

## Immunologische Laboruntersuchung bei Tumorpatienten

Der Erfolg einer „immunstimulierenden“ Therapie bei Patienten mit Tumorerkrankungen hängt im Wesentlichen von folgenden Punkten ab:

### 1. Ist die Immunstimulation indiziert?

- Die Immunstimulation muss indiziert sein, das heißt, es muss nachgewiesen sein, dass die funktionellen Immunparameter tatsächlich erniedrigt sind. Die Stimulation eines funktionell intakten Immunsystems ist nur in Ausnahmefällen hilfreich. Die aktuelle Immunkompetenz kann nur über funktionelle Untersuchungen (LTT-Immunkompetenz, NK-Zell-Zytotoxizitätstest) erfolgen und auch nur damit ist der Erfolg im Nachhinein kontrollierbar.
- Es muss ausgeschlossen sein, dass nicht eine schon vorher bestehende Immunaktivierung Ursache einer reduzierten Lymphozyten- oder NK-Zellfunktion ist. Im zellulären Immunprofil sollten daher die HLADR<sup>+</sup> T-Zellen nicht wesentlich erhöht und die CD4/CD8-Ratio nicht kleiner als 0,8 sein.
- Es muss nachgewiesen sein, dass der Patient über ausreichend stimulierbare Immunzellen (v.a. CD4<sup>+</sup> Helferzellen) verfügt. Als Grenze werden 250 CD4<sup>+</sup> Zellen/µl angegeben. Anderenfalls ist eine immunrestaurative Therapie den immunstimulierenden Maßnahmen vorzuziehen (Spurenelemente, Vitamine, Thymus).

### 2. Bewegt sich das Immunsystem unter Therapie in die richtige Richtung?

Unter immunstimulierender Therapie (z. B. mit Mistel-, Organ- oder Mikroorganismen-haltigen Präparaten) können folgende Laborparameter zur Verlaufsbeurteilung und Prognoseabschätzung herangezogen werden, die spezifische Fragen beantworten:

#### • Ist eine TH1-Polarisation erreicht worden?

Die Analyse erfolgt im TH1/TH2-Profil mit Messung von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  = TH1) und Interleukin-4 (IL-4 = TH2) nach Stimulation einer Vollblutprobe des Patienten. Basale T-zelluläre Zytokinpiegel (im Blut) sind nicht aussagekräftig, da sie selbst bei schweren Dysbalancen in zu geringen Mengen ins Blut abgegeben werden. Ziel einer immunstimulierenden Therapie ist immer eine TH1-Polarisation (d. h. IFN- $\gamma$   $\uparrow$ , IL-4  $\downarrow$ ). Die IFN- $\gamma$ -produzierenden TH1-Zellen sind die wichtigsten Effektorzellen, die zur Elimination „entarteter“ Zellen beitragen.

IMD Labor Berlin		Ärztlicher Befundbericht	
Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
<b>TH1/TH2 - Balance</b> Angegeben sind die Zytokinkonzentrationen nach 24 Stunden Stimulation mit ConA/SEB.			
IFN- $\gamma$ (TH1)	463	pg/ml	374 - 1660
IL-4 (TH2)	<b>330</b>	pg/ml	28 - 141
TH1/TH2 Ratio	<b>1,4</b>		6,1 - 21
Der Befund zeigt eine deutliche TH1/TH2-Dysbalance mit Überwiegen der TH2-Immunantwort.			

**Abb. 1** Ungünstiges TH2-Übergewicht bei einem Patienten mit metastasierendem Rektum-Ca vor Therapie. Ziel einer immunstimulierenden Therapie ist ein Anstieg von IFN- $\gamma$  bei Abfall von IL-4.

#### • Bleibt der Anteil immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen (Treg) niedrig?

Die regulatorischen T-Zellen (Treg) sind eine wichtige Untergruppe der CD4-Zellen (normal ca. 4-10 %). Sie nehmen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz ein, die bei Tumorerkrankungen kontraproduktiv ist. Regulatorische T-Zellen hemmen die Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und anderen Immunzellen gegen Tumorantigene und unterstützen somit das Tumorwachstum. Es konnte eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Treg-Zellen und dem Status des Tumors nachgewiesen werden. Fortgeschrittene Tumorstadien zeigten dabei eine zunehmende Infiltration des Gewebes mit Tregs. Zudem konnte ein inverser Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tregs im Tumorgewebe und der Überlebensrate aufgezeigt werden.

