



Organ des Zentral-  
verbandes der Ärzte für  
Naturheilverfahren e. V.

Heft 2  
Februar 1992  
33. Jahrgang  
Seite 123–133

# Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren

W. P. Bieger Immundiagnostik bei Tumorkranken



MEDIZINISCH LITERARISCHE VERLAGSGESELLSCHAFT MBH · UELZEN

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Übersicht werden aus der Vielzahl der Möglichkeiten der Immundiagnostik bei Malignomen verschiedene neuere Einzelaspekte ausführlicher diskutiert. Besonderer Stellenwert für die Routinediagnostik wird der Lymphozytencharakterisierung mittels Durchflußzytometrie, der Lymphozytenfunktionsanalyse im Hauttest mit Recall-Antigenen bzw. im In-vitro-Transformationstest und der differenzierten Funktionsanalyse mittels In-vitro-Zytokinfreisetzung beigemessen. Hinzu tritt die Funktionsanalyse der Monozyten/Makrophagen mittels Phagozytose und Chemolumineszenz und eventuell in Zukunft auch die Analyse der NK-Zellaktivität. Alle vorliegenden Ergebnisse weisen auf einen mittleren bis schweren Defekt des spezifischen und unspezifischen zellulären Immunsystems bei Tumorpatienten hin. Allen genannten Diagnoseverfahren gemeinsam ist, daß sie mit hohem Aufwand und entsprechend hohen Kosten verbunden sind, so daß ihre Anwendung im Einzelfall kritisch geprüft werden muß.

**Schlüsselwörter:** Immundiagnostik, Tumornachsorge, Lymphozytentransformationstest, Lymphozytenfunktionsanalyse

### Summary

The present survey summarizes some of the immunological procedures applied in the diagnosis of malignoma patients. Special emphasis is paid to the immuno-phenotyping of lymphocytes by flow cytometry, to the analysis of lymphocyte function by skintesting (Multitest Merieux) or by the in vitro lymphocyte transformation test and to the differential analysis of lymphocyte function by in vitro cytokine measurement. The analysis of monocyte/macrophage function by phagocytosis and chemoluminescence assay and the future role of NK-cell testing is also discussed. All results presented point to a significant defect of unspecific and specific cellular immune function in malignoma patients. The immunological procedures should be used only in special cases since they are all highly cost effective.

**Key words:** immunodiagnosics, subsequent tumour care, lymphocyte transformation test, lymphocyte function analysis

### Résumé

Le présent aperçu traite de façon plus détaillée de divers nouveaux aspects tirés du grand nombre de possibilités d'immunodiagnostic des malignomes. Pour le diagnostic de routine, on accorde une importance particulière à la caractérisation des lymphocytes à l'aide de la cytométrie de passage, à l'analyse fonctionnelle des lymphocytes dans le test cutané avec des antigènes recall ou dans le test de transformation in vitro ainsi qu'à l'analyse fonctionnelle différenciée par le dégagement de cytokine in vitro. Il faut également y ajouter l'analyse fonctionnelle des monocytes/macrophages par phagocytose et chimioluminescence et éventuellement à l'avenir l'analyse de l'activité cellulaire des cellules tueuses. Tous les résultats obtenus jusqu'à présent font état d'un défaut, allant de moyen à grave, du système immunitaire cellulaire spécifique et non spécifique chez les patients atteints de tumeurs. Toutes les méthodes de diagnostic citées ont en commun leur grande complexité et les frais donc élevés qu'elles entraînent; il faut soumettre leur utilisation au cas par cas à un examen critique.

**Mots clés:** diagnose de l'immunité, soins consécutifs de tumeurs, essai de transformation des lymphocytes, analyse de fonctionnement des lymphocytes

### Einleitung

Die Immunologie befindet sich seit Jahren in einem Prozeß rasanter Entwicklung. Begünstigt durch weitreichende methodische und technische Entwicklungen, sind nicht nur die Grundlagen der Immunologie wesentlich transparenter geworden, auch die Anwendung immunologischer Diagnoseverfahren für klinische Fragestellungen hat ungeahnten Aufschwung genommen.

Im Mittelpunkt der Entwicklungen steht die routinemäßige Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper und der Einsatz molekulargenetischer Verfahren. Mit monoklonalen Antikörpern konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl morphologisch und funktionell unterschiedlicher Zellen des Immunsystems identifiziert und charakterisiert werden. Auf molekulargenetischer Ebene wurde die strukturelle Verwandtschaft der Erkennungsmoleküle des Immunsystems (Super-Genfamilie: MHC-Komplex, Immunglobuline, T-Zellrezeptoren) erhellt und die Synthese antigen-

spezifischer Strukturen der spezifischen zellulären Immunität auf aktive Anpassung des zellulären Genoms (DNS-Rearrangement) zurückgeführt.

Von der Vielzahl technischer Entwicklungen ist besonders die Durchflußzytometrie hervorzuheben, die den Einsatz monoklonaler Antikörper in der immunologischen Routinediagnostik etabliert hat.

Damit ist die Analyse und routinemäßige Kontrolle immunologischer Veränderungen als Ursache und Folge zahlreicher Erkrankungen in den Vordergrund gerückt. Hierzu ist im besonderen Maße die Immunologie maligner Erkrankungen zu zählen: Defektmechanismen, die die Vermehrung maligner Zellen ermöglichen, Immunreaktionen mit dem Ziel der Erkennung und Elimination entarteter Zellen, die Messung tumorinduzierter Immundefekte.

