinander verglichen wurden, lässt sich für beide PB-Zellgruppen feststellen, dass der Antikörper CD45-APC, mit Werten von 73% für unstimulierte und von 65% für ME stimulierte PBZ, am stärksten gebunden wurde. Unter IL-2 Stimulation lässt sich die stärkste Bindung für den Antikörper CD3-PerCP mit 58% nachweisen. Der schwächste gebundene Antikörper ist sehr uneinheitlich. So stellt sich für unstimulierte PBZ der Antikörper CD56-FITC mit 13% sowie der Antikörper CD19-PE mit 18,5% für IL-2 stimulierte und der Antikörper NKG2D-PE für ME stimulierte Zellen mit 12%, als am schwächsten gebunden dar. Die insgesamt höchste Antikörperbindung scheint sich tendenziell dezent für IL-2 stimulierte und ME stimulierte PBZ zu zeigen.

Die Standardabweichungen bewegen sich dabei für die unstimulierte Zellgruppe zwischen 11% und 25%, für die IL-2 stimulierte Zellgruppe zwischen 14% und 25% und für die ME stimulierte Zellgruppe zwischen 7% und 34%. Die Standardabweichungen für unstimulierte und IL-2 stimulierte PBZ befinden sich somit in einem einheitlichen Bereich und die Standardabweichungen für ME stimulierte PBZ liegen dezent darüber (Abbildung 5.2).



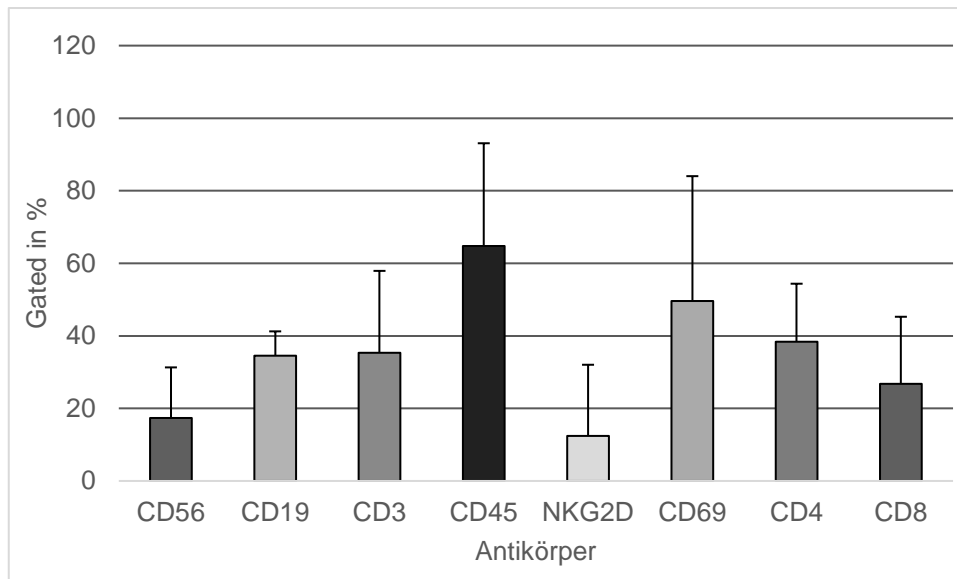
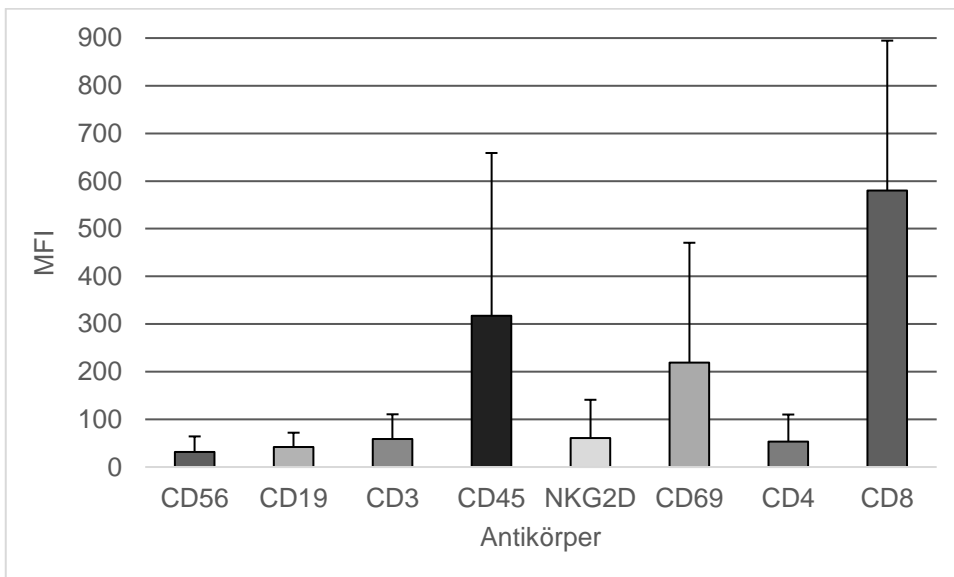
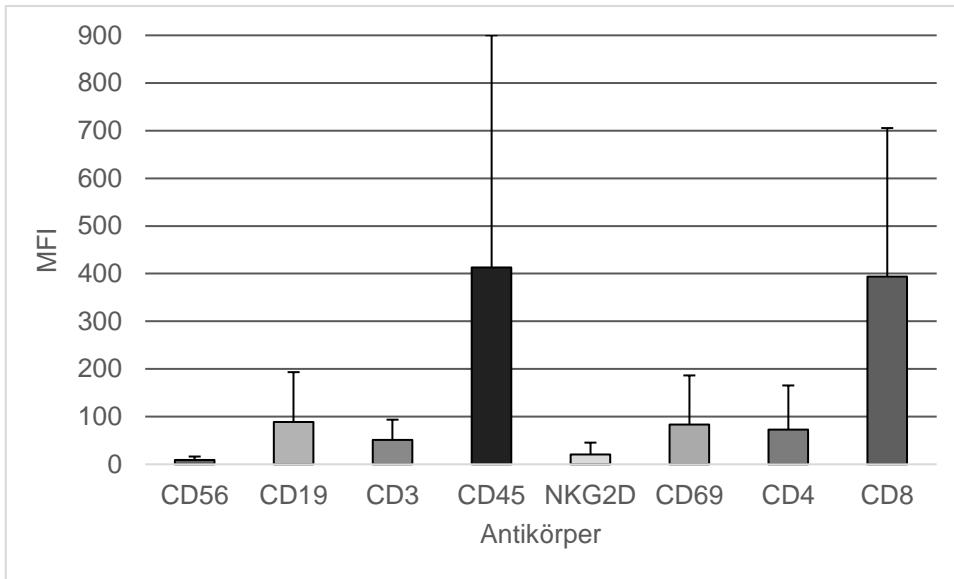


Abbildung 5.2: Graphische Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper-Detektion innerhalb einer ausgewählten Region mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie für unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und ME (unten) stimulierte PB-Zellen, $n = 8$ (n =Anzahl unabhängiger Experimente)

Die Übersicht in Abbildung 5.3 verdeutlicht für jeweils alle drei PB-Zellgruppen den Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität. So ergibt sich für unstimulierte PB-Zellen der höchste MFI für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD45-APC, mit einem Wert von 413. Unter IL-2 Stimulation und ME Stimulation lässt sich der höchste MFI für den Antikörper CD8-PE feststellen, mit Werten von 580 und 298. Der schwächste MFI zeigt sich für den Antikörper CD56-APC unter unstimulierten und IL-2 stimulierten Bedingungen, mit Werten von 9 und 31,5. Mit einem Wert von 18 verdeutlicht der Antikörper NKG2D-PE unter ME Stimulation seine schwächste Bindung.

Für die unstimulierten MFI-Werte liegen die Standardabweichungen zwischen 7 und 487, für die IL-2 stimulierten MFI-Werte zwischen 30 und 341,5 und für die ME stimulierten MFI-Werte zwischen 23 und 323. Auch hier befinden sich die Standardabweichungen in uneinheitlichen Bereichen.



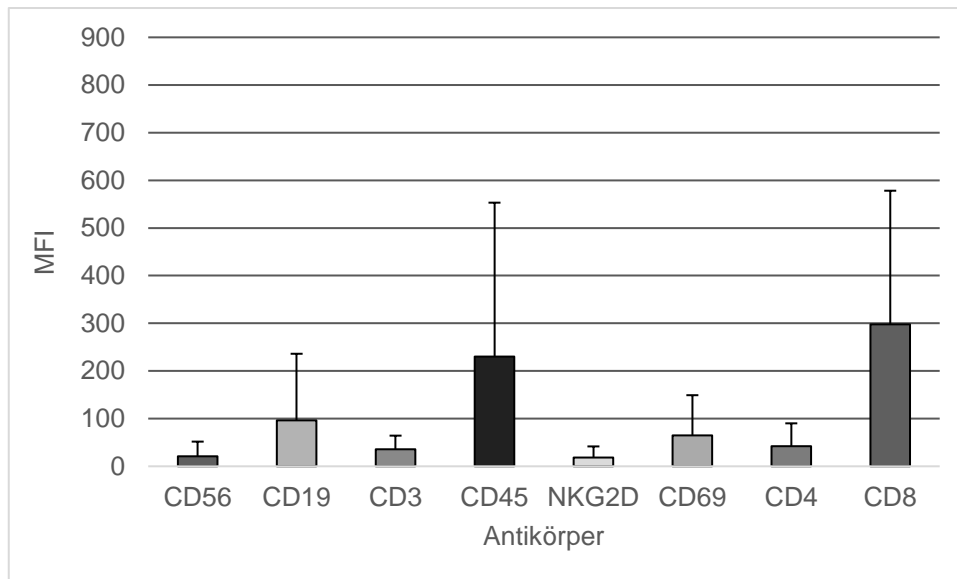
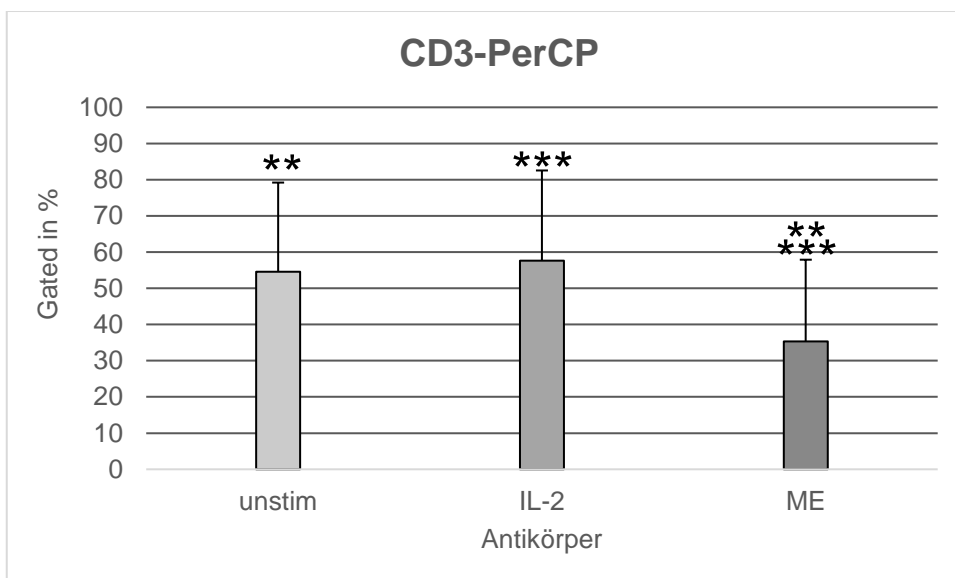
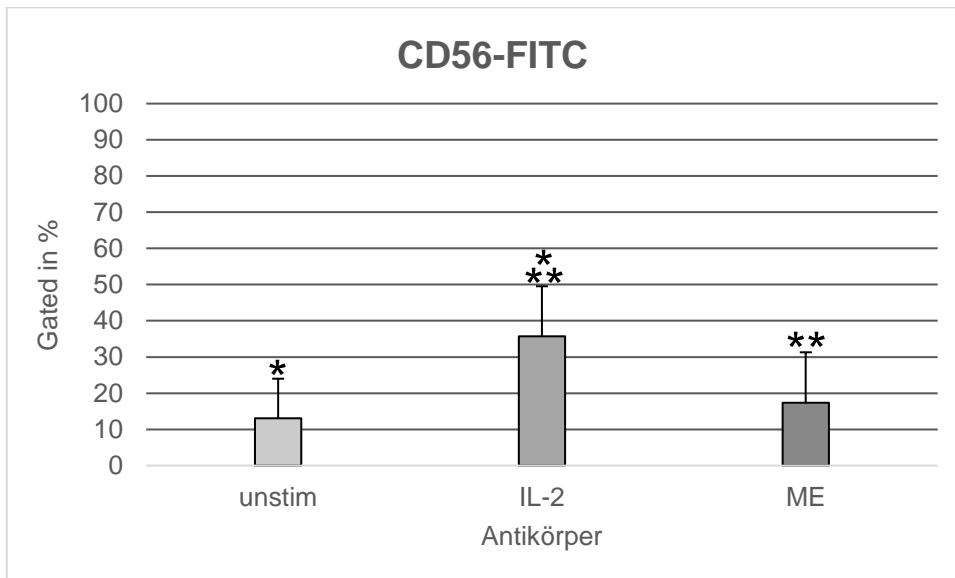


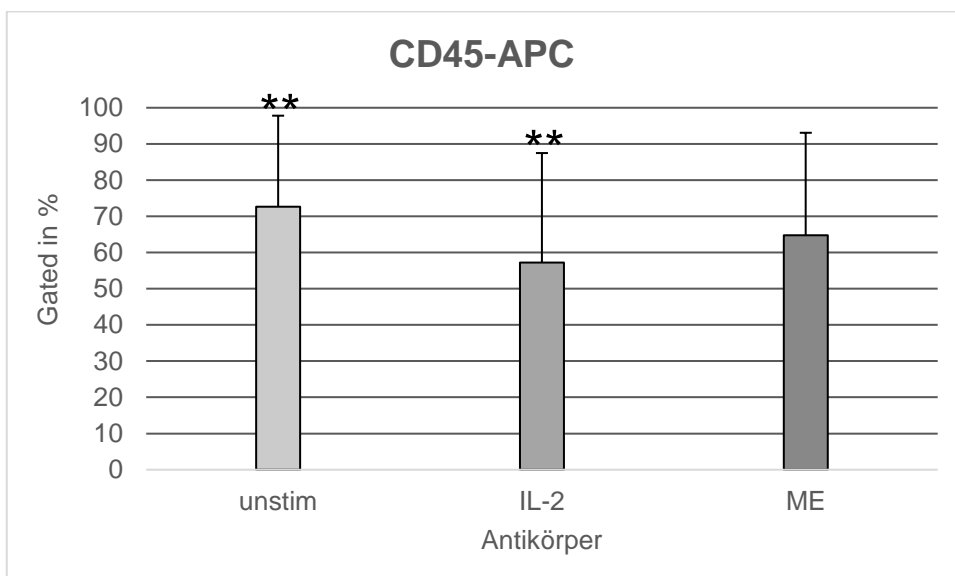
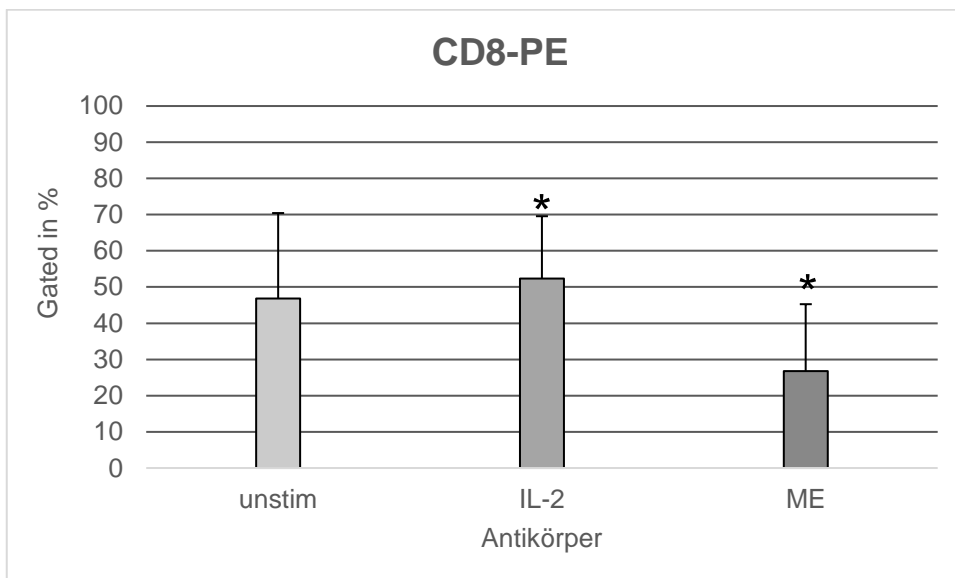
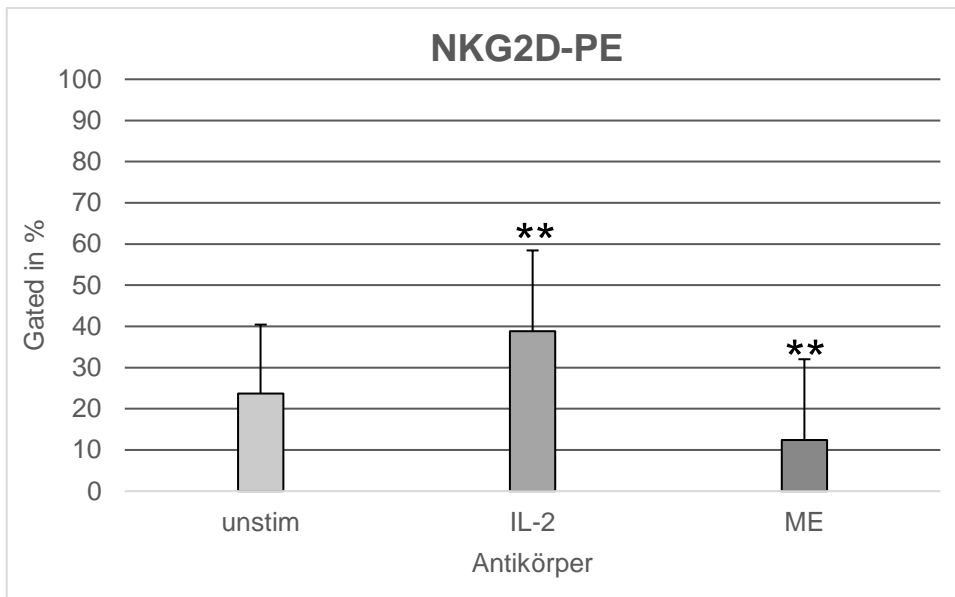
Abbildung 5.3: Graphische Darstellung der MFI-Werte der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper für jeweils unstimulierte (oben), IL-2 (mittig) und ME (unten) stimulierte PB-Zellen, $n=8$ (n = Anzahl unabhängiger Experimente)

Um auch hier eine Aussage über die Signifikanz zwischen den, unter unterschiedlichen Stimulationszuständen gemessenen, gebundenen Antikörper, treffen zu können, wurden erneut alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper jeweils für ihre unterschiedlichen Stimulationszustände per Zweistichproben-t-Test miteinander verglichen (Abbildung 5.4).

So ergibt sich für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD56-FITC mit einem p-Wert von 0,015 eine geringe Signifikanz zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter PBZ, wie auch eine moderate Signifikanz mit $p=0,0034$ zwischen den Mittelwerten IL-2 und ME stimulierter PBZ. Auch für den Antikörper CD3-PerCP lässt sich zwischen den Mittelwerten IL-2 und ME stimulierter PBZ sogar eine deutliche Signifikanz, mit $p=0,000024$, nachweisen. Mit $p=0,0020$ ist für den gleichen Antikörper eine moderate Signifikanz zwischen den Mittelwerten unstimulierter und ME stimulierter PB-Zellgruppen feststellbar. Die Antikörper NKG2D-PE und CD8-PE weisen jeweils eine Signifikanz zwischen den Mittelwerten IL-2 stimulierter und ME stimulierter PB-Zellen auf. Dabei zeigt sich mit $p=0,0036$ für NKG2D-PE eine moderate und mit einem p-Wert von 0,04 für CD8-PE eine geringe Signifikanz. Eine weitere Signifikanz ergibt sich für den Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper CD45-APC zwischen den Mittelwerten unstimulierter und IL-2 stimulierter PB-Zellgruppen. Mit einem p-Wert von 0,005 präsentiert sich hier eine moderate Signifikanz. Für den Antikörper CD4-FITC zeigt sich ebenfalls eine geringe Signifikanz zwischen den Mittelwerten unstimulierter und ME stimulierter PBZ. Nur für

die beiden weiteren Antikörper CD19-PE und CD69-APC lässt sich, mit p-Werten zwischen 0,06 und 0,67, keine nennenswerte Signifikanz nachweisen. Die peripheren Blutzellen stellen somit im Vergleich zu den anderen FACS-basierenden Experimenten die qualitativ und quantitativ stärksten Signifikanzen zwischen den Mittelwerten der unterschiedlich stimulierten PBZ für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper dar (Abbildung 5.4).