Treg-Zellen eignen sich sehr gut als Verlaufsmarker bei immunmodulierenden Therapien. Prognostisch günstig ist, wenn sie nicht ansteigen. Labordiagnostisch werden regulatorische T-Zellen zytofluorometrisch anhand der Markerkonstellation CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> identifiziert.

Additiv zu diesem Nachweis wird auf Treg-Zellen das Oberflächenmolekül CD39 nachgewiesen. CD39 ist ein membranständiges Protein (Ektoenzym), welches die Umwandlung von ATP bzw. ADP in AMP bewirkt. Das AMP wird extrazellulär in Adenosin umgewandelt, welches immunsuppressiv wirkt. Der Nachweis der CD39<sup>+</sup> Treg-Fraktion kann somit einen Hinweis über die aktuelle immunsuppressive Kapazität der Treg-Zellen geben.

Haben Sie Fragen? Unser Service Team beantwortet sie gerne unter +49 (0)30 770 01-220.

• **Steigen die CD8-Zellen mit zytotoxischer Effektorkapazität an?**

Der häufig auch heute noch falsch verwendete Begriff CD8-Suppressorzellen für die gesamte CD8-Population ist überholt. Der „CD28-Status“ differenziert die CD8-Lymphozyten in Zellen mit zytotoxischen Eigenschaften und solche, die tatsächlich eine suppressorische (immunsuppressive) Funktion innehaben. Es ist verständlich, dass eine immunstimulierende Therapie zum Ziel hat, den Anteil an zytotoxischen, d.h. CD28-positiven CD8-Zellen zu erhöhen.

• **Wie ist die Thymus-Restfunktion des Patienten?**

Der Oberflächenmarker CD31 charakterisiert eine Subpopulation der naiven CD4-Helferzellen, die erst kürzlich den Thymus verlassen haben. Man spricht von „recent thymic emigrants – RTE-Zellen“. Der Anteil der CD31+ naiven CD4-Zellen im Blut ist somit ein Maß für die verbliebene Thymus-Restfunktion. Eine verminderte Thymusfunktion äußert sich in einer reduzierten „Nachschubfähigkeit“ an jungfräulichen T-Lymphozyten vor allem dann, wenn z.B. durch Infektionen oder nach Chemo- oder Strahlentherapie ein verstärkter „Verbrauch“ stattfindet. Die Untersuchung ist somit sinnvoll vor immunologisch belastenden Therapien zur Abschätzung der Regenerationsfähigkeit und evtl. Planung früher Intervention (Immunrestaurations-Marker).

**Die genannten Parameter sind neben den bekannten Standardanalysen wie CD4-, CD8-, NK- und B-Zellen sowie aktivierten T-Zellen im quantitativen Immunprofil „Immunkompetenz Tumor“ enthalten.**

**Welches diagnostische Vorgehen ist zu empfehlen?**

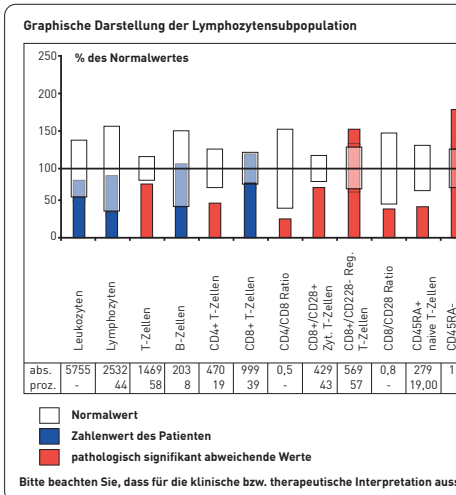
Vor immunstimulierender Therapie

1. LTT-Immunkompetenz + NK-Zellzytotoxizitätstest (zur Indikationsstellung und als Ausgangsbasis)
2. Quantitatives Immunprofil „Immunkompetenz Tumor“
3. TH1/TH2-Profil (als Ausgangswert)

Die Wiederholung der Analysen 6-8 Wochen nach Beginn der Immunstimulation beantwortet folgende Fragen:

1. Hat sich die Funktion der T-Lymphozyten und der NK-Zellen verbessert?
2. Zeigen sich Verschiebungen bei den zellulären Markern, die für eine nachhaltige Verbesserung der immunologischen Situation sprechen (v.a. Treg-Zellen und Anteil an CD39+ Treg-Zellen, CD28+ zytotoxische T-Zellen)
3. Konnte eine TH1-Polarisation erreicht werden (IFN-γ Anstieg und/oder IL-4-Abfall?)