Ein Teil der immunologischen Phänomene, die primär oder sekundär mit Beginn, Ausbreitung und Therapie maligner Erkrankungen assoziiert sind, sind der Messung im Routinelabor zugänglich. Im folgenden werden die wichtigsten Verfahren beschrieben und einzelne Ergebnisse vorgestellt. Drei Analyseverfahren wird besondere Bedeutung beigemessen, der Lymphozytentypisierung mit Durchflußzytometrie, der Lymphozytenfunktionsanalyse im Transformationstest und der Bestimmung zellulärer Aktivitätsparameter mittels Zytokinfreisetzung.

**Lymphozytentypisierung, Durchflußzytometrie**

Die Zellen des Immunsystems formen einen unspezifischen und einen spezifischen Arm der Abwehr gegenüber körperfremden Antigenen oder körpereigenen Strukturelementen, die aufgrund von Veränderungen als körperfremd eingestuft wurden, wie z. B. Tumorzellen.

Abb. 1 gibt eine Übersicht der verschiedenen an der Immunabwehr beteiligten Zelltypen. Im Zentrum der unspezifischen Immunantwort steht der Makrophage/Monozyt. Das Antigen wird phagozytiert, intrazellulär fragmentiert, und bestimmte Fragmente werden auf die Zelloberfläche zurück exportiert, wo sie in enger Nachbarschaft zu MHC-Strukturen den nachgeordneten Zellen des Immunsystems präsentiert (1,2) werden. Präsentation in Assoziation mit MHC-II-Strukturen initialisiert die spezifische Erkennung durch T-Helferzellen (CD4), die dann die Phase der spezifischen Immunreaktion einleiten. Neben den CD4-Zellen können auch T-Zellen vom suppressorisch/zytotoxischen Typ (CD8) von Fragmenten in Assoziation mit MHC I aktiviert werden (3, 4). Der Hauptweg der lymphozytären Aktivierung führt jedoch über die Helferzellen, die nach Antigenpräsentation proliferieren und z. T. durch direkten Zell-Zell-Kontakt, z. T. durch Sekretion von Lym-

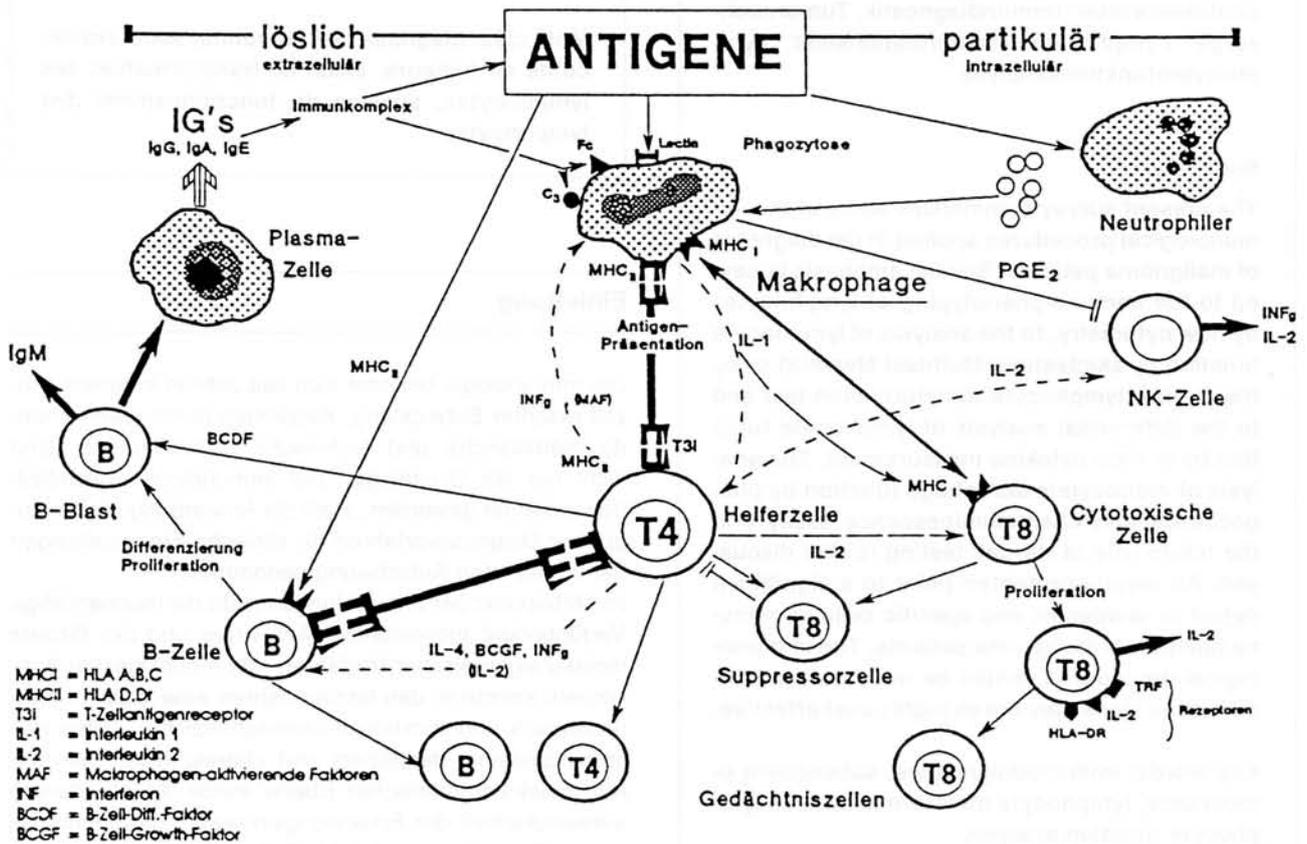


Abb. 1: Die Induktion der antigenspezifischen Immunantwort.