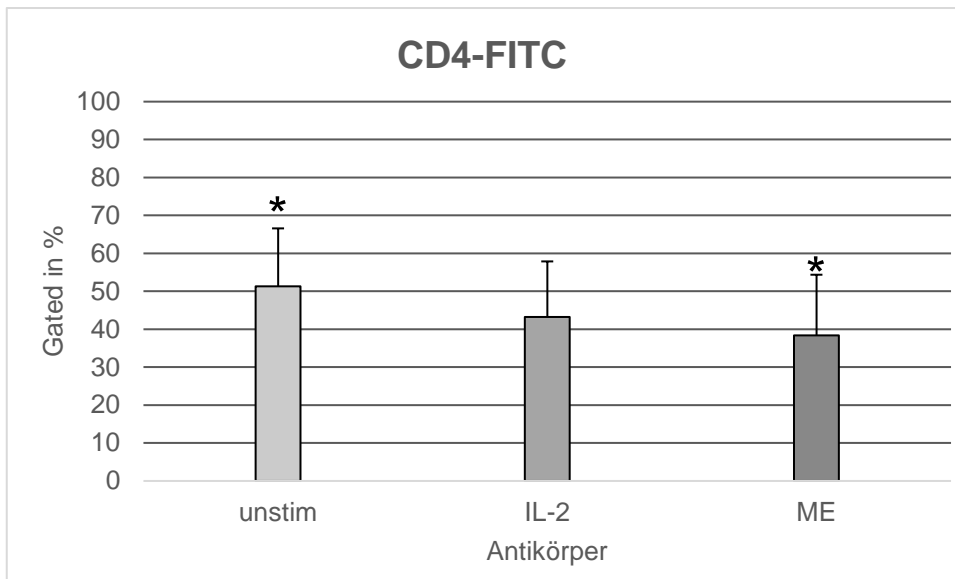


Abbildung 5.4: Graphisch vergleichende Darstellung der Signifikanz der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper zwischen den unterschiedlich stimulierten PB-Zellgruppen mittels Zweistichproben-t-Test, * p = geringe Signifikanz ($p < 0,05$), ** p = moderate Signifikanz ($p < 0,01$), *** p = deutliche Signifikanz ($p < 0,001$), $n = 8$ (n =Anzahl unabhängiger Experimente)

IV. Diskussion

Tumorerkrankungen nehmen sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin einen hohen Stellenwert ein. Laut Internationaler Agentur für Krebsforschung (IARC) erkrankt im Laufe des Lebens jede sechste Frau und jeder fünfte Mann an Krebs (Bray et al. 2018). Auch in der Veterinärmedizin erkrankt durchschnittlich jeder vierte Hund und jede vierte Katze an einer malignen Neoplasie (Di Cerbo et al. 2014; Komazawa et al. 2016). Somit stellen bösartige Tumorerkrankungen in beiden medizinischen Bereichen einen Routinefall dar und bedürfen einer entsprechenden Therapie. Im Rahmen der konventionellen Medizin bilden Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie die grundlegenden Therapieansätze der Onkologie. Trotz entsprechender therapeutischer Ansätze verläuft der Großteil onkologischer Erkrankungen nach wie vor tödlich, was die Notwendigkeit für weitere mögliche Behandlungsmethoden deutlich macht. Ein moderner Ansatz bei der Bekämpfung bösartiger Krebserkrankungen ist die Immunologie. Ziel ist es hierbei, das körpereigene Immunsystem zu stimulieren, zu verstärken und eine antigenspezifische Immunantwort zu induzieren. Dabei hat sich im Bereich der komplementären Medizin insbesondere die Europäische weißbeerige Mistel (*Viscum album L.*) als Immunmodulator innerhalb der letzten Jahrzehnte etabliert. Neben den konventionellen onkologischen Therapieansätzen gilt sie, als eine der wichtigsten und stärksten pflanzlichen Arzneimittel, als alternative und unterstützende Therapieoption bei der Behandlung von Krebserkrankungen (Büssing 2000; Wilkens et al. 2016). Ihr klinisch relevanter Ansatz, für die Therapie von Tumorerkrankungen, beruht auf ihrer Inhaltsstoff basierenden immunstimulierenden/immunmodulierenden, zytotoxischen und auch antitumoralen Wirkung, welche bereits in zahlreichen vorklinischen und klinischen Studien belegt wurde (Beuth et al. 1992; Büssing 2006; Maier et al. 2002; Marvibaigi et al. 2014; Pieme et al. 2012; Son et al. 2010; Zhao et al. 2012). Trotz entsprechender Studien über die vielfältigen Effekte der Mistel gilt sie nicht allgemeingültig als Onkotherapeutikum und ist weiterhin Gegenstand großer Skepsis, vor allem im Bereich der konventionellen Medizin. Thema dieser Arbeit war die Untersuchung jener immunstimulierenden und zytotoxischen Wirkung des Mistelextraktes Iscador® M und eine damit einhergehende Bewertung dieses als mögliche adjuvante onkologische Therapieoption. Dabei konnten beide Wirkungen auf die verwendeten Effektor- und Targetzellen im Rahmen der hier durchgeführten Experimente sogar teilweise deutlich demonstriert werden und belegen somit die Beobachtungen und Ergebnisse bereits bestehender Literatur.

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien bestätigen die mistelbedingte Fähigkeit des Immunsystems zu verstärken und eine Tumorerstörung beziehungsweise eine Tumorreduzierung zu erhöhen. Sowohl die zytotoxische als auch die antitumorale Wirkung von Mistelextrakten beruht dabei auf einer immunstimulierenden/immunmodulierenden Wirkung und einer damit einhergehenden verstärkten Expression von Granulozyten, NK-Zellen, Pan-T-Zellen und T-Helferzellen. Zellen, welche maßgeblich an der natürlichen Tumorerabwehr beteiligt sind und sich zytotoxisch gegen entartete Zellen richten (Beuth et al. 1992; Burger et al. 2001; Hajto 1986; Heiny et al. 1998; Stauder et al. 2002). Dabei lässt sich die immunmodulatorische Aktivität der Mistel laut Beuth et al. (1995), Hajto et al. (1998) und Lee et al. (2009) auf die Kohlenhydrat-bindende B-Kette des ML-1 zurückführen, welche die Zytokinsekretion steigert und somit auch die Ausschüttung und die Aktivität von NK-Zellen und T-Zellen erhöht.

Jene verstärkte Expression von NK-Zellen und verschiedenen T-Zell-Subpopulationen lässt sich auch in dieser Arbeit mittels durchgeführter Mehrfarbendurchflusszytometrie nachweisen. So zeigen alle mit Iscador® M stimulierten KHYG-1-Zellen die stärkste Antikörperbindung für den Antikörper NKG2D, welcher als aktivierender NK-Zellrezeptor fungiert und die zellvermittelte Zytotoxizität der NK-Zellen stimuliert (Abbildung 3.2, 4.2). Seine Expression ist somit hinweisend auf die Aktivität von NK-Zellen. Auch die unstimulierten und IL-2 stimulierten KHYG-1-Zellen präsentieren die stärkste Antikörperbindung für NKG2D. Im Vergleich zwischen den drei unterschiedlich stimulierten KHYG-1-Zellengruppen ergibt sich jedoch auch insgesamt die stärkste Bindung von NKG2D für alle ME stimulierten KHYG-1-Zellen. Eine Signifikanz für die Antikörperbindung von NKG2D zwischen den drei Stimulationszuständen mittels T-Test, ist jedoch für keines der durchgeführten Experimente feststellbar. Interessanterweise beobachten Lee et al. (2007) in ihrer Studie, dass das Mistelextrakt *ABNOBA viscum Fraxini* die Expression der natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (NCR) NKp30 und NKp46 sowie den NKG2D-Rezeptor inhibiert. Nach erfolgter Stimulation mit IL-2 und IL-15 ist ein deutlich angeregtes NKp30- und NKG2D-Level erkennbar, welches nach Zugabe des Mistelextraktes nahezu auf das Level unstimulierter Zellen supprimiert wurde. Auch für unbehandelte NK-Zellen konnte unter Mistelextraktzugabe eine signifikante Inhibierung ihrer zytotoxischen Aktivität festgestellt werden. Die Autoren dieser Studie gehen dabei von einer durch Mistelextrakt induzierten Apoptose der NK-Zellen aus. Der exakte Mechanismus, welcher die mistelinduzierte Suppression der aktiven NK-Zell-Rezeptoren ausgelöst hat, ist jedoch nur schwer nachvollziehbar und nicht bekannt. In der hier vorliegenden Doktorarbeit sind ebenfalls NK-Zellen (KHYG-1)

gleichzeitig mit dem Zytokin IL-2 und Iscador® M stimuliert wurden. Jene IL-2+ME stimulierten NK-Zellen weisen innerhalb des dazu durchgeführten Experimentes die höchste Antikörperbindung für NKG2D und somit auch die stärkste Expression von NKG2D-Rezeptoren auf (Abbildung 2.2). Im Rahmen desselben Experimentes exprimieren auch die unstimulierten und IL-2 stimulierten KHYG-1-Zellen NKG2D-Rezeptoren am stärksten, jedoch prozentual schwächer als unter IL-2+ME Stimulation (Abbildung 2.2). Eine Signifikanz zwischen den drei Stimulationszuständen ist auch hier nicht feststellbar, ebenso wenig wie eine Suppression des NKG2D-Rezeptors. Die beiden NCR Nkp30 und Nkp46 werden vergleichsweise insgesamt schwach exprimiert, befinden sich aber für alle drei Stimulationszustände auf einem ähnlich niedrigen Level, mit einer Tendenz für die höchste Expression unter Mistelextraktstimulation (Abbildung 2.2). Eine mistelbedingte Inhibierung lässt sich somit auch für die NCR nicht erkennen. Neben einer verstärkten NK-Zell-Expression demonstrieren mehrere Studien auch die Expression von T-Lymphozyten nach erfolgter Mistelextraktstimulation (1993; Beuth et al. 1992; 1995; Hajto 1986; Heiny et al. 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit für ME stimulierte MOLT-4-Zellen zeigt ebenfalls jene T-Zellexpression. So ergibt sich für alle Iscador® M stimulierten MOLT-4-Zellen, mittels Mehrfarbendurchflusszytometrie, die stärkste Antikörperbindung entweder für CD8+ oder CD45. Dabei dient CD45 der Signaltransduktion und damit der Aktivierung von T-Zellen. Zudem wird er als Pan-Leukozytenmarker von allen Leukozyten exprimiert. Im Gegensatz dazu ist CD8+ ein spezifischer T-Zellen-Subpopulationsmarker. Er wird auf den zytotoxischen T-Zellen exprimiert, die der Tötung von infizierten und entarteten Zellen dienen. Die Expression beider Rezeptoren weist somit auf eine vergleichsweise verstärkte Aktivität der T-Zellen und der T-Zell-Subpopulation zytotoxischer T-Zellen hin. Eine Signifikanz für die Antikörperbindung von CD8+ und CD45 zwischen den beiden Stimulationszuständen ist jedoch ebenfalls nicht nachweisbar. Die von Beuth et al. (1995), Heiny et al. (1998) und Schink (1997) beobachtete gesteigerte Aktivität von NK-Zellen und T-Lymphozyten nach Stimulation mit ME, kann somit auch in dieser Arbeit demonstriert werden. Neben einer Erhöhung von T-Lymphozyten zeigen Büssing et al. (2007) in ihrer Studie mit 36 Brustkrebspatientinnen unter ME Stimulation, auch eine dauerhafte Stabilisierung der T-Zellen-Anzahl und deren Funktion, während die Zellzahl und die Zellaktivität in der Kontrollgruppe ohne Mistelextrakt abnahm. Mistelpräparate induzieren also sowohl eine Stabilisierung als auch eine Zunahme jener direkt an der Tumorabwehr beteiligten Zellen und verbessern zudem die zelluläre als auch die humorale Immunantwort (Gardin 2009; Kienle et al. 2009; Kienle Kiene 2003; Kienle et al. 2010; Marvibaigi et al. 2014; Matthes et al. 2005). So resultiert eine Langzeittherapie mit Iscador® laut Heinzerling et al. (2006) in eine spezifische T-Helferzellen Antwort, welche die Induzierung von

T-Gedächtniszellen aktiviert, welche wiederum antiinfektiöse und antitumorale Wirkung haben könnten.

Der bereits erwähnte immunstimulierende/immunmodulierende Effekt der Mistel stellt einen Teil der antitumoralen Wirkung dar. Der andere Teil beruht auf der zytotoxischen Wirkung der A-Kette des ML-1, welche in eine induzierte Apoptose oder den nekrotischen Zelltod resultiert (Bantel et al. 1999; Endo et al. 1988). Die Annahme, dass der antitumorale Effekt der Mistel auf einer induzierten Apoptose beruht, bestätigen Harmsma et al. (2006) in ihrer Studie und berichten, dass Iscador® innerhalb verschiedener Tumorzelllinien, unter anderem auch Brustkrebszelllinien, eine frühzeitige Zellzyklusregression verursacht, auf welche dann besagte Apoptose folgt. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse daraufhin, dass Iscador® Qu durch Aktivierung des mitochondrialen Transduktionsweges und Iscador® M durch Aktivierung des Todesrezeptor-Transduktionsweges jeweils die Apoptose induzieren. Auch die Studie von Ramaekers et al. (2007) veröffentlicht sehr ähnliche Ergebnisse, zeigen aber, dass Iscador® M sowohl über den mitochondrialen als auch über den Todesrezeptor-Transduktionsweg die Apoptose induzieren kann. Zudem konnte eine vollständige Inhibierung des Voranschreitens der S-Phase innerhalb, der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinie MCF-7, nachgewiesen werden. Die zytolytische/zytostatische Wirkung der Viskotoxine, welche auf einer Indizierung des nekrotischen Zelltodes durch Lyse der Zellmembran beruht, liegt ebenso dem antitumoralen Effekt von Mistelextrakten zugrunde. Jene Apoptose und Nekrose induzierende Eigenschaften von Iscador® M scheinen auf den, im Zuge dieser Doktorarbeit, gemessenen Werten der spezifischen Lyse zu beruhen. So ergeben sich für alle mistelstimulierten Effektorzelllinien die höchsten Werte spezifischer Lyse, sowohl gegenüber MCF-7 als auch gegenüber Panc-1 (Abbildung 2.0, 3.0, 4.0). Dabei erzielten die peripheren Blutzellen gegenüber der Brustkrebszelllinie MCF-7 im Vergleich sowohl für unstimulierte als auch für IL-2 und ME stimulierte Zellen, die höchsten Werte spezifischer Lyse (Abbildung 5.0). Der antitumorale Effekt der Mistel lässt sich somit anhand hoher mistelbedingter spezifischer Lyse-Werte innerhalb aller durchgeführten Experimente feststellen und im Rahmen bestehender Literatur bestätigen.

Neben den beiden tiefgefrorenen Effektorzelllinien KHYG-1 und MOLT-4 wurden auch periphere Blutzellen aus frischem Blut gewonnen und als Effektorzellen verwendet. Wie erwartet zeigen diese im unstimulierten und Mistelextrakt stimulierten Zustand ebenfalls die höchste Expression für den Pan-Leukozytenmarker CD45. Die Zellpopulation der peripheren Blutzellen besteht nach hier erfolgter Zentrifugation und Versetzung mit der Trennflüssigkeit BicolI hauptsächlich aus weißen Blutkörperchen, welche alle auf ihrer

Zelloberfläche CD45 exprimieren, weshalb die Antikörperbindung von CD45 somit erwartungsgemäß am höchsten ist. Mit einem prozentualen Anteil von 61%-85% aller Lymphozyten im Blut machen T-Lymphozyten den größten Anteil aus. Gefolgt von Natürlichen Killerzellen mit 10%-30% und B-Lymphozyten mit 7%-23% (Kaufmann 2012). Ein dementsprechendes Bild stellt sich auch bei der gemessenen Antikörperbindung dar. Neben CD45 erweisen sich die Antikörperbindungen für die spezifischen T-Zell-Marker CD8+, CD4+ und CD3 sowie für den Pan-Aktivierungsmarker CD69 als am stärksten. Die B-Lymphozyten- und NK-Zell-Marker CD19, NKG2D und CD56 werden entsprechend prozentual schwächer gebunden (Abbildung 5.2). Interessanterweise lässt sich für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit PBZ kein Vorteil in der Expression der verschiedenen Marker für die ME stimulierte Zellgruppe erkennen, sondern für die IL-2 stimulierte Zellgruppe. Für die Mistelextrakt stimulierte Zellgruppe lässt sich sogar die geringste Antikörperbindung für nahezu alle Antikörper feststellen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass ein Teil der T-Zellen aus dem frischen Blut der Spenderperson immunstatusbedingt bereits aktiviert waren und IL-2 ausgeschüttet haben, was durch zusätzliche Stimulation mit IL-2 weiter verstärkt wurde. IL-2, als sogenannter T-Zell-Wachstumsfaktor, hat somit die Proliferation und die Differenzierung weiterer T- und B-Lymphozyten, ebenso wie die Proliferation und die Differenzierung von NK-Zellen, verstärkt induziert. Letztendlich lagen jene Zellgruppen in einer höheren Zellzahl vor als innerhalb der unstimulierten und ME stimulierten Zellsuspension. Folglich ergibt sich auch der größte Anteil gebundener Antikörper für die IL-2 stimulierte Zellgruppe. Ein möglicher Hinweis für diese Annahme könnte die, nur für die IL-2 stimulierte-Zellgruppe feststellbare, stärkste Antikörperbindung von CD3-PerCP sein. So ist CD3 T-Zell-spezifisch, dient der Membranexpression und der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors, welcher wiederum als Aktivator von T-Lymphozyten fungiert und somit ebenfalls ursächlich für eine gesteigerte T-Lymphozytenanzahl unter IL-2-Stimulation sein könnte. Zudem gelten TCR's als charakterisierendes Merkmal der T-Zellen. Ohne CD3 ist es den TCR's nicht möglich auf die Membranoberfläche zu gelangen, weshalb sich der monomorphe CD3-Komplex für einen diagnostischen T-Zell-Nachweis eignet (Bröker et al. 2019; Rink et al. 2015). Warum die ME-Zellgruppe insgesamt die geringste Antikörperbindung aufweist ist unklar. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass es sich nicht um eine reine Zelllinie handelt, sondern neben 25%-40% Natürlichen Killerzellen und T- und B-Lymphozyten, auch Granulozyten mit 50%-80% und Makrophagen und Monozyten mit 2%-8%, enthalten sind (Kaufmann 2012). Da Mistelextrakt auch die Proliferation von Granulozyten stimuliert, könnte es somit sein, dass die PBZ-Zellkultur hauptsächlich aus

Granulozyten bestanden hat, was bei der Auszählung der Zellen nicht differenziert werden konnte (Hajto 1986). So ist es möglich, dass zwar die notwendige Gesamtzellzahl nach Inkubation erreicht wurde, aber nicht die notwendige Zellzahl pro Zellpopulation. Hinweisend auf die Anwesenheit eines hohen Anteils von unter anderen Granulozyten, könnte die stärkste Antikörperbindung für den Pan-Leukozytenmarker CD45 sein, welcher auch von Granulozyten, Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Demgegenüber steht die geringe Antikörperbindung für spezifische NK-Zell-Marker und T- und B-Lymphozytenmarker, welche möglicherweise durch den grundsätzlichen Mangel entsprechender Zellpopulationen bedingt ist.

Im Rahmen der Experimente mit PBZ lassen sich im Vergleich zu allen weiteren Experimenten die höchsten Signifikanzen zwischen den unterschiedlich stimulierten Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper feststellen. So zeigt sich vor allem eine Signifikanz zwischen den IL-2 stimulierten und ME stimulierten Antikörpern CD56-APC ($p= 0,003$), CD3-PerCP ($p= 0,00002$), NKG2D-PE ($p= 0,004$) und CD8-PE ($p= 0,04$), womit die Annahme eines potenziellen unterschiedlichen prozentualen Anteils an NK-Zellen und T-Lymphozyten innerhalb der IL-2 und ME stimulierten Zellgruppen zusätzlich untermauert werden kann (Abbildung 5.4). Dabei handelt es sich bei CD56, CD3 und CD8+ um spezifische T-Lymphozyten- beziehungsweise bei NKG2D, um spezifische NK-Zell-Marker, die innerhalb der IL-2 stimulierten Zellpopulation offensichtlich stärker gebunden wurden als innerhalb der ME-Zellpopulation. Interessanterweise weisen die drei unterschiedlich stimulierten PBZ-Zellgruppen dennoch jeweils insgesamt die höchsten spezifischen Lyse-Werte für alle durchgeführten Experimente mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 auf (Abbildung 5.0). So ergibt sich eine spezifische Lyse für unstimulierte Zellen von maximal 184%, für IL-2 stimulierte PBZ von maximal 204% und für ME stimulierte Zellen von maximal 183%, wobei sich auch hier das Maximum für die IL-2 stimulierte Zellgruppe zeigt. Ursächlich für die insgesamt höchsten spezifischen Lyse-Werte, könnte der unterschiedliche Ausgangszustand der verschiedenen Effektorzelllinien sein. So waren die beiden Effektorzelllinien KHYG-1 und MOLT-4 ursprünglich tiefgefroren, wohingegen die peripheren Blutzellen direkt nach Blutabnahme gewonnen und verarbeitet wurden, weshalb die Annahme, dass die peripheren Blutzellen gegenüber der tiefgefrorenen Effektorzelllinien bereits ein gewisses Aktivitätslevel hatten und dieses unter Stimulation verstärkt wurde, nahe liegt. Demgegenüber stehen die KHYG-1- und MOLT-4-Zellen, welche mittels entsprechenden Mediums und der jeweiligen Stimulanzen aktiviert und langsam stimuliert wurden. Möglicherweise ist der prozentuale Anteil an T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen innerhalb der PBZ-Zellsuspension nicht hoch, ihre Aktivität und Funktion dafür jedoch umso höher.

Das Blut zur Gewinnung von frischen peripheren Blutzellen wurde nur von einem Spender entnommen, wobei kritisch zu betrachten ist, dass der genaue und aktuelle Immunstatus der Spenderperson nicht bekannt war. Mit knapp 60 Jahren weist die Person zudem ein immunologisch höheres Alter auf, da laut Fahy et al. (2019) die Immunantwort ab 60 Jahren langsam verzögert ist. Weiter kritisch zu betrachten ist außerdem die hier verwendete Iscador® M Dosis und die Inkubationszeit, welche äquivalent zu den beiden reinen Effektorzelllinien sind. So könnte eine höhere Dosis und eine verlängerte Inkubationszeit die Zellzahl der Lymphozyten und NK-Zellen möglicherweise positiv beeinflussen und somit auch die Menge exprimierter Zelloberflächenmarker und die von ihnen gebundenen Antikörper erhöhen.

Indikationen für eine Misteltherapie sind aufgrund ihrer immunstimulierenden und antitumoralen Wirkung sehr vielfältig und reichen von einer Progressionsverhinderung von Präkanzerosen bis hin zu einer Behandlung der unterschiedlichsten Tumorarten und Tumorstadien. Die Misteltherapie soll insbesondere im Rahmen der Nachsorge, Nebenwirkungen einer Chemo- und/oder Strahlentherapie vermindern, die rezidiv- und metastasenfremde Überlebenszeit verlängern und insbesondere die Lebensqualität verbessern (Matthiessen et al. 1995; Rippe 2017). Eine Neoplasie, an denen die Wirkungen und Effekte einer Misteltherapie besonders gut erforscht sind, stellt das Mammakarzinom dar. So haben bereits zahlreiche in vitro und in vivo Studien den Effekt der Mistel und derer aktiven Komponenten auf Brustkrebszellen untersucht und berichten dabei vorrangig über den antitumoralen und zytotoxischen Effekt auf verschiedene Brustkrebszelllinien. Gegenstand jener Studien, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, war oftmals die Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Dabei weisen, neben der hier verwendeten Europäischen Mistel, auch Mistelarten wie die Koreanische, die Chinesische, die Iranische und auch die Amerikanische Mistel, zytotoxische Effekte speziell gegen die Tumorzelllinie MCF-7 auf (Hojjat et al. 2006; Jacobo-Salcedo et al. 2011; Yang et al. 2011; Zhao et al. 2012). Zudem demonstriert die Indische Mistel auch eine signifikante Inhibierung der Zellproliferation und ein damit einhergehendes verzögertes Tumorwachstum (Dashora et al. 2011). Die zytotoxische und antiproliferative Wirkung der hier verwendeten Europäischen Mistel auf verschiedene Brustkrebszelllinien zeigen unter anderem Kelter et al. (2007) und Maier et al. (2002) in ihren Studien. Die antitumorale und zytotoxische Wirkung von *Viscum album L.* auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Zytotoxizitätsassay ebenfalls nachgewiesen werden und reiht sich somit in die bisherigen Ergebnisse der bestehenden Literatur ein. So ergibt sich für die mit ME stimulierten Effektorzellen

(KHYG-1- und MOLT-4-Zellen) innerhalb der MCF-7-Experimente der höchste spezifische Lyse-Wert mit Werten zwischen 150%-153% für die KHYG-1-Zellen und mit Werten zwischen 158%-179% für die MOLT-4-Zellen (Abbildung 2.0, 3.0). Anhand jener Werte kann, im Rahmen dieser Doktorarbeit, der antitumorale Effekt der mistelstimulierten Effektorzellen auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 verdeutlicht und bestätigt werden. Zwar wurden die Parameter der Lebensqualität und der rezidiv- und metastasenfreien Überlebenszeit innerhalb dieser Arbeit nicht thematisiert, legen aber aufgrund vorhandener Literatur und der hier präsentierten Werte der spezifischen Lyse eine mögliche erhöhte Tumorzelllyse nahe, welche in einen weniger starken Krankheitsverlauf, in eine bessere Lebensqualität und in eine verlängerte rezidiv- und metastasenfreie Überlebenszeit resultieren könnte.

Auch für weitere Mammakarzinomzelllinien konnte der zytotoxische Effekt von *Viscum album* in verschiedenen Studien demonstriert werden (Beuth et al. 2006; Knöpfel-Sidler et al. 2005; Maier et al. 2002; Pieme et al. 2012). So wurde in einer Studie von Hugo et al. (2007) mit der HER2-Brustkrebszelllinie als Modelzelllinie beobachtet, dass Iscador® M die durch den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-bedingte Tumorproliferation inhibiert und sich somit auch für diese aggressive und prognostisch ungünstigere Brustkrebsform als vielversprechender therapeutischer Ansatz erweisen könnte. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Studie von Weissenstein et al. (2016) in der das für HER2 positive-Mammakarzinome gängige Medikament Trastuzumab mit einer Behandlung mit Iscador® M verglichen wurde. Dabei bewirkten beide Präparate in vitro, einzeln oder in Kombination, eine Inhibierung der Tumorproliferation. Ursächlich hierfür ist eine Hemmung der G0/G1-Zellzyklusphase unter Trastuzumab und eine Hemmung der G2/M-Zellzyklusphase unter Iscador® M. Auch wurde für beide Präparate eine signifikante Inhibierung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) festgestellt. Zusätzlich ist unter Iscador® M eine Apoptose zu beobachten, welche sich unter Trastuzumab nicht nachweisen ließ. Somit erwies sich ME in vitro als genauso beziehungsweise stärker wirksam als der Antikörper Trastuzumab.

Limitierende Faktoren in all diesen Studien sind die oftmals geringe Patientenzahl, das Fehlen einer Kontrollgruppe und die Inhomogenität aufgrund unterschiedlicher Mistelpräparate und Tumorzelllinien. Jedoch beschreiben Eggenschwiler et al. (2007) in ihrer in vitro Studie, dass alle untersuchten Iscador®-Zubereitungen sowohl einen zytotoxischen als auch einen antitumoralen Effekt auf verschiedene Brustkrebszelllinien haben. Auch die innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Experimente beruhen ebenfalls auf in vitro Experimente. Demgegenüber stehen in vivo Studien, in welchen mithilfe von Tiermodellen die zytotoxische und antitumorale Wirkung der Mistel untersucht und bestätigt wurde. Bestandteil der meisten Studien war ebenfalls die

Europäische Mistel und deren Wirkung in Mäusen und Ratten. Der größte Teil der Studien berichtet dabei über eine Reduzierung der Tumorproliferation und der Tumorgröße und über eine gesteigerte induzierte Apoptose (Berger et al. 1983; Beuth et al. 2006; Drees et al. 1996). So zeigt sich beispielsweise im Rahmen der Behandlung des B-Non-Hodgkin-Lymphoms (B-NHL) nach subkutan applizierter Mistel-Monotherapie, in einer Studie von Kühn (2005), in 42% der Fälle eine partielle oder komplette Tumorremission. Auch erzielte die subkutane Misteltherapie bei der Behandlung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) bei 8,1% der Patienten eine partielle und bei 13,1% der Patienten sogar eine komplette Remission (Mabed et al. 2004). Ursächlich hierfür könnte der Apoptose induzierende und Proteinbiosynthese inhibierende Effekt sein sowie das tumorhemmende Potenzial, bedingt durch den zytolytischen/zytotoxischen Effekt der Mistellektine und Viskotoxine.

Im Vergleich zu in vitro Studien sind die Ergebnisse von in vivo Studien bisher jedoch inkonstant und bedürfen weiterer, standardisierter und qualitativ hochwertiger Studien. Tumorproliferation, Tumorregression und Apoptoseanzahl wurden in der vorliegenden Doktorarbeit nicht untersucht. Auf der Basis bestehender Literatur und der erhaltenen hohen experimentellen spezifischen Lyse-Werte, liegt eine hohe Apoptoseanzahl und eine damit möglicherweise einhergehende Tumorregression jedoch nahe.

Die Misteltherapie bei Brustkrebspatientinnen findet in Europa vor allem zusätzlich zu einer Chemotherapie Anwendung. Dabei geht laut zahlreichen Studien der zusätzliche Gebrauch von Mistelpräparaten parallel zu einer adjuvanten und/oder palliativen Chemotherapie grundsätzlich mit einer Reduktion krankheits- und therapiebedingter Nebenwirkungen, einer Senkung der Toxizität der Chemotherapeutika sowie mit einer positiven Auswirkung auf die Remissionsrate und die Gesamtüberlebenszeit einher. Zudem ist eine Verbesserung der Lebensqualität und des Wohlbefindens feststellbar. Die meisten Studien untersuchen die Wirkung der Mistel im Vergleich zu einer Chemotherapie oder den therapeutischen Nutzen einer Kombination aus beiden Therapieansätzen. So gibt es in den Studien von Friedel et al. (2009), Kim et al. (2012), Lange-Lindberg et al. (2006) und Tröger et al. (2014) jeweils eine Chemotherapie erhaltende Kontrollgruppe und eine Chemotherapie und Mistelextrakt erhaltende ME-Gruppe. Für alle vier Studien lässt sich im Ergebnis ein Vorteil für die Patienten der ME-Gruppe bezüglich der Lebensqualität feststellen. In einer umfassenden systemischen Übersichtsarbeit von Kienle et al. (2010), bestehend aus 10 nicht-randomisierten klinischen Studien und 26 randomisierten Studien, ist ebenfalls mehrheitlich eine Verbesserung der Lebensqualität erkennbar. Insgesamt zeigt sich diese in 22 der 26 randomisierten Studien sowie in allen 10 nicht-randomisierten Studien.

Auch eine von Büssing et al. (2012) durchgeführte Metaanalyse, bestehend aus 9 randomisierten und 4 nicht-randomisierten klinischen Studien, weist hinsichtlich der Lebensqualität bei verschiedenen Tumorentitäten positive Tendenzen auf. Ebenso berichten Beuth et al. (2008), in ihrer Studie mit 741 Mammakarzinompatientinnen, über eine deutliche Steigerung der Lebensqualität innerhalb der ME erhaltenden Gruppe. Auch für die ME-Gruppe innerhalb der qualitativ hochwertigen Studie von Semiglasov et al. (2004), lassen sich sehr ähnliche Ergebnisse feststellen. In einer weiteren prospektiven, multizentrischen Studie derselben Autoren ist eine erneute signifikante Verbesserung der Lebensqualität unter Misteltherapie zu beobachten (Semiglasov et al. 2006).

Zudem lässt sich auch eine mistelbedingte verbesserte Verträglichkeit der onkologischen Therapien in zahlreichen Studien nachweisen. Piao et al. (2004) beispielsweise berichten über eine stabile beziehungsweise verbesserte Verträglichkeit der Chemotherapie bei Brustkrebspatientinnen unter Misteltherapie. Auf eine mistelbedingte verbesserte Verträglichkeit der Chemotherapie weisen auch Friedel et al. (2009), Matthes et al. (2010), Schumacher et al. (2003) und Semiglasov et al. (2004) hin. In der systemischen Übersichtsarbeit von Kienle et al. (2010) zeigt sich neben einer Verbesserung der Lebensqualität auch ein besseres psychosomatisches Wohlbefinden sowie eine Linderung von Nebenwirkungen wie Erbrechen, Übelkeit und Fatigue. In einer von Werner et al. (2011) durchgeführten multizentrischen, kontrollierten Studie wurden Patienten, mit unterschiedlichen Krebserkrankungen, verschiedene Iscador®-Präparate verabreicht, wobei sich für alle verwendeten Präparate eine signifikante Verbesserung der tumorassoziierten Symptome beobachten ließ.

Neben zahlreichen Studien, welche die Lebensqualität und die Verträglichkeit von Mistelextrakten unter Misteltherapie untersuchen und auch belegen, gibt es ebenso viele Studien, welche mögliche Wechselwirkungen und Nebenwirkungen erforschen. Wechselwirkungen durch die Misteltherapie im Sinne einer Stimulation des Tumorwachstums oder einer Abschwächung von Chemotherapeutika und deren Therapieeffekt konnte bisher weder in vitro noch in vivo nachgewiesen werden (Burger et al. 2003; Burkhart et al. 2010; Kienle et al. 2006; Kleeberg et al. 2004; Maldacker 2006; Träger et al. 2013). Kelter et al. (2007) berichten in ihrer Studie über den Effekt verschiedener Helixor-Mistelextrakte und konnten im Rahmen von 38 humanen Zelllinien keine Proliferation und ebenfalls keine Wachstumsstimulation feststellen. Eine ähnlich Studie mit Iscador®-Präparaten wurde von Maier et al. (2002) durchgeführt. Eine Wachstumsstimulation oder Tumorproliferation war ebenfalls nicht nachweisbar. Auch der Therapieeffekt von Chemotherapeutika wird mistelbedingt nicht abgeschwächt

(Pelzer et al. 2018; Schad et al. 2018). Vielmehr zeigt sich eine synergetische antitumorale Wirkung zwischen den Chemotherapeutika und der Misteltherapie (Axtner et al. 2016; Grossarth-Maticcek et al. 2001; Tröger et al. 2013).

Nebenwirkungen sind wie Wechselwirkungen verschwindet gering und sind oftmals selbstlimitierend. Sie beschränken sich hauptsächlich auf grippeartige Symptome, wie Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Fieber und leichte gastrointestinale Beschwerden sowie auf lokale Reaktionen an der Injektionsstelle infolge einer gemischtzelligen Leukozyteninfiltration (Axtner et al. 2016; Eisenbraun et al. 2011; Kienle et al. 2016; Schöffski et al. 2004). Eine leichte Temperaturerhöhung und eine leichte lokale Reaktion signalisieren jedoch eine gewünschte Immunstimulation. In einer Studie von Bock et al. (2004) mit 1.442 Mammakarzinompatientinnen ergeben sich innerhalb der ME-Gruppe signifikant weniger therapiebedingte Nebenwirkungen als innerhalb der Kontrollgruppe ohne Misteltherapie (16% vs. 54%, $p < 0,001$). Lediglich 6 von 710 Patientinnen (0,8%) entwickelten leichte bis moderate systemische Nebenwirkungen und 123 Patientinnen zeigten lokale Reaktionen in Form von Schwellungen, Rötungen und Juckreiz. In einer randomisierten Phase-II-Studie von Bar-Sela (2011) ist bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom unter Misteltherapie zu beobachten, dass es deutlich seltener zu einer Dosisreduktion des Chemotherapeutikums kommt, da Nebenwirkungen nahezu ausbleiben. Auch im Zusammenhang mit einer Strahlentherapie konnten Wechselwirkungen und mistelinduzierte Nebenwirkungen nicht nachgewiesen werden (Kienle et al. 2016; Steele et al. 2014a). Somit erweist sich eine Misteltherapie als insgesamt sicher und gut verträglich. Laut Heinzerling et al. (2006) beruht dabei das Verschwinden von Nebenwirkungen auf der mistelbedingten Aktivierung von Monozyten, welche aus einer Aktivierung von CD14 resultiert. Eine Aktivierung von Monozyten aktiviert wiederum das unspezifische Immunsystem und ist so möglicherweise für die Verringerung von Nebenwirkungen ursächlich.

Im Rahmen einer Vielzahl von kasuistischen und retrospektiven Untersuchungen zeigt sich insgesamt eine mistelbedingte positive Auswirkung auf das Gesamtüberleben, wobei sich die beste Evidenz bisher für epidemiologische Untersuchungen nachweisen lässt (Bock et al. 2004; Grossarth-Maticcek et al. 2006; Konrad et al. 2006; Ostermann et al. 2009; Semiglazov et al. 2006; Werner et al. 2011; Ziegler et al. 2010). 2009 wurden 11 Kohortenstudien, 19 randomisierte klinische Studien und 16 nicht-randomisierte klinische Studien im Rahmen einer systematischen Übersichtsarbeit, unter anderem auf Tumoransprechen und Überleben, untersucht. Dabei ergibt sich für einen Großteil der Studien eine günstige Tendenz für das Gesamtüberleben (Kienle et al. 2009). Auch Grossarth-Maticcek et al. (2001) berichten über ein deutlich verlängertes Gesamtüberleben für Brustkrebspatientinnen unter Misteltherapie. Die mediane

Überlebenszeit für Frauen ohne zusätzliche Misteltherapie wird von den Autoren mit 2,3 Jahren und für Frauen mit Misteltherapie mit 6,2 Jahren angegeben. Die Gesamtüberlebenszeit hat sich somit nahezu verdreifacht. In einem aktuellen systemischen Bericht von Ostermann et al. (2020) schlussfolgern die Autoren ebenfalls, dass eine adjuvante Behandlung mittels Iscador® das Überleben von Krebspatienten verbessern kann. Insgesamt beobachten viele Studien eine positive Tendenz für ein verlängertes Gesamtüberleben, dennoch sind einige dieser Studien uneindeutig, nicht verblindet, qualitativ nicht ausreichend oder teilweise auch unvollständig, sodass die erzielten Ergebnisse nicht zuverlässig nachvollziehbar sind und einer Standardisierung bedürfen.

Publikationen zur Misteltherapie bei Pankreaskarzinompatienten sind limitiert, liefern bisher jedoch spektakuläre und signifikante Daten. So berichten Matthes et al. (2005) auch für Pankreaskarzinompatienten über eine verbesserte Lebensqualität unter einer Kombinationstherapie bestehend aus Gemcitabin und ME. Zudem war auch eine Tumorremission feststellbar. In einer weiteren Studie von Matthes et al. (2008) zeigt sich für Patienten mit inoperablem Stadium III/IV Pankreaskarzinom eine Äquivalenz zwischen der medianen Überlebenszeit unter einer Misteltherapie und unter einer Behandlung mit dem Chemotherapeutika FOLFIRINOX, mit 11,6 Monaten beziehungsweise 11,1 Monaten.

Demgegenüber ist in einer multizentrischen Beobachtungsstudie von Axtner et al. (2016) ,mit Stadium IV erkrankten Pankreaskarzinompatienten, ein deutlich verlängertes Gesamtüberleben unter Misteltherapie nachweisbar. Eine Kombinationstherapie, bestehend aus ME und Chemotherapie, verlängerte das Gesamtüberleben hier signifikant gegenüber der Gruppe mit alleiniger Chemotherapie von 7,3 Monate auf 12,1 Monate. Auch Tröger et al. (2013) stellten bei Patienten unter Misteltherapie, bei einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität, einen statistisch signifikanten Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens fest. Innerhalb der Mistelgruppe zeigt sich sogar eine Verdoppelung des medianen Überlebens (6,6 Monate vs. 3,2 Monate). In einer weiteren ähnlichen Studie von Tröger et al. (2014) ergab sich erneut ein statistisch signifikanter Vorteil für das Gesamtüberleben unter Misteltherapie. In der Studie von Tröger et al. (2013) lässt sich zudem eine gute Verträglichkeit der Misteltherapie nachweisen. Nebenwirkungen beschränken sich dabei auch hier hauptsächlich auf lokale Reizungen. Auch ist für einige krankheitsbedingte Symptome eine signifikante Reduzierung erkennbar, was letztendlich in eine bessere Lebensqualität resultiert. Das im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Pankreaskarzinomzelllinien-Experiment präsentiert seine höchsten Werte spezifischer Lyse ebenfalls für die ME stimulierten KHYG-1-Zellen

mit 173% und mit 166% für die ME stimulierten MOLT-4-Zellen. Dabei liegen die Werte der spezifischen Lyse, im Vergleich zu den Werten des äquivalent durchgeführten Experimentes mit der Brustkrebszelllinie MCF-7, hier etwas höher (Abbildung 4.0). Eine Signifikanz zwischen den ME stimulierten Zellgruppen liegt jedoch weder für die beiden KHYG-1-Zellengruppen ($p= 0,06$) noch für die beiden MOLT-4-Zellgruppen ($p= 0,13$) vor. Eine moderate Signifikanz zeigt sich allerdings innerhalb des Panc-1-Experimentes für die Mittelwerte der spezifischen Lyse-Werte zwischen unstimulierter und ME stimulierter KHYG-1-Zellen sowie für die Mittelwerte unstimulierter und IL-2 stimulierter KHYG-1-Zellen, mit einem p-Wert von jeweils 0,003. Eine moderate Signifikanz für die Mittelwerte zwischen IL-2 und ME stimulierter KHYG-1-Zellen ist ebenfalls erkennbar ($p= 0,009$) (Abbildung 4.1). Zwar sind die Parameter Lebensqualität und Gesamtüberleben weiterhin kein Bestandteil dieser Doktorarbeit, aufgrund der vorliegenden Werte der spezifischen Lyse und bestehender Literatur, liegt jedoch auch für die Panc-1-Zelllinie eine mögliche mistelbedingte Tumorregression und eine damit einhergehende verbesserte Lebensqualität und ein verlängertes Gesamtüberleben nahe. Aufgrund der limitierten Therapieansätze für das humane Pankreasadenokarzinom, welche grundsätzlich nur auf einer OP und einer adjuvanten Chemotherapie beruhen, stellt die Misteltherapie insbesondere für dieses Krankheitsbild einen aussichtsreichen Therapieansatz dar. Mit der Senkung krankheits- und therapiebedingter Nebenwirkungen, einer Erhöhung der Lebensqualität und auch einer möglichen Tumorregression, besitzt die Misteltherapie das Potenzial den schweren Verlauf einer bösartigen Pankreastumorerkrankung zu mildern und zu lindern.