Anschließend sind in Abhängigkeit von der klinischen Situation Kontrollen im Abstand von 4-8 Monaten zu empfehlen, wobei man sich auf die im Ausgangsbefund pathologischen Befunde beschränken kann.



**Abb. 2** Das quantitative Immunprofil „Immunkompetenz Tumor“ wurde hier bei einer 58-jährigen Patientin mit Mamma-Ca erstellt. Immunstimulierende Maßnahmen sollten bei dieser Befundkonstellation nur „unter Sicht“ vorgenommen werden, da die regulatorischen CD8+/CD28-T-Zellen sowie der Anteil der CD39+ Tregs (CD4+/CD25+/-/CD127low) erhöht sind. Die regulatorischen T-Zellen sollten unter Therapie nicht signifikant ansteigen.

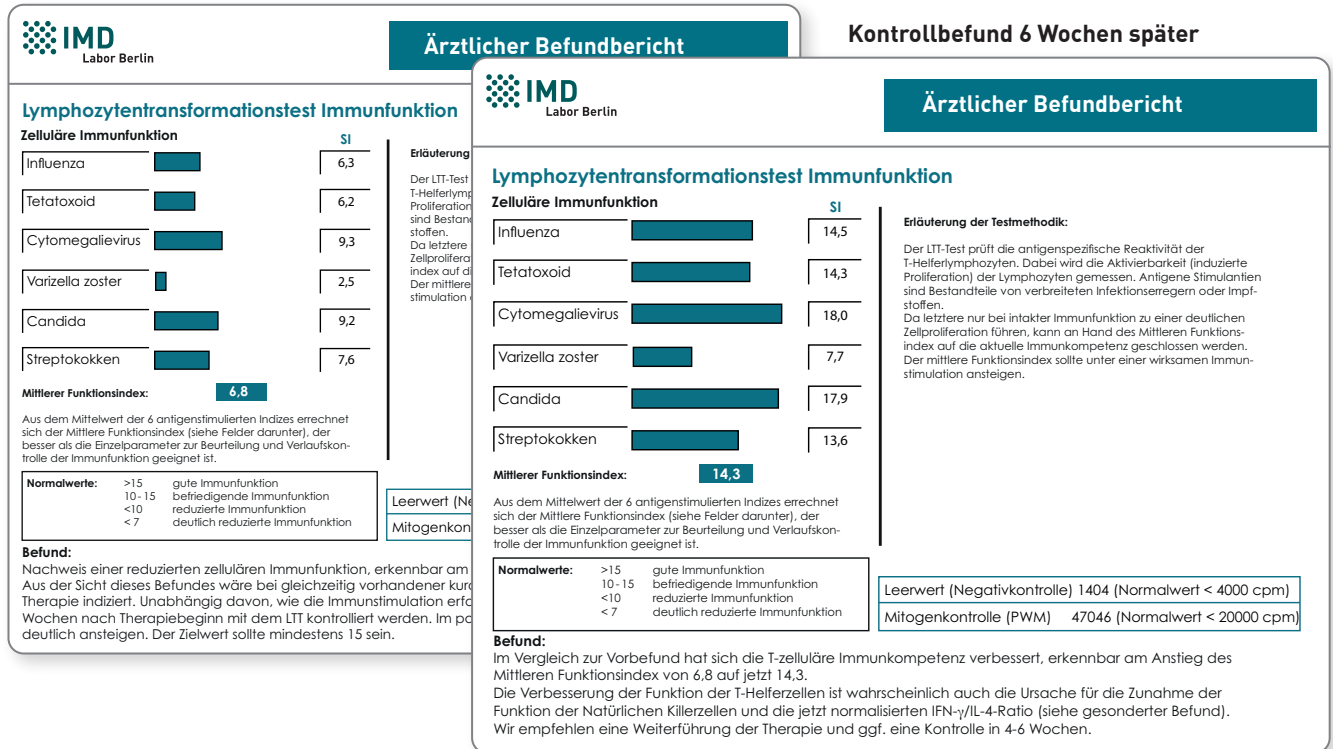
Der Befund wird immer numerisch und graphisch zur Verfügung gestellt.