phokinen, nachgeordnete Effektor- und Regulatorzellen aktivieren (5). Auch an der Aktivierung der Helferzellen seitens Makrophagen ist neben dem Antigen-Kontakt ein Zytokin beteiligt, Interleukin 1 (6). Die Aktivierung von B-Zellen durch Kontakt mit Helferzellen wird u. a. gefördert durch Interleukin 4, IL 5, IL 6 und durch Gamma-Interferon (7). B-Zellen proliferieren über B-Lymphoblasten zu Plasmazellen, die spezifisch gegen das Antigen gerichtete Immunglobuline vom Typ IgG, IgA, IgM oder IgE sezernieren. Spezifische Immunglobuline werden außerdem in die Zelloberfläche der B-Zellen integriert und ermöglichen bei erneuter Antigen-Exposition unmittelbare Antigenerkennung und schnellere und effizientere Aktivierung (8). Unter Mitwirkung von Interleukin 2 induzieren aktivierte Helferzellen (9) andererseits Proliferation, Differenzierung und Aktivierung der CD8-positiven T-Zellreihe, die sich zum einen aus regulatorisch bedeutsamen Suppressorzellen, zum anderen aus zytotoxischen Effektorzellen zusammensetzt. Die Suppressorzellen reduzieren gegenregulatorisch die Aktivität der Helferzellen und sind maßgeblich für die Ruhigstellung des zellulären Immunsystems nach erfolgreicher Antigenabwehr.

Die einzige Lymphozytenpopulation, die dem unspezifischen zellulären Immunsystem zuzurechnen ist, ist die natürliche Killerzelle/NK-Zelle (10, 11). Die NK-Zelle wird durch direkten Antigenkontakt, wobei in erster Linie transformierte Zellen (virusinfizierte Zellen, Tumorzellen) als Antigen in Betracht kommen, aktiviert. Die NK-Zelle attackiert und tötet gegebenenfalls die transformierte Zelle ab. Die Aktivität der NK-Zelle wird durch Zytokine, sowohl aus Makrophagen als auch aus Helferzellen (Interleukin 2), moduliert.

Demnach besteht die Population der Helferzellen aus mindestens zwei funktionell unterschiedlichen Hauptgruppen, sogenannten Helfer-Regulatorzellen (Helper-Suppressor-Type), die die suppressorisch aktiven CD8-Zellen aktivieren, und sogenannten Helfer-Effektorzellen (Helper-Inducer-Type), die die B-Zellen bzw. zytotoxischen Zellen aktivieren.

Die Aktivierung der T-Zellen ist zum Teil mit immunologisch faßbaren Veränderungen der Zelloberfläche verbunden. Sie führt zur Expression von IL-2-Rezeptoren, außerdem zur vermehrten Oberflächenexpression von Transferrinrezeptoren und HLA-DR Merkmalen des MHC. Die Expression von IL-2-Rezeptoren erhöht die Effizienz der IL-2-modulierten Interaktion der T-Zellsubpopulationen, die HLA-DR-Expression steigert die Effizienz der MHC-abhängigen Antigenerkennung. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen den IL-2-Rezeptor oder HLA-DR kann der Anteil aktivierter T-Zellen an der Gesamtpopulation ermittelt und somit auf der Basis morphologischer Daten eine funktionelle Aussage bezüglich des Aktivitätszustandes des zellulären Immunsystems gemacht werden. Nach erfolgreichem Antigen-Erstkontakt werden sogenannte Gedächtniszellen der verschiedenen Lymphozytenpopulationen geformt, die das strukturelle Muster des betreffenden Antigens genetisch konservieren. Dies sowohl auf der Seite der B-Zellreihe als auch auf der Seite

der T-Zellreihe mit Ausbildung spezifisch-adaptierter Immunglobulin- bzw. T-Zell-Rezeptoren durch Gen-Rearrangement.

Eine Vielzahl monoklonaler Antikörper (MAb) wurde in den letzten Jahren entwickelt, mit deren Hilfe die Identifizierung der genannten Zellarten nach Zuordnung bestimmter Oberflächenmerkmale zu den Zellarten und ihren funktionellen Untergruppen ermöglicht wurde. Eine Auswahl der wichtigsten Antikörper ist in Tab. I aufgelistet. Die Antikörper werden nach Abschluß der Charakterisierung nach einer international akzeptierten Nomenklatur definiert, z. B. CD3 für T-Zellen, wobei CD für „Cluster Differentiation“ steht.

Für den Einsatz in der Durchflußzytometrie werden die MAb mit Fluoreszeinen oder anderen fluoreszierenden Markermolekülen gekoppelt. Lymphozyten werden zunächst im üblichen Dichtgradientenverfahren isoliert, mit entsprechenden MAb's inkubiert, wobei der markierte Antikörper an Oberflächenmoleküle bindet. Die Zellen werden anschließend gewaschen, mit Formaldehyd fixiert und die spezifische, Zell-assoziierte Fluoreszenz im Durchflußzytometer (z. B. FacScan oder Epics Profile) analysiert. Im Vergleich (Tab. II) zu früheren konventionellen mikroskopischen Analyseverfahren zeichnet sich die Durchflußzytometrie (14) durch ungleich höhere Empfindlichkeit, Schnelligkeit und Präzision aus.