Insgesamt zeigen die Studien über eine Misteltherapie jedoch verschiedene limitierende Faktoren. Im Rahmen der Bewertung der Lebensqualität verwenden einige Autoren keine umfangreiche, standardisierte Validierung, sondern eigens entwickelte Bewertungsparameter, weshalb sich insgesamt eine starke Inhomogenität bezüglich der Bewertung der Lebensqualität feststellen lässt. Auch unterscheiden sich oftmals der Beobachtungszeitraum, die Dosierung und auch die methodische Qualität der Studien stark. Ein weiterer schwerwiegender limitierender Faktor ist eine fehlende Verblindung der Studie. Ohne Verblindung ist ein Placebo-Effekt oder eine verstärkte Aufmerksamkeit auf Beschwerden innerhalb der Behandlungsgruppe nicht auszuschließen. Zudem verzichteten einige Autoren auf eine Placebo-Kontrollgruppe. Andere limitierende Faktoren ergeben sich grundsätzlich durch die teilweise sehr geringe Patientenzahl und durch die teilweise ungenauen Formulierungen der Autoren. So geben einige Autoren eine Gesamtzahl für beobachtete Nebenwirkungen an, differenzieren aber nicht exakt wie viele davon jeweils in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen aufgetreten sind. In Studien bezüglich der vergleichweisen

Toxizität von Chemotherapien fehlen teilweise die Angaben über einen Signifikanztest oder p-Werte. Auch werden die Wechselwirkungen zum Teil nicht genau spezifiziert und auch hier erweist sich die Datenlage als insgesamt heterogen. Zukünftige Studien sollten somit qualitativ hochwertig und in ihren Angaben präziser sein. Auch empfiehlt sich eine größere Patientenanzahl, eine Dosis-Standardisierung und ein placebo-kontrolliertes, verblindetes Studiendesign.

Als limitierende Faktoren innerhalb der vorliegenden Doktorarbeit sind hauptsächlich methodische Fehler, wie Pipettierfehler und Messfehler zu nennen. Der Aufbau der Experimente war grundsätzlich immer derselbe und sollte somit reproduzierbar sein. Auch die verwendeten Zellen beziehungsweise Zelllinien, die benötigte Zellzahl sowie verwendete Medien, Stimulanzen und Dosierungen blieben innerhalb der verschiedenen Experimente einheitlich. Für die Ergebnisse der spezifischen Lyse dienten jeweils die unstimulierten Zellgruppen und für die Durchflusszytometrie die Isotypen als Positivkontrolle.

Jedoch unterscheidet sich die Anzahl unabhängiger Experimente. Für einen exakteren Vergleich würde sich eine identische Anzahl anbieten. Zudem würden sich weitere Versuche mit unterschiedlichen Iscador®-Dosierungen empfehlen, um zu zeigen ob der mistelinduzierte Effekt dosisabhängig verstärkt beziehungsweise geschwächt werden kann oder ob sich unter unterschiedlichen Dosierungen weitere beziehungsweise reverse Effekte zeigen.

Die Misteltherapie bietet einen vielversprechenden Ansatz als potenzielle adjuvante Therapiemöglichkeit. Im deutschsprachigen Raum werden derzeit bei etwa 40%-50% der humanmedizinischen Tumorpatienten komplementärmedizinische Krebstherapien angewandt, wobei *Viscum album L.* das am meisten verwendete Mittel darstellt (Schwabe et al. 2004). Melzer et al. (2009) geben die Prävalenz adjuvanter Misteltherapien zur Basistherapie von Tumoren sogar mit 29% bis 77% an. Mammatumore sind die am häufigsten auftretenden Tumore der Frau und stellen somit einen Routinefall in der Praxis dar (Eucker et al. 2018; Schem et al. 2019). Auch das Pankreaskarzinom, als die vierthäufigste Tumorerkrankung mit tödlichem Ausgang, kommt somit zwar verhältnismäßig seltener vor, stellt aber aufgrund der sehr ungünstigen Prognose sowohl Ärzte als auch Patienten vor eine große Herausforderung (Oettle 2018; Robert-Koch-Institut 2017a). Der therapeutische Standard für beide Tumorarten beruht dabei auf der chirurgischen Entfernung (Deutsche Krebsgesellschaft 2018; Stratmann et al. 2008). Weitere konventionelle Therapieansätze bilden die Chemo- und die Strahlentherapie. Trotz verschiedenster therapeutischer Ansätze sterben auch heute noch pro Jahr ca. 18.000 Brustkrebspatientinnen und nahezu alle

Pankreaskarzinompatienten (Robert-Koch-Institut 2017a; Schem et al. 2019). Folglich bedarf es dringend weiterer therapeutischer Alternativen und Ansätze. Eine solche Alternative bietet möglicherweise die komplementäre Misteltherapie als sogenannter „biological response modifier“ im Rahmen der Immuntherapie.

Die konventionellen onkologischen Therapieansätze, wie Chemotherapie und Strahlentherapie, sind oftmals mit starken Nebenwirkungen und einer damit einhergehenden Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Demgegenüber steht die Misteltherapie, die in zahlreichen Studien als gut verträglich und sicher beschrieben wird. Nebenwirkungen sind oftmals selbstlimitierend, beschränken sich meistens auf eine lokale Reizung der Injektionsstelle und eine leicht erhöhte Körpertemperatur (Axtner et al. 2016; Bock et al. 2004). Zudem reduziert die Mistel tumor- und therapiebedingte Nebenwirkungen und trägt somit zur besseren Verträglichkeit von Chemo- und Strahlentherapie bei (Bock et al. 2014; Marvibaigi et al. 2014). Auch ist eine Limitation aufgrund der Lage des Tumors, wie sie des Öfteren für eine Bestrahlungstherapie vorliegt, für eine Misteltherapie nicht gegeben. Außerdem wird auch tumorumgebendes Gewebe nicht zusätzlich beschädigt, wie es im Zuge einer Bestrahlung durchaus vorkommen kann. Wie auch Chemotherapeutika sind Mistelextrakte nicht zielgerichtet, beschädigen aber im Gegensatz zu den herkömmlichen Zytostatika keine gesunden somatischen Zellen, womit wiederum eine verbesserte Lebensqualität und weniger Nebenwirkungen einhergehen. Auch andere medikamentöse Ansätze wie Hormonpräparate, wie sie häufig zur Behandlung des humanen Mammakarzinoms eingesetzt werden, stellen einen Eingriff in den Hormonhaushalt dar und erhöhen beispielsweise das Risiko für andere Erkrankungen wie Osteoporose.

Die meist subkutane Applikation der Mistelpräparate ermöglicht zudem eine einfache Handhabung ohne viel Aufwand (Rippe 2017). Auch andere Applikationsarten wie intramuskulär, oral und intratumoral sind bereits beschrieben wurden und ermöglichen somit ein breiteres Anwendungsspektrum (Beuth et al. 2006; Drees et al. 1996). Demgegenüber stehen beispielsweise der hohe apparative Aufwand einer Strahlentherapie und die Sicherheitsmaßnahmen, welche während der Applikation von Zytostatika eingehalten werden müssen, damit die verabreichende Person nicht selbst in Kontakt mit dem Präparat kommt und Schäden davonträgt, da einige Zytostatika sowohl mutagene als auch kanzerogene Eigenschaften aufweisen. Eine krebsauslösende Gefahr besteht zudem auch unter langfristiger Strahlentherapie. Wechselwirkungen im Sinne einer Tumorproliferation konnten unter Misteltherapie jedoch bisher weder in vitro noch in vivo nachgewiesen werden (Burger et al. 2003; Kelter et al. 2007). Infolge aller mistelbedingten Effekte verbessert sich laut zahlreicher Studien letztendlich auch die Lebensqualität und das Gesamtüberleben (Semiglazov et

al. 2006; Tröger et al. 2014). Neben der Misteltherapie als Bestandteil der Immunonkologie gibt es in diesem Bereich noch weitere aussichtsreiche Ansätze, wie beispielsweise monoklonale Antikörper gegen immunabschwächende Proteine, wie PD-1 und CTLA-4, wobei die Blockade beider Proteine in eine starke Aktivierung des Immunsystems und in die Auslösung antitumorale Effekte resultiert. Auch andere immunologische Therapieansätze, wie CAR-T-Zellen und BiTE, stellen mögliche Therapieansätze dar (Bröker et al. 2019; Shi et al. 2019). In einer Studie von Weissenstein et al. (2016) wurde Brustkrebspatientinnen der monoklonale Antikörper Trastuzumab gemeinsam mit einem Mistelpräparat verabreicht, was in eine synergistische antitumorale Wirkung resultierte. Eine mistelbedingte Abschwächung des Antikörpers war dementsprechend nicht feststellbar. Somit stellt die Mistel nicht nur eine adjuvante Alternative zu den konventionellen Therapieansätzen dar, sondern auch für moderne Ansätze im Bereich der Immunonkologie.

Ein anderer onkologischer Therapieansatz beruht auf den Mechanismen der Zellmigration, dem damit einhergehenden Potenzial Metastasen zu bilden und deren möglichen Beeinflussung und Unterdrückung. Sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin, sterben Krebspatienten nicht an ihrem Primärtumor, sondern an den sich später entwickelnden Metastasen. Ein Hauptziel der Tumorbehandlung besteht somit in der Hemmung der Zellmigration, wodurch eine Progression der Erkrankung verzögert oder sogar verhindert werden könnte (Zänker 1997). Auch hier zeigen sich in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse mit Mistelpräparaten. Eine aktuelle Studie von Felenda et al. (2019) bestätigt jenen migrationshemmenden/antiproliferativen Einfluss von Iscucin[®]M auf verschiedene humane Tumorzelllinien. Die Migration von Tumorzellen kann somit mittels Mistelextrakt möglicherweise reduziert beziehungsweise vermieden und die Bildung von Metastasen und das Fortschreiten der Krankheit potenziell hinausgezögert werden. Der genaue zugrunde liegende Mechanismus ist nicht bekannt. Eine Annahme beruht jedoch darauf, dass das in den verschiedenen Iscador[®]-Präparaten enthaltene ML-1 promigratorische Substanzen hemmt, indem ML-1 einen Komplex mit diesen bildet und so zu deren Inaktivierung führt. Da promigratorische Substanzen auch mit einer Veränderung der Genexpression einhergehen und ML-1 durch Inaktivierung der ribosomalen Untereinheit diese blockieren kann, ist auch ein solcher Mechanismus in Betracht zu ziehen (Hong et al. 2012). Aber auch Viscotoxine zeigen immunogenetische Effekte und sollten deshalb bei der Erklärung des zugrunde liegenden Mechanismus ebenfalls mit in Betracht gezogen werden (Schaller et al. 1996; Tabiasco et al. 2002).

Einen anderen tendenziell vielversprechenden therapeutischen Ansatz könnte eine Kombinationstherapie bestehend aus Mistelextrakt und COX-2-Inhibitoren bieten. Das

durch das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) synthetisierte Prostaglandin-E2 regt die Bildung des sogenannten vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors an und fördert somit die Angiogenese des Tumors. Angiogenese ist für das Wachstum und die Metastasierung solider Tumore essenziell und korreliert beispielsweise mit der Prognose für humane und kanine Mammakarzinome (Lavalle et al. 2009). In ca. 40% aller humaner Brustkrebskarzinome ist die Expression von COX-2 erhöht. Physiologischerweise ist COX-2 im Brustepithelium jedoch nicht präsent und steigt erst im Falle eines prämaligen Brustkrebsstadiums an (Regulski et al. 2016). Auch für einige Pankreaskarzinome konnte die Expression von COX-2 bereits nachgewiesen werden (Ding et al. 2000; Eibl et al. 2005). Daraus schließend könnte COX-2 entscheidend für das Tumorwachstum sein und COX-2-Inhibitoren somit ein aussichtsreicher Therapieansatz in der Behandlung verschiedener Tumorarten (Lavalle et al. 2009; Regulski et al. 2016). Wie auch für COX-2-Inhibitoren konnten antiangiogene Effekte ebenfalls bereits für Mistellektine beobachtet werden (Hajto et al. 1990).

Des Weiteren induzieren COX-2-Inhibitoren, ebenso wie Mistelextrakte, eine Apoptose, weisen antiproliferative Effekte auf und besitzen die Fähigkeit das Immunsystem zu verstärken (Regulski et al. 2016). Eine synergetische Wirkung beider Präparate gegen verschiedenste Tumorarten ist somit durchaus denkbar und sollte in zukünftigen Studien verfolgt und untersucht werden.

Aufgrund der belegten antiproliferativen und antitumoralen Eigenschaften von Mistelextrakten auf zahlreiche Tumorzelllinien, sollten diese ebenfalls weiterhin als vielversprechender onkologischer Therapieansatz berücksichtigt und erforscht werden (Burger et al. 2003; Maier et al. 2002).

Mithilfe bereits bestehender Literatur und der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, lässt sich die Misteltherapie als mögliche erfolgversprechende, effektive und gut verträgliche ergänzende Therapiemöglichkeit in der Bekämpfung von Krebserkrankungen einstufen. Insbesondere im Rahmen fortgeschrittener Tumorerkrankungen sollte sie aufgrund ihrer Lebensqualität verbessernden, Nebenwirkungen senkenden und Gesamtüberleben verlängerten Eigenschaften, verstärkt Anwendung finden.

Als Alternative soll sie bestehende und bewerte Therapieverfahren wie die Chemotherapie und die Strahlentherapie nicht ersetzen, sondern soll diese unterstützen und im Falle, dass der Einsatz konventioneller Therapieverfahren aufgrund fortgeschrittener Krankheit nicht mehr möglich oder vertretbar ist, als sichere und verträgliche Alternative dienen. *Viscum album* stellt somit durchaus eine adjuvante onkologische Therapieoption bei der Behandlung von humanen Mamma- und Pankreaskarzinomen dar.

Wie bereits erwähnt, werden im deutschsprachigen Raum derzeit bei etwa 40%-50% der humanmedizinischen Tumorpatienten komplementärmedizinische Krebstherapien angewandt, wobei *Viscum album L.* das am meisten verwendete Mittel darstellt (Schwabe et al. 2004). In der Veterinärmedizin spielt die Misteltherapie, als adjuvante Therapieoption, bisher nur eine untergeordnete Rolle, gewinnt aber auch hier vermehrt an Bedeutung (Biegel et al. 2017; Spadiut 2001). Im Vergleich zur Humanmedizin sind veterinärmedizinische wissenschaftliche Erkenntnisse über die Chirurgie unterstützende Therapieansätze wie Strahlen-, Chemo-, Hormon- und Immuntherapie, stark limitiert. So sind veterinärmedizinische Erkenntnisse über die Mistel als adjuvante Therapieoption rar. Eine 1999 gegründete tierärztliche Forschungsgruppe (Viscum-Vet-Group) beschäftigt sich jedoch seitdem mit der Mistel und ihrer Wirkung als Immuntherapeutikum für den veterinärmedizinischen Bereich. Dabei liegen ihre Forschungsschwerpunkte insbesondere auf kanine Mammatumore, auf kanine orale Melanome, auf feline Fibrosarkome und auf Equine Sarkoide. Zwar beschränkt sich die aktuelle Datenlage auf wenige Studien zu den genannten vier Tumorarten, jedoch zeigen diese vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Tumorregression, des rezidivfreien Intervalls, des Sterberisikos, der Gesamtüberlebenszeit, der Lebensqualität und der Verträglichkeit (Biegel et al. 2011; Biegel et al. 2017; Christen-Clottu et al. 2010; von Bodungen et al. 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich speziell auf das kanine Mamma- und Pankreaskarzinom festgelegt. Veterinärmedizinische Literatur ist grundsätzlich spärlich, wobei kanine Tumorerkrankungen vergleichsweise jedoch am besten erforscht sind. Zudem treten die thematisierten Tumorarten spezievergleichend am häufigsten in Hunden auf. Die wenigen vorhandenen Studien über adjuvante postoperative Therapieansätze bei der Behandlung von kaninen Mammatumoren berichten jedoch weitgehend über erfolgversprechende Ergebnisse. So zeigt eine aktuelle Studie erstmalig die Wirkung von Mistel als adjuvante postoperative Behandlungsoption bei kaninen Mammatumoren (Biegel et al. 2017). Es handelt sich dabei um eine kontrollierte Studie mit einer prospektiven Behandlungsgruppe (ME) und einer retrospektiven Kontrollgruppe (KON). Erfasst wurden hierbei die Gesamtüberlebenszeit, das Sterberisiko, die Lebensqualität und die Verträglichkeit. So ergab sich für die ME-Gruppe ein um 53% verringertes Gesamtsterberisiko gegenüber der KON-Gruppe, welches mit einem p-Wert von 0,15 jedoch statistisch nicht signifikant ist. Als Tendenz belegbar war dagegen das tumorbedingte Sterberisiko. Dieses wurde in der ME-Gruppe, im Vergleich zur KON-Gruppe, auf 25% gesenkt ($p = 0,07$). Eine mögliche Ursache für das in der ME-Gruppe verringerte Sterberisiko könnte eine durch Mistelextrakt erhöhte spezifische Lyse der kaninen Mammatumorzelllinie sein, welche

im Rahmen dieser Arbeit gegenüber der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 demonstriert werden konnte (Abbildung 3.0). Aufgrund der ausgewählten Methodik konnte die Lebensqualität, als entscheidender Faktor sowohl in der Human- als auch insbesondere in der Veterinärmedizin, nur innerhalb der prospektiven Therapiegruppe erhoben werden. Bezogen wurde sich dabei auf vier ausgewählte Parameter, deren Entwicklung über die gesamte Behandlungsdauer kontinuierlich und subjektiv von den Hundebesitzern dokumentiert wurde. Aufgrund des hohen Niveaus der Lebensqualität wurde auf eine gute Verträglichkeit des hier verwendeten Mistelextraktes Iscador® P geschlossen, über Nebenwirkungen wurde nicht berichtet. Eine direkt vergleichbare Studie über die Misteltherapie bei kaninen Mammatumoren liegt bisher nicht vor.

Trotz der erheblichen Bedeutung der Aufrechterhaltung einer hohen Lebensqualität, insbesondere in der veterinärmedizinischen Onkologie, sind auch dazu Studienlagen rar. Jedoch zeigen humanmedizinische Studien zur Misteltherapie bei Tumorerkrankungen, auch speziell für Mammakarzinome, teilweise eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität und der Gesamtüberlebenszeit (Beuth et al. 2008; Bock et al. 2004; Grossarth-Maticek et al. 2001; Kienle et al. 2010; Ostermann et al. 2009; Werner et al. 2011; Ziegler et al. 2010). So berichten Schumacher et al. (2003) in einer multizentrischen, retrolektiven Kohorten-Studie mit 689 Brustkrebspatientinnen, über eine Verbesserung der Lebensqualität unter Misteltherapie. Auch in dem von Kienle et al. (2007) veröffentlichten systematischen Bericht über prospektive klinische Studien über anthroposophische Mistelextrakte, lässt sich ein vorteilhafter Effekt von Mistelextrakten bezüglich der Lebensqualität beobachten.

Kritisch, in der von Biegel et al. (2017) veröffentlichten Studie zu betrachten, ist die verwendete visuelle Analogskala zur Beurteilung der Lebensqualität der Hunde durch die Tierhalter. Im Gegensatz zur Humanmedizin fehlen in der Veterinärmedizin grundsätzlich allgemein anerkannte und verlässliche Erfassungsmethoden zur Validierung der Lebensqualität von Hunden und Katzen unter adjuvanter Therapie bei Krebserkrankungen (Giuffrida et al. 2014). Trotz einer Patientenzahl von 56, welche damit gegenüber anderen Studien, (Arenas et al. 2016; Simon et al. 2006; Tran et al. 2016) im oberen Bereich der Patientenzahl liegt, empfiehlt sich eine höhere Patientenzahl. Zwar ist die hier vorliegende Darstellung des Studiendesigns nicht optimal, dennoch ist es methodisch vergleichsweise zu aktuell publizierter Literatur ähnlich. Optimalerweise sollte mit einer unbehandelten Kontrollgruppe gearbeitet werden. Allerdings erweisen sich placebo-kontrollierte Studien bei malignen Tumorerkrankungen aufgrund mangelnder Compliance seitens der Tierhalter als kaum durchführbar (Biegel et al. 2017). Auch im Bereich der Humanmedizin sind nicht-placebo-kontrollierte Studien nicht unüblich. So ist es häufig der Fall, dass neue

Therapieformen mit bereits bestehenden Therapieformen verglichen werden (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2012; Munzone et al. 2015). Das hier angegebene Sterberisiko wird auch in humanmedizinischen Studien üblicherweise angegeben, fehlt aber häufig in veterinärmedizinischen Studien und bedarf somit ebenfalls einer Standardisierung. Lediglich zwei weitere Studien, die ebenfalls adjuvante postoperative Therapiemethoden für kanine Mammatumoren untersuchten, machten Angaben zum Sterberisiko (Arenas et al. 2016; Kristiansen et al. 2016).

Bisher veröffentlichte Studien zu adjuvanten postoperativen Therapieoptionen beschränken sich speziell für kanine Mammakarzinome auf den Ansatz der Chemotherapie. Karayannopoulou et al. (2001) berichten beispielsweise in ihrer Studie, dass die adjuvante postoperative Chemotherapie bei kaninen Mammatumoren mit 5-FU und Cyclophosphamid gegenüber der alleinigen chirurgischen Therapie einen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit und auch auf das krankheitsfreie Intervall hat ($p < 0,05$). Simon et al. (2006) und auch Tran et al. (2016) wiederum konnten in ihren Studien keinen Vorteil einer postoperativen Chemotherapie gegenüber alleiniger chirurgischer Therapie erkennen. Demgegenüber stehen die beiden Studien von Nunes et al. (2019) und De Campos et al. (2018). Beide Studien stellten für Hündinnen unter postoperativer Chemotherapie eine deutlich verlängerte Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu denen ohne weitere adjuvante Therapie fest.

Ein anderer medikamentöser Therapieansatz wie beispielsweise die Hormontherapie, die in der Humanmedizin erfolgreich mit Antiöstrogenen praktiziert wird, scheint aufgrund massiver Nebenwirkungen beim Hund kein erfolgversprechender Therapieansatz zu sein (Morris et al. 1993; Morris et al. 1998; Tavares et al. 2010). Als weiterer Therapieansatz könnten beispielsweise Cyclooxygenase-2-Inhibitoren (COX-2) auch im veterinärmedizinischen Bereich dienen und eine verfolgenswerte Behandlungsoption darstellen. So berichten Arenas et al. (2016) in ihrer Studie, dass Hunde mit hochmalignen Mammatumoren unter Therapie mit Firocoxib einen signifikanten Vorteil bezüglich des krankheitsfreien Überlebens und der Gesamtüberlebenszeit präsentieren, im Vergleich zu denjenigen Hunden ohne adjuvante Therapie. Auch Nunes et al. (2019) stellen nach paralleler Chemotherapie und Therapie mit Firocoxib einen deutlichen Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens gegenüber den anderen Studiengruppen fest. COX-2 kommt in einer Vielzahl von Tumorzellen vor, unter anderem in Mammakarzinomen, was Lavalley et al. (2009) in ihrer Arbeit immunhistochemisch beweisen konnten. Des Weiteren weisen Lavalley et al. (2009) in ihrer Studie nach, dass eine erhöhte COX-2-Expression und Mikrogefäßdichte des Tumors mit einer schlechteren Prognose und Gesamtüberlebenszeit einhergehen. Eine weitere typische adjuvante Therapieoption von Mammatumoren in der Humanmedizin ist die Bestrahlung.

In der Veterinärmedizin ist dieses Verfahren für kanine Mammatumoren bisher nicht evaluiert und scheint für metastasierte Formen wenig sinnvoll, da Fernmetastasen nicht erreicht werden (Sleeckx et al. 2011b). Eine Studienlage zu einer Bestrahlungstherapie mit gemeinsamer oder anschließender Misteltherapie ist in der Veterinärmedizin nahezu nicht vorhanden. Lediglich von Bodungen et al. (2017) untersuchten die Wirkung einer kombinierten Strahlentherapie mit adjuvanter Misteltherapie auf das orale maligne Melanom und zeigen dabei einen positiven Effekt auf die Gesamtüberlebenszeit. Zudem beschreiben sie den Einsatz von Mistelextrakt als sichere und nebenwirkungsarme Behandlungsoption. Die Studienpopulationen sind jedoch verhältnismäßig klein und heterogen und nicht alle prognostischen Parameter sind beständig. Für weitere Studien empfehlen sich somit größere Gruppen, eine standardisierte Validierung und ein prospektives Studiendesign.

Die Datenlage zu adjuvanten postoperativen Therapiemöglichkeiten bei kaninen Pankreasadenokarzinomen ist noch geringfügiger als die zu kaninen Mammatumoren und beschränkt sich nahezu ausschließlich auf einen chemotherapeutischen Ansatz. Studien über den postoperativen Einsatz von Mistelextrakten bei kaninen Pankreastumoren liegen bisher nicht vor. Im Falle eines chemotherapeutischen Therapieversuches ist Gemcitabin das Mittel der Wahl. Martinez-Ruzafa et al. (2009) erzielten in ihrer Studie mittels Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Carboplatin, nach einer Verabreichung über sechs Zyklen, bei einer von drei Katzen eine komplette Remission des Pankreaskarzinoms. Einen weiteren Ansatz beschreibt Althaus (2010) mit dem Einsatz von 5-FU und Paclitaxel. Aber auch diese Therapieversuche beschränken sich bis dato nur auf Einzelberichte und sind nicht kliniktauglich. Einen Goldstandard für die Behandlung des kaninen exokrinen Pankreaskarzinoms gibt es bis heute nicht (Paoloni et al. 2007). Grundsätzlich existiert für das fortgeschrittene kanine exokrine Pankreaskarzinom derzeit keine erfolgversprechende heilende Behandlung (Bennett et al. 2001). Ein weiterer aktuell diskutierter Ansatz ist der intrakavitäre Einsatz von Cisplatin/Carboplatin beim Hund beziehungsweise Carboplatin bei der Katze (Kessler 2013). Insgesamt gilt das Pankreasadenokarzinom als sehr chemotherapieresistent und trägt so zu dessen äußerst schlechten Prognose bei, weshalb insbesondere für dieses Krankheitsbild weitere adjuvante Therapieansätze dringend notwendig sind (Ghaneh et al. 2007). Das im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte humane Pankreaskarzinomzelllinien-Experiment erzielt seine höchsten Werte spezifischer Lyse für die ME stimulierten Effektorzellen. Ein äquivalentes Ergebnis für eine kanine Pankreaskarzinomzelllinie ist durchaus denkbar. So berichten humanmedizinische Studien für Pankreaskarzinompatienten unter Misteltherapie, über eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität, eine Verlängerung der

Gesamtüberlebenszeit und vereinzelt sogar über eine Tumorregression, welche sich möglicherweise auf eine mistelinduzierte erhöhte spezifische Lyse der Tumorzellen zurückführen lassen kann (Axtner et al. 2016; Schad et al. 2014; Tröger et al. 2013).

Neben der Mistel als Immuntherapie gibt es im Rahmen der humanmedizinischen Tumoronkologie noch weitere immunologische Ansätze, wie beispielsweise der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen die Immunsystem abschwächenden Proteine PD-1 und CTLA-4, durch dessen Blockade eine starke Aktivierung des Immunsystems und antitumorale Effekte ausgelöst werden (Bröker et al. 2019; Shi et al. 2019). Grundsätzlich können alle immuntherapeutischen Ansätze aus der Humanmedizin auch im veterinärmedizinischen Bereich angewandt werden, zumal nahezu alle Ansätze bereits im Laufe ihrer Forschung an Tiermodellen getestet werden. Ein großer limitierender Faktor für die Kleintiermedizin ist hierbei jedoch vor allem der finanzielle Faktor, da immuntherapeutische Präparate nicht selten sehr teuer sind. Auch stellt sich hier wieder die Frage nach der Akzeptanz durch die Tierbesitzer. Die Immunonkologie ist ein moderner erfolgversprechender Ansatz, mit der Notwendigkeit für weitere Langzeitstudien, um so konkrete Aussagen über den therapeutischen Erfolg und kurz- und langfristige Nebenwirkungen treffen zu können. Ein anderer onkologischer Therapieansatz beruht auch in der Veterinärmedizin auf den Mechanismen der Zellmigration. Auch hier lassen sich in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse mit ME feststellen. So zeigt Hugo (2006) in ihrer Dissertation, in welcher das Migrationsverhalten der kaninen Mammakarzinomzelllinie CMT-U-27 erstmals unter Zugabe von Iscador® M untersucht wurde, das Iscador® M hemmend auf promigratorische Substanzen wirkt und somit möglicherweise die Migration von Tumorzellen reduzieren beziehungsweise vermeiden und damit die Bildung von Metastasen und das Fortschreiten der Krankheit gegebenenfalls hinauszögern kann. Ihre Ergebnisse sind damit äquivalent zu denen der humanmedizinische Studie von Felenda et al. (2019). Beide Studien dienen somit als direkter Beweis für die antimigratorischen, antitumoralen und antiangiogenen Effekte der Mistel und bestätigen den Nutzen weiterführender Studien über die Misteltherapie als alternative onkologische Therapieoption. Auch im Rahmen der Veterinärmedizin sollte der antiangiogene Ansatz der COX-2-Inhibitoren gemeinsam mit einer Misteltherapie verfolgt und untersucht werden. Für beide Substanzen liegen jeweils vielversprechende Studien, auch innerhalb der Veterinärmedizin vor, sodass eine synergetische antitumorale Wirkung beider Präparate auch im Tier durchaus denkbar ist.

Der Einsatz von Mistelpräparaten bei Tumorerkrankungen in Deutschland beschränkt sich bisher hauptsächlich auf den humanmedizinischen Bereich (Schwabe et al. 2004). Für den veterinärmedizinischen Bereich zeigt sich jedoch eine Tendenz zum vermehrten Einsatz und findet hier, entweder als Monotherapie oder als Chemotherapie ergänzende Therapie, Anwendung (Christen-Clottu et al. 2010; Lefebvre et al. 2007). Der Einsatz einer Misteltherapie in der tierärztlichen Kleintierpraxis würde einige Vorteile bieten. So erfolgt die Applikation per subkutaner Injektion, ist somit zeitsparend und leicht anwendbar. Bisher durchgeführte Studien weisen eine gute Verträglichkeit und nur leichte Nebenwirkungen auf, bei denen es sich meist um selbstlimitierendes leichtes Fieber und Hautreaktionen handelt (Biegel et al. 2013; Biegel et al. 2017; Glardon et al. 2014). Eine humanmedizinische Übersichtsarbeit gibt die, mit einer subkutanen Mistelinjektion einhergehenden lokalen Nebenwirkungen mit 15,9% und systemische Nebenwirkungen mit 1,6% an (Melzer et al. 2009). Im Gegensatz dazu weisen andere Therapieansätze wie Chemotherapie und Strahlentherapie schwerwiegende Nebenwirkungen auf, wie zum Beispiel Übelkeit, Erbrechen, Fellverlust und Appetitlosigkeit. Auch ist bisher nicht erforscht, inwieweit der Kontakt mit einem chemotherapeutisch behandelten Hund eine Gefahr für den Tierbesitzer darstellt. Jedoch sind strenge Maßnahmen zur Verhinderung eines direkten Kontaktes mit Chemotherapeutika Bestandteil der Guten klinischen Praxis (GCP). Im Falle einer versehentlichen Selbstinjektion eines Mistelextraktes, oder einem versehentlichen Kontakt mit einer verwendeten Kanüle, geht mistelbedingt ein sehr geringes bis kein Risiko einher. Weiterhin sind die therapeutischen Möglichkeiten bei Tumorerkrankungen von Kleintieren grundsätzlich stark eingeschränkt und belaufen sich, wenn möglich, auf einen operativen Eingriff. Oftmals scheuen Tierbesitzer den anschließenden Einsatz von Chemotherapeutika, da diese mit bereits genannten nicht unerheblichen Nebenwirkungen einhergehen. Aufgrund des hohen apparativen Aufwandes und der Tatsache, dass nur wenige Kliniken eine Bestrahlungstherapie anbieten können, stellt auch diese nur eine stark eingeschränkte Therapieoption dar. Zusätzlich müssen die Tiere für jede Sitzung in Narkose gelegt werden, was sowohl Stress für das Tier als auch für den Besitzer bedeutet. All dies kann zur Folge haben, dass nach Entfernung des Primärtumors eine Wiedervorstellung des Tieres erst erfolgt, wenn dieses Metastasen, Rezidive oder ein reduziertes Allgemeinbefinden aufweist. Die dann zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten sind noch eingeschränkter und gehen oftmals mit dem natürlichen Tod, oder die durch den Tierarzt durchgeführte Euthanasie des Tieres, einher. Aufgrund der je nach Tumorart eingeschränkten Chemo- und Radiotherapie werden Mistelpräparate in Form einer Monotherapie oder in Form einer Kombinationstherapie mit paralleler Chemotherapie, wie es bereits in der Humanmedizin

üblich ist, verabreicht. Sobald es der Zustand des Patienten erlaubt, sollte postoperativ mit einer adjuvanten Misteltherapie begonnen werden. Da kanine Mammatumore die bei unkastrierten Hündinnen die am häufigsten vorkommenden Tumore sind, erweisen sich diese in der Kleintierpraxis als ein sehr häufig auftretendes Krankheitsbild. Auch hier gilt der chirurgische Eingriff als therapeutisches Standardverfahren. Ein postoperatives anschließendes erfolgversprechendes Chemotherapieprotokoll gibt es auch für dieses Krankheitsbild bisher leider nicht. Kanine Pankreaskarzinome treten im Gegensatz dazu selten auf, sind dafür aber nahezu ausnahmslos infaust und bedürfen aufgrund dessen dringend weiterer therapeutischer Ansätze. Aufgrund ihrer Lebensqualität aufrechterhaltenden und Nebenwirkungen senkenden Eigenschaften, kommt der Misteltherapie insbesondere bezüglich des schwer verlaufenden Pankreaskarzinoms eine essenzielle Bedeutung zu. So wird beispielsweise in der Tierklinik Spadiut, Graz, seit ca. 30 Jahren neben chirurgischen Maßnahmen ausschließlich mit Mistelpräparaten behandelt und das mit gutem Erfolg und sehr guten Erfahrungen (Spadiut 2001). Zudem zeigen zahlreiche humanmedizinische Studien über ME und dessen Wirkung, sowohl auf Mamma-, als auch auf Pankreaskarzinome, vielversprechende Ergebnisse, welche sich durchaus auf den veterinärmedizinischen Patienten übertragen lassen könnten. Basierend, auf den in dieser Arbeit durchgeführten in vitro Versuchen, zusammen mit der in dieser Arbeit vorgestellten bestehenden veterinär- und insbesondere humanmedizinischen Literatur, erweist sich die Misteltherapie, wie auch beim humanmedizinischen Krebspatienten, beim veterinärmedizinischen Krebspatienten ebenfalls als eine potenzielle aussichtsreiche, in Betracht zu ziehende Behandlungsalternative. Auch in der Veterinärmedizin soll die Misteltherapie als Alternative bestehende und bewerte Therapieverfahren wie die operative Entfernung, die Chemotherapie und die Strahlentherapie nicht ersetzen, sondern soll diese unterstützen und im Falle, dass der Einsatz konventioneller Therapieverfahren aufgrund fortgeschrittener Krankheit nicht mehr möglich oder vertretbar ist, als sichere und gut verträgliche Alternative dienen. Somit stellt *Viscum album* auch für die Veterinärmedizin eine mögliche adjuvante onkologische Therapieoption dar.

V. Zusammenfassung

***Viscum album* als adjuvante onkologische Therapieoption bei der Behandlung von humanen Mamma- und Pankreaskarzinomen**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden in vitro Studien zu der zytotoxischen Wirkung von *Viscum album*-stimulierten Effektorzellen auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1, durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer möglichen immunstimulierenden Wirkung auf verschiedene Effektorzelllinien und einer möglichen zytotoxischen Wirkung auf zwei humane Krebszelllinien durch das Mistelextrakt Iscador® M.

Hierfür dienten die NK-Leukämie-Zelllinie KHYG-1, die T-lymphoblastische Leukämie-Zelllinie MOLT-4 und frisch gewonnene periphere Blutzellen als Effektorzellen. Sowohl die Effektorzelllinien als auch die beiden Targetzelllinien (MCF-7, Panc-1) wurden zunächst als Zellkulturen angelegt. Im Laufe der Studie wurden die drei Effektorzelllinien in verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Stimulanzen versetzt. Zunächst wurden im Rahmen der Experimente mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 die Effektorzellen KHYG-1 mit dem Zytokin IL-2 und dem Lektin Phytohämagglutinin stimuliert. Auch die MOLT-4-Zellen wurden mit Phytohämagglutinin versetzt. In einem weiteren Experiment mit MCF-7-Zellen, wurde das Lektin Phytohämagglutinin für beide genannten Effektorzelllinien durch das zu untersuchende Mistelextrakt Iscador® M ersetzt. Ein weiterer experimenteller Ansatz innerhalb der MCF-7-Experimente war die Stimulation beider Effektorzelllinien mittels simultaner Stimulation mit IL-2 und Iscador® M. Im Rahmen der Experimente mit der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 wurden die KHYG-1-Zellen ebenfalls jeweils mit dem Zytokin IL-2 und dem Mistelextrakt Iscador® M versetzt. Auch die hierfür verwendeten MOLT-4-Zellen wurden ebenso mit Iscador® M stimuliert. Äquivalent zu dem unter Panc-1 verwendeten Stimulationsprotokoll für die KHYG-1-Zelllinie, wurden aus frischem Blut gewonnene periphere Blutzellen stimuliert und deren zytotoxische Wirkung gegen MCF-7 ebenfalls getestet. Nach erfolgter Stimulation der verschiedenen Effektorzellen und der Anlegung eines Zytotoxizitätassays bestehend aus stimulierten Effektorzellen und kultivierten Targetzellen, erfolgte die Messung der zytotoxischen Wirkung auf die beiden Targetzelllinien per Spektrophotometer. Dabei ergibt sich die, durch die Effektorzellen bewirkte, höchste spezifische Lyse, sowohl im Rahmen der durchgeführten Mammakarzinomzell-Experimente als auch im Rahmen der durchgeführten

Pankreaskarzinomzell-Experimente, für jene Effektorzellen, welche mit dem Mistelextrakt Iscador® M versetzt und stimuliert wurden. Die insgesamt höchste spezifische Lyse gegen MCF-7-Zellen zeigt sich vergleichend für alle durchgeführten Experimente sowohl für unstimulierte als auch für IL-2 und Iscador® M stimulierte Effektorzellen, jeweils für die aus frischem Blut gewonnenen peripheren Blutzellen.

Die Reste der Effektorzellensuspensionen-Ansätze für das Zytotoxizitätassay dienten anschließend für das optische Messverfahren der Durchflusszytometrie, um so die Zellaktivität der verschiedenen Effektorzelllinien unter den unterschiedlichen Stimulationszuständen, anhand der Menge aktivierter und inhibierter Rezeptoren an der Zelloberfläche, zu erfassen und zu analysieren. Dafür wurden die verschiedenen Effektorzelllinien mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern versetzt und markiert. Somit erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine sogenannte Mehrfarbendurchflusszytometrie, bei welcher parallel mehrere Fluoreszenzfarbstoffe Anwendung fanden und die Messung dieser auf deren unterschiedlichen Emissions- und Absorptionspektren beruht. Gemessen wurde dabei der Prozentsatz positiv gefärbter Zellen und der Durchschnittswert der Fluoreszenz-Intensität (MFI), welcher als Maß für die Menge gebundener Fluoreszenzfarbstoffe pro Partikel dient.

Als Resultat zeigt sich für die KHYG-1-Zellen aller Experimente der höchste Prozentsatz positiv gefärbter Zellen insgesamt deutlich für den Antikörper NKG2D-PE, welcher als aktivierender NK-Zellrezeptor fungiert und somit hinweisend auf die Aktivität von NK-Zellen ist. Der höchste Prozentsatz positiv gefärbter Zellen für die MOLT-4-Zellen lässt sich insgesamt für die beiden Antikörper CD45-APC und CD8-PE feststellen. Auch für die PBZ weist der Antikörper CD45 durchschnittlich den höchsten Prozentsatz positiv gefärbter Zellen auf, wobei CD45 ein Pan-Leukozytenmarker ist, der von allen Leukozyten exprimiert wird und der Signaltransduktion dient. CD8+, als der spezifischere Marker, wird von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und ist somit ebenfalls hinweisend für die Aktivität jener T-Zell-Subpopulation. Der größte MFI, also die größte Menge gebundener Fluoreszenzfarbstoffe pro Partikel, lässt sich insgesamt für die KHYG-1-Zellen für die Antikörper NKG2D-PE und CD56-APC, für die MOLT-4-Zellen für den Antikörper CD45-APC und für die PBZ für die Antikörper CD45-APC und CD8-PE, nachweisen.

Laut bestehender Literatur konnte der mistelinduzierte stimulierende Effekt sowohl auf NK-Zellen als auch auf T-Lymphozyten bereits festgestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ist ebenfalls jene immunstimulierende Wirkung der Mistel erkennbar an der verstärkten Expression von NKG2D-Rezeptoren innerhalb der NK-Zelllinie KHYG-1 und an der verstärkten Expression von CD8+-Rezeptoren innerhalb der T-Zelllinie MOLT-4. Mittels der Werte der spezifischen Lyse, welche sich in den

meisten hier durchgeführten Experimenten am stärksten und deutlichsten unter Mistel-extraktstimulation darstellen, bestätigt sich auch die zytotoxische Wirkung der Mistel. Sowohl der immunstimulierende Effekt auf die Effektorzelllinien KHYG-1, MOLT-4 und PBZ, als auch der zytotoxische Effekt von *Viscum album L.* auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1, lassen sich im Rahmen dieser Arbeit feststellen und belegen.

VI. Summary

***Viscum album* as an adjuvant oncological therapeutic option in the treatment of human breast carcinoma and pancreatic carcinoma**

Within the scope of this doctoral thesis in vitro studies on the cytotoxic effect of *Viscum album* stimulated effector cells on the mammary carcinoma cell line MCF-7 and the pancreatic carcinoma cell line Panc-1 were conducted. This thesis aims to examine a potential immunostimulatory effect of the mistletoe extract Iscador® M on different effector cell lines, as well as a possible cytotoxic effect on two human cancer cell lines. The NK-leukaemia cell line KHYG-1, the T-lymphoblastic leukaemia cell line MOLT-4 and freshly extracted peripheral blood cells served as effector cells for this purpose. Both the effector cell lines and the two target cell lines (MCF 7, Panc-1) were initially set up as cell cultures. Over the course of the study the three effector cell lines were mixed with various stimulants in different experiments. As part of the experiments on the breast cancer cell line MCF-7 the effector cells KHYG-1 were stimulated with the cytokine IL-2 and the lectin phytohaemagglutinin. The MOLT-4 cells were mixed with phytohaemagglutinin, too. In another experiment with the MCF-7-cells the lectin phytohaemagglutinin was replaced by the mistletoe extract Iscador® M, which is to be examined for both mentioned effector cells lines. The stimulation of both effector cell lines through the simultaneous stimulation with IL-2 and Iscador® M served as another experimental approach within the MCF-7 experiments. As part of the experiments on the pancreatic carcinoma cell line Panc-1 the KHYG-1-cells were each also mixed with the cytokine IL-2 and the mistletoe extract Iscador® M. The MOLT-4-cells used for this purpose were also stimulated with Iscador® M. Just like the stimulation protocol for the KHYG-1 cell line used under Panc-1 peripheral blood cells that were extracted from fresh blood were stimulated the same way and their cytotoxic effect against MCF-7 was tested, too. After the stimulation of the different effector cells and the creation of a cytotoxicity assay consisting of stimulated effector cells and cultivated target cells the cytotoxic effect on both target cell lines was measured through a spectrophotometer. The highest specific lysis provided by the effector cells becomes apparent for those effector cells which were stimulated with the mistletoe extract Iscador® M in the context of both the mammary carcinoma cell experiments and the pancreatic carcinoma cell experiments. Comparing all the experiments conducted the overall highest specific lysis against MCF-7-cells can in each case be seen on the unstimulated effector cells and the

cells stimulated with IL-2 and Iscador® M for the peripheral blood cells extracted from fresh blood.

The rest of the effector cell suspension approaches for the cytotoxicity assay was then used for the optical measuring of the flow cytometry in order to gather and analyse the cell activity of the different effector cell lines for different conditions of stimulation on the basis of the amount of activated and inhibited receptors on the surface of the cells. Therefore the different effector cell lines were mixed and marked with various fluorescent dye-conjugated antibodies. In the scope of this thesis a so called multicolour flow cytometry was applied, for which several different fluorescent dyes were simultaneously used, and which is based on the different emission and absorption spectra of the different fluorescent dyes. The percentage of positively stained cells was measured, as well as the mean of fluorescence intensity (MFI), which functions as measurement for the amount of bound fluorescent dyes per particle.

As result for the KHYG-1-cells of all experiments the highest percentage of positively stained cells appears for the antibody NKG2D-PE, which functions as an activating NK-cell receptor and therefore indicates the activity of NK-cells. The highest percentage of positively stained cells for the MOLT-4-cells overall becomes evident for the antibodies CD45-APC and CD8-PE. For the PBZ the highest percentage of positively stained cells overall becomes evident for the antibody CD45, too. CD45 is a pan-leukocyte marker, which is expressed by all leukocytes and is used for signal transduction. CD8+ as the specific marker is expressed by cytotoxic T-cells and therefore indicates the activity of the given T-cell-subpopulation. The highest MFI, that means the highest amount of bound fluorescent dyes per particle overall appears in the KHYG-1 cells for the antibodies NKG2D-PE and CD56-APC, in the MOLT-4 cells for the antibody CD45-APC and in the PBZ for the antibodies CD45-APC and CD8-PE.

According to existing literature several studies have already identified the stimulating effect on NK-cells and T-lymphocytes induced by the mistletoe. Within the scope of this doctor thesis the mentioned immunostimulatory effect of the mistletoe is recognizable in the intensified expression of NKG2D-receptors within the NK-cell line KHYG-1 and in the intensified expression of CD8+-receptors within the T-cell line MOLT-4.

By means of the specific lysis data, which most of the experiments conducted in this thesis show most clearly through the stimulation with mistletoe extract, the cytotoxic effect of the mistletoe is confirmed as well. Both the immunostimulatory effect on the effector cell lines and the cytotoxic/antitumoral effect of *Viscum album L.* on the mammary carcinoma cell line MCF-7 and the pancreatic carcinoma cell line Panc-1 becomes evident within the scope of this thesis.

VII. Anhang

Tabelle 1: Darstellung der wesentlichen Effekte von *Viscum album L.* und dessen einzelner Inhaltsstoffe auf das Immunsystem (nach Pfüller et al. (2001) und Stein (1995))

<u>Stoffklasse</u>	<u>Stoffgruppen</u>	<u>Antitumorale Effekte</u>	<u>Zelluläres Immunsystem</u>	<u>Humorales Immunsystem</u>	<u>Zyto-kine</u>
Glykoproteine	Mistlektine I-III	Zytotoxizität durch Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese Senkung der Tumorzellzahl	Erhöhung der Phagozytose und NK-Zell-Aktivität Monozyten- und Makrophagen-Aktivierung Freisetzung von IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- α Steigerung der Pan-T-Zellen, der T-Helferzellen, der LGL-Zahl und der neutrophilen Granulozyten Erhöhung der IL-2R-, HLA-DQ- und HLA-DR-Expression Senkung der Lymphozytenproliferation	Steigerung des C-reaktiven Proteins, der Komponentärkomponente C3 und der Antikörperreduktion Erhöhung der IgM-Zellzahl Steigerung von Coeruloplasmin, Albumin und Haptoglobin	IFN- α IFN- γ IL-1 IL-2 IL-6 GM-CSF MIF

Polypeptide	Viskotoxin Kutter'sches Peptid	Nekrose induzierend NK-Zell vermittelte Zytotoxizität Zytotoxizität durch Lyse der Zellmembran	Steigerung der Aktivität von Granulozyten und zytotoxi- schen T-Zellen Phagozyto- stimulie- rung Senkung der CD8+ Zellzahl Steigerung der Zytotoxi- zität humaner Lymphozyten		IL-6
Oligo-/Poly- saccharide	Arabino- galaktane Galaktorurane Rhamnogalak- turonane	Tumorphem- mung im Tier- versuch	Steigerung der Phagozy- tose-, der NK- und der LAK-Zell- Aktivität Erhöhung der Carbon- Clearance	Aktivierung des alternati- ven Komple- mentärweges	TNF- α Monozy- ten/Mak- rophagen IFN- γ
Flavonoide	Quercetin und Derivate	Tumorphem- mung im Tierversuch Inhibierung der Kollegenase IV-Aktivität			

Aminosäuren	Arginin GABA	Inhibierung der Tumorinduk- tion im Tierversuch	Induktion der Apoptose in verschiede- nen Zellkulturmo- dellen		
Mistelextrakt in seiner Gesamtheit		Steigerung von CD3+, CD19+, T-Helferzellen, T-Zellen, der LGL-Zahl, eosinophiler und neutrophiler Granulozy- ten Steigerung der NK-Zellen- und Phagozytose- aktivität Steigerung der ADCC Erhöhung der Lymphozyten- proliferation			

Legende: ADCC= Antikörper-gebundene zellvermittelte Zytotoxizität,

CD= Differenzierungsmarker, GM-CSF= Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor, HLA= Humanes Leukozyten-Antigensystem, IFN= Interferone (α, γ),

IL= Interleukine (1,2,6), IL-2R= Interleukin-2 Rezeptor, LAK= Lymphokin-aktivierte Killerzellen, LGL= große granulierte Lymphozyten, MIF= Migrationsinhibitionsfaktor,

TNF= Tumornekrosefaktor (α)

VIII. Literaturverzeichnis

- Alenza, D. P., et al. 1998. 'Relation between Habitual Diet and Canine Mammary Tumors in a Case-Control Study', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12: 132-139.
- Althaus, F. R. 2010. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* (Enke in MVS Medizinverlag: Stuttgart).
- Anderson, N. V., et al. 1967. 'Pancreatic carcinoma in the dog', *J Am Vet Med Assoc*, 150: 286-295.
- Arenas, C., et al. 2016. 'Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study', *Vet Rec*, 179: 125.
- Arnicke, U. 1998. 'Mammatumoren bei der Hündin: Immunhistochemischer Nachweis von Metastasen und Mikrometastasen im Axillarlymphknoten und im Knochen. Dissertation Freie Universität Berlin.
- Arslan, C., et al. 2014. 'Current and future systemic treatment options in metastatic pancreatic cancer', *Journal of gastrointestinal oncology*, 5: 280-295.
- Axtner, J., et al. 2016. 'Health services research of integrative oncology in palliative care of patients with advanced pancreatic cancer', *BMC Cancer*, 16: 579-579.
- Bachmann, J., et al. 2006. 'Pancreatic resection for pancreatic cancer', *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 8: 346-351.
- Bantel, H., et al. 1999. 'Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis', *Cancer Research*, 59: 2083-2090.
- Bar-Sela, G. 2011. 'White-Berry Mistletoe (*Viscum album* L.) as complementary treatment in cancer: Does it help?', *European Journal of Integrative Medicine*, 3: 55-62.
- Bearss, J. J., et al. 2012. 'Histologic, Immunohistochemical, and Clinical Features of 27 Mammary Tumors in 18 Male Dogs', *Veterinary Pathology*, 49: 602-607.
- Beauvais, W., et al. 2012. 'The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review', *Journal of Small Animal Practice*, 53: 314-322.
- Becker, H. 1986. 'Botany of European Mistletoe (*Viscum album* L.)', *Oncology*, 43(suppl 1): 2-7.
- Becker, H., et al. 2005. "Kurzer Überblick über die Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.). In: Scheer R., Bauer R., Becker H., Fintelmann V., Kemper F.H., Schilcher H., editors. Fortschritte in der Misteltherapie." In, 3-11. KVC Verlag Essen.
- Beger, H. G., et al. 2008. 'Pancreatic Cancer-Low survival rates', *Deutsches Arzteblatt international*, 105: 655-656.

- Bennett, P. F., et al. 2001. *Ultrasonographic and cytopathological diagnosis of exocrine pancreatic carcinoma in the dog and cat*. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*
- Berger, M., et al. 1983. 'Studies on the tumor-inhibiting efficacy of Iscador in experimental animal tumors', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 105: 262-265.
- Beuth, J., et al. 1993. 'Comparative studies on the immunoactive potency of galactoside-specific lectin from mistletoe pure substance against standardized extract', *Arzneimittelforschung/Drug research*, 43: 166-169.
- Beuth, J., et al. 1995. 'Immunostimulating activity of different dosages of mistletoe lectin-1 in patients with mammary carcinoma', *Arzneimittelforschung*, 45: 505-507.
- Beuth, J., et al. 1994. 'Immunoprotective activity of the galactoside-specific mistletoe lectin in cortisone-treated BALB/c-mice', *In vivo (Athens, Greece)*, 8: 989-992.
- Beuth, J., et al. 1992. 'Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients', *The clinical investigator*, 70: 658-661.
- Beuth, J., et al. 2006. 'Intratumoral application of standardized mistletoe extracts down regulates tumor weight via decreased cell proliferation, increased apoptosis and necrosis in a murine model', *Anticancer Res*, 26: 4451-4456.
- Beuth, J., et al. 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: 523-527.
- Biegel, U., et al. 2013. *Mistelextrakt (Viscum album) als ergänzendes Therapiekonzept beim feline Fibrosarkom*. In: Scheer, R. und , et al. (Hrsg.) *die Mistel in der Tumorthherapie*. (KVC Verlag: Essen).
- Biegel, U., et al. 2011. 'Orally administered *Viscum album* *Quercus* dilutions in the therapy of feline fibrosarcoma in cats', *Phytomedicine*, 18.
- Biegel, U., et al. 2017. 'Postoperative adjuvante Therapie mit einem Mistelextrakt *Viscum album* ssp. bei Hündinnen mit Mammatumoren', *Complementary Medicine Research*, 24: 349-357.
- Bock, P. R., et al. 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: 456-466.
- Bock, P. R., et al. 2014. 'Targeting inflammation in cancer-related-fatigue: a rationale for mistletoe therapy as supportive care in colorectal cancer patients', *Inflammation & allergy drug targets*, 13: 105-111.
- Bopp, A. 2006. *Die Mistel-Heilpflanze in der Krebstherapie* (rüffer&rub Sachbuchverlag: Zürich).
- Bostock, D. E. 1973. 'The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs', *Journal of Small Animal Practice*, 14: 27-40.

- Brandenberger, M., et al. 2011. 'An Exploratory Study on the Quality of Life and Individual Coping of Cancer Patients During Mistletoe Therapy', *Integr Cancer Ther*, 11: 90-100.
- Bray, F., et al. 2018. 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68: 394-424.
- Bright, J. M. 1985. 'Pancreatic adenocarcinoma in a dog with a maldigestion syndrome. J AM Vet Med Assoc.', 187: 420-421.
- Brodey, R. S., et al. 1966. 'The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. J Am Vet Med Assoc.', 149: 1047-1049.
- Bröker, B., et al. 2019. *Grundwissen Immunologie* (Springer-Verlag: Berlin).
- Brønden, L. B., et al. 2010. 'Data from the Danish Veterinary Cancer Registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark', *Veterinary Record*, 166: 586-590.
- Buchholz, T. A., et al. 2002. 'Pathologic tumor size and lymph node status predict for different rates of locoregional recurrence after mastectomy for breast cancer patients treated with neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy', *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 53: 880-888.
- Burger, A. M., et al. 2003. 'No evidence of stimulation of human tumor cell proliferation by a standardized aqueous mistletoe extract in vitro', *Anticancer Res*, 23: 3801-3806.
- Burger, A. M., et al. 2001. 'Antiproliferative activity of an aqueous mistletoe extract in human tumor cell lines and xenografts in vitro', *Arzneimittelforschung*, 51: 748-757.
- Burkhart, J., et al. 2010. 'In vitro investigation into the potential of a mistletoe extract to alleviate adverse effects of cyclophosphamide', *Altern Ther Health Med*, 16: 40-48.
- Büssing, A. 2000. *Biological and Pharmacological Properties of Viscum album L. in Mistletoe. The Genus Viscum*. (Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands).
- Büssing, A. 2006. 'Immune modulation using mistletoe (*Viscum album L.*) extracts Iscador', *Arzneimittelforschung*, 56: 508-515.
- Büssing, A., et al. 2005. 'Prevention of surgery-induced suppression of granulocyte function by intravenous application of a fermented extract from *Viscum album L.* in breast cancer patients', *Anticancer Res*, 25: 4753-4757.
- Büssing, A., et al. 2008. 'Modulation of chemotherapy-associated immunosuppression by intravenous application of *Viscum album L.* Extract (Iscador): A randomised phase II study', *European Journal of Integrative Medicine*, 1: 2-3.
- Büssing, A., et al. 2012. 'Quality of life and related dimensions in cancer patients treated with mistletoe extract (iscador): a meta-analysis', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012: 219402-219402.
- Büssing, A., et al. 2007. 'Course of mitogen-stimulated T lymphocytes in cancer patients treated with *Viscum album* extracts', *Anticancer Res*, 27: 2903-2910.

- Büssing, A., et al. 1996. 'Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistletoe lectins', *Cancer Letters*, 99: 59-72.
- Cascinu, S., et al. 2001. 'Survival and quality of life in gastrointestinal tumors: two different end points?', *AnnOncol 12 Suppl*, 3: 31-36.
- Casey, H. W., et al. 1979. 'Mammary Neoplasia in Animals: Pathologic Aspects and the Effects of Contraceptive Steroids.' in Carolyn H. Lingeman (ed.), *Carcinogenic Hormones* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Cassali, G. D., et al. 2012. 'Canine Mammary Mixed Tumours: A Review', *Veterinary Medicine International*, 2012: 7.
- Cassali, G. D., et al. 2007. 'Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours', *Cytopathology*, 18: 191-196.
- Cassali, G. D., et al. 2014. 'Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013', *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 7: 38-69.
- Cave, T. A., et al. 2007. 'Metabolic epidermal necrosis in a dog associated with pancreatic adenocarcinoma, hyperglucagonaemia, hyperinsulinaemia and hypoaminoacidaemia', *J Small Anim Pract*, 48: 522-526.
- Chang, S. C., et al. 2005. 'Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002)', *J Am Vet Med Assoc*, 227: 1625-1629.
- Chang, S. C., et al. 2007. 'Pancreatic cancer cell carcinoma with intracranial metastasis in dog. *J Vet Med Sci*', 69: 91-93.
- Chen, S., et al. 2006. 'Resection and use of a cyclooxygenase-2 inhibitor for treatment of pancreatic adenocarcinoma in a cockatiel', *J Am Vet Med Assoc*, 228: 69-73.
- Christen-Clottu, O., et al. 2010. 'Treatment of Clinically Diagnosed Equine Sarcoid with a Mistletoe Extract (*Viscum album austriacus*)', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 1483-1489.
- Christen, P., et al. 2016. *Biochemie und Molekularbiologie* (Springer-Verlag: Berlin).
- Classen, M., et al. 2003. *Innere Medizin* (Urban & Fischer Verlag).
- Cleary, M. P., et al. 2010. 'Effect of Obesity on Breast Cancer Development', *Veterinary Pathology*, 47: 202-213.
- Clemente, M., et al. 2010. 'Histological, Immunohistological, and Ultrastructural Description of Vasculogenic Mimicry in Canine Mammary Cancer', *Veterinary Pathology*, 47: 265-274.
- Conroy, T., et al. 2011. 'FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer', *N Engl J Med*, 364: 1817-1825.

- Cordner, A. P., et al. 2015. 'Cytologic findings and diagnostic yield in 92 dogs undergoing fine-needle aspiration of the pancreas', *J Vet Diagn Invest*, 27: 236-240.
- Coulon, A., et al. 2002. 'Modes of membrane interaction of a natural cysteine-rich peptide: viscotoxin A3', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1559: 145-159.
- Dahme, E., et al. 2007. *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere* (Enke Verlag).
- Dashora, N., et al. 2011. 'In vitro cytotoxic activity of *Dendrophthoe falcata* on human breast adenocarcinoma Cells-MCF-7', *International Journal of Cancer Research*, 7: 47-54.
- De Campos, C. B., et al. 2018. 'Adjuvant Thalidomide and Metronomic Chemotherapy for the Treatment of Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms', *In vivo (Athens, Greece)*, 32: 1659-1666.
- de M Souza, C. H., et al. 2009. 'Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment', *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 50: 506-510.
- Dennis, M. M., et al. 2008. 'Hyalinizing pancreatic adenocarcinoma in six dogs', *Vet Pathol*, 45: 475-483.
- Deutsche Krebsgesellschaft. 2018. *Gastrointestinale Tumoren* (Elsevier, Berlin).
- Di Cerbo, A., et al. 2014. 'Onco-epidemiology of domestic animals and targeted therapeutic attempts: perspectives on human oncology', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140: 1807-1814.
- Dietrich, J. B., et al. 1992. 'Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins', *Anti-cancer drugs*, 3: 507-511.
- Ding, X. Z., et al. 2000. 'Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells', *Anticancer Res*, 20: 2625-2631.
- Dobson, J., et al. 2002. 'Canine neoplasia in the UK: Estimates of incidence rates from a population of insured dogs', *The Journal of small animal practice*, 43: 240-246.
- Donnay, I., et al. 1996. 'Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues', *Research in Veterinary Science*, 60: 251-254.
- Donnez, J., et al. 2011. *Principles and Practice of Fertility Preservation* (Cambridge University Press: Cambridge).
- Dorn, C. R., et al. 1968. 'Survey of Animal Neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer Morbidity in Dogs and Cats From Alameda County2', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 40: 307-318.
- Drees, M., et al. 1996. *Direct cytotoxic effects of preparations used as unconventional methods in cancer therapy in human tumor xenografts in the clonogenic assay and in nude mice. In Immunodeficient Animals: Models for Cancer Research* (Karger: Basel, Switzerland).

- Driver, J. 1997. 'Statistische Untersuchungen zu Abgangsursachen bei Hunden anhand des Sektionsgutes des Institutes für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen aus den Jahren 1978-1922. Vet Med Diss, Gießen'.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, Group. 2012. 'Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials', *The Lancet*, 379: 432-444.
- Eberle, N., et al. 2011. 'Comparison of examination of thoracic radiographs and thoracic computed tomography in dogs with appendicular osteosarcoma', *Vet Comp Oncol*, 9: 131-140.
- Egenvall, A., et al. 2005. 'Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002', *Prev Vet Med*, 69: 109-127.
- Eggenschwiler, J., et al. 2007. 'Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*)', *BMC complementary and alternative medicine*, 7: 14.
- Eibl, G., et al. 2005. 'Growth Stimulation of COX-2-Negative Pancreatic Cancer by a Selective COX-2 Inhibitor', *Cancer Research*, 65: 982-990.
- Eisenbraun, J., et al. 2011. 'Quality of life in breast cancer patients during chemotherapy and concurrent therapy with a mistletoe extract', *Phytomedicine*, 18: 151-157.
- Endo, Y., et al. 1988. 'The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes The RNA N-glycosidase activity of the protein', *FEBS Letters*, 231: 378-380.
- Eser, S., et al. 2014. 'Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer', *Br. J. Cancer* 111, 5: 817-822.
- Ettinger, S. J., et al. 2005. *Textbook of veterinary internal medicine* (Edn., Philadelphia, W. B. Saunders Co.).
- Eucker, J., et al. 2018. *Mammakarzinome. In: Klinikleitfaden Hämatologie Onkologie* (Elsevier, Berlin).
- Fabbrini, F., et al. 2005. 'Feline cutaneous and visceral necrotizing panniculitis and steatitis associated with a pancreatic tumour', *Vet Dermatol*, 16: 413-419.
- Fahy, G. M., et al. 2019. 'Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans', *Aging Cell*, 18: 13028.
- Farrell, A. S., et al. 2014. 'Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer', *Molecular cancer research : MCR*, 12: 924-939.
- Felenda, J. E., et al. 2019. 'In-vitro-Untersuchungen zur Hemmung der Angiogenese und der Tumorzellmigration durch einen wässrigen Extrakt aus *Viscum album* ssp. *album*, Mali', *DZO*, 51: 81-88.
- Fischer, A. 2006. "Charakterisierung der immunmodulatorischen Wirkung von Mistelpräparaten auf Zellen des Immunsystems bei Rindern. Dissertation." In.: Universität Hannover.

- Fossum, T. W. 2009. *Chirurgie der Kleintiere* (Elsevier, Urban & Fischer: München, Jena).
- Fowler, E. H. , et al. 1977. 'Pathologic changes in mammary glands and uteri from beagle bitches receiving low levels of medroxyprogesterone acetate: an overview of research in progress. In: Pharmacology of steroid contraceptive drugs, Raven press, New York': 375.
- Frank, D. W., et al. 1979. 'Mammary Tumors and Serum Hormones in the Bitch Treated with Medroxyprogesterone Acetate or Progesterone for Four Years', *Fertility and Sterility*, 31: 340-346.
- Franz, H. 1985. 'Ingredients of mistletoe (*Viscum album* L.) as potential drugs', *Pharmazie*, 40: 97-104.
- Franz, H., et al. 1981. *Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.)* (Biochem J).
- Friedel, W. E., et al. 2009. 'Systematic evaluation of the clinical effects of supportive mistletoe treatment within chemo- and/or radiotherapy protocols and long-term mistletoe application in nonmetastatic colorectal carcinoma: multicenter, controlled, observational cohort study', *J Soc Integr Oncol*, 7: 137-145.
- Gall, T. M., et al. 2015. 'Pancreatic cancer: current understanding of molecular and genetic aetiologies', *Postgrad Med J*, 91: 594-600.
- Gardin, N. E. 2009. 'Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series', *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23: 407-411.
- Ghaneh, P., et al. 2007. 'Biology and management of pancreatic cancer', *Gut*, 56: 1134-1152.
- Giudici, M., et al. 2005. "Membranaktivität der Viscotoxine A3 und B – Interaktionen mit Modellmembranen. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Fintelman V, Kemper FH, Schilcher H, editors. Fortschritte in der Misteltherapie." In, 99-107. Essen, KVC Verlag.
- Giuffrida, M. A., et al. 2014. 'Quality of life measurement in prospective studies of cancer treatments in dogs and cats', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28: 1824-1829.
- Gizinski, S., et al. 2004. 'Untersuchungen zur peripheren Steroidhormonkonzentration sowie zur Östrogenrezeptorendichte und Verteilung des Proliferationsmarkers Ki-67 in kaninen Mammatumoren verschiedener Dignität', *Tierarztl Prax Ausg K*, 32: 214-220.
- Glaridon, O. J., et al. 2014. '*Viscum album* L. (Iscador) in the cat: tolerance, adverse reactions and indications', *Schweiz Arch Tierheilkd*, 156: 381-388.
- Göbel, T., et al. 2010. In: *Physiologie der Haustiere von Wolfgang von Engelhardt* (Enke Verlag: Stuttgart).
- Goldschmidt, M. H., et al. 2001. 'Neoplastic lesions of the mammary gland. In: Pathobiology of The Aging Dog, ed. Mohr, U , Iowa State University Press, Ames, IA, 2001.': 168-178.
- Gottwald, D. 1998. 'Ein Beitrag zur Häufigkeit von Mammatumoren beim Hund. Statistische Auswertung der Einsendungen einer Praxis für Tierpathologie aus den Jahren 1990 bis 1995. Diss med vet, München'.

- Grieve, M. 1994. *A Modern Herbal* (Penguin Books: London, UK).
- Grossarth-Maticcek, R., et al. 2001. 'Use of Iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study', *Altern Ther Health Med*, 7: 57.
- Grossarth-Maticcek, R., et al. 2006. 'Prospective Controlled Cohort Studies on Long-Term Therapy of Breast Cancer Patients with a Mistletoe Preparation (Iscador®)', *Complementary Medicine Research*, 13: 285-292.
- Hajto, T. 1986. 'Immunomodulatory effects of iscador: a *Viscum album* preparation', *Oncology*, 43: 51-65.
- Hajto, T., et al. 1997. 'Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity', *Anti-cancer drugs*, 8 Suppl 1: 43-46.
- Hajto, T., et al. 1990. 'Increased Secretion of Tumor Necrosis Factor α , Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells Exposed to β -Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extract', *Cancer Research*, 50: 3322-3326.
- Hajto, T., et al. 1998. 'Effect of a Recombinant Lectin, *Viscum album* Agglutinin on the Secretion of Interleukin-12 in Cultured Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and on NK-Cell-Mediated Cytotoxicity of Rat Splenocytes in vitro and in vivo', *Natural Immunity*, 16: 34-46.
- Hamilton, J. M. 1974. 'Comparative Aspects of Mammary Tumors.' in George Klein, Sidney Weinhouse and Alexander Haddow (eds.), *Advances in Cancer Research* (Academic Press).
- Harmsma, M., et al. 2006. 'Effects of Mistletoe (*Viscum album* L.) Extracts Iscador on Cell Cycle and Survival of Tumor Cells', *Arzneimittelforschung*, 56: 474-482.
- Haworth, M. D., et al. 2014. 'Diagnostic accuracy of the SNAP and Spec canine pancreatic lipase tests for pancreatitis in dogs presenting with clinical signs of acute abdominal disease', *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 24: 135-143.
- Head, K. W., et al. 2002. *In: Tumors in Domestic Animals* (Univ. California Press, Berkeley).
- Hecht, S., et al. 2007. 'Imagine findings in pancreatic neoplasia and nodular hyperplasia in 19 cats', *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 48: 45-50.
- Hegi, G. 1981. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa III* (Verlag Paul Parey: Berlin).
- Heiny, B. M., et al. 1998. 'Correlation of immune cell activities and beta-endorphin release in breast carcinoma patients treated with galactose-specific lectin standardized mistletoe extract', *Anticancer Res*, 18: 583-586.
- Heinzerling, L., et al. 2006. 'Immunologic effector mechanisms of a standardized mistletoe extract on the function of human monocytes and lymphocytes in vitro, ex vivo, and in vivo', *Journal of clinical immunology*, 26: 347-359.
- Henderson, I. C., et al. 2003. 'Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer', *J Clin Oncol*, 21: 976-983.

- Henry, C. J. 2009. *Mammary Cancer in Bongura J and Twedt D (eds) Kirks Current Veterinary Therapy XIV* (Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri USA).
- Hess, R. S., et al. 1998. 'Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in dogs with fatal acute pancreatitis: 70 cases (1986-1995)', *J Am Vet Med Assoc*, 213: 665-670.
- Hojjat, S. A., et al. 2006. 'Cytotoxic effects of Iranian mistletoe extract on a panel of cancer cells', *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2: 157-162.
- Hong, C.-E., et al. 2012. 'The Antimutagenic Effect of Mistletoe Lectin (*Viscum album* L. var. *coloratum* agglutinin)', *Phytotherapy Research*, 26: 787-790.
- Horneber, M. A., et al. 2008. 'Mistletoe therapy in oncology', *Cochrane Database Syst Rev*: Cd003297.
- Hortobagyi, G. N., et al. 1988. 'Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery, and radiation therapy', *Cancer*, 62: 2507-2516.
- Hugo, F. 2006. 'Einfluss von Mistelextrakt auf die Migration von kaninen Mammatumorzellen und die Genexpression und das Wachstum von humanen B-NHL-Zelllinien in Bezug auf den Einsatz der Misteltherapie bei Mensch und Tier', Universität Leipzig.
- Hugo, F., et al. 2007. '*Viscum album* extracts Iscador P and Iscador M counteract the growth factor induced effects in human follicular B-NHL cells and breast cancer cells', *Medicina*, 67: 90-96.
- Iscador. 2019. '[www. Iscador AG.de](http://www.iscador.de)'.
- Itoh, T., et al. 2005. 'Clinicopathological Survey of 101 Canine Mammary Gland Tumors: Differences between Small-Breed Dogs and Others', *Journal of Veterinary Medical Science*, 67: 345-347.
- Jacobo-Salcedo, M. d. R., et al. 2011. 'Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants', *Natural product communications*, 6.
- Jäger, S., et al. 2007. 'Solubility Studies of Oleanolic Acid and Betulinic Acid in Aqueous Solutions and Plant Extracts of *Viscum album* L', *Planta Med*, 73: 157-162.
- Janni, W., et al. 2010. 'Adjuvant aromatase inhibitor therapy: outcomes and safety', *Cancer Treat Rev*, 36: 249-261.
- Jemal, A., et al. 2011. 'Global cancer statistics', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61: 69-90.
- Johansson, S., et al. 2003. 'Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells', *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60: 165-175.
- Karayannopoulou, M., et al. 2001. 'Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer', *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 48: 85-96.
- Kaufmann, S. H. E. 2012. *Basiswissen Immunologie* (Springer-Verlag: Berlin Heidelberg).

- Kelter, G., et al. 2007. 'Cytotoxic activity and absence of tumor growth stimulation of standardized mistletoe extracts in human tumor models in vitro', *Anticancer Res*, 27: 223-233.
- Kessler, M. 2013. *Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze* (Enke: Stuttgart).
- Kessler, M., et al. 2013. *Kleintieronkologie*.
- Kienle, G. S. 2009. 'Misteltherapie bei Krebs - was ist belegt, was nicht', *Gynäkologie+Geburtshilfe*, 11: 52-53.
- Kienle, G. S., et al. 2003. 'Mistletoe in cancer - a systemic review on controlled clinical trials': 109-119.
- Kienle, G. S., et al. 2009. 'Viscum album L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research', *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 28: 79-79.
- Kienle, G. S., et al. 2003. *Die Mistel in der Onkologie: Fakten und Konzeptionelle Grundlagen* (Schattauer: Stuttgart).
- Kienle, G. S., et al. 2007. 'Complementary cancer therapy: A systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts', *Eur J Med Res*, 12: 103-119.
- Kienle, G. S., et al. 2010. 'Review article: Influence of *Viscum album L* (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies', *Integr Cancer Ther*, 9: 142-157.
- Kienle, G. S., et al. 2006. "Anthroposophische Medizin in der klinischen Forschung." In. Stuttgart.
- Kienle, G. S., et al. 2016. 'Intravenous Mistletoe Treatment in Integrative Cancer Care: A Qualitative Study Exploring the Procedures, Concepts, and Observations of Expert Doctors', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2016: 4628287-4628287.
- Kim, K. C., et al. 2012. 'Quality of life, immunomodulation and safety of adjuvant mistletoe treatment in patients with gastric carcinoma - a randomized, controlled pilot study', *BMC complementary and alternative medicine*, 12: 172.
- Kircher, C. H., et al. 1976. 'Tumours of the pancreas', *Bull World Health Organ*, 53: 195-202.
- Kleeberg, U. R., et al. 2004. 'Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial: rIFN-alpha2b versus rIFN-gamma versus ISCADOR M versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3 mm) or regional lymph node metastasis.', *European Journal of Cancer*, 40: 390-402.
- Kleger, A., et al. 2014. 'Pharmakotherapie beim Pankreaskarzinom', *Arzneimitteltherapie*, 32: 274-282.
- Klett, C. Y., et al. 1989. 'Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from *viscum album* extract', *Arzneimittelforschung*, 39: 1580-1585.

- Klopfleisch, R. 2017a. *Veterinär-onkologie kompakt* (Springer-Verlag GmbH).
- Klopfleisch, R. 2017b. *Veterinär-onkologie kompakt* (Springer-Verlag GmbH).
- Knöpfel-Sidler, F, et al. 2005. 'Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different mistletoe extracts', *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60: 448-454.
- Koch, E. 1938. 'Experimentelle Untersuchungen über entzündung- und nekroseerzeugende Wirkung von *Viscum album*', *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin*, 103: 740-749.
- Kohn, B., et al. 2012. *Praktikum der Hundeklinik* (Enke: Stuttgart).
- Komazawa, S., et al. 2016. 'Canine tumor development and crude incidence of tumors by breed based on domestic dogs in Gifu prefecture', *J Vet Med Sci*, 78: 1269-1275.
- Konrad, U, et al. 2006. "Documentation of published clinical trials and observational studies with Iscador." In.: Tech. Rep., Verein für Krebsforschung, Arlesheim, Switzerland.
- Kovacs, E. 2000. 'Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients treated with *Viscum album* extract', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 54: 305-310.
- Kreis, W. 2009. *Fortschritte bei der Strukturaufklärung von Inhaltsstoffen der Mistel*. In: Scheer R, Alban S, Becker H, Holzgrabe U, Kemper F, Kreis W, et al., editors. *Die Mistel in der Tumorthherapie* (KVC 2009: Essen).
- Kristiansen, V. M., et al. 2016. 'Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Mammary Carcinomas: A Randomized Controlled Trial', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30: 230-241.
- Kröz, M, et al. 2002. 'Blut- und Gewebeseosinophilie, Mistellektin-Antikörper und Lebensqualität bei einer Mammakarzinom-Patientin unter intratumoraler und subkutaner Misteltherapie', *Complementary Medicine Research*, 9: 160-167.
- Kühn, J. J. 2005. *Misteltherapie bei malignen Lymphomen-Neue Erkenntnisse und Erfahrungen im Rahmen einer prospektiven Kasuistikserie bei Patienten mit follikulärem Non-Hodgkin-Lymphom*. In: Schilcher, editor. *Fortschritte in der Misteltherapie-Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*. (KVC-Verlag: Essen).
- Kunzmann, V., et al. 2014. 'Intensified Neoadjuvant Chemotherapy with Nab-Paclitaxel plus Gemcitabine Followed by FOLFIRINOX in a Patient with Locally Advanced Unresectable Pancreatic Cancer', *Case reports in oncology*, 7: 648-655.
- Kurzman, I. D., et al. 1986. 'Prognostic factors in canine mammary tumors', *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*, 1: 25-32.
- Kuttan, G., et al. 1993. 'Reduction of Leukopenia in mice by "*Viscum album*" Administration during Radiation and Chemotherapy', *Tumori Journal*, 79: 74-76.
- Lange-Lindberg, A.-M., et al. 2006. 'Mistletoe treatments for minimising side effects of anticancer chemotherapy', *GMS health technology assessment*, 2: Doc18-Doc18.

- Langenbach, A., et al. 2001. 'Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors', *J Am Vet Med Assoc*, 218: 1424-1428.
- Larsson, M. H. M. A., et al. 1989. 'Obstructive jaundice caused by a metastatic adenocarcinoma of the pancreas in a cat. *Ars Veterinaria.*', 5: 113-116.
- Lavalle, G. E., et al. 2009. 'Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival', *Vet Pathol*, 46: 1275-1280.
- Lee, C.-H., et al. 2009. 'Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin in vitro and in vivo', *International Immunopharmacology*, 9: 1555-1561.
- Lee, S. J., et al. 2007. 'Suppressive effect of a standardized mistletoe extract on the expression of activatory NK receptors and function of human NK cells', *J Clin Immunol*, 27: 477-485.
- Lefebvre, G., et al. 2007. 'Treatment of transmissible venereal tumor (TVT) in dogs with *Viscum album* (mistletoe) associated to chemotherapy. 70: 78-86.
- Li, D., et al. 2004. 'Pancreatic cancer', *The Lancet*, 363: 1049-1057.
- Loewe-Mesch, A., et al. 2008. 'Adjuvante simultane Mistel-/Chemotherapie bei Mammakarzinom – Einfluss auf Immunparameter, Lebensqualität und Verträglichkeit', *Complementary Medicine Research*, 15: 22-30.
- Luther, P., et al. 1986. *Die Mistel-Botanik, Lektine, medizinische Anwendung.* (VEB Verlag/Springer Verlag: Heidelberg).
- Mabed, M., et al. 2004. 'Phase II study of viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma', *British journal of cancer*, 90: 65-69.
- MacVean, D. W., et al. 1978. 'Frequency of Canine and Feline Tumors in a Defined Population', *Veterinary Pathology*, 15: 700-715.
- Maier, G., et al. 2002. 'Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro', *Anti-cancer drugs*, 13: 373-379.
- Maisonneuve, P., et al. 2010. 'Past Medical History and Pancreatic Cancer Risk: Results From a Multicenter Case-Control Study', *Annals of Epidemiology*, 20: 92-98.
- Maldacker, J. 2006. 'Preclinical investigations with mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador', *Arzneimittelforschung*, 56: 497-507.
- Mansky, P. J., et al. 2013. 'NCCAM/NCI Phase 1 Study of Mistletoe Extract and Gemcitabine in Patients with Advanced Solid Tumors', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013: 964592-964592.
- Marquardt, C. 2003. 'Untersuchungen zur präoperativen Dignitätserfassung kaniner Mammatumoren mittels Ultraschall und Nadelbiopsie. Dissertation med. vet.', JLU Gießen.
- Martinez-Ruzafa, I., et al. 2009. 'Tolerability of gemcitabine and carboplatin doublet therapy in cats with carcinomas', *J Vet Intern Med*, 23: 570-577.

- Maruyama, H., et al. 2004. 'The incidence of disseminated intravascular coagulation in dogs with malignant tumor', *J Vet Med Sci*, 66: 573-575.
- Marvibaigi, M., et al. 2014. 'Preclinical and Clinical Effects of Mistletoe against Breast Cancer', *BioMed Research International*, 2014: 15.
- Matthes, H., et al. 2005. "Endoscopic ultrasound-guided fine-needle injection of *Viscum album* L.(mistletoe; Helixor (R) M) in the therapy of primary inoperable pancreas cancer: a pilot study." In *Gastroenterology*, 433-434. WB Saunders Co Independence.
- Matthes, H., et al. 2008. 'Integrative Therapiemöglichkeiten des inoperablen Pankreaskarzinoms—eine Übersicht', *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*, 40: 106-110.
- Matthes, H., et al. 2010. 'Molecular Mistletoe Therapy: Friend or Foe in Established Anti-Tumor Protocols? A Multicenter, Controlled, Retrospective Pharmaco-Epidemiological Study in Pancreas Cancer', *Current Molecular Medicine*, 10: 430-439.
- Matthes, H., et al. 2004. *Viscum album in the therapy of primary inoperable hepatocellular carcinoma (HCC)*. In: *Gastroenterology, Supplements*.
- Matthiessen, P. F., et al. 1995. *Die Misteltherapie des Krebses*. In: *Wrba H (Hrsg) Kombinierte Tumorthherapie*. (Hippokrates: Stuttgart).
- Mayr, B., et al. 2003. 'K-ras mutations in canine pancreatic cancers', *The Veterinary record* 153. 3:87-89.
- Melzer, J., et al. 2009. 'Efficacy and Safety of Mistletoe Preparations (*Viscum album*) for Patients with Cancer Diseases', *Complementary Medicine Research*, 16: 217-226.
- Merlo, D. F., et al. 2008. 'Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 976-984.
- Misdorp, W. 1988. 'Canine mammary tumours: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins', *Veterinary Quarterly*, 10: 26-33.
- Misdorp, W. 2002. 'Tumors of the Mammary Gland.' in, *Tumors in Domestic Animals*.
- Misdorp W., et al. 1999. "Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat," In: World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Series 2, No. 2, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC,' 7: 59.
- Moe, L. 2001. 'Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds', *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 57: 439-443.
- Moebus, V., et al. 2010. 'Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study', *J Clin Oncol*, 28: 2874-2880.
- Morris, J. S., et al. 1993. 'Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia', *Vet Rec*, 133: 539-542.

- Morris, J. S., et al. 1998. 'Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms', *Vet Rec*, 142: 656-658.
- Morrison, W. B. 2002. *Cancer in dogs and cats. Medical and surgical management* (Teton NewMedia: Jackson Hole, Wyoming).
- Mueller, E. A., et al. 1990. 'A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon γ inducer', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 32: 221-227.
- Münster, M., et al. 1988. 'Tumoren des exokrinen Pankreas. Tierärztl Prax.': 317-320.
- Munzone, E., et al. 2015. 'Outcomes of special histotypes of breast cancer after adjuvant endocrine therapy with letrozole or tamoxifen in the monotherapy cohort of the BIG 1-98 trial', *Ann Oncol*, 26: 2442-2449.
- Nelson, R. W. , et al. 2010. *Innere Medizin der Kleintiere* (Elsevier, Urban & Fischer: München).
- Nemanic, S., et al. 2006. 'Comparison of thoracic radiographs and single breath-hold helical CT for detection of pulmonary nodules in dogs with metastatic neoplasia', *J Vet Intern Med*, 20: 508-515.
- Neoptolemos, J. P., et al. 2001. 'Influence of resection margins on survival for patients with pancreatic cancer treated by adjuvant chemoradiation and/or chemotherapy in the ESPAC-1 randomized controlled trial', *Annals of surgery*, 234: 758-768.
- Nolte, I., et al. 2000. *Praxis der Onkologie bei Hund und Katze* (Enke: Stuttgart).
- Nunes, F. C., et al. 2019. 'Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival', *Veterinary and Animal Science*, 7: 100039.
- Nyman, H. T., et al. 2006. 'Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant superficial lymph nodes in dogs', *Am J Vet Res*, 67: 978-984.
- Oettle, H. 2018. *Pankreaskarzinom, In:Klinikleitfaden Hämatologie und Onkologie* (Elsevier, Berlin).
- Ogilvie, G. K., et al. 1991. 'Efficacy of mitoxantrone against various neoplasms in dogs', *J Am Vet Med Assoc*, 198: 1618-1621.
- Ogilvie, G. K., et al. 1989. 'Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms', *J Am Vet Med Assoc*, 195: 1580-1583.
- Orhan, D. D., et al. 2006. "Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Flavonoids Isolated from *Viscum album* ssp. *album*." In *Zeitschrift für Naturforschung C*, 26.
- Orlando, L., et al. 2010. 'Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer', *Cancer Treat Rev*, 36 Suppl 3: S67-71.
- Ostermann, T., et al. 2020. 'A Systematic Review and Meta-Analysis on the Survival of Cancer Patients Treated with a Fermented *Viscum album* L. Extract (Iscador): An Update of Findings', *Complement Med Res*: 1-12.

- Ostermann, T., et al. 2012. 'Retrospective studies on the survival of cancer patients treated with mistletoe extracts: a meta-analysis', *Explore (NY)*, 8: 277-281.
- Ostermann, T., et al. 2009. 'Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review', *BMC Cancer*, 9: 451.
- Otoni, C. C., et al. 2010. 'Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors', *Acta Vet Scand*, 52: 20.
- Pae, H. O., et al. 2000. 'Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by mistletoe lectin', *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 22: 697-709.
- Paepke, D. 2018. 'Die Misteltherapie in der Onkologie', *Im Focus Onkologie*, 21: 64-68.
- Paoloni, M. C., et al. 2007. 'Comparative oncology today. The Veterinary clinics of North America.', *Small animal practice* 37, 6: 1023-1032.
- Pelzer, F., et al. 2018. 'Complementary Treatment with Mistletoe Extracts During Chemotherapy: Safety, Neutropenia, Fever, and Quality of Life Assessed in a Randomized Study', *Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)*, 24: 954-961.
- Petercord, R., et al. 2017. "Grüne Mitesser - Die Misteln an Tanne, Kiefer und Laubbaumarten." In.: Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft.
- Petersen, G. M., et al. 2003. 'Familial Pancreatic Cancer: Where Are We in 2003?', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 95: 180-181.
- Pfüller, U., et al. 2001. "Natürliche Mistellektine und das rekombinante Mistellektin im Vergleich-Biochemie und biologische Eigenschaften. In: Fintelmann, editor. Die Mistel in der Tumorthherapie-Grundlagenforschung und Klinik." In, 3-14. Essen.
- Philibert, J. C., et al. 2003. 'Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17: 102-106.
- Piao, B. K., et al. 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: 303-309.
- Pieme, C. A., et al. 2012. 'In vitro antiproliferative and anti-oxidant activities of methanol extracts of *Urena lobata* and *Viscum album* against breast cancer cell lines', *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94: 987-999.
- Poirier, V. J., et al. 2004. 'Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors', *J Vet Intern Med*, 18: 219-222.
- Posch, B. 2002. 'Pankreasdiagnostik mittels Computertomografie bei Hund und Katze. Vet Med Diss, Veterinärmedizinische Universität Wien'.
- Priester, W. A. 1974. 'Data from Eleven United States and Canadian Colleges of Veterinary Medicine on Pancreatic Carcinoma in Domestic Animals', *Cancer Research*, 34: 1372-1375.

- Priester, W. A. 1979. 'Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumour type, and geographical region from which reported', *Journal of Small Animal Practice*, 20: 1-11.
- Pryme, I. F., et al. 2006. 'Suppression of growth of tumour cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins', *Histology and Histopathology*, 21: 285-299.
- Quigley, K. A., et al. 2001. 'Hyperlipasemia in 6 dogs with pancreatic or hepatic neoplasia: evidence for tumor lipase production', *Vet Clin Pathol*, 30: 114-120.
- Ramaekers, F. C. S. , et al. 2007. 'Mistletoe extracts (*Viscum album* L.) Iscador interact with the cell cycle machinery and target survival mechanisms in cancer cells', *Medicina*, 67: 79-84.
- Ramm, H. 2006. "Einfluß bodenchemischer Standortfaktoren auf Wachstum und pharmazeutische Qualität von Eichenmisteln (*Viscum album* auf *Quercus robur* und *petraea*).". In, 189. Braunschweig: Landbauforschung Völkenrode - Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL).
- Regulski, M., et al. 2016. 'COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer', *Drug Discov Today*, 21: 598-615.
- Rhiem, K., et al. 2015. 'Risikofaktoren und Prävention des Mammakarzinoms', *Der Onkologe*, 21: 202-210.
- Rink, L., et al. 2015. *Immunologie für Einsteiger* (Springer Verlag: Berlin).
- Rippe, O. 2017. *Die Mistel - Eine Heilpflanze für die Krankheiten unserer Zeit* (Richard Pflaum Verlag GmbH & Co. KG München).
- Robert-Koch-Institut. 2016a. 'Brustkrebs (C50), In: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, 36-39.
- Robert-Koch-Institut. 2016b. 'Krebserkrankungen der Bauchspeicheldrüse (C25)', In: *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*: 61-63.
- Robert-Koch-Institut. 2017a. 'Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom)', Zentrum für Krebsregisterdaten.
- Robert-Koch-Institut. 2017b. "Brustkrebs (Mammakarzinom)." In *Zentrum für Krebsregisterdaten*. Zentrum für Krebsregisterdaten.
- Rostock, M. 2000. "Misteltherapie: Ihr aktueller Stellenwert bei der Behandlung von Tumorerkrankungen." In, 167-180. Heidelberg: Steinkopff.
- Rostock, M., et al. 2016. *Komplementärmedizin bei Krebspatienten*.
- Rowlatt, U. F. 1967. *Pancreatic neoplasms of rats and mice. In Pathology of laboratory rats and mice. Kapitel 4, ed.E. Cotchin& F. J. C. Roe.*
- Rutteman , G. R. . 2005. *Mammatumoren des Hundes. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie.* (Enke: Stuttgart).

- Rutteman, G. R., et al. 2001. 'Tumors of the mammary gland. In: Withrow S.J. MacEwen E.G. (Hrsg.): Small Animal Clinical Oncology. 3. Auflage. W.B. Saunders, Philadelphia, PA': 455-477.
- Saba, C. F., et al. 2007. 'Mammary Gland Tumors in Male Dogs', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 1056-1059.
- Sahora, K., et al. 2008. 'Moderne Tumorthherapie des Pankreaskarzinoms', *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 6, 3: 17-24.
- Sahora, K., et al. 2009. 'Pankreaskarzinom und periampulläres Karzinom', *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 7: 36-44.
- Salzer, G. 1986. 'Pleura carcinosis. Cytomorphological findings with the mistletoe preparation iscador and other pharmaceuticals', *Oncology*, 43 Suppl 1: 66-70.
- Sanders, M. E., et al. 2005. 'The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up', *Cancer*, 103: 2481-2484.
- Schad, F., et al. 2014. 'Intratatumoral Mistletoe (*Viscum album* L) Therapy in Patients With Unresectable Pancreas Carcinoma:A Retrospective Analysis', *Integr Cancer Ther*, 13: 332-340.
- Schad, F., et al. 2018. 'Safety of Combined Treatment With Monoclonal Antibodies and *Viscum album* L Preparations', *Integr Cancer Ther*, 17: 41-51.
- Schaller, G., et al. 1996. 'Cytotoxicity of Different Viscotoxins and Extracts from the European Subspecies of *Viscum album* L', *Phytotherapy Research*, 10: 473-477.
- Schem, C, et al. 2019. *Maligne Tumoren der Mamma. In: Praxisbuch Gynäkologische Onkologie* (Springer: Berlin).
- Schink, M. 1990. "Vergleichende Untersuchungen über das Proteinmuster der europäischen Mistel (*Viscum album* L.) mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese." In. Universität Hohenheim.
- Schink, M. 1997. 'Mistletoe therapy for human cancer: the role of the natural killer cells', *Anti-cancer drugs*, 8 Suppl 1: S47-51.
- Schneider, R. 1970. 'Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer', *Cancer*, 26: 419-426.
- Schneider, R., et al. 1969. 'Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival²', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 43: 1249-1261.
- Schöffski, P., et al. 2004. 'Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumine) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group', *Ann Oncol*, 15: 1816-1824.
- Schumacher, K, et al. 2003. 'Influence of postoperative complementary treatment with lectin-standardized mistletoe extract on breast cancer patients. A controlled epidemiological multicentric retrospective cohort study', *Anticancer Res*, 23: 5081-5087.

- Schwabe, U., et al. 2004. *Arzneiverordnungs-Report 2003: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*.
- Seaman, R. L. 2004. 'Exocrine pancreatic neoplasia in the cat: a case series', *J Am Anim Hosp Assoc*, 40: 238-245.
- Semiglasov, V. F., et al. 2004. 'The standardised mistletoe extract PS76A2 improves QoL in patients with breast cancer receiving adjuvant CMF chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial', *Anticancer Res*, 24: 1293-1302.
- Semiglasov, V. F., et al. 2006. 'Quality of life is improved in breast cancer patients by Standardised Mistletoe Extract PS76A2 during chemotherapy and follow-up: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial', *Anticancer Res*, 26: 1519-1529.
- Seufferlein, T., et al. 2012. 'Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†', *Annals of Oncology*, 23: vii33-vii40.
- Seufferlein, T., et al. 2013. "Leitlinienreport der S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V..
- Seufferlein, T., et al. 2014. 'Ductal pancreatic adenocarcinoma', *Deutsches Arzteblatt international*, 111: 396-402.
- Shi, L. Z., et al. 2019. 'Blockade of CTLA-4 and PD-1 Enhances adoptive T-cell therapy efficacy in an ICOS mediated manner', *Cancer Immunology Research: canimm.0873.2018*.
- Simon, D., et al. 2006. 'Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel', *J Vet Intern Med*, 20: 1184-1190.
- Simon, D., et al. 2009. 'Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome', *Vet Clin Pathol*, 38: 521-528.
- Sleeckx, N, et al. 2011a. 'Canine Mammary Tumours, an Overview', *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 1112-1131.
- Sleeckx, N., et al. 2011b. 'Canine mammary tumours, an overview', *Reprod Domest Anim*, 46: 1112-1131.
- Son, G. S., et al. 2010. 'Immunologic response to mistletoe extract (*Viscum album* L.) after conventional treatment in patients with operable breast cancer', *Journal of Breast Cancer*, 13: 14-18.
- Sorenmo, K. U. 2003. 'Canine mammary gland tumors', *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33: 573-596.
- Sorenmo, K. U. , et al. 2013. 'Tumors of the mammary gland, In: Withrow S.J., Vail D.M. & Page R.L. (Eds), *Small Animal Clinical Oncology*. Saunders Elsevier, St.Louis.', 5.Auflage, 538-556.
- Sorenmo, K. U., et al. 2009. 'Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence*', *Veterinary and Comparative Oncology*, 7: 162-172.

- Spadiut, H. W. 2001. 'Tumorthherapie: Gute Erfahrung mit Mistelpräparat. VET-Impulse', 16: 9-11.
- Spalding, D., et al. 2011. 'Pancreatic cancer', *Medicine*, 39: 274-278.
- Spillmann, T., et al. 2013. *Kleintieronkologie* (Kessler, M.: Enke, Stuttgart).
- Spillmann, T., et al. 2000. 'Die Stellung der Laparoskopie in der Diagnostik von Pankreaserkrankungen. Tierärztl Prax.', 28: 349-355.
- Stauder, H., et al. 2002. 'Mistletoe Extracts Standardised in terms of Mistletoe Lectins (ML I) in Oncology: Current State of Clinical Research', *Oncology Research and Treatment*, 25: 374-380.
- Steele, M. L., et al. 2014a. 'Adverse Drug Reactions and Expected Effects to Therapy with Subcutaneous Mistletoe Extracts (*Viscum album* L.) in Cancer Patients', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2014: 724258-724258.
- Steele, M. L., et al. 2014b. 'Safety of Intravenous Application of Mistletoe (*Viscum album* L.) Preparations in Oncology: An Observational Study', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2014: 236310-236310.
- Stein, G. 1995. "Untersuchungen zur Interaktion von Mistelantigenen mit dem Immunsystem." In, edited by Tübingen Eberhard-Karls-Universität. Essen.
- Steiner, J. M., et al. 2007. 'Histologic findings and minimal-invasive serum markers in dogs with neoplasia involving the pancreas. Proc 25th Conf. ACVIM, Seattle, WA 2007'.
- Steiner, R. 1961. "Vortrag vom 2.4." in 1920; *Geisteswissenschaft und Medizin GA 312* (Verlag der Rudolf Steiner Nachlassverwaltung: Dornach, Switzerland).
- Stockhaus, C., et al. 2001. 'Klinische Erfahrungen mit der zytologischen Diagnostik beim Hund. In: Schweiz Arch Tierheilkunde 2001': 233-240.
- Støvring, M., et al. 1997. 'A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate', *APMIS*, 105: 590-596.
- Stratmann, N., et al. 2008. 'Mammary Tumor Recurrence in Bitches After Regional Mastectomy', *Veterinary Surgery*, 37: 82-86.
- Stratmann, N., et al. 2006. 'Untersuchung zur Lokalisation und Dignität von Mammatumoren bei Hündinnen mit multiplen Gesäugeneoplasien', *Tierärztl Prax Ausg K*, 34: 23-28.
- Tabiasco, J., et al. 2002. 'Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity', *European Journal of Biochemistry*, 269: 2591-2600.
- Tavares, W. L. F., et al. 2010. 'Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs', *Acta Vet Scand*, 52: 67.
- Tempero, M. A., et al. 2017. 'Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology', 15: 1028.
- Tran, C. M., et al. 2016. 'Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy', *Vet Comp Oncol*, 14: 252-262.

- Tröger, W., et al. 2013. 'Viscum album [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: A randomised clinical trial on overall survival', *European Journal of Cancer*, 49: 3788-3797.
- Tröger, W., et al. 2014. 'Quality of life of patients with advanced pancreatic cancer during treatment with mistletoe: a randomized controlled trial', *Deutsches Arzteblatt international*, 111: 493-502.
- Tröger, W., et al. 2009. 'Quality of life and neutropenia in patients with early stage breast cancer: a randomized pilot study comparing additional treatment with mistletoe extract to chemotherapy alone', *Breast cancer : basic and clinical research*, 3: 35-45.
- Tröger, W., et al. 2012. 'Five-year follow-up of patients with early stage breast cancer after a randomized study comparing additional treatment with viscum album (L.) extract to chemotherapy alone', *Breast cancer : basic and clinical research*, 6: 173-180.
- Valle, J. W., et al. 2014. 'Optimal Duration and Timing of Adjuvant Chemotherapy After Definitive Surgery for Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas: Ongoing Lessons From the ESPAC-3 Study', *Journal of Clinical Oncology*, 32: 504-512.
- Valsecchi, M. E., et al. 2014. 'Recent Treatment Advances and Novel Therapies in Pancreas Cancer: A Review', *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 45: 190-201.
- Vincent, A., et al. 2011. 'Pancreatic cancer', *Lancet*, 378: 607-620.
- Voelter, W., et al. 2005. 'Mistletoe Lectins, Structure and Function', *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 1: 149-162.
- von Bodungen, U., et al. 2017. 'Kombinierte Anwendung von Strahlentherapie und adjuvanter Therapie mit einem Mistelextrakt (*Viscum album* L.) zur Behandlung des oralen malignen Melanoms beim Hund: Eine retrospektive Studie', *Complementary Medicine Research*, 24: 358-363.
- Von Hoff, D. D., et al. 2013. 'Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine', *N Engl J Med*, 369: 1691-1703.
- Weissenstein, U., et al. 2016. 'Interaction of a standardized mistletoe (*Viscum album*) preparation with antitumor effects of Trastuzumab in vitro', *BMC complementary and alternative medicine*, 16: 271-271.
- Werner, M, et al. 2011. 'Supportive therapy with mistletoe extract in tumor patients-Results of four controlled pharmacoepidemiological cohort studies as basis for prospective studies', *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*, 18: S12-S12.
- Whelan, T. J., et al. 2000. 'Does locoregional radiation therapy improve survival in breast cancer? A meta-analysis', *J Clin Oncol*, 18: 1220-1229.
- Wilkens, J., et al. 2016. *Misteln - Kraftvolle Krebsheiler aus der Natur - Vorbrugen, lindern, heilen* (AT Verlag: Aarau und München).
- Winkler, K., et al. 2005. 'Characterization of membrane vesicles in plant extracts', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45: 57-65.

- Withrow, S. J., et al. 2001. *Small animal clinical oncology* (Saunders Co.: Edn., Philadelphia).
- Withrow, S. J., et al. 2013. *Withrow&MacEwen's Small animal clinical oncology* (Elsevier/Saunders: St. Louis, Mo.).
- Wode, K., et al. 2009. 'Mistletoe treatment in cancer-related fatigue: a case report', *Cases Journal*, 2: 77.
- Wolfgang, C. L., et al. 2013. 'Recent progress in pancreatic cancer', *CA Cancer J Clin*, 63: 318-348.
- Wu, A. H., et al. 1999. 'Meta-analysis: Dietary Fat Intake, Serum Estrogen Levels, and the Risk of Breast Cancer', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 91: 529-534.
- Yadav, D., et al. 2013. 'The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer', *Gastroenterology*, 144: 1252-1261.
- Yamagami, T., et al. 1996. 'Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. J. Vet. Med. Sci., v.58': 1079-1083.
- Yang, Y., et al. 2011. 'Triterpenoids and triterpenoid saponins of *Viscum liquidambaricum*', *China journal of Chinese materia medica*, 36: 162-165.
- Yoon, T. J., et al. 1999. 'Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells', *Cancer Letters*, 136: 33-40.
- Zambirinis, C. P., et al. 2013. 'Signaling via MYD88 in the pancreatic tumor microenvironment: A double-edged sword', *Oncoimmunology*, 2: e22567-e22567.
- Zänker, K. S. 1997. 'To move or not to move, that is the question: two different paradigms of locomoting cells-the lymphocyte and the metastatic tumour cell.', *Cancer Lett.* 118: 131-134.
- Zee-Cheng, R. K. 1997. 'Anticancer research on Loranthaceae plants', *Drugs of the Future*, Vol. 22, Nr. 5: 519-553ß.
- Zhao, Y. L., et al. 2012. 'Cytotoxic constituents of *Viscum coloratum*', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67: 129-134.
- Ziegler, R., et al. 2010. 'Individual Patient Data Meta-analysis of Survival and Psychosomatic Self-regulation from Published Prospective Controlled Cohort Studies for Long-term Therapy of Breast Cancer Patients with a Mistletoe Preparation (Iscador)', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 7: 157-166.

IX. Danksagung

An dem Gelingen meiner Doktorarbeit waren einige mir nahestehende Menschen beteiligt, denen ich Dank schulde.

An erster Stelle muss dabei mein Doktorvater Herr Dr. Mathias Gehrmann genannt werden. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich, standen jederzeit für Fragen zur Verfügung, haben mich immer aufgebaut und mir immer geholfen, auch wenn es mal eine schwerere Phase gegeben hat. Das habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Herzlichen Dank.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel. Herzlichen Dank, nicht nur für die Annahme meiner Dissertation, sondern auch für Ihr offenes Ohr und Ihre ständige Bereitschaft für Fragen.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie und enge Freunde. Danke für Eure Unterstützung, Motivation und Geduld. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft, ich bin Euch auf ewig dankbar.