IMD Labor Berlin		Ärztlicher Befundbericht	
		Normwerte	Normwerte
Leukozyten	5755 /µl	3900 - 10200	
Lymphozyten	2532 /µl	1100 - 4500	44 %
Monozyten	576 /µl	100 - 900	10 %
Granulozyten	2647 /µl	2400 - 7400	46 %
<b>Immunkompetenz</b>			
T-Zellen	1469 /µl	920 - 2580	58 %
B-Zellen	203 /µl	120 - 630	8 %
NK-Zellen	861 /µl	210 - 740	34 %
CD4+ T-Helferzellen	470 /µl	550 - 1460	19 %
CD8+ T-Zellen	999 /µl	280 - 930	39 %
naive T-Zellen (CD45RA+)	279 /µl	300 - 1200	19 %
Thymusreserve (CD31+)			88 %
<b>Immunkompetenz</b>			
CD4/CD8-Ratio	0,47	1 - 3	
aktivierte T-Zellen (HLA-DR+)	206 /µl	< 230	8 %
präaktivierte T-Zellen (CD25+)	177 /µl	< 230	7 %
memory T-Zellen (CD45RA-)	1190 /µl	300 - 1300	81 %
CD8+/CD28+ (zytotoxisch)	429 /µl	238 - 448	43 %
aktivierte NK-Zellen	23 /µl	< 40	2,7 %
CD4+/CD8+ T-Zellen			0,7 %
<b>Immuntoleranz</b>			
Treg (CD4+/CD25+/-/CD127low)	22 /µl	35 - 120	4,7 %
Anteil CD39+ Treg			64 %
CD8+/CD28- (regulatorisch)	569 /µl	100 - 370	57 %
CD8/CD28-Ratio	0,75 /µl	1 - 2,8	
Immunkompetenz: intakt – lediglich leicht verminderte CD4-Zellen Thymusreserve: liegt im altersbezogenen Referenzbereich Immunkompetenz: moderate Hinweise – leicht erhöhte CD8- und NK-Zellen sowie erhöhter Anteil an memory T-Zellen (Hinweis auf chronische Immunkompetenz) Immuntoleranz: tendenziell gesteigert – erhöhte regulatorische (CD8+/CD28-) T-Zellen sowie erhöhter Anteil CD39+ Tregs (CD4+/CD25+/-/CD127low), was Hinweis für eine funktionelle Immunsuppression sein kann.			

**Erläuternde Darstellung eines sehr guten Verlaufsberichtes nach alternierender Therapie mit Mistel und einem Thymuspräparat bei einer 54-jährigen Patientin mit Mamma-Ca.**