Ein weiterer, wesentlicher Vorteil der Durchflußzytometrie ist die Zelldifferenzierung unter Simultaneinsatz von bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzmarkern. Dies ermöglicht u. a. die exakte Bestimmung aktivierter T-Zellen (12), die neben dem T-Zellmarker CD3 auch Aktivierungsmoleküle aufweisen (HLA DR), oder aktivierter T-Helferzellen (CD4+, HLA DR), T-Suppressorzellen (CD8+, HLA DR) oder verschiedener Reifestadien der B-Zellreihe (CALLA+, CD19+).

Auch die Quantifizierung komplexer Zellpopulationen wird durch den Simultaneinsatz verschiedener MAb möglich. Die Population der NK-Zellen ist nach heute gesicherter Erkenntnis phänotypisch sehr heterogen (13). Mit Hilfe mehrerer monoklonaler Antikörper (z. B. Leu 11, Leu 19, Leu 7) kann die Mehrzahl der NK-Zellen erfaßt werden. Auf diese Weise gelang auch die Abgrenzung der NK-Zellen von mehreren Arten zytotoxischer T-Zellen, die das CD3-Antigen exprimieren, jedoch verschieden strukturierte T-Zellrezeptormoleküle aufweisen. In den letzten Jahren wurden zwei weitere zytotoxische Zellpopulationen charakterisiert, die beide erst unter Einfluß von Interleukin 2 zu Killerzellen ausdifferenzieren: LAK/Lymphokin-aktivierte Killerzellen bzw. TIL/Tumor-infiltrierende Lymphozyten, die unter IL2-Einfluß noch effektiver als LAK stimuliert werden.

Für die Analyse der NK/zytotoxischen Zellen wird in der Routine-Zytometrie eine Mischung von CD3, Leu 11, Leu 19 eingesetzt, so daß die Evaluierung der NK-Zellpopulationen und der CD2-positiven Killerzellen ermöglicht wird.

In Tab. III sind die Zellpopulationen dargestellt, die Gegenstand der Routinedurchflußzytometrie sind.

Tab. I: Lymphozyten-Differenzierungsantigene.

Zellart	Klassifizierung	CD (WHO)	monoklonale AK
T-Lymphozyt	pan T	CD 3	Leu 4, Okt 3
	unreife T-Zelle	CD 7	Leu 9
	E-Rosettenrezeptor	CD 2	Leu 5, Okt 11
	T-Zellrezeptor	—	TA 1, TCR-1
Helfer-Zelle	—	CD 4	Leu 3, Okt 4
	Helfer-Inducer-Subtyp	CD 4 / CDw 29	T 4 / 4 B 4
	Suppressor-Inducer-Subtyp	CD 4 / CD 45 RA	Leu 3 / Leu 18, T 4 / 2 H 4
Suppressorzelle	—	CD 8	Leu 2 / Okt 8
	Zytotoxischer Subtyp	CD 8 / S6F1	CD 8 / S6F1 +
Aktivierte Zelle	HLA DR	—	OKDR, anti HLA DR
	Transferrinrezeptor	CD 71	
	IL 2-Rezeptor	CD 25	anti IL 2 R
NK-Zelle	NK / LGL	CD 16	Leu 11
	NK, zytotox. T-Zelle	CD 56	Leu 19
	HNK-1	CD 57	Leu 7
Thymozyt	—	CD 1	Leu 6, Okt 6/10, T 6
B-Zelle	pan B	CD 19	Leu 12, OKB 2, B 4
	aktivierte B-Zelle	CD 20	B 1, Leu 16
	aktivierte B-Zelle	CD 23	B 6, Leu 20
	prä-B-Zelle, CALLA	CD 10	CALLA
Monozyt	Monozyt	CD 15	Leu M 1, OK M 1, Mo 1
	reifer Monozyt, Makrophage	CD 14	Leu M 3

Der Umfang der Lymphozytendifferenzierung muß von der jeweiligen Fragestellung abhängig gemacht werden. Zu den wichtigsten Parametern für die Beurteilung des Funktionszustandes der Lymphozytenpopulationen zählen die Helfer- und Suppressorzellen (Absolutzahlen) und deren Verhältnis (T4/T8-Quotient) als Hinweis auf das regulatorische Gleichgewicht.

In Tab. IV sind die T-Zellpopulationen und Ergebnisse des Lymphozytentransformationstestes (Mitogen-Test) aufgelistet, wie sie nach eigenen Untersuchungen und nach Literaturangaben (15) bei primären und sekundären Immundefekten gefunden werden. Neben Fällen mit hochgradig gestörter Lymphozytenfunktion und pathologischer Helfer-/Suppressor-Relation finden sich Erkrankungen mit normalem Quotienten und gestörter Funktion.

### Lymphozytentransformationstest

Der Lymphozytentransformationstest zählt zu den ältesten immunologischen Testverfahren (16, 17). Dennoch hat er bis heute keinesfalls an Bedeutung verloren. Der Test basiert auf der spezifischen In-vitro-Stimulation der Proliferation einzelner Lymphozytenpopulationen durch Mitogene (Concanavalin Phytohämagglutinin, Pokeweed

Tab. II: Vergleich Durchflußzytometrie — Mikroskopie.

	Durchflußzytometrie	Mikroskopie
Zeit:	1,5 Minuten	15 - 30 Minuten
Zellzahl gemessen:	5 - 10000	100 - 300
Mehrfachmarkierung:	sehr gut	kaum möglich

Tab. III: Normalprogramm der Lymphozytentypisierung.

Marker	%	Normalverteilung Zellen/ul
Lymphozyten	20 - 40	1600 - 3600
Monozyten	2 - 8	140 - 800
Granulozyten	40 - 80	2000 - 5600
T-Zellen CD 3	61 - 85	860 - 2680
B-Zellen CD 19	7 - 23	110 - 575
T-Helferzellen CD 4	30 - 61,5	480 - 1580
T-Suppressorzellen CD 8	20,6 - 48,5	300 - 1360
aktivierte Zellen HLA DR +	0 - 12	0 - 230
T4 / T8-Quotient CD 4 / CD 8	0,8 - 2,8	
NK-Zellen CD 8-/Leu 11/19 +	10 - 22	160 - 790
zytotoxische CD 8 + /		
T8-Zellen Leu 11/19 +	2 - 10	32 - 360

Tab. IV: Zelluläre Immunität bei Immundefekten.

Diagnose	Mitogen-Test PHA/CON A	PWM	CD 3	CD 4	T-Zell. CD 8	T4/T8
	cpm	cpm	%	%	%	
Gesunde	66.000	28.900	73,0	45,8	34,5	1,3
Rezidiv. Infekte	30.080	12.700	60,6	31,0	38,9	0,8
Pneumonie	22.100	17.100	64,1	28,7	41,0	0,7
Histiozytosis	45.600	22.000	47,0	21,0	21,0	1,0
DiGeorge Syndrom	34.600	8.300	33,5	15,1	42,8	0,4
Hodgkin Lymphom	41.000	16.300	68,2	42,6	38,7	1,1
Malignom	52.00	21.400	65,3	46,3	42,1	1,1
Metastas. Malignom	29.400	5.800	64,1	39,2	56,0	0,7
HIV/ARC	29.400	9.300	62,3	32,3	40,4	0,8
HIV/AIDS	12.300	4.000	60,1	9,1	45,5	0,2

Tab. V: Vergleich beider Testverfahren.

	Multitest in vivo	Mitogen-Test in vitro
Aufwand	gering	groß
Kosten	niedrig	hoch
Altersgrenze	> 1 Jahr	keine
Testdauer	2 Tage	5 Tage
Reproduzierbarkeit	mäßig	sehr gut
Störanfälligkeit	hoch	gering
Sensitivität	mittel	hoch
Material	Patient	1-2 ml NH-Blut

Tab. VI: Effekt einer UV-A1-Behandlung auf das Immunsystem.

Parameter	Basal	UV A 1	Diff. %
Leukozyten (Zellen/ $\mu$ l)	5641	6741	+ 20
Lymphozyten	1499	1511	+ 1
Granulozyten	3819	4720	+ 24
Monozyten	295	376	+ 28
CD 3-Zellen	780	860	+ 11
CD 4-Zellen	343	419	+ 22
CD 8-Zellen	442	359	- 15
4/8-Quotient	1,25	1,53	+ 22
aktiv. Zellen	142	112	- 22
NK-Zellen	365	310	- 18
B-Zellen	145	144	$\pm$ 0
Multitest Merieux (Score)	6,9	13,3	+ 93
Mitogen Response (CPM)			
PHA/Con A	67.100	104.005	+ 55
PWM	23.500	42.530	+ 81
TET. Toxoid	4.800	5.900	+ 23

UV-A 1 (340 - 440 nm) UVASUN 30.000 BIOMED, 750 W/qm  
30 min Bestrahlung/d; Dauer 14 Tage; 2.700.000 Jm<sup>2</sup>/2/d

Mitogen), lösliche Antigene (bakterielle Antigene, Toxine, virale Antigene etc.) oder Zytokine. Die Transformation der Lymphozyten wird anhand der Einbaurates von radioaktiv markiertem Thymidin in die zelluläre DNS gemessen. Sowohl B-Zellen als auch T-Zellen oder T-Helferzellen können selektiv stimuliert werden. Trotz unübersehbarer methodischer Schwächen hat sich der Test in der Routine für die Lymphozytenfunktionsanalyse hervorragend bewährt.

Vergleichbare Resultate liefert der Hauttest mit Recall-Antigenen, der sogenannte Multitest Merieux (18). Das Ausmaß der Hautreaktion nach Aufbringen der Antigene ist ein zufriedenstellendes Maß der zellulären Immunfunktion. Die mit dem Multitest Merieux gewonnenen Ergebnisse sind z. T. direkt mit denen des In-vitro-Lymphozytentransformationstestes vergleichbar. Dennoch werden in Einzelfällen erhebliche Diskrepanzen in der Aussage beider Testverfahren beobachtet. *Stickl* (19) konnte in einer Studie mit Malignompatienten zeigen, daß bei scheinbar unauffälligem Hauttest in der Mehrzahl der Fälle der Lymphozytentransformationstest pathologisch war. In Tab. V sind die Unterschiede der beiden Testverfahren zusammengefaßt.

In einer Studie (20) über den Einfluß von UV-A1-Strahlung auf das zelluläre Immunsystem konnte neben der Analyse der Lymphozytensubpopulationen der Funktionszustand der Probanden-Lymphozyten mit beiden Testverfahren verfolgt werden (Tab. VI). Während für unselektiertes UV-Licht in früheren Studien ein immunsuppressiver Effekt beschrieben wurde (21), konnte für längerwelliges UV-A1-Licht (340 bis 440 nm) ein überraschend ausgeprägter immunstimulierender Effekt nachgewiesen werden.

Die positiven Effekte des langwelligen Lichtes sind offensichtlich durch die toxischen Effekte des kurzwelligen UV-Lichtes bei unselektierter UV-Einstrahlung überdeckt. In einer analog durchgeführten Studie bei Malignompatienten (22) konnte auch in dieser Patientengruppe ein ausgeprägter immunstimulierender Effekt des langwelligen UV-A1-Lichtes demonstriert werden. Abgesehen von einer mäßiggradigen Zunahme der Helferzellen mit Anstieg des Helfer/Suppressorquotienten ist die Aktivierung der Lymphozyten sowohl im Hauttest als auch im Mitogen-Test besonders hervorzuheben. Dabei kam es nicht nur zu einer Aktivierung im Sinne einer Normalisierung bei supprimierten Zellen von Malignompatienten, sondern bei Normalpersonen auch zu einer starken Stimulation über das Basalniveau hinaus.

## Lymphokine

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Peptiden identifiziert, die von Immunzellen sezerniert werden und inzwischen einheitlich als Zytokine bezeichnet werden (7). Zytokine werden je nach Zelltyp auch als Lymphokine bei Sekretion durch Lymphozyten bzw. als Monokine bei Sekretion durch Monozyten/Makrophagen bezeichnet. Ihre

Tab. VII: Übersicht über die für Tumordiagnostik (und Therapie) relevanten Zytokine.

Zytokin	Synonyme	Herkunft	Hauptwirkungen
Interferon-alpha	Leukozyten-Interferon	Leukozyten	Zytotoxisch, immunmodulierend Expression von Tumorantigenen und MHC
Interferon-beta	Fibroblasten-Interferon	Fibroblasten T-Zellen	s. o.
Interferon-gamma	Immun-Interferon	T-Zellen	s. o.
Interleukin 1	Lymphozytenaktivierender Faktor	Makrophagen/ Monozyten	Stimuliert T- und B-Zellen Induktion von Zytokinsekretion (IL 2, IL 6, INF, TNF)
Interleukin 2	T-Zell-Wachstumsfaktor	aktivierte T-Zelle (CD 4)	Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, NK-Zellen, LAK-Zellen, TIL-Zellen
Interleukin 4	BSF-1, B-Zell-Wachstumsfaktor	T-Zellen	B-Zellstimulation (IgG 4, IgE), Mastzellen
Interleukin 5	Eo-CSF	T-Zellen	B-Zellstimulation, Eosinophilie
Interleukin 6	IFN-b2, BSF-2 BCDF	T-Zellen Monozyten	B-Zellstimulation Entzündungsreaktionen (Leber) Granulozyten, Monozyten
Interleukin 7	präß-CGF Lymphopoetin 1	Thymozyten	Stimulation der B-Zellreifung, T-Zellen
TNF alpha	Kachektin	Makrophagen/ Monozyten	Tumornekrose, zytotoxische Substanz der NK-Zellen und Makrophagen, Synergie mit INF. Stimulation von Zytokinen, Prostaglandinen, Hormonen
TNF beta	Lymphotoxin	T-/B-Zellen	s. o.

Zahl nimmt fast wöchentlich weiter zu. Unter den zur Zeit bekannten Zytokinen kommt den in Tab. VII aufgelisteten herausragende Bedeutung zu.

Für die Mehrzahl der Lymphokine wurden inzwischen Immunoassays zum quantitativen Nachweis in Körperflüssigkeiten und Kulturüberständen etabliert. Zu erwähnen ist außerdem, daß verschiedene Zytokine, insbesondere IL1, IL2, Gamma-Interferon und Alpha TNF-Eingang in die Tumorthherapie gefunden haben.

Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen eröffnet die Möglichkeit, die dynamische Interaktion der Immunzellen zu objektivieren. Die Messung der Serumkonzentration ist jedoch bisher nur beschränkt möglich. Zum einen liegen die Zytokinkonzentrationen im Normalfall außerordentlich niedrig im Picogramm-Bereich, zum anderen begrenzen kurze Plasmahalbwertszeiten den Interpretationsspielraum. Dennoch wurden in Einzelfällen relevante Ergebnisse gewonnen (Tumorthherapie, AIDS-Syndrom, schwere Infektionen, Sepsis, aktives Stadium von Autoimmunerkrankungen).

Wesentlich unproblematischer ist die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand nach In-vitro-Inkubation isolierter Lymphozytenpopulationen. Dabei können bis zu 1000fach höhere Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand als im Serum gemessen werden. Die In-vitro-Bestimmung hat sich als hervorragendes Meßver-

fahren für den Funktionszustand der Immunzellen erwiesen, wobei die Messung verschiedener Zytokine Rückschlüsse auf den Funktionszustand einzelner Zellarten erlaubt. Die Messung ist ebenso gut geeignet für den Wirkungsnachweis immunmodulierender Substanzen.

Tab. VIII: Lymphozytenfunktion bei Malignom.

	Kontrolle	Patient	Diff. %
Mitogen Response (cpm)			
PHA/ConA	77.300	51.000	-34
PWM	28.600	16.600	-42
TET	6.100	5.020	-18
Lymphokine in vitro (U/ml) (PHA/PWM-Stimulation)			
IL 2	1.280	760	-41
IL 6	8.300	6.730	-19
INFg	560	405	-28
TNFa (pg/ml)	1.420	1.105	-22

**Mitogen response:**

3H-Thymidin-Einbaurate (1 uCi/ml); 4 Tage Kultur, 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml.

**Lymphokinfreisetzung:**

10<sup>6</sup> Lymphozyten/ml. 4 Tage Kultur mit PHA + PWM. Lymphokinnachweis im Überstand mit RIA/Elisa.

In eigenen vorläufigen Messungen wurden bei Tumorpapienten neben den bereits beschriebenen Funktionsdefekten im Lymphozytentransformationstest signifikante Einschränkungen der Zytokinfreisetzung *in vitro* gefunden (Tab. VIII).

Die Konzentration aller im Kulturüberstand gemessenen Zytokine (IL 2, IL 6, Gamma-Interferon, Alpha-TNF) lag nach Mitogenstimulation bei Tumorpapienten erheblich niedriger als bei gesunden Probanden. Die Einschränkung der IL-2-Sekretion fiel besonders ins Gewicht, eventuell als Hinweis auf eine zentrale Funktionseinschränkung der T-Helferzellen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den genauen Stellenwert der *In-vitro*-Zytokinbestimmung für die immunologische Funktionsdiagnostik bei Tumorpapienten zu ermitteln.

### Phagozytose, NK-Zellen

Abschließend soll noch auf die Makrophagen eingegangen werden, deren besondere Rolle für die Immunabwehr bei Malignomen nicht unterschätzt werden kann. Damit stellt auch die Funktionsanalyse der Makrophagen eine wesentliche Komponente der Immundiagnostik bei Malignomen dar.

Während der Makrophage als gewebsgebundene Zelle nur bedingt zugänglich ist, liefert der im peripheren Blut zirkulierende Monozyt grundsätzlich die gleichen Resultate. Als Vorstufe der Makrophagen ist er mit den gleichen Funktionen ausgestattet, wenn auch aufgrund geringeren Reifegrades in reduzierter Aktivität (23). Der Monozyt/Makrophage steht im Mittelpunkt der Antigen-Primärantwort, ausgestattet mit der Fähigkeit der unspezifischen Reaktion. Zu diesem Zeitpunkt existieren noch keine antigenspezifischen Lymphozyten (Gedächtniszellen) der B- und T-Zellreihe. Der Makrophage realisiert ein potentielles Antigen nicht auf immunologischer, sondern auf physikalisch/morphologischer Basis. Die Einzelheiten des Erkennungsmechanismus sind noch wenig bekannt. Dem Makrophagen kommt die Primärentscheidung darüber zu, ob eine maligne entartete, körpereigene Zelle als Antigen realisiert und eine Immunantwort ermöglicht wird. Der Aktivitätszustand, in dem sich der Makrophage zu diesem Zeitpunkt befindet, ist von entscheidender Bedeutung (24). Tierversuche haben gezeigt, daß aktivierte Makrophagen wesentlich effizienter in der Lage sind, ein Tumorzellinokulat zu eliminieren als ruhende Zellen.

Die Aktivität von Makrophagen/Monozyten kann in verschiedenen Testverfahren ermittelt werden. Dabei stehen allerdings nur einzelne der zahllosen Makrophagen-Aktivitäten zur Disposition. In der Routinediagnostik haben

Tab. IX: Immundiagnostik bei Tumoren: Übersicht.

	Flow Zytometrie	In-vitro-Kultur	Serum
<b>I. unspezifische Immunität</b>			
Makrophagen	-Phagozytose	Chemolumineszenz Candida Killing	Interleukin 1  Neopterin
NK-Zellen	Typisierung Leu 11/19 Leu 7 CD 8 +/-	Zytotoxizitätstest	
<b>II. spezifische Immunität</b>			
T-Zellen	CD 3-Typisierung aktivierte T-Zellen HLA-DR; IL 2-R; TRF-R CD 4/Helferzellen Helfer/Inducer Helfer/Suppressor CD 8/Suppressorzellen zytotoxische T-Zellen CD 1/Thymozyten	Mitogen-Stimulation PHA, ConA, Okt 3 Lymphokine <i>in vitro</i> IL 1, IL 2, IL 6, TNF, INF	$\beta$ 2-Mikroglobulin sIL 2-Rezeptor, sCD 4, sCD 8 Interleukin 2  Interferon gamma Interleukin 6 TNF alpha
B-Zellen	Typisierung CALLA/CD 10 CD 19  CD 23	Mitogen-Stimulation PWM Tetanustoxoid, etc. Lymphokine <i>in vitro</i> IL 2, IL 4	Interleukin 4
<b>Material:</b> Flow Zytometrie: 2 ml NH (Heparin)-Blut/ Test In-vitro-Kultur: 1 bis 2 ml NH-Blut/ Assay Serum: 0,2 ml Serum /Parameter			

sich etabliert 1. die Analyse der Phagozytoseaktivität, 2. die Analyse der metabolischen Aktivität bzw. metabolischen Funktionskapazität der Zellen durch Bestimmung der basalen und stimulierbaren Chemolumineszenz und (verbunden mit signifikant höherem experimentiellem Aufwand) 3. die Messung der Makrophagen-Migrationsfähigkeit durch Bestimmung der Chemotaxis und gegebenenfalls die Analyse einzelner sekretorischer Produkte (Lysozym).

Die Makrophagenaktivität unterliegt zahlreichen Einflüssen, u. a. metabolischen Faktoren (Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Ernährungszustand), hormonellen Einflüssen (Cortisol, Adrenalin, Thyroxin, Insulin, etc.) und Einflüssen des spezifischen Immunsystems, z. B. Zytokinen. Entsprechend vielseitig ist die Makrophagenaktivität auch durch exogene Faktoren beeinflussbar (25). Zahlreiche Studien am Tiermodell und mit Patienten haben gezeigt, daß die Makrophagenfunktion bei Malignomen eingeschränkt ist. Ungeklärt ist jedoch, ob diesem Befund ursächliche Bedeutung zukommt oder ob es sich um sekundäre Phänomene handelt.

Die zweite Zellpopulation des unspezifischen zellulären Immunsystems, die von entscheidender Bedeutung für die Primärauseinandersetzung mit Antigen ist, ist die Population der natürlichen Killerzellen. Die NK-Zellen stellen eine heterogen zusammengesetzte Zellpopulation dar, die inzwischen, wenn auch mit gewissen Einschränkungen, zufriedenstellend in der Routinediagnostik quantifizierbar ist (s. o.). Die Funktionsanalyse dieser Zellgruppe ist für die Routinediagnostik noch nicht mit vertretbarem Aufwand einsetzbar.

In Tab. IX sind alle angesprochenen Testverfahren zusammenfassend aufgelistet, wobei die verschiedenen Techniken/Kompartimente hervorgehoben sind.

#### Literatur

- Schwarz, R. H.: T-Lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the Major Histocompatibility Complex. *Ann. Rev. Immunol.* 3 (1985) 239.
- Chestnut, R. W., H. N. Grey: Antigen presenting cells and mechanism of antigen presentation. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 5 (1985) 263.
- Strominger, J. L., D. C. Wiley: Structure of human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329 (1987) 506.
- Wiley, D. C.: A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332 (1988) 845.
- Weiss, A., et al.: The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Ann. Rev. Immunol.* 4 (1986) 593.
- Dinarelo, C. A.: Interleukin 1. *Rev. Infect. Dis.* 6 (1984) 51.
- Kaufmann, H. E.: Interleukine. *Dtsch. Ärztebl.* 85 (1988) 2069.
- Reinherz, E. L., et al.: Human B-Lymphocytes. Springer Verlag, 1986.
- Gillis, S.: Interleukin 2; Biology and biochemistry. *J. Clin. Immunol.* 3 (1983) 1.
- Jondal, M.: Review: The human NK-cell—a short overview and an hypothesis on NK recognition. *Clin. Exp. Immunol.* 70 (1987) 255.
- Hebermann, R., C. Reynolds, J. Ortaldo: Mechanism of cytotoxicity by natural Killer (NK) cells. *Ann. Rev. Immunol.* 78 (1984) 651.
- Stelzer, G. T., J. P. Robinson: Flow Cytometric evaluation of Leukocyte function. *Diag. Clin. Immunol.* 5 (1988) 223.
- Lanier, L. L., J. H. Phillips: Evidence for three types of human cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol.* 132 (1984) 151.
- Westermann, J., R. Pabst: Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Imm. Today* 11 (1990) 406.
- Cunningham-Rundles, S., R. Yeger-Arbman, P. Edelson, D. Sanders, P. V. Giardina, M. W. Hilgartner: Experimental Approach to the Study of Immune Function in Children with Possible Human Immunodeficiency Virus Infection. *J. Clin. Lab. Anal.* 4 (1990) 399.
- Thorpe, P. E., S. C. Knight: Microplate culture of mouse lymph node cells. 1 Quantitation of responses to allogeneic lymphocytes, endotoxin and phytomitogens. *J. Immunol. Meth.* 5 (1974) 387.
- Ashman, R. F.: Lymphocyte activation. In: *Fundamental Immunology*, ed. W. E. Paul. Raven Press, New York (1984) 267.
- Adami, G. F., B. Vitale, V. Bachi: Delayed hypersensitivity. Serial evaluation by means of a multitest system. *JRCS Med. Sci.* 9 (1981) 1132.
- Stickl, H., T. Schleich, N. Rumland: Die zellulärvermittelte Abwehrfähigkeit. Vergleich des Lymphozyten-Stimulationsindex und der Kutanreaktion auf Recall-Antigene. *Fortschr. Med.* 104 (1986) 117.
- Hager, E. D., B. Benninghoff, W. P. Bieger, M. F. Mutzhas: Photoimmunotherapy (PIT) by high doses of long-wave UVA. 7. Int. Congr. Immunology (Abstract) (1989) 106.
- Hersey, P., E. Hasic, A. Edwards, M. Bradley, G. Haran, W. H. McCarthy: Immunological effects of solarium exposure. *Lancet* (1983) 545.
- Hager, E. D., B. Benninghoff, A. Pakdaman, H. Stickl, M. F. Mutzhas: Verbesserung zellvermittelter Immunität bei Tumorpatienten durch hochdosierte Phototherapie mit langwelligem UVA. *Dtsch. Zschr. Onkol.* 21 (1989) 42.
- Nathan, C. F., H. W. Murray, Z. A. Cohn: The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* 303 (1980) 622.
- Leskovaar, P.: Neue Modellvorstellungen zu einigen Kernfragen der Immunologie unter besonderer Berücksichtigung der Tumorummunologie. *Dtsch. Zschr. Onkol.* 22 (1990) 1.
- Adolph, T., E. Zoch: Wirkung von homogenen und heterogenen Thymuspräparaten auf die Phagozytosekapazität der neoplastischen Makrophagen (P388) D1 und der Myelomomozysten (WEHI-3). *Dtsch. Zschr. Onkol.* 22 (1990) 129.

#### Anschrift des Verfassers:

Priv.-Doz. Dr. med. habil. W. P. Bieger, Medizinisch-Immunologisches Labor, Mittererstr. 3, D-8000 München 2.