**1. LTT-Immunkompetenz**

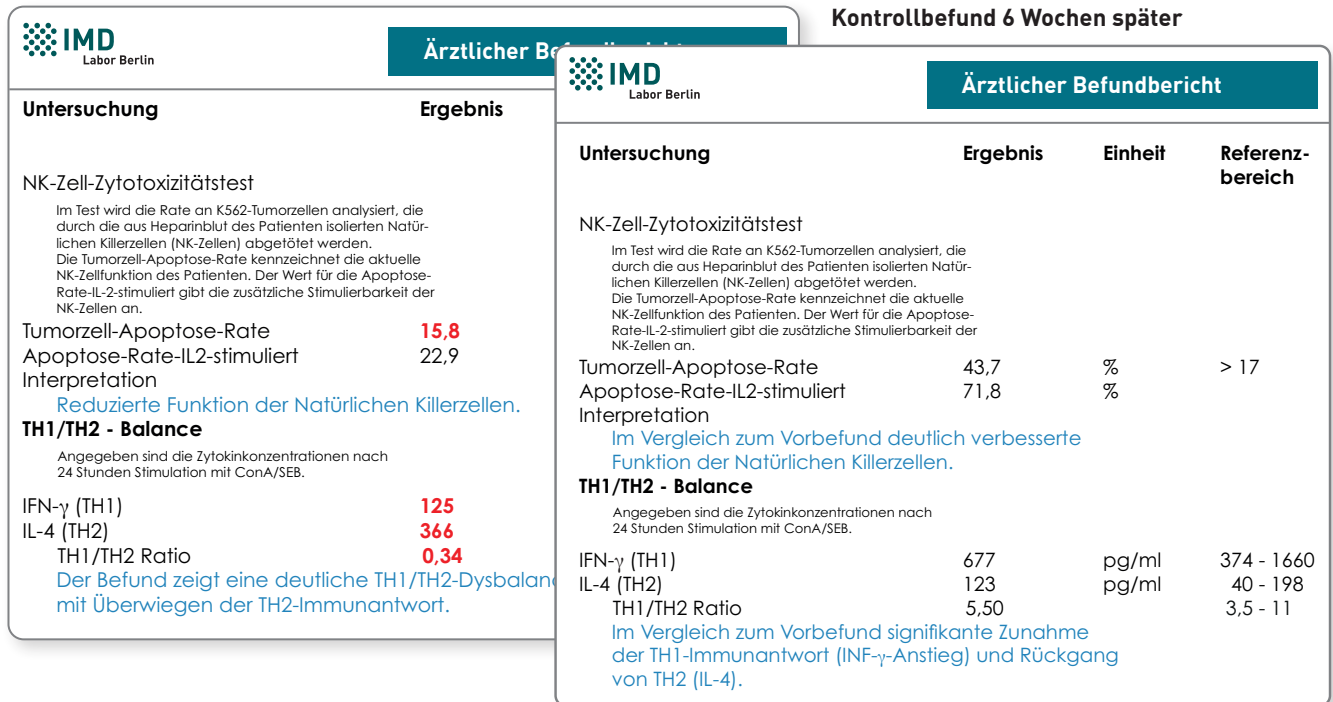
**Vorbefund**



**Abb. 3** Der LTT-Immunkompetenz erlaubt die Analyse der Funktion von Lymphozyten sowie indirekt auch der Monozyten und Dendritischen Zellen. Der Test beruht auf dem Prinzip der Lymphozytenstimulation durch Gedächtnisantigene (Recallantigene), gegen die bei intakter zellulärer Immunkompetenz eine starke Immunreaktivität bestehen sollte. Im Testansatz werden diese Antigene durch Monozyten und dendritische Zellen aufbereitet und den T-Helferlymphozyten präsentiert. Diese werden in Korrelation zur aktuellen Immunkompetenz aktiviert und zur Zellteilung angeregt. Die dabei obligate DNS-Synthese wird quantitativ erfasst.

**2. NK-Zell-Zytotoxizitätstest und TH1/TH2-Profil**

**Vorbefund**



**Abb. 4** Beim NK-Zell-Zytotoxizitätstest wird im Labor eine Tumorzelllinie mit dem Membranfarbstoff Calcein markiert. Anschließend werden unter standardisierten Bedingungen die NK-Zellen des Patienten zugesetzt. Bei dem durch die NK-Zellen induzierten Lyseprozess der Tumorzellen wird der Farbstoff Calcein freigesetzt und dann quantitativ bestimmt. Durch Paralleluntersuchung standardisierter Kontrollansätze kann somit der prozentuale Anteil an zerstörten Tumorzellen bestimmt werden. Zur Untersuchung der TH1/TH2-Balance wird heparinisiertes Blut des Patienten für 24 h mit unspezifischen Stimulantien (Concanavalin A und SEB) versetzt. Anschließend werden die in den Überstand freigegebenen Zytokine mittels Multiplex-ELISA parallel aus einem Ansatz bestimmt.

### 3. Immunprofil „Immunkompetenz Tumor“

#### Vorbefund

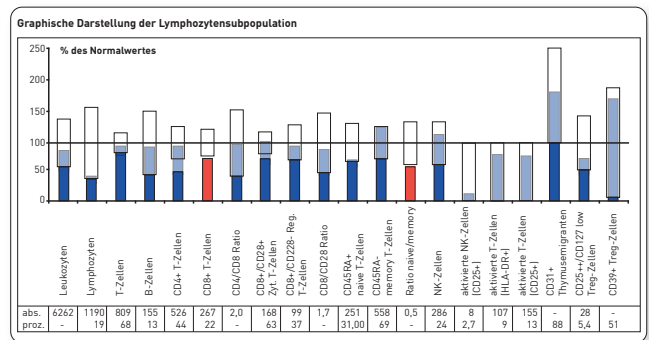
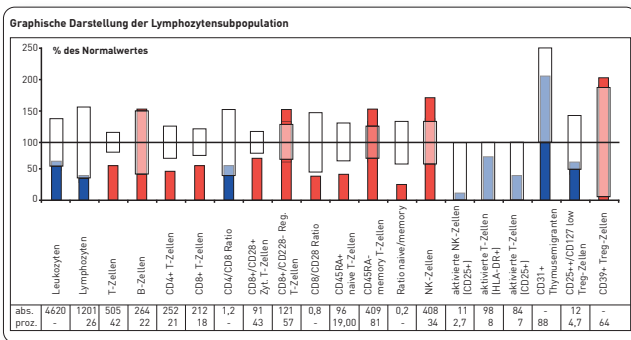
IMD Labor Berlin		Ärztlicher Befundbericht			
		Normwerte		Normwerte	
Leukozyten	4620 /µl	3900 - 10200			
Lymphozyten	1201 /µl	1100 - 4500	26 %	20 - 44	
Monozyten	416 /µl	100 - 900	9 %	2 - 9,5	
Granulozyten	3003 /µl	2400 - 7400	65 %	42 - 75	
<b>Immunkompetenz</b>					
T-Zellen	505 /µl	920 - 2580	42 %	61 - 84	
B-Zellen	264 /µl	120 - 630	22 %	7 - 21	
NK-Zellen	408 /µl	210 - 740	34 %	10 - 30	
CD4+ T-Helferzellen	267 /µl	550 - 1460	22 %	32 - 60	
CD8+ T-Zellen	227 /µl	280 - 930	19 %	23 - 40	
naive T-Zellen (CD45RA+)	96 /µl	300 - 1200	19 %	30 - 63	
Thymusreserve (CD31+)			88 %	> 54	
<b>Immunkaktivierung</b>					
CD4/CD8-Ratio	1,18	1 - 3			
aktivierte T-Zellen (HLA-DR+)	96 /µl	< 230	8 %	< 11	
präaktivierte T-Zellen (CD25+)	84 /µl	< 230	7 %	< 18	
memory T-Zellen (CD45RA-)	409 /µl	300 - 1300	81 %	37 - 70	
CD8+/CD28- [zytotoxisch]	98 /µl	238 - 448	43 %	49 - 73	
aktivierte NK-Zellen	11 /µl	< 40	2,7 %	< 17	
CD4+/CD8+ T-Zellen			0,4 %	< 5	
<b>Immuntoleranz</b>					
Treg (CD4+/CD25+//CD127low)	13 /µl	35 - 120	4,7 %	4 - 10	
Anteil CD39+ Treg			64 %	< 54	
CD8+/CD28- [regulatorisch]	129 /µl	100 - 370	57 %	26 - 51	
CD8/CD28-Ratio	0,75 /µl	1 - 2,8			

**Immunkompetenz:** reduziert - CD4- und CD8-Zellen vermindert  
**Thymusreserve:** liegt im altersbezogenen Referenzbereich  
**Immunkaktivierung:** dezente Hinweise - erhöhter Anteil an memory T-Zellen (Hinweis auf chronische Immunkaktivierung)  
**Immuntoleranz:** tendenziell erhöht - regulatorische (CD8+/CD28-) T-Zellen erhöht sowie erhöhter Anteil an CD39+ Treg (CD4+/CD25+//CD127-), was Hinweis für eine funktionelle Immunsuppression sein kann.

#### Kontrollbefund 6 Wochen später

IMD Labor Berlin		Ärztlicher Befundbericht			
		Normwerte		Normwerte	
Leukozyten	5800 /µl	3900 - 10200			
Lymphozyten	1160 /µl	1100 - 4500	20 %	20 - 44	
Monozyten	348 /µl	100 - 900	6 %	2 - 9,5	
Granulozyten	4292 /µl	2400 - 7400	74 %	42 - 75	
<b>Immunkompetenz</b>					
T-Zellen	789 /µl	920 - 2580	68 %	61 - 84	
B-Zellen	151 /µl	120 - 630	13 %	7 - 21	
NK-Zellen	220 /µl	210 - 740	19 %	10 - 30	
CD4+ T-Helferzellen	497 /µl	550 - 1460	43 %	32 - 60	
CD8+ T-Zellen	260 /µl	280 - 930	22 %	23 - 40	
naive T-Zellen (CD45RA+)	245 /µl	300 - 1200	31 %	30 - 63	
Thymusreserve (CD31+)			79 %	> 54	
<b>Immunkaktivierung</b>					
CD4/CD8-Ratio	1,91	1 - 3			
aktivierte T-Zellen (HLA-DR+)	104 /µl	< 230	9 %	< 11	
präaktivierte T-Zellen (CD25+)	151 /µl	< 230	13 %	< 18	
memory T-Zellen (CD45RA-)	544 /µl	300 - 1300	69 %	37 - 70	
CD8+/CD28- [zytotoxisch]	164 /µl	238 - 448	63 %	49 - 73	
aktivierte NK-Zellen	6 /µl	< 40	2,7 %	< 17	
CD4+/CD8+ T-Zellen			0,1 %	< 5	
<b>Immuntoleranz</b>					
Treg (CD4+/CD25+//CD127low)	27 /µl	35 - 120	5,4 %	4 - 10	
Anteil CD39+ Treg			51 %	< 54	
CD8+/CD28- [regulatorisch]	96 /µl	100 - 370	37 %	26 - 51	
CD8/CD28-Ratio	1,7 /µl	1 - 2,8			

Im Vergleich zum Vorbefund zeigt sich tendenziell ein Anstieg der CD4-Zellen.  
 Die Fraktion der zytotoxischen (CD8+/CD28-) T-Zellen hat zugenommen.  
 Abfall der CD39+ Tregs bei fast unverändertem Gesamtanteil der CD4+/CD25+//CD127- Treg-Zellen sowie Rückgang der regulatorischen (CD8+/CD28-) T-Zellen.  
 Aus Sicht dieses Befundes spricht nichts gegen eine Fortführung der Therapie.



**Abb. 5** Die Differenzierung der Immunzellen erfolgt anhand der Bindung fluoreszenzmarkierter monoklonaler zellspezifischer Antikörper und anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Die graphische Darstellung dient lediglich der besseren Erkennung von abweichenden Verteilungen.

#### Material

##### LTT-Immunkompetenz:

20 ml Heparinblut + 5 ml Vollblut (Serum)

##### NK-Zell-Zytotoxizitätstest:

10 ml Heparinblut

##### Quantitatives Immunprofil „Immunkompetenz Tumor“

2 ml EDTA-Blut

##### TH1/TH2-Profil:

5 ml Heparinblut

#### Abrechnung

Eine Abrechnung für die **LTT-Immunkompetenz** und das **Quantitative Immunprofil „Immunkompetenz Tumor“** ist bei gegebener Indikation im kassen- und privatärztlichen Bereich gegeben.

Eine Abrechnung für den **NK-Zell-Zytotoxizitätstest** und das **TH1/TH2-Profil** ist nur im privatärztlichen Bereich (GOÄ) gegeben. Für Selbstzahler bitte die Preise bei unserem Serviceteam erfragen.

#### Sie wollen sich einen Vortrag dazu ansehen?

Zu diesem Thema steht Ihnen in unserem Videoarchiv ein Übersichtsvortrag zur Verfügung. Der Zugang ist ohne Anmeldung und kostenfrei möglich.

**inflammatioTHEK** [www.inflammatio.de](http://www.inflammatio.de)

#### Literatur

- AM Gallimore et al. Positive and negative influences of regulatory cells on tumour immunity. *Oncogene* 2008; 27:5586-93
- Kohler S, Thiel A. Life after the thymus - CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*. 2008; 26
- Vrisekoop N, van Gent R, de Boer AB, Otto SA, Borleffs JC, Steingrover R, Prins JM, Kuijpers TW, Wolfs TF, Geelen SP, Vulto I, Lansdorp P, Tesselar K, Borghans JA, Miedema F.: Restoration of the CD4 T cell compartment after long-term highly active antiretroviral therapy without phenotypical signs of accelerated immunological aging. *J Immunol*. 2008; 15:181:1573-81
- Kilpatrick RD, Rickabaugh T, Hultin LE, Hultin P, Hausner MA, Detels R, Phair J, Jamieson BD. Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J Immunol*. 2008 1;180:1499-507.
- Sun X, Wu Y, Gao W, Enjyoji K, Csizmadia E, Müller CE, Murakami T, Robson SC. CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice.