

**Aus der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Wolfgang Janni**

Vergleich der Lymphozytenpopulationen bei Brustkrebspatientinnen, die mit einer stammzellgestützten sequentiellen Hochdosischemotherapie oder einer wachstumsfaktorgestützten dosisintensivierten Chemotherapie behandelt werden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Nevim Karaoglu

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan
Referentin: Prof. Dr. U. Koldovsky
Korreferent: Prof. Dr. N. Gattermann

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. U. Koldovsky dafür danken, dass sie mir das Thema dieser Arbeit zur selbstständigen Bearbeitung überlassen hat, mich hervorragend mit ihrer zügigen, liebevollen und persönlichen Art unterstützt hat. Durch ihre begeisternde, unkomplizierte, pragmatische und sehr spontane Hilfe bei der Durchführung dieser Doktorarbeit ist mein Interesse für die wissenschaftliche Tätigkeit besonders angeregt worden.

Ganz besonderen Dank gebührt meinen Eltern, Havva und Celalettin Karaoglu, die mir nicht nur die Voraussetzungen gaben, eine medizinische Doktorarbeit beginnen zu können, sondern mich auch bei der Fertigstellung auf ihrer Art tatkräftig unterstützt haben.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Geschwistern Sükran, Nermin, Inci, Numan und Tuba für ihre emotionale Unterstützung und für das Korrekturlesen danken.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeiterinnen des Studiensekretariates und des Onkologisch-Immunologischen Labors der UFK Düsseldorf für ihre freundliche Unterstützung, insbesondere Frau Edeltraut Holla für ihre wertvolle Mithilfe.

Diese Arbeit ist gewidmet meinen Eltern und meiner Tochter Selima

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen und Begriffserklärungen	4
2.	Einleitung	5
2.1.	Mammakarzinom, Stadien- und Risikogruppeneinteilung und Prognosefaktoren	5
2.2.	Präoperative (neoadjuvante) Systemtherapie	7
2.3.	Adjuvante Strahlentherapie	8
2.4.	Adjuvante endokrine Therapie	8
2.5.	Adjuvante Chemotherapie	9
2.6.	Nachsorge	9
2.7.	Metastasiertes Mammakarzinom	10
2.8.	Immuntherapeutische Strategien	11
2.9.	Trastuzumabtherapie	11
2.10.	Tumorspezifische Vakzinierung	12
2.11.	Immunsystem des Menschen	13
2.12.	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	14
3.	Material und Methoden	15
3.1.	Patientinnenkollektiv	15
3.2.	Randomisierung	15
3.3.	Therapieregime	15
3.4.	Nachsorge	17
3.5.	Blutabnahmen	18
3.5.1.	Patienteninformation und Datenschutz	18
3.5.2.	Zeitpunkte der Blutabnahmen und Menge des benötigten Blutes	18
3.6.	Messmethoden	18
3.6.1.	Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen	18
3.6.2.	Bestimmung der Lymphozytenfunktionen	19
3.7.	Datenmanagement und statistische Aspekte	20
3.7.1.	Datenmanagement	20
3.7.2.	Statistische Verfahren und Graphiken	20
4.	Ergebnisse	21
4.1.	Anzahl der Patientinnen nach Armzugehörigkeit und klinischem Status	21
4.2.	Adjuvanter stammzellgestützter sequentieller Hochdosis-Chemotherapie-Arm (Arm A)	24
4.2.1.	Verlauf der Lymphozytenphenotypen im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung bis nach 6 und mehr Jahren	24
4.2.1.1.	Verlauf der Gesamt-, T- und B-Lymphozyten	24
4.2.1.2.	Verlauf der CD4- und CD8-Zellen und der Natürlichen Killerzellen	27
4.3.	Adjuvanter wachstumsfaktorgestützter dosisintensivierter Chemotherapie-Arm (Arm B)	31
4.3.1.	Verlauf der Lymphozytenphenotypen im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung bis nach 6 und mehr Jahren	31
4.3.1.1.	Verlauf der Gesamt-, T- und B-Lymphozyten	31
4.3.1.2.	Verlauf der CD4- und CD8-Zellen und der Natürlichen Killerzellen	34
4.4.	Vergleich Phenotyp der Lymphozyten in adjuvant Arm A mit Arm B: Verlauf zwischen Randomisierung und Beobachtung nach 6 und mehr Jahren	38
4.4.1.	Verlauf der Gesamtzellen	38
4.4.2.	Verlauf der T-Lymphozyten	39
4.4.3.	Verlauf der B-Lymphozyten	41
4.4.4.	Verlauf der CD4-T-Zellen	42
4.4.5.	Verlauf der CD8-T-Zellen	43
4.4.6.	Verlauf des Quotienten aus CD4-T-Zellen/CD8-Zellen	44
4.4.7.	Verlauf der Natürlichen Killerzellen	45

4.5.	Vergleich der CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen in Arm A und Arm B bei Patientinnen mit einem Rezidiv	46
4.5.1.	Verlauf der CD4-T-Zellen bei lebenden Patientinnen mit einem Rezidiv	46
4.5.2.	Verlauf der CD4-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben	46
4.5.3.	Verlauf der CD8-T-Zellen bei lebenden Patientinnen mit einem Rezidiv	47
4.5.4.	Verlauf der CD8-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben	48
4.5.5.	Verlauf des Quotienten aus der Zellzahl der CD4- und CD8-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv und zum Zeitpunkt der Auswertung lebend	48
4.5.6.	Verlauf des Quotienten aus der Zellzahl der CD4- und CD8-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben	49
4.6.	Darstellung der Funktionsteste der Lymphozyten in adjuvant Arm A, Arm B und im Vergleich Arm A mit Arm B: Verlauf von der Randomisierung bis nach 1 Jahr	50
5.	Diskussion	53
6.	Zusammenfassung	57
7.	Literaturverzeichnis	58
8.	Anhang	64
8.1.	zu 2.4. Adjuvante endokrine Therapie	64
8.2.	zu 3.1. Patientinnenkollektiv	64
8.3.	zu 4.2. Adjuvanter stammzellgestützter sequentieller Hochdosis-Chemotherapie-Arm (Arm A)	65
8.4.	zu 4.3. Adjuvanter wachstumsfaktorgestützter dosisintensivierter Chemotherapie-Arm (Arm B)	74
8.5.	zu 4.5. Vergleich der CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen in Arm A und Arm B bei Patientinnen mit einem Rezidiv	83
8.6.	zu 4.6. Darstellung der Funktionsteste der Lymphozyten in adjuvant Arm A, Arm B und im Vergleich Arm A zu Arm B: Verlauf von der Randomisierung bis nach 1 Jahr	86
9.	Lebenslauf	88

1. Abkürzungen und Begriffserklärungen

AC	Adriamycin, Cyclophosphamid
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologischer Onkologie
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMG	Arzneimittelgesetz
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCIRG	Breast Cancer International Research Group
BD	Becton & Dickinson
BRCA1	breast cancer type 1 = Brustkrebs 1-Gen
BRCA2	breast cancer type 2 = Brustkrebs 2-Gen
C225	Cetuximab = therapeutischer chimerer monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1
Cand	Candida-Antigen
CD	cluster of differentiation = Differenzierungsantigene auf Zelloberflächen
CD3-Zellen	Lymphozyten mit Zelloberflächenantigen 3, T-Lymphozyten
CD4-Zellen	Lymphozyten mit Zelloberflächenantigen 4, meist Helfer-T-Zellen
CD8-Zellen	Lymphozyten mit Zelloberflächenantigen 8, Suppressor-/Zytotoxische T-Zellen
CD16-Zellen	Lymphozyten mit Zelloberflächenantigen 16, Natürliche Killerzellen (NK)
CD19-Zellen	Lymphozyten mit Zelloberflächenantigen 19, B-Lymphozyten
CD34+	CD34+ Stammzellen, durch CD34-Antigen erkannt
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
ConA	Concavalin-A
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ER+	Estrogenrezeptor positiv
FAC	5-Fluorouracil, Adriamycin, Cyclophosphamid
FEC	5-Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid
FEV	Forciertes Expiratorisches Volumen
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GnRH	Gonadotropin-releasing-Hormon
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
HDC	Hochdosis-Chemotherapie
Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HLA-DR-Zellen	aktivierte T-Lymphozyten, die über das HLA-DR-Antigen gemessen werden
IL-2	Zytokin: Interleukin-2
LK	Lymphknoten
MDACC	MD Anderson Cancer Center
MHC	Major Histocompatibility Complex
OKT3	ORTHOCLONE OKT[®]3 (muromonab-CD3)
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBPC-T	Peripheral Blood Progenitor Cell-Transplantation
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PHA	Phytohaemagglutinin
Poke	Pokeweed
PGR+	Progesteronrezeptor positiv
r-metHuG-CSF	recombinant nicht-glykosylierte Methionin- Humangranulozyten-Kolonien- stimulierender Faktor
SD	Standardabweichung
TNM	Tumor/ Nodes /Metastasen
UFK	Universitätsfrauenklinik
UICC	Union International Contre le Cancer
UpM	Umdrehungen pro Minute

2. Einleitung

2.1. Mammakarzinom: Stadien-und Risikogruppeneinteilung und Prognosefaktoren

Brustkrebs stellt in Deutschland und weltweit die häufigste bösartige Erkrankung der weiblichen Bevölkerung dar und ist die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen.

Nach Schätzung der WHO erkrankten im Jahr 2000 weltweit über eine Million Frauen an einem Mammakarzinom, 370.000 verstarben daran. Für Europa ging man im selben Jahr von 350.000 Neuerkrankungen und 130.000 Sterbefällen aus [1].

Schätzungen der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Instituts (RKI) gehen von jährlich etwa 60 000 Neuerkrankungen in Deutschland aus [2].

Zugeführte Östrogene tragen als Bestandteil von oralen Kontrazeptiva oder als Bestandteil einer langjährigen postmenopausalen Hormonbehandlung substantiell zur Risikoerhöhung bei [3-6]. Neben weiteren Risikofaktoren wie frühe Menarche, späte erste Schwangerschaft, wenige Schwangerschaften, kurzes, bzw. kein Stillen, späte Menopause, Rauchen, geringe körperliche Aktivität, Überernährung, Alkoholkonsum, hormoneller Status und genetische Disposition - (Das Lebenszeitrisiko für Trägerinnen der Gene BRCA1 und BRCA2 liegt bei 80-85% [1]) - spielt das Alter eine entscheidende Rolle.

Das Erkrankungsrisiko nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Der Risikoanstieg ist jedoch besonders auffällig zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr. Damit liegt das mittlere Erkrankungsalter etwas über 60 Jahren. Dies ist im Gegensatz zu vielen anderen bösartigen Erkrankungen vergleichsweise früh. Das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen für Krebs insgesamt liegt bei 67 Jahren.

Insbesondere bei jüngeren Frauen im Alter von 35 bis 59 Jahren sind 40% der Krebsneuerkrankungen und knapp 30% der Todesfälle auf den Brustkrebs zurückzuführen. Laut Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes verstarben im Jahr 2003 in Deutschland 17.173 Frauen an Brustkrebs. Mit einer Krebssterblichkeit von 18% belegt das Mammakarzinom damit den ersten Rang.

Das Mammakarzinom stellt heute eine chronische Systemerkrankung mit lokaler Komponente und früher systemischer Disseminierung dar. Die Mehrzahl der Patientinnen verstirbt nicht an den lokoregionären Rezidiven, sondern an den Folgen der Mikrometastasierung [7].

Die häufigste Lokalisation des Mammakarzinoms ist im oberen, äußeren Quadranten der Brust. Mit 65-80 Prozent sind invasiv duktale Karzinome die häufigste histologische Variante, gefolgt von den lobulären mit 6-15 Prozent, den medullären mit 3 Prozent, den tubulären mit 1 bis 15 Prozent, den muzinösen mit 1 bis 2 Prozent und den papillären Karzinomen mit 1 bis 7 Prozent [8].

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation nach UICC bzw. nach AJCC [9].

Zu beachten ist, dass diese Einteilung nach dem neusten Forschungsstand regelmäßig modifiziert wird. Ende 2002 wurde die TNM-Klassifizierung beim Mammakarzinom in der 6. Auflage bei der Klassifizierung der regionären Lymphknotenmetastasen geändert. Im Vordergrund steht die Zahl der befallenen axillären Lymphknoten, anders berücksichtigt werden infra- und supraklavikuläre Metastasen und das Auftreten von „Mammaria-interna-Metastasen“. In der Tabelle 1 werden diese Veränderungen in der Zuordnung der TNM- zur UICC-Klassifizierung gezeigt.

Tabelle 1: Zuordnung nach der Union International Contre le Cancer (UICC) und TNM-Stadieneinteilung			
UICC	TNM		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
Stadium IIIB	T3	N1, N2	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	jedes M

Folgende Parameter sind von prognostischer Bedeutung: Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Befall der axillären Lymphknoten, Hormonrezeptorstatus, histologisches Grading, Onkogen-Expression (Her2/neu). Sie erlauben eine individuelle Vorhersage für den von einer Therapie unbeeinflussten Krankheitsverlauf (Rezidiv- und Todesrisiko). Diese etablierten, routinemäßig bestimmten Prognosefaktoren werden für die Therapieentscheidung benötigt. Neben diesen etablierten Faktoren sind mehr als 100 neue weitere Faktoren beschrieben, die noch unzureichend untersucht und standardisiert sind [10]. Diese sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht über die wichtigsten Prognosefaktoren und prädiktiven Faktoren beim Mammakarzinom	
Prognosefaktoren	Prädiktive Faktoren
Etablierte (Bestimmung obligat): Alter (< 35 Jahre, ungünstige Prognose) Tumorgröße Nodalstatus Hormonrezeptorstatus Histologischer Tumortyp Grading	Hormonrezeptorstatus für Ansprechen einer endokrinen Therapie HER2 für das Ansprechen einer Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin) Menopausenstatus: Hormonentzug bei hormonsensitiven Mammakarzinom
Neuere (Bestimmung nicht obligat): Mitose-Index, S-Phase, Ki-67, MIB, PCNA, TLI, EGF, IGF1, IGF2, pS2, TSP Cathepsin D, B und L, uPA, PAI-1 Adhäsionsmoleküle Chemokine, Ep-CAM, CD-44-codierte Glykoproteine, E-Cadherin, Lamininrezeptor Angiogenese VEGF Apoptose TNF, FasL, TRAIL, bcl-2, bax Onkogene/ Tumorsuppressorgene P53, c-myc, BRCA1, BRCA2 Immunhistologischer Tumorzellennachweis im Knochenmark und Lymphknoten	

Für den Verlauf der Erkrankung ist die Früherkennung von besonderer Bedeutung, weil Tumore im frühen Stadium behandelt, eine bessere Prognose haben als weiter fortgeschrittene, insbesondere dann, wenn noch keine Mikrometastasen vorliegen. Patientinnen mit einem Tumor ohne Lymphknotenbefall haben bereits ein Metastasierungsrisiko von 20%. Diese Rate erhöht sich auf 40-60% bei 3 positiven Lymphknoten (LK) und auf mehr als 80% bei ≥ 4 LK.

Auf der St. Galler Konsensuskonferenz 2005 wurde eine neue Einteilung für die Risikokategorien festgelegt. Diese sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Risikogruppen nach der St. Galler Konsensuskonferenz 2005		
Risikokategorie	Hormonsensibel	Nicht hormonsensibel
Niedriges Risiko	Nodalnegativ, ER und/oder PGR positiv und alle der folgenden Kriterien: pT ≤ 2 cm und Grading 1 keine vaskuläre Invasion und HER-2/neu negativ	Nicht anwendbar (mikroinvasive Karzinome oder spezifische Tumorphänotyp –medulläre, apokine oder myoepitheliale Karzinome, ohne Nachweis von LK)
Mittleres Risiko	Nodalnegativ, ER und/oder PGR positiv, und mindestens eines der folgenden Kriterien: pT > 2 cm oder Grading 2-3 oder Alter < 35 Jahre oder HER- 2/neu positiv oder vaskuläre Invasion Nodalpositiv 1-3 LK mit HER- 2/neu negativ und ohne vaskuläre Invasion	Gleiche Kriterien, aber hormonrezeptornegativ
Hohes Risiko	Nodalpositiv ≥ 4 LK oder Nodalpositiv mit extensiver vaskulärer Invasion oder HER- 2/neu positiv	Gleiche Kriterien, aber hormonrezeptornegativ

So wurde es notwendig, die Lokaltherapie wie Operation und Bestrahlung durch eine systemische Therapie zu ergänzen, deren Hauptziel die Vernichtung schon vorhandener Mikrometastasen ist. Dabei hat sich die operative Standardtherapie von der verstümmelnden Halsted-Operation zu brusterhaltenden Verfahren [11] und Exzision axillärer Sentinellymphknoten weiterentwickelt [12]. Größere Kenntnisse der Biologie des Mammakarzinoms haben dazu geführt, dass heute die systemische Therapie als sinnvolle Ergänzung der regionären Therapie im Zentrum der Brusttherapie steht. Sie ermöglicht eine differenzierte und individualisierte Therapie.

Der konsequente Einsatz der adjuvanten systemischen Therapie hat neben der Früherkennung seit etwa 1990 zum Rückgang der Mortalitätsrate geführt [2].

Das relative Rezidiv- und Metastasierungsrisiko wurde dadurch um jeweils etwa 20 bis 45 Prozent reduziert.

Folgend sind die wichtigsten Therapierichtlinien zusammengefasst, wobei die primär operativen Therapien ausgenommen wurden [13,14].

2.2. Präoperative (neoadjuvante) Systemtherapie

Sie kann durch eine zytostatische Therapie oder bei älteren Patientinnen mit einer Hormonrezeptor positiven Erkrankung und Komorbidität durch eine Antihormontherapie (Aromatasehemmer) [15] erfolgen.

Das Gesamtüberleben von Patientinnen mit primär systemischer und adjuvanter Behandlung ist vergleichbar [16]. Die primäre systemische Therapie hat den Vorteil, die Rate der brusterhaltenden Therapien zu erhöhen und einer Evaluation prädiktiver Faktoren. Ein weiterer Vorteil ist das Realtime-Monitoring, mit welchem der Effekt der Therapie besser ausgewertet werden kann.

Sie ist beim inflammatorischen Mammakarzinom und inoperablen T4-Tumoren indiziert. Bei Ansprechen erfolgt dann eine Mastektomie mit nachfolgender Strahlentherapie. Bei

Nichtansprechen erfolgt eine Umstellung der Chemotherapie oder Wechsel zur Strahlentherapie ebenfalls mit dem Ziel einer späteren Mastektomie.

Weitere mögliche Indikation für eine präoperative Systemtherapie sind lokal fortgeschrittene (>2 cm), primär operable (Notwendigkeit der Mastektomie), hormonrezeptornegative Tumoren mit dem Ziel der Brusterhaltung.

Primär brusterhaltend operable kleine Tumore sollten nur innerhalb von Studien neoadjuvant therapiert werden. Die neoadjuvante Chemotherapie erfolgt mit mindestens vier Kursen anthrazyklinhaltiger Chemotherapie (EC, AC, FEC, FAC), gegebenenfalls gefolgt von maximal vier Kursen Taxantherapie [17].

Eine Standardkombination existiert bisher nicht. Der Therapierfolg muß klinisch und mammographisch alle sechs Wochen überprüft werden.

2.3. Adjuvante Strahlentherapie

Die Strahlentherapie trägt zur lokoregionären Tumorkontrolle bei und beeinflusst positiv das Überleben vieler Patientinnen [18].

Sie ist bei brusterhaltender Operation obligatorisch für die betroffene Brustdrüse. Nach Mastektomie besteht die Indikation zur Bestrahlung der Brustwand bei T3/T4-Tumoren und bei > 3 befallenen axillären Lymphknoten sowie bei unvollständiger Resektion mit fehlender Möglichkeit zur kurativen Nachresektion und T2-Tumoren > 3 cm. Sie sollte innerhalb von vier bis sechs Monaten postoperativ und so früh wie möglich nach Abschluss der verabreichten Chemotherapie erfolgen [19].

Eine Bestrahlung der supraclavikulären Lymphabflusswege wird bei Nachweis von > 3 oder fixierten axillären Lymphknoten empfohlen. Die Indikation zur Bestrahlung der Mammaria interna-Lymphknoten ist unklar. Die Bestrahlung der Axilla wird nicht empfohlen.

Eine intraoperative Strahlentherapie könnte für Patientinnen mit niedrigem Rezidivrisiko in Zukunft eine Alternative zur zeitaufwendigen Percutanbestrahlung darstellen.

2.4. Adjuvante endokrine Therapie

Grundvoraussetzung für die Effektivität jeder endokrinen Therapie ist ein hormonsensitives Tumorleiden, welches sich durch immunhistochemische Färbung des Primärtumors definiert. Ein immunreaktiver Score nach Remmele [22] von 1-4 gibt den Hormonrezeptorstatus an (Kasten1 im Anhang).

Hierfür stehen im wesentliche drei Möglichkeiten zur Verfügung: GnRH-Analoga oder andere Formen der Ovarsuppression (Prämenopause), Tamoxifen (Prä- und Postmenopause) und die Aromataseinhibitoren (Postmenopause) [20, 21].

Die Behandlungsdauer umfasst 5 Jahre. Bei postmenopausalen Patientinnen sollte die Therapie einen Aromatasehemmer beinhalten anstatt oder in Sequenz zu Tamoxifen. Darauf weisen fünf große randomisierte Studien hin. Alle vorliegenden Studien weisen auf eine signifikante Verbesserung des rezidivfreien Überlebens durch den Einsatz von Aromataseinhibitoren von drei bis fünf Prozent hin [23].

Bei Kontraindikation für Tamoxifen (z.B. Thrombosen/Embolien) sollte ein Aromatasehemmer während der gesamten Behandlungszeit eingesetzt werden [24].

Aromatasehemmer hemmen direkt die Tumoraromatase und senken damit die autochtone Östrogenproduktion im Tumor.

Allen Aromataseinhibitoren gemeinsam ist die Reduktion der Knochendichte und die Zunahme von Muskel- und Gelenksbeschwerden. Sie dürfen deshalb außerhalb von Studien nur bei postmenopausalen Patientinnen eingesetzt werden.

Bei prämenopausalen Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren ist Tamoxifen die Therapie der Wahl. Bei jungen Patientinnen unter 40 Jahren und Nachweis von Risikofaktoren kann zusätzlich zur 5-jährigen Tamoxifen-therapie eine hormonelle Suppression der Ovarialfunktion mit GnRH-Analoga für zwei bis drei Jahre erfolgen [21] oder eine Ovariectomie.

Die antihormonelle Behandlung sollte nach einer Chemotherapie erfolgen.

2.5. Adjuvante Chemotherapie

Sie hat sich in den letzten 20 Jahren von einem klinischen Experiment zu einer evidenzbasierten Standardprimärtherapie entwickelt, auf die nur bei Patientinnen mit „minimalen“ Rezidivrisiko verzichtet werden kann. Diese Patientinnen müssen einen nodalnegativen Axillastatus haben, ≥ 35 Jahre alt und Hormonrezeptorstatus positiv sein, einen Tumor ≤ 2 cm haben, ein histopathologisches Grading 1 aufweisen und keinen Nachweis einer Her2-Überexpression oder vaskuläre Invasion am Primärtumor aufweisen.

Bei allen übrigen Patientinnen muss eine adjuvante Systemtherapie nach individueller Abwägung zwischen Überlebensvorteil und Nebenwirkung erwogen werden.

Für Patientinnen mit erhöhtem Risiko und für manche Gruppen mit mittlerem Risiko ist eine Kombinationschemotherapie mit CMF x 6, AC x 4-6, FEC oder FAC Standard. Ergebnisse von Metaanalysen zeigen einen signifikanten Überlebensvorteil beim Einsatz von anthrazyklinhaltigen Mehrfachkombinationen im Vergleich zu CMF und sollten deshalb bevorzugt in adäquater Dosierung über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten zum Einsatz kommen [25].

Nur bei Kontraindikation gegen Anthrazykline soll CMF allein 6 mal verabreicht werden [26].

Es gibt bisher kein nationales oder internationales Konsens darüber, was das beste Schema ist. Das FEC120-Protokoll nach Levine et al. [25] scheint einem Goldstandard am nächsten zu kommen. Eine in Europa häufig verwendete Alternative stellt das französische FEC100-Protokoll, das so genannte Bonterre-Schema, dar.

Die Erhöhung der Dosisdichte, also eine Verkürzung der Zeitintervalle zwischen den Zyklen, scheint sich positiv auf die Therapieeffizienz auszuwirken. In einer amerikanischen und einer AGO-Studie zeigte sich, dass eine dosisdichte Behandlung zu einer signifikanten Reduktion des Rezidivrisikos führte [27,28] ohne jedoch zum jetzigen Zeitpunkt einen neuen Therapiestandard zu begründen.

Taxane können in der adjuvanten Therapie noch nicht generell empfohlen werden, da die vorliegenden Phase III-Studien bisher widersprüchliche Ergebnisse, auch hinsichtlich der möglicherweise profitierenden Subgruppen, gezeigt haben und Langzeitergebnisse noch nicht vorliegen. Unklar ist auch, ob Taxane sequentiell nach Anthrazyklinen (z.B. AC x 4 gefolgt von Paclitaxal x 4) oder in Kombination (z.B. TAC x 6: Docetaxal, Adriamycin, Cyclophosphamid) eingesetzt werden sollten. Die ECOG hat beim ASCO 2005 Phase-III-Daten publiziert, die bezüglich krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben keinen Unterschied zeigten zwischen der Kombination von Doxorubicin und Docetaxal im Vergleich mit Doxorubicin und Cyclophosphamid [29]. Febrile Neutropenien waren 3-fach häufiger in der Doxorubicin/Doxetaxal-Gruppe.

Im Gegensatz dazu berichten Gianni et al., dass Doxorubicin plus Paclitaxal gefolgt von CMF ein längeres krankheitsfreies Überleben ergab als Doxorubicin allein, gefolgt von CMF, wobei jedoch das Gesamtüberleben nicht unterschiedlich war [30].

Auch die Studien MDACC 94-002, BCIRG001 und PACS01 zeigten ein längeres krankheitsfreies Intervall, wenn Taxan verwendet wurde. Der Vergleich der verschiedenen Studien ergibt, dass Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positiven Tumoren weniger von taxanhaltigen Therapien profitieren, dass möglicherweise die sequentielle Gabe von Anthrazyklin und Taxan günstiger ist als die gleichzeitige Gabe und dass 6 Zyklen wahrscheinlich besser sind als 4 Zyklen. Die Sankt Gallener Konsensus-Konferenz hat sich für die sequentielle Gabe aber nur bei Hochrisiko-Patientinnen entschieden. Für Patientinnen mit einem mittleren Risiko wurden Taxane wegen noch offener Fragen nur in klinischen Studien empfohlen. Für eine Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation besteht keine Indikation, da keine Überlebensvorteile im Vergleich zu konventionell dosierten Chemotherapien belegt werden konnten [21].

2.6. Nachsorge

Die Nachsorge bei Patientinnen mit Mammakarzinom erfolgt symptomorientiert. Anamnese und körperliche Untersuchung erfolgen in den ersten drei Jahren vierteljährlich, danach halbjährlich und nach fünf Jahren jährlich.

Mammographien der erhaltenen betroffenen Brust erfolgen in den ersten drei Jahren halbjährlich, danach jährlich, der kontralateralen Brust jährlich. Zusätzliche apparative Diagnostik (Leberultraschall, Röntgen-Thorax, Skelettszintigraphie) beziehungsweise Laboruntersuchungen (Tumormarker, Transaminasen) haben derzeit für das Gesamtüberleben keinerlei Vorteile gezeigt [31].

2.7. Metastasiertes Mammakarzinom

In nur seltenen Fällen (2-5%) besteht die Möglichkeit auf Heilung. Allerdings gibt es durch verbesserte Therapiemöglichkeiten zunehmend langjährige Verläufe [32].

Bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren ist die Hormontherapie das Vorgehen der Wahl, bei postmenopausalen Patientinnen zuerst Aromatasehemmer, dann Tamoxifen, dann Gestagene. Bei Patientinnen, die adjuvant keine Tamoxifentherapie erhalten haben oder deren Behandlung länger als ein Jahr zurückliegt, kann auch Tamoxifen gegeben werden [33].

Nach Tamoxifenversagen kann Fulvestrant in beide Sequenzen eingefügt werden [34].

Prämenopausale Patientinnen starten mit GnRH-Analoga und/oder Tamoxifen. Bei Progression erfolgt eine Kombination beider Substanzen oder erfolgt der Wechsel auf das noch nicht angewandte Präparat [35]. Danach erfolgt der Einsatz von Aromatasehemmern, sofern nicht die Indikation einer Chemotherapie besteht. Dabei ist noch unklar, ob bei erhaltener Ovarialfunktion die zusätzliche Gabe eines GnRH-Analogs zusätzlich zur Aromatasehemmertherapie notwendig ist. Bei neuerlichem Progress erfolgt die Behandlung mit Gestagenen.

Für alle Patientinnen sollte nach zwischenzeitlich indizierter Chemotherapie jeweils eine erneute Hormontherapie erwogen werden, solange nicht alle Optionen diesbezüglich ausgenutzt wurden.

Ziel einer Chemotherapie ist eine Besserung der Symptome beziehungsweise der Erhalt der Symptomfreiheit und eine verlängerte Überlebenszeit bei guter Lebensqualität.

Dazu sollten vorhandene Therapieoptionen konsequent ausgeschöpft werden. Es liegen keine Daten vor, die die Empfehlung einer optimalen Reihenfolge von Zytostatika(-kombinationen) bei Auftreten einer Metastasierung und nachfolgendem Progress der Erkrankung ermöglichen. Wichtigstes Kriterium zur Einschätzung der Bedeutung einer Chemotherapiestudie ist das erzielte progressionsfreie Überleben. Allerdings wird das progressionsfreie Überleben durch im Anschluss an die Chemotherapie verabreichte z.B. endokrine Erhaltungstherapie bei Hormonrezeptor-positiven Erkrankungen mitbeeinflusst, so dass es zunehmend schwierig wird, Einzelsubstanzen Überlebensvorteile zuzuordnen.

Entscheidungsgrundlage ist die klinische Situation unter Berücksichtigung einer evtl. zuvor durchgeführten adjuvanten Chemotherapie. Bei älteren und /oder chemotherapeutisch unbehandelten Patientinnen ohne wesentliche tumorbedingte Beschwerden wird das CMF-Protokoll angewendet. Bei Patientinnen mit vorausgegangener adjuvanter CMF-Therapie sollte eine anthrazyklinhaltige Therapie in Betracht gezogen werden. Liegen Kontraindikationen vor, oder sind bereits adjuvant Anthrazykline verabreicht worden und diese Therapie liegt weniger als zwölf Monate zurück, werden taxanhaltige Protokolle verwendet, bei Patientinnen mit HER2-Überexpression in Kombination mit Trastuzumab [36].

Sollten bereits (neo-)adjuvante Kombinationstherapien mit Anthrazyklinen und Taxanen erfolgt sein, kommen Protokolle mit gut verträglichen Substanzen wie Vinorelbin, Capecitabine oder 5-Fluorouracil in Frage. Die Entscheidung muss individuell erfolgen und hängt sowohl von prognostischen Parametern als auch von den adjuvanten und Erstlinien-Therapien ab. Angesichts der palliativen Therapie müssen die zu erwartenden Nebenwirkungen mit den Erfolgsaussichten in einem adäquaten Verhältnis stehen.

Die höchsten Ansprechquoten in der Erstbehandlung werden mit Kombinationen von Anthrazyklinen und Taxanen erzielt, die jedoch mit erheblicher Toxizität verbunden sind und gegenüber einem sequenziellen Einsatz der Einzelsubstanzen keinen Überlebensvorteil zeigen konnten [37,38].

Bei mit Anthrazyklin vorbehandelten Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom ist ein Überlebensvorteil für die Kombination Docetaxal und Capecitabine versus Docetaxal alleine beschrieben [39].

Bei nur mäßigem Tumorprogress und geringen tumorbedingten Beschwerden ist daher eine zytostatische Monotherapie der Kombinationstherapie vorzuziehen [37]. Patientinnen mit raschem Tumorprogress und ausgeprägten tumorbedingten Beschwerden sollten dagegen bevorzugt eine Kombinationschemotherapie erhalten. Dabei ist einer intermittierenden Chemotherapie bis zum Progress gegenüber einer Dauertherapie der Vorzug zu geben.

Bei Hormonrezeptor-positiven Erkrankungen ist im Anschluss eine Hormontherapie zu erwägen, da eine antihormonelle Therapie prinzipiell auch nach einer Chemotherapie noch wirksam ist [40, 41].

Eine Kombination von Chemotherapie mit antihormoneller Therapie ist jedoch nicht zu empfehlen. Hochdosischemotherapien mit peripherer Blutstammzelltransplantation sind außerhalb klinischer Studien nicht indiziert.

2.8. Immuntherapeutische Strategien

Bereits vor 100 Jahren wurde von Coley die gezielte Aktivierung des Immunsystems zur Bekämpfung maligner Erkrankungen geäußert und in ersten Versuchen an Patienten bestätigt [42].

Aber erst die Entwicklungen der letzten Jahre in der Immunologie und Molekularbiologie und damit das besser Verständnis der komplexen Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzelle haben die Basis zur Durchführung immuntherapeutischer Studien geschaffen mit dem Ziel durch Aktivierung des Immunsystems gezielt maligne Zellen zu zerstören.

Im Gegensatz zu Pathogenen, die in den Körper eindringen, induzieren tumorassoziierte Antigene meistens nur eine schwache Immunabwehr, weil Tumorantigene selten so genannte Neoantigene darstellen, sondern physiologisch auch auf normalen Zellen exprimiert sind [43].

Damit gegen solche Antigene eine wirksame Immunantwort hervorgerufen wird, muss die immunologische Toleranzschwäche durchbrochen werden. Die zwei häufigsten Ansätze sind monoklonale Antikörper und die Vakzine.

Monoklonale Antikörper sollen im Rahmen einer passiven Immuntherapie im Patient spezifische Tumorzellen auffinden und zerstören. Ihre Aktivität entfalten sie nach Bindung an die Tumorzelle über die Blockierung von Signaltransduktionswegen (Inhibition von Proliferationsreizen), Auslösung von Komplementkaskaden (complement mediated cytotoxicity) oder Rekrutierung von Effektorzellen (antibody dependent cellular cytotoxicity) [44, 45, 46].

Mit der Entwicklung rekombinanter Antikörper als chimäre beziehungsweise humanisierte Antikörper waren Wiederholungen der Therapien möglich. Verbesserte Produktionsbedingungen ließen ein kosteneffiziente Herstellung der benötigten Mengen zu [47].

Zwei wichtige Vertreter aus der Gruppe der wachstumsfaktorrezeptorbindenden monoklonalen Antikörper sind C225 [48], der den von vielen epithelialen Tumoren überexprimierte EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) erkennt, und Trastuzumab, der gegen den Oberflächenrezeptor Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) gerichtet ist.

In Phase-1 und -2-Studien bei Patienten mit Bronchial-, Nieren-, Prostata-, Ovarial-, Pankreas-, Brust- oder auch Blasen-tumoren erwies sich C225 als gut verträglich, induzierte selten inhibierende Antikörper und scheint wie Trastuzumab synergistisch zu wirken, wenn der Antikörper in Kombination mit Chemo- und Strahlentherapie, aber auch mit Angiogeneseinhibitoren eingesetzt wird [49,50].

2.9. Trastuzumabtherapie

Trastuzumab ist ein rekombinanter humanisierter, monoklonaler Antikörper vom IgG1-kappa-Typ, der spezifisch und mit hoher Affinität gegen den Oberflächenrezeptor HER2/neu gerichtet ist. Her2-Rezeptoren sind im Bereich der Zellmembran lokalisiert, empfangen Wachstumssignale und sind somit an der Steuerung des Zellwachstums (Teilung und Vermehrung) beteiligt. Sie werden durch ein Protoonkogen auf dem Chromosom 17 codiert. Normale Epithelzellen besitzen zwei Kopien dieses Protoonkogens und exprimieren nur physiologische Mengen des wachstumsregulierenden HER2-Rezeptorproteins. Bei etwa 20 bis 25 Prozent der Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom und der high grade Ductal Carcinoma in situ sind diese Rezeptoren überexprimiert, was nach heutiger Kenntnis auf einer Genamplifikation beruht [51]. Der Defekt wurde 1987 von Prof. Axel Ullrich am Max-Planck-Institut für Biochemie nachgewiesen und korreliert mit einem beschleunigten Tumorwachstum, einem aggressiveren Tumortyp und somit mit einer schlechteren Prognose der Patientinnen. Häufig entwickeln sie Lungen- und Lebermetastasen. Eine klare Korrelation zu Lymphknoten- und Knochenmetastasen besteht jedoch nicht. Das Risiko eines Mammakarzinoms der kontralateralen Brust ist ebenfalls signifikant erhöht. Eine besonders schlechte Prognose haben Frauen mit HER2/neu-positivem, aber Progesteron- und Östrogen-negativem Tumor [52].

Neben der prognostischen und diagnostischen Bedeutung hat die Bestimmung des Her2/neu-Rezeptors eine therapeutische Bedeutung. Bei Überexpression kann eine Immuntherapie mit Trastuzumab eingeleitet werden. Trastuzumab bindet direkt und spezifisch an die Rezeptoren auf den Tumorzellen und verhindert so die Übertragung von weiteren Wachstumssignalen. Somit kann sich die Zelle nicht mehr teilen. Zugleich werden körpereigene Abwehrmechanismen aktiviert und die Tumorzellen können durch beispielsweise Antikörper-vermittelte Zytotoxizität eliminiert werden.

Nur bei nachgewiesener Her2/neu-Überexpression ist eine entsprechende Therapie bei metastasierter Erkrankung sinnvoll. In der Routine wird eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Ein Score von 3+ gilt als eindeutig positiv, 0 oder 1+ als negativ. Der Score 2+ wird durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISCH) bestätigt.

Die Möglichkeit einer Monotherapie mit Trastuzumab oder einer Kombinationstherapie mit Paclitaxal besteht [36]. Kombinationen mit anderen Substanzen wie Vinorelbin [53], Docetaxal oder Platinpräparate sollten angewendet werden, wenn Paclitaxal bereits zuvor als Monotherapie oder in

Kombination eingesetzt worden war. Eine Kombination mit Anthrazyklinen empfiehlt sich aufgrund der potentiellen Kardiotoxizität nicht [36].

Wegen der langen Halbwertszeit von 25,5+/-5 Wochen wird zur Vermeidung von kardialen Funktionsstörungen ein mehrmonatiges Intervall nach Trastuzumab-Therapie vor Anthrazyklingabe empfohlen.

Bei nachgewiesenem Progress unter Trastuzumabtherapie sollte die Behandlung abgesetzt werden.

Die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) hat Trastuzumab seit Mai 2006 auch zur neoadjuvanten und adjuvanten Behandlung von Patientinnen mit HER2/neu-positiven Tumoren nach Abschluss einer Chemotherapie und ggf. der Strahlentherapie zugelassen. In der adjuvanten Situation zeigte die HERA-Studien eine hochsignifikante Verlängerung des krankheitsfreien Intervalls bei Gabe nach Abschluss der Chemotherapie bzw. begleitend zu einer sequenzierten Taxanbehandlung. Ähnliche Verbesserungen des krankheitsfreien Intervalls zeigten die Daten aus den amerikanischen NSABP-B31- und NCCTG-N9831-Studien [54,55]. Da bisher erst die einjährige Gabe von Trastuzumab nach Abschluss der Chemotherapie ausgewertet wurde, ist die Gabe auch nur für diesen Zeitraum angezeigt. Gegenwärtig wird noch der Effekt einer zweijährigen Gabe analysiert. Da aber Langzeitergebnisse noch fehlen und die Toxizität nicht gering ist, ist außerhalb von Studien Zurückhaltung geboten.

Während die Infusionen selbst vergleichsweise nebenwirkungsarm sind, gelegentlich Schüttelfrost und Fieber unter der ersten Anwendung auftritt, kann die mehrwöchige Antikörpertherapie bei einigen Patientinnen kardiale Schäden bis hin zu bedrohlichen Arrhythmien und Herzinsuffizienz hervorrufen. Der Grund liegt offenbar darin, dass HER2-Rezeptoren bei bestimmten Herzerkrankungen auch von Herzmuskelzellen hergestellt werden, die dann ebenfalls zum Angriffsziel der Antikörper werden. Vorbestehende Herzerkrankungen (Herzinsuffizienz, Art. Hypertonus und KHK in der Anamnese), ein Alter über 60 Jahren und eine Vorbehandlung mit Anthrazyklinen erhöhen die Anfälligkeit des Herzens für eine Schädigung durch den Antikörper.

Deshalb sollten vor und während der Therapie mit Trastuzumab regelmäßig klinische Untersuchungen, einschließlich EKG, Messung von Gewicht, Puls, Blutdruck und Überprüfung der linksventrikulären Pumpfunktion mittels Echokardiographie erfolgen.

2.10. Tumorspezifische Vakzinierung

Im Gegensatz zu der passiven Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern benötigen Impfstrategien die aktive Beteiligung und Unterstützung des Immunsystems, um eine gezielte Immunantwort gegen Tumorzellen entwickeln zu können. Die früher favorisierte These, dass das Immunsystem zwischen „Selbst“ und „Nichtselbst“ unterscheiden kann, ist heutzutage nicht mehr haltbar [56]. Wahrscheinlich erkennt das Immunsystem alle Tumoren und entwickelt eine Immunantwort gegen sie, wenn auch ineffizient [57]. Damit eine Tumorzelle als immunogen erkannt werden kann, muss sie auf ihrer Oberfläche in Verbindung mit genetisch determinierten MHC-Molekülen Peptidfragmente der Tumorantigene präsentieren [58]. Die initiale Aktivierung des Immunsystem gegen diese Tumorpeptide erfolgt in der Regel nicht durch die Tumorzelle selbst, sondern durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Diese phagozytieren unter anderem Tumorproteine, prozessieren sie und präsentieren dem Immunsystem einzelne Peptidbruchstücke im MHC-Molekül auf ihrer Zelloberfläche. Der Komplex von MHC-Molekül und Peptid wird dann von zytotoxischen (CD8+-) beziehungsweise von Helfer-(CD4+-) T-Lymphozyten erkannt und führt zur T-Zellaktivierung [59]. Die so aktivierte T-Zelle kann nach Erkennung des gleichen MHC-Peptid-Komplexes auf der Tumorzelle diese direkt oder indirekt zerstören. Allein die Zahl der einzelnen Schritte lässt die Komplexität und Anfälligkeit des immunologischen Netzwerkes erahnen. Voraussetzung für eine erfolgreiche Vakzinierung ist das Vorhandensein immunogener Peptide, die effiziente Präsentation dieser Peptide durch APC und ein intaktes Immunsystem, das in der Lage ist mit einer raschen und adäquaten T-Zellantwort zu reagieren.

Erst technische Entwicklung der letzten Jahre auf dem Gebiet der Tumorzellvakzinierung, wie Methoden zur Identifizierung von Tumorantigenen [57], ein besseres Verständnis für die Antigenprozessierung und -präsentation durch APC [60] und bessere Reagenzien, die im Patient induzierte Immunantwort zu messen und im Verlauf zu überwachen [61], haben neue Impulse gebracht. Mögliche Strategien sind Vakzinierung mit Tumorzellen, Virus-modifizierte Tumorzellen, In-vivo-Applikation von Peptiden und Proteinen und ex-vivo-Beladung von dendritischen Zellen, wie z.B. mit Her2/neu-Peptiden („Targeting Her2/neu in DCIS using Dendritic Cells with staged IL 12 Secretion“: Cancer Research February 15 2007 Volume 67 Number 4) oder Zelltherapie mit autologen Gedächtnis-T-Zellen.

2.11. Immunsystem des Menschen

Neben den natürlichen Barrieren wie der Haut mit ihrer Schweiß- und Talgsekretion, dem GI-Trakt mit seiner Magensäure- und Enzymsekretion, dem Respirations-Trakt mit seiner spezifischen Schleimhaut und Surfactantsekretion und dem Urogenital-Trakt mit der Produktion von saurem Urin schützt sich der Mensch durch ein Immunsystem vor Krankheitserregern.

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einem spezifischen erworbenem, welches im Wesentlichen durch die Lymphozyten repräsentiert wird, und einem unspezifischen angeborenem Abwehrsystem, welches in ein humorales System und ein zelluläres System unterteilt wird. Alle drei Systeme ergänzen einander. Das unspezifische humorale System wird aktiviert durch Faktoren des Komplementsystems und anderen Plasmaproteinen. Sie haben die Fähigkeit, körperfremde Zellen abzutöten, Antigen-Antikörper-Komplexe aufzulösen und körpereigene Zellen, die bei der Entzündungsreaktion beteiligt sind, zu aktivieren.

Das unspezifische zelluläre System, bestehend aus phagozytierenden Granulozyten und Makrophagen (MPS = Mononukleäres Phagozyten-System), zerstört Krankheitserreger und Antigen-Antikörper-Komplexe. Außerdem spielen Zellen des MPS, in dem sie als Antigen-präsentierende Zellen (APC) für T-Zellen fungieren, eine wichtige Rolle bei der Erkennung körperfremder Stoffe durch das spezifische Immunsystem. Das unspezifische Abwehrsystem ist für die primäre Abwehr körperfremder Stoffe zuständig. Das spezifische Abwehrsystem gewinnt seine Wirksamkeit erst durch die Auseinandersetzung mit dem Fremdkörper.

Das spezifische Immunsystem dient zur Abwehr von außen eindringender Krankheitserreger und entarteter körpereigener Zellen. Die immunkompetenten Zellen erkennen Fremdkörper an deren Oberflächenstruktur (=antigene Determinante) und bilden gegen diese spezifische Antikörper. Außerdem besitzt es die Fähigkeit, diese antigenen Strukturen in Erinnerung zu behalten (immunologisches Gedächtnis). Bei Kontakt mit demselben Antigen reagiert es rascher und stärker als beim Erstkontakt, so dass keine erneuten oder schwächere Krankheitssymptome auftreten.

Sowohl bei der Antikörperbildung als auch bei der immunologischen Gedächtnisfunktion spielt das lymphatische System die zentrale Rolle.

Die Lymphozyten sind zum größten Teil gewebeständig im Knochenmark und in den lymphatischen Organen. Nur 4% zirkulieren im Blutkreislauf. Sie machen 25-40% der Leukozyten aus und lassen sich in drei Gruppen unterteilen: B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Nullzellen.

Die B-Zellen machen etwa 10 -12% der Lymphozyten aus. Sie entstehen und reifen im Knochenmark. Nach Antigenkontakt wandeln sie sich zum Teil in Plasmazellen um und produzieren Immunglobuline. Sie produzieren Antikörper, die auf der Zellmembran exprimiert und sezerniert werden. Diese Immunglobuline repräsentieren als spezifische Antikörper das spezifische humorale Immunsystem. Ein anderer Teil der aktivierten B-Lymphozyten entwickelt sich zu langlebigen B-Gedächtniszellen.

T-Lymphozyten machen etwa 70% der im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus und repräsentieren das spezifische zelluläre Immunsystem. Sie entstehen im Knochenmark und reifen im Thymus. Sie besitzen einen spezifischen Rezeptor (CD3). Nach Aktivierung durch ein Antigen vermehren sie sich und differenzieren zu langlebigen T-Gedächtniszellen und T-Effektorzellen. Die T-Effektorzellen lassen sich wiederum in T-Helferzellen (Schaltzelle des Immunsystems), zytotoxische T-Zellen und T-Suppressorzellen (regulieren die Immunantwort) unterteilen. T-Helferzellen setzen Lymphokine frei und stimulieren damit die Antikörperbildung, andere Lymphozytensubtypen und die Makrophagen. Die zytotoxischen T-Zellen zerstören antigentragende Zellen. Die T-Suppressorzellen hemmen die Aktivität von T- und B-Lymphozyten und verhindern dadurch eine überschießende Immunreaktion.

Nullzellen machen etwa 10% der zirkulierenden Lymphozyten im Blut aus. Zu ihnen gehören die natürlichen Killerzellen, die die Fähigkeit haben antigen- und antikörperunabhängig Zellen abzutöten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zerstörung von Tumorzellen [62].

Außer nach ihren Funktionen lassen sich die Lymphozyten auch anhand ihrer Oberflächenantigene in verschiedene Subpopulationen unterteilen. Die T-Lymphozyten tragen das CD3-Antigen, die T-Helferzellen das CD4-Antigen, die zytotoxischen T-Zellen das CD8-Antigen, die natürlichen Killerzellen das CD16-Antigen und die B-Lymphozyten das CD19-Antigen.

Ihr Anteil läßt sich im peripheren Blut mit immunologischen Meßmethoden bestimmen. Im Blut gesunder Menschen kommen diese Lymphozytensubpopulationen in einem relativ konstanten Verhältnis vor.

Bei der Abwehr maligner Tumoren spielt das spezifische Immunsystem und insbesondere die T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Die Progression eines Tumors geht mit einem Abfall der Absolutzahlen der Lymphozyten einher [63].

Bereits 1994 zeigten Koldovsky et al [64] zeigen, dass bei Krebspatienten Unterschiede in der Lymphozytenverteilung zu finden sind.

Als Marker werden die Anzahl der Lymphozyten, die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen und die Lymphozytenfunktion im Blut gemessen [65-68].

2.12. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Fortschritte in der Tumorummunologie und Molekularbiologie haben in den letzten Jahren ein besseres Verständnis für die komplexe Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorzelle ermöglicht und neue Reagenzien in der Tumortherapie hervorgebracht. Monoklonale Antikörper, wie Trastuzumab, sind bereits fester Bestandteil für die Behandlung bestimmter Hämoblastosen und solider Tumoren.

Ziel dieser Arbeit ist es, Veränderungen des Immunsystem unter einer adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit einem Hochrisikomammakarzinom, die entweder mit einer dosisdichten sequenziellen wachstumsfaktorgestützten Chemotherapie oder einer stammzell- und wachstumsfaktorgestützten sequentiellen Hochdosischemotherapie behandelt wurden, darzustellen. Dabei werden Verschiebungen in dem Verhältnis der einzelnen Subpopulationen von Lymphozyten zueinander anhand der Phenotypbestimmung dieser Zellpopulationen analysiert, die Lymphozytenfunktionen verglichen und Korrelationen zum Krankheitsverlauf der Patientinnen überprüft.

3. Material und Methoden

3.1. Patientinnenkollektiv

Die Patientinnen stammen aus einer prospektiven, zweiarmigen, parallelen, offenen randomisierten Phase III-Untersuchung zur Therapieoptimierung einer adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit Hochrisiko-Mammakarzinom im Stadium II/III mit mehr als 9 positiven Lymphknoten. Bei dieser Studien wurde eine stammzell- und wachstumsfaktorgestützte sequentielle Hochdosistherapie (Arm A) mit einer wachstumsfaktorgestützten dosisintensivierten Chemotherapie (Arm B) verglichen. Multizentrisch wurden 403 Patientinnen in der Zeit vom Juni 1995 bis Juni 2002 randomisiert, die folgende Einschlusskriterien aufwiesen:

- primär operiertes, histologisch gesichertes Mammakarzinom im Stadium II/III: pT0-4, pN+, M0 (\geq 10 positive Lymphknoten im Resektat des axillären Fettgewebes)
- M0 gesichert durch Röntgen-Thorax, Skelettszintigramm und Leberultraschall
- adäquates operatives Verfahren: R0-Resektion und Axillaclearing Level I-II gefordert, Level III empfohlen
- Alter 18-60 Jahre
- Allgemeinzustand ECOG/WHO <2 (siehe Kasten 2 im Anhang).

Ausschlusskriterien waren erhöhtes Kreatinin i.S., Bilirubin i.S. $> 2,0$ mg/dl, manifeste kardiale Vorschädigung mit Ejektionsfraktion $< 70\%$, unzureichende pulmonale Funktion (FEV $< 60\%$), hämatopoetische Insuffizienz (Leukozyten $< 3,5$ G/l, Thrombozyten < 100 G/l), vorangegangene Chemotherapie, Zweitneoplasie mit Ausnahme eines kurativ behandelten Basalioms der Haut, Schwangerschaft, Stillzeit (bei Frauen im empfängnisfähigem Alter sind kontrazeptive Maßnahmen zu ergreifen), Operation mehr als sechs Wochen zurückliegend, inadäquate Operation (unzureichendes axilläres Clearing, Exzision nicht im Gesunden), inflammatorisches Mammakarzinom, Morbus Paget, sequentielles Mammakarzinom, bekannte Allergie gegen E. Coli erzeugte Medikamente, mangelnde Kooperationsbereitschaft/-fähigkeit, Drogenabusus, fehlendes Einverständnis nach Aufklärung und fehlende Bereitschaft zur Speicherung und Weitergabe der persönlichen Krankheitsdaten im Rahmen des Protokolls.

3.2. Randomisierung

Nach Operation und abgeschlossener Stagingdiagnostik wurden die Patientinnen bei Vorliegen aller Einschlusskriterien und Fehlen von Ausschlusskriterien randomisiert und im gleichen Verhältnis den Therapiearmen A und B zugeordnet. Hierzu wurden computergenerierte Randomisierungslisten verwendet. Es wurde eine Blockrandomisierung mit variabler Blockgröße durchgeführt. Eine prospektive Stratifizierung erfolgte nach Prüfzentren und Primärtumorgröße (< 4 cm oder ≥ 4 cm).

Nach Registrierung der Patientin wurde dem Prüfarzt die Therapiezuordnung durch die Zentrale mitgeteilt und schriftlich bestätigt

Patientinnen im Hochdosisarm sollten unmittelbar nach Randomisierung mit allen Unterlagen in der für die teilnehmende Institution zuständigen Klinik zur Stammzellseparation und Chemotherapie vorgestellt werden. Die Therapie in dem konventionellem Arm sollte, soweit möglich, ambulant erfolgen.

3.3. Therapieregime

3.3.1. Operation: operatives Entfernen des Primärtumors und Axillaclearing.

3.3.2. Staging und Toxizitätsdiagnostik: pT0-4, N ≥ 10 befallene Lymphknoten, M0

3.3.3. Radomisierung: Stratifizierung nach Primärtumorgröße ≥ 4 cm/ < 4 cm

3.3.4. Chemotherapie :

3.3.4.1. Hochdosisarm mit kurzer Induktionsphase und Tandem-HDC (Arm A):

Cyclophosphamid und Thiotepa wurden ausgewählt für den HDC-Arm, weil sie beim Mammakarzinom als hoch effektiv und mit Stammzellsupport um einen Faktor von 6 bzw. 20 eskalierbar sind.

Stammzellapharese = back-up (Minimum von 2×10^6 CD34+-Zellen pro kg Körpergewicht) →

1. Kurs EC am Tag 1 mit 90 mg/m^2 Epiadriamycin i.v. (Kurzinfusion) und 600 mg/m^2 Cyclophosphamid i.v. (Kurzinfusion).

5 µg/kg G-CSF (R-metHuG-CSF, Filgrastim®) s.c. ab Tag 5 bis zum Durchschreiten des Nadirs und Erreichen von Leukozytenwerten von $\geq 3,0 \text{ G/l}$.

2. Kurs EC am Tag 15 mit 90 mg/m^2 Epiadriamycin i.v. (Kurzinfusion) und 600 mg/m^2 Cyclophosphamid i.v. (Kurzinfusion).

5 µg/kg G-CSF (R-metHuG-CSF, Filgrastim®) s.c. ab Tag 5.

Zytotoxische Mobilisierung und Aphaese ab Tag 8 nach 2. EC-Kurs in Abhängigkeit von der Anzahl CD34+-Zellen. Für alle Patienten wurde für jedes Apheresat ein Minimum von 2×10^6 CD34+-Zellen pro kg Körpergewicht angelegt. →

Kurs 3 und 4 ECT: sobald die Erholung von vorausgegangener Chemotherapie (EC) dies zulässt. 1. ECT am Tag 14 nach 2. EC und 2. ECT am Tag 21 nach 1. ECT mit 90 mg/m^2 Epiadriamycin i.v. (Kurzinfusion) am Tag 1, 1000 mg/m^2 Cyclophosphamid i.v. über 1 h am Tag 1,2,3 und 133 mg/m^2 Thiotepa i.v. über 3-4 h am Tag 1,2,3.

Jeweils am Tag 5 Reinfusion der autologen PBPC.

Jeweils 5 µg/kg G-CSF (R-metHuG-CSF) s.c. ab Tag 5 bis zum Durchschreiten des Nadirs und Erreichen von Leukozytenwerten von $\geq 3,0 \text{ G/l}$.

Eine Gesamtdosis von 360 mg/m^2 Epiadriamycin, 7200 mg/m^2 Cyclophosphamid und 800 mg/m^2 Thiotepa wurden über 11 Wochen verabreicht.

3.3.4.2. Dosisintensivierte EC mit sequentiell CMF als Kontrollarm (Arm B):

Es wurden vier Kurse EC (Epiadriamycin/Cyclophosphamid), gefolgt von drei Kursen CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil) appliziert. Letzteres war ein seinerzeit in Deutschland weit verbreitetes Protokoll zur Therapie des Hochrisiko-Mammakarzinoms. Abweichend von einem klassischen Phase-III-Prinzip wurde beschlossen, diesen Standardarm durch Reduktion der Dreiwochen- auf Zweiwochenintervalle (entsprechend einer Steigerung der Dosisintensität um den Faktor 1,5) stärker zu machen. Wegen der hämatotoxischen Nebenwirkungen infolge der Intervallverkürzung wurde prophylaktisch der Wachstumsfaktor G-CSF von Tag fünf bis zwölf appliziert.

1. Kurs EC am Tag 1 mit 90 mg/m^2 Epiadriamycin i.v. (Kurzinfusion) und 600 mg/m^2 Cyclophosphamid i.v. (Kurzinfusion, Uromitexan). →

2. bis 4. Kurs EC erfolgen jeweils am Tag 15 nach letztem Kurs beziehungsweise sobald der klinische Zustand dies zulässt (Leukozyten $\geq 3,0 \text{ G/l}$, Thrombozyten $> 75 \text{ G/l}$, Mukositis $< \text{Grad II WHO}$).

Ab Tag 5-12 5 µg/kg G-CSF (R-metHuG-CSF) s.c.. Dieses muss 2 Tage vor Gabe der EC abgesetzt sein. →

Kurs 5 bis 7 CMF jeweils am Tag 15 nach letztem Kurs mit 600 mg/m^2 Cyclophosphamid i.v. (Kurzinfusion, Uromitexan) am Tag 1, 40 mg/m^2 Methotrexat i.v. Tag 1 und 600 mg/m^2 5-Flourouracil i.v. am Tag 1.

Ab Tag 5-12 5 µg/kg G-CSF (R-metHuG-CSF) s.c..Bei Leukozyten $> 10 \text{ G/l}$ kann R-metHuG-CSF-Therapie vorzeitig beendet werden, falls der Nadir bereits durchschritten wurde.

Eine Gesamtdosis von 360 mg/m^2 Epiadriamycin, 4200 mg/m^2 Cyclophosphamid, 120 mg/m^2 Methotrexat und 1800 mg/m^2 5-Flourouracil wurden über 14 Wochen verabreicht.

3.3.5. Strahlentherapie

Vier Wochen nach Beendigung der Chemotherapie erfolgt obligat eine adjuvante Radiatio der Thoraxwand, der Brust und Supragrube.

3.3.6. Adjuvante endokrine Therapie mit Tamoxifen

Nach Abschluss der Chemo- beziehungsweise der Strahlentherapie wird bei Patientinnen mit positivem oder unbekanntem Rezeptorstatus eine adjuvante Hormontherapie mit 20 mg/d Tamoxifen über 4 Jahre durchgeführt. Abbildung 1 fasst das Studiendesign zusammen.

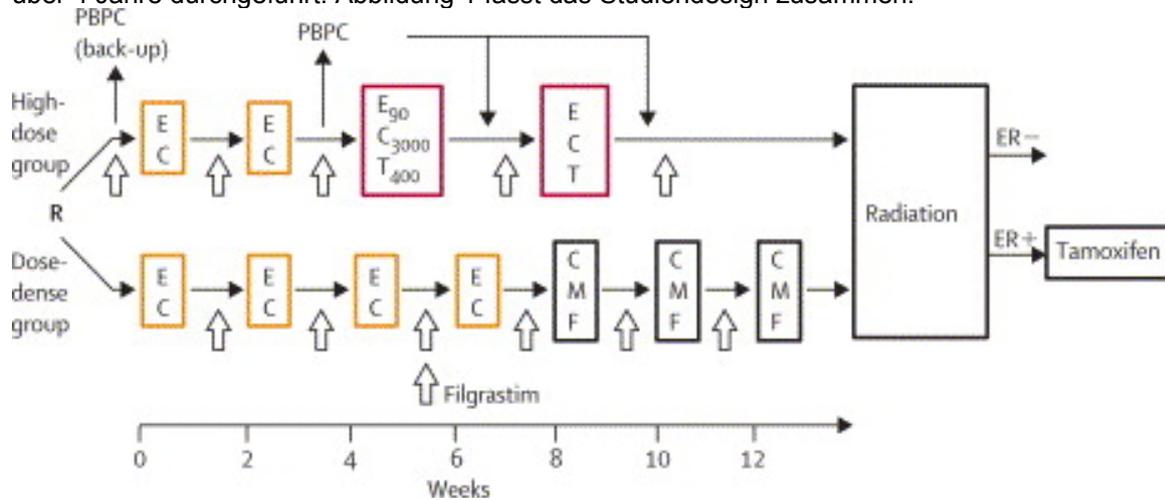


Abbildung 1: Überblick über das Studiendesign

PBPC= peripheral-blood progenitor cells; E= Epiadriamycin; C= Cyclophosphamid; T= Thiotepa; M= Methotrexat; F= 5-Fluoruracil.

3.4. Nachsorge

Die Untersuchungen setzen sich zusammen aus Erhebungen zur Langzeittoxizität nach der Behandlung sowie den Nachsorgeerhebungen zur Erfassung eines Krankheitsrezidivs. Für an der UFK Düsseldorf behandelte Patientinnen kommen Untersuchungen im Rahmen der Begleitprojekte* hinzu.

Tabelle 4:

Untersuchungen	nach Monaten						
	3	6	9	12	18	24	jährlich
Anamnese, klin. Befund	X	X	X	X	X	X	X
Labor (chem. Profil)	X	X	X	X	X	X	X
Marker (fakultativ)	X	X	X	X	X	X	X
Mammographie, ggf. Mammasonographie		X		X		X	X
Röntgen Thorax		X		X	X	X	X
Echokardiographie, EKG	X	X		X	X	X	X
Lungenfunktion		X		X			
Lebersonographie	X	X		X	X	X	X
Knochenszintigraphie				X		X	X
Tumormimmunologie*	X	X		X	X	X	X
Knochendichtemessung*		X		X		X	

3.5. Blutabnahmen

3.5.1. Patienteninformation und Datenschutz

Die Patientinnen wurden vor Aufnahme in die Studie über diese informiert und das schriftliche oder mündliche Einverständnis vor Zeugen (gemäß § 40, Abs. 2 bzw. § 41, Abs. 6 AMG) zur Teilnahme eingeholt. Gleichzeitig wurde die Einwilligung für die Kontrolluntersuchungen einschließlich der erforderlichen Blutabnahmen für die Tumormimmunologie, das Einverständnis zur Weitergabe der personenbezogenen Daten an das onkologische Labor sowie zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung und die Einsichtnahme in die Krankenakte eingeholt. Die Vorschriften des Datenschutzgesetzes wurden strikt eingehalten.

Den Patientinnen wurde ein Informationsblatt mit den wesentlichen Angaben zur Untersuchung und Therapie ausgehändigt. Die Durchführung der Aufklärung wurde in Form einer Aktennotiz protokolliert. Die Einverständniserklärungen für die immunologischen Untersuchungen wurden dort archiviert.

3.5.2. Zeitpunkte der Blutabnahmen und Menge des benötigten Blutes

Im Arm A erfolgten Blutabnahmen für die Lymphozytenfunktionstests und Lymphozytensubpopulationen vor Beginn des 1. Kurses EC, vor Beginn des 2. Kurses EC, vor der 1. ECT, vor der 2. ECT, nach Therapieabschluss, jedoch vor der Bestrahlung, nach 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 und 60 Monaten nach der Therapie.

Im Arm B erfolgten die Blutabnahmen vor dem 1. Kurs EC, vor dem 2. Kurs EC, vor dem 2. Kurs CMF, nach Therapieabschluss, jedoch vor der Bestrahlung, nach 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 und 60 Monaten nach der Therapie.

Benötigt wurden 8 ml heparinisertes Vollblut für die Bestimmung der Lymphozyten-subpopulationen und -funktionsteste. Mit dieser Menge konnten in der Regel ausreichend Zellen gewonnen werden.

3.6. Messmethoden

3.6.1. Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

Die Lymphozytensubpopulationen werden im direkten Fluoreszenztest des Calibur der Firma BD (Becton & Dickinson) bestimmt.

Der Cytofluorograph arbeitet nach dem Prinzip der Flow- cytometry, die die Zelle nach ihrer Größe, Dichte und Oberflächenmarker analysiert.

Die Flow-cytometry klassifiziert die Zellen oder Partikel bei gleichzeitiger Messung im Forward scattered und right-angle scattered light sowie in der Grün-, Rot- und Orange-Floureszenz.

Das Forward scattered light bestimmt die Zellgröße, das Right-angle scattered light die Granularität, die Grün-Fluoreszenz die FITC konjugierten Zelloberflächen-Antikörper, die Rot-Fluoreszenz die Cy-5 und die Orange-Fluoreszenz die PE = Phycoerythin konjugierten Zelloberflächen-Antikörper.

Die Ergebnisse werden in Form eines Zytoprogramms oder Histogramms dargestellt.

50 µl heparinisertes Vollblut werden mit 10 µg AK (FITC; PE; Cy-5) versetzt und 30 min im Kühlschrank inkubiert. Im ersten Röhrchen befinden sich die CD4- (FITC), CD8-(PE) und CD3- (Cy-5) Zellen, im 2. Röhrchen die CD16- (FITC), CD19- (PE) und CD3- (Cy-5) Zellen und im 3. Röhrchen die aktivierten CD8- (FITC), HLA-DR- (PE) und CD4- (Cy-5) Zellen.

Die Kontrolle entspricht dem Immunglobulin.

Nach der Inkubation wird 3 ml Lyselösung zur Lyse der Erythrozyten hinzugefügt. Diese Lyselösung setzt sich zusammen aus 8,26 g/l +/- 5% Ammoniumchlorid, 1,00 g/l +/- 5% Potassium Bicarbonat, 0,037 g/l Tetrasolium EDTA und 100 ml For reconstitution to.

Nach 15-20 min Lyse erfolgt der Messvorgang.

Im Verlauf der Studie erfolgte eine Umstellung auf FACS calibur. Die Messung erfolgt nach Auskalibrieren der Farben. Hier werden 50 µl heparinisertes Vollblut mit 10 µg AK (FITC, PE, PerCP, HLA-DR-APC) versetzt, bei Raumtemperatur 15 min inkubiert, danach die Erythrozyten mit 500 µl Lyselösung (Becton & Dickinson) lysiert und gemessen. Eine Kontrolle entfällt.

Im ersten Röhrchen befinden sich die CD4- (FITC), CD8- (PE), CD3- (PerCP) / HLA-DR- (APC) Zellen, im 2. Röhrchen die CD3- (FITC) / CD 16+56- (PE) / CD45- (PerCP), CD19- (APC) Zellen, im 3. Röhrchen die aktivierten CD4- (FITC) / CD8-(PE) und HLA-DR- (APC) Zellen.

Bei den Messungen wurden die relative und absolute Menge der Lymphozytensubpopulationen CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+ , die Gesamt-Lymphozytenzahl und das CD4+/CD8+ Verhältnis ermittelt.

Die laborspezifischen Normwerte sind in folgender Tabelle 5 dargestellt:

Tabelle 5:

Zelltyp:	Relativ (%):	x [10 ⁶ Zellen/ml]
CD3+ (T-Lymphozyten)	65-84	0,94-2,11
CD4+ (Helfer-T-Zellen)	41-55	0,62-1,46
CD8+ (Suppressor/Zytotoxische T-Zellen)	17-30	0,23-0,73
CD16+ (Natürliche Killerzellen)	6-20	0,10-0,44
CD19+ (B-Lymphozyten)	5-17	0,09-0,39
Gesamtlymphozytenzahl		1,43-0,03
HLA-DR+ (aktivierte T-Lymphozyten)	8-19	0,12-0,44

3.6.2. Bestimmung der Lymphozytenfunktionen

In diesem Testverfahren wird im Gegensatz zur rein quantitativen Erfassung der Zellzahl die Funktionsfähigkeit der einzelnen Lymphozytengruppen in vitro erfasst.

Die Funktionen werden nach Stimulation der Lymphozyten mit unspezifischen und spezifischen Stimuli (ConA, Pokeweed, PHA, Candida-Antigen, IL-2 und antiCD3) in einem H-3-Thymidin-Inkorporationstest bestimmt.

Die Lymphozyten werden aus Vollblut über einen Ficoll Gradienten gewonnen. Dazu werden 8 ml Blut 1:2 mit Medium verdünnt und über 22 ml Ficoll geschichtet. Danach 30 min bei ca. 1300 UpM ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand bis zum weißen Ring wird verworfen. Die aufgenommenen Lymphozyten werden in 30 ml Medium 20 min lang bei 700 UpM zentrifugiert. Danach saugt man das Nährmedium ab, gibt 4 ml Nährmedium hinzu und vermischt das Ganze. In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gibt man 450 µl Nährmedium und 50 µl von der Zellsuspension. Die Zellen werden in der Neubauer-Kammer gezählt und die Zellsuspension dementsprechend auf 1x 10⁶/ml verdünnt. Anschließend werden die Zellen in eine Mikrotiterplatte nach folgendem Schema getropft.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												

Von A - D:

1+2: 150 µl Nährmedium* und 50 µl Zellsuspension (5x10⁴ Zellen)

3-8: 50 µl Nährmedium, 100 µl Stimulus** und 50 µl Zellsuspension

9: 100 µl Nährmedium, 50 µl PHA***, 50 µl Zellsuspension

Die Zellsuspension muss zwischen dem Tropfen immer wieder aufgeschüttelt werden. Nach 5 Tagen wird 3H-Thymidin zugegeben. Nach 16-18 Stunden wird die Thymidininkorporation gemessen, indem die Zellen auf Filter geerntet werden und 3H-Thymidin im Scintillationszähler gemessen wird. Die Proliferation wird als Index dargestellt: Quotienten aus cpm (counts/minute) der stimulierten Kultur und der korrespondierenden negativen Kultur.

*Nährmedium: 500 ml serumfreies Iscove Medium, angereichert mit 5 ml 100xGlutamin (200 mM), 5 ml 100x nonessential Aminoacids (10 mM), 5 ml Pen/Strep (5000U, resp 5000µg Strep) und 5 ml Natriumpyrovat (100 mM)

**CONA (Sigma) final conc 1 mg/ml
 Pokeweed (Sigma) final con 5 µg/ml
 IL 2 (Sigma) final conc 80 U/ml
 antiCD3 (Ortho) final conc 10 nag/ml
 3Hthymidin 0.5 µg/well

*** PHA (Wellcome Diagnostic) final conc 20 µg/ml

3.7. Datenmanagement und statische Aspekte

3.7.1. Datenmanagement

Die erhobenen Befunde wurden manuell von den Mitarbeiterinnen des Onkologisch-Immunologischen Labors der Frauenklinik in eine Access-Datenbank eingegeben. Aus dieser Datenbank stammen die Werte, die die Grundlage dieser Arbeit darstellen. Die Daten wurden dann in eine SPSS-Datenbank exportiert, welche verschlüsselt Familienname, Vorname, Patientenummer, Labornummer, Eingangsdatum und die Laborwerte für folgende Parameter erhielten:

1. Lymphozytenteste: CD3-ABS, CD3-REL, CD4-ABS, CD4-REL, CD8-ABS, CD8-REL, CD16-ABS, CD16-REL, CD19-ABS, CD19-REL, HLACD4-ABS, HLACD4-REL, HLACD8-ABS, HLACD8-REL, Gesamtlmphozyten und das Verhältnis CD4/CD8.

2. Funktionsteste: Kontrolle 1, Kontrolle 2, IL2, OKT3, CONA, CAND, POKE, PHA. Unter der Rubrik Hinweis wurde die entsprechende zeitliche Zuordnung zum Therapiezeitpunkt vorgenommen. Dabei war das Randomisierungsdatum der Bezugspunkt.

Aus dem Studiensekretariat der UFK Düsseldorf wurden die weiteren erforderlichen Daten wie Randomisierungsdatum, Armzugehörigkeit, der Status (Rezidiv, Tod, Lebend) und dazugehörige Datum bezogen und den jeweiligen Patientinnen zugeordnet.

Der Hinweis wurde zu statistischen Zwecken in nicht randomisiert, Randomisierung, unter Therapie, Abschluss, nach 3-6 Monaten, nach 1 Jahr, nach 2 Jahren, nach 3 Jahren, nach 4 Jahren, nach 5 Jahren und nach 6 Jahren kodiert.

Die Armzugehörigkeit wurde zu statistischen Zwecken in nicht randomisiert, adjuvant Arm A, adjuvant Arm B, metastasiert Arm A, metastasiert Arm B, metastasiert ohne Arm kodiert. Desweiteren wurde der Status zu statistischen Zwecken in Rezidiv, lebend, Tod, unklar/unbekannt kodiert.

3.7.2. Statistische Verfahren und Graphiken

Die statische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for Analysis in Social Science, 14.0, SPSS-Inc, Chicago, Illinois, U.S.A) für Windows Microsoft. Als weitere Software wurde Access und Word für Windows von Microsoft verwendet.

Bei der Berechnung des Signifikanzniveaus wurden Werte mit $p > 0,05$ als nicht signifikant, Werte mit $p \leq 0,05$ als signifikant, Werte mit $p \leq 0,01$ als sehr signifikant und Werte mit $p \leq 0,001$ als hoch signifikant bezeichnet.

Der U-Test nach Mann-Whitney wurde zum nichtparametrischen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben zur Evaluierung statischer Unterschiede benutzt.

Box-and-Whiskers-Plots

Box-and-Whiskers-Plot ist eine graphische Darstellung, die besonders zur Wiedergabe von quantitativen Merkmalen geeignet ist, in der jede Stichprobe durch eine rechteckige Box repräsentiert wird. Diese wird unten und oben (beziehungsweise rechts und links) von der 1. und 3. Perzentile begrenzt und beinhaltet 50% der Stichprobenwerte. Innerhalb der Box wird der Median gekennzeichnet. Die von der Box ausgehenden Striche (engl. whiskers = Schnurrhaare) zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten beobachteten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen. Außerdem werden Ausreisser und Extremwerte angezeigt. Extremwerte sind Fälle, deren Wert zwischen 1,5 bis 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen. Ausreisser sind Fälle, deren Wert mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen.

Die Plots liefern Hinweise zu Lagemaßen (Mediane, Perzentile, Minima, Maxima) und Streuungsmaßen.

4. Ergebnisse

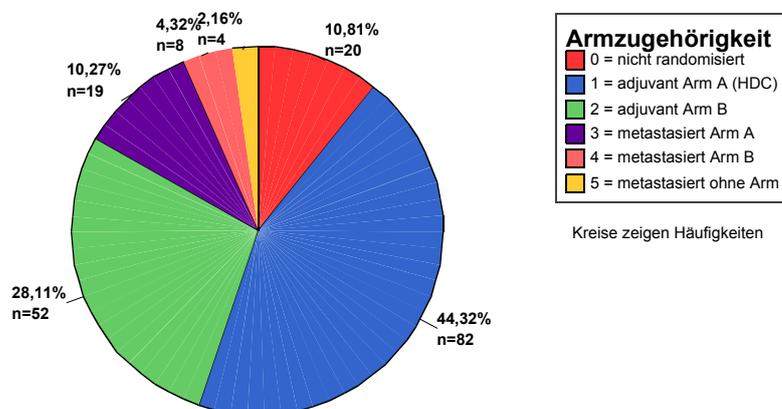
4.1. Anzahl der Patientinnen nach Armzugehörigkeit und klinischem Status

Die Patientinnen stammen aus einer Phase-III-Studie (Prof. Dr. U. A. Nitz [77]) der 1994 gegründeten Westdeutschen Studiengruppe, die an der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf beheimatet ist. In dieser Studie zur adjuvanten Therapie des Hochrisiko-Mammakarzinoms im Stadium II / III mit mehr als neun positiven Lymphknoten wurde eine stammzell- und wachstumsfaktorgestützte sequentielle Hochdosis-Chemotherapie (Arm A) mit einer wachstumsfaktorgestützten dosisintensivierten Chemotherapie (Arm B) in Form einer prospektiven randomisierten Untersuchung zur Therapieoptimierung verglichen.

Multizentrisch wurden 403 Patientinnen in der Zeit vom Juni 1995 bis Juni 2002 in diese Studie eingeschlossen. Davon wurden 201 Patientinnen dem Arm A und 202 Patientinnen dem Arm B zugeführt. Von 134 aus dieser Studie stammenden Patientinnen konnten in der Zeit von Oktober 1995 bis September 2002 Untersuchungen im Onkologisch-Immunologischen Labor der UFK Düsseldorf durchgeführt werden: 82 Patientinnen wurden im Arm A und 52 Patientinnen im Arm B behandelt. Des Weiteren lagen uns noch Daten von 20 nicht randomisierten Patientinnen und 31 Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom vor. Von den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurden 19 mit einer stammzellgestützten sequentiellen Hochdosistherapie (Arm A) und 8 Patientinnen mit einer wachstumsfaktorgestützten dosisintensivierten Chemotherapie (Arm B) behandelt und 4 dieser Patientinnen waren keinem Arm zugeordnet. Insgesamt liegen uns Daten von 185 Patientinnen vor.

Abbildung 2:

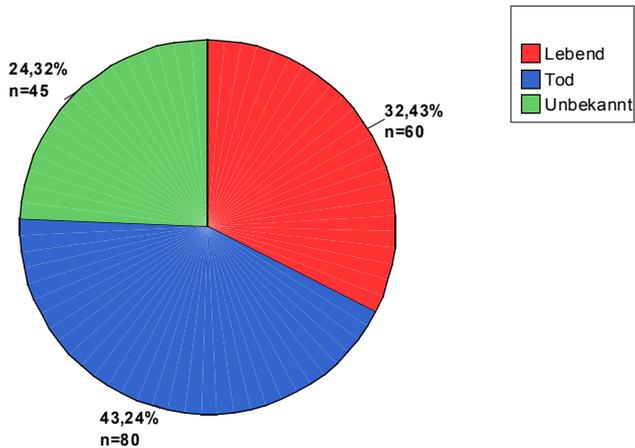
Anzahl der Patientinnen nach Armzugehörigkeit
insgesamt 185 Patientinnen



Von den 185 Patientinnen sind bis September 2002 80 verstorben, 60 lebend und von 45 Patientinnen ist der klinische Status nicht bekannt.

Abbildung 3:

Anzahl der Patientinnen nach ihrem klinischen Zustand
insgesamt 185 Patientinnen

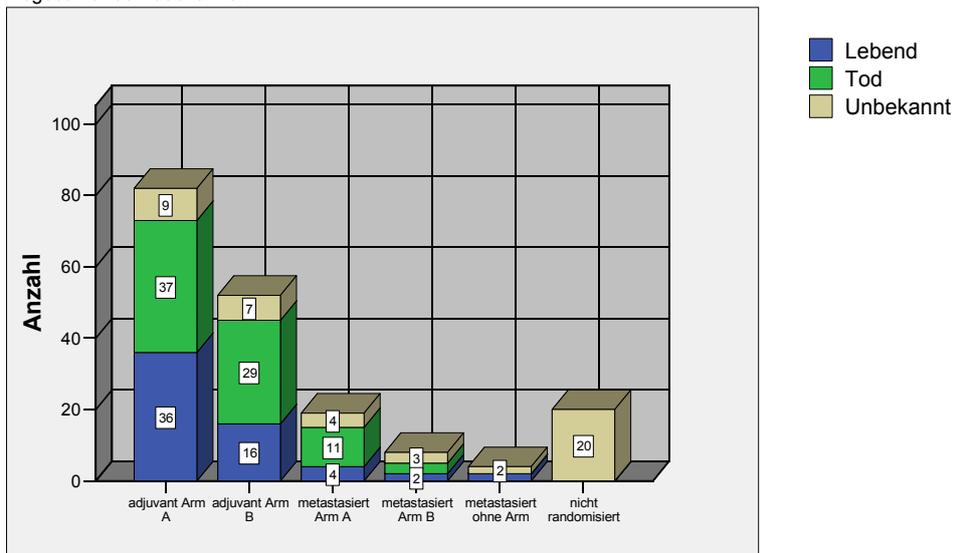


In den einzelnen Armen sieht die Verteilung folgendermaßen aus:

Abbildung 4:

Anzahl der Patientinnen nach Armzugehörigkeit und klinischem Status

insgesamt 185 Patientinnen



Bei unbekanntem Status war der klinische Zustand nicht erfasst.

Bei den 20 nicht randomisierten Patientinnen ist der Status nicht bekannt.

Im adjuvanten stammzellunterstützten Hochdosisarm (Arm A, 82 Patientinnen) leben 36 und haben alle ein Rezidiv entwickelt. 37 Patientinnen sind verstorben, davon 13 mit einem Rezidiv.

Bei neun Frauen konnte der klinische Zustand nicht ermittelt werden.

Im adjuvanten Kontrollarm (Arm B, 52 Frauen) sind 16 Versuchsteilnehmerinnen lebend, alle entwickelten ein Rezidiv. 29 Patientinnen sind verstorben, davon 13 mit einem Rezidiv. Bei drei Patientinnen ist das Rezidiv bekannt. Die weitere klinische Situation konnte nicht ermittelt werden. Bei sieben Patientinnen ist der gesamte klinische Zustand unbekannt.

Von den 19 Patientinnen mit Metastasen im Arm A sind vier lebend, elf verstorben und bei vier Patientinnen kann über den Zustand keine sichere Aussage gemacht werden. Von acht Frauen mit einem Rezidiv sind vier verstorben. Die klinische Situation der Übrigen ist nicht bekannt.

Von den 8 Patientinnen mit Metastasen im Arm B leben zwei Frauen, drei sind verstorben und bei drei Teilnehmerinnen ist der Status unbekannt. Von vier Frauen mit einem Rezidiv leben zwei und bei den zwei weiteren ist der klinische Zustand nicht bekannt.

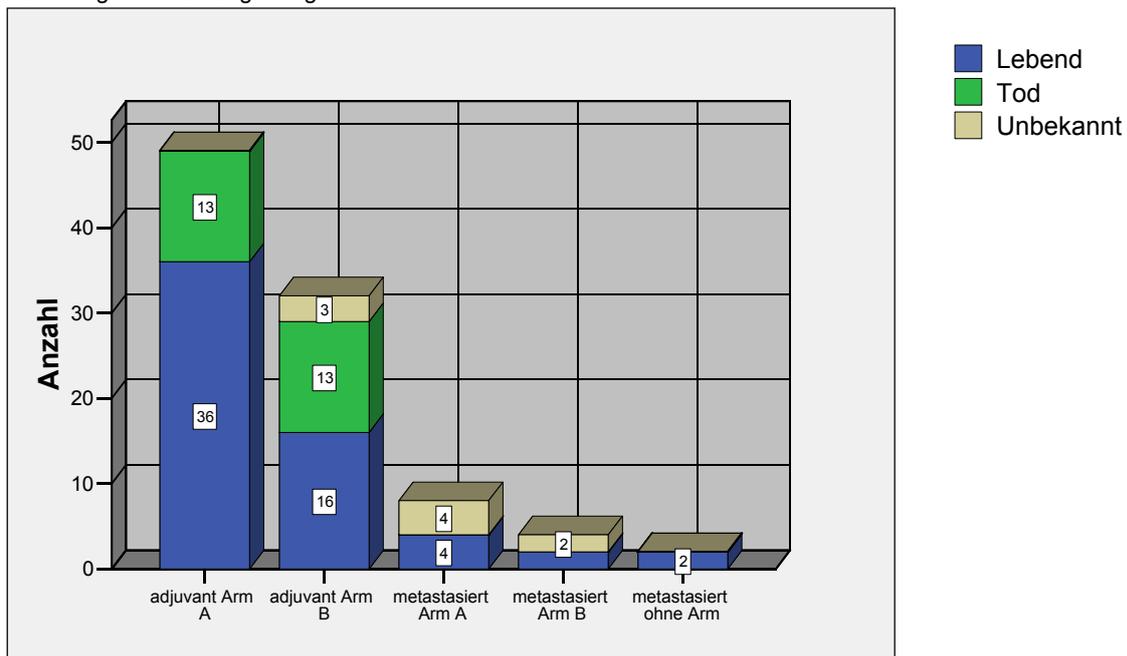
Bei den vier Patientinnen mit Metastasen ohne Armzugehörigkeit sind zwei am Leben. Sie haben ein Rezidiv entwickelt. Der klinische Zustand der anderen zwei Frauen ist nicht erfasst.

In der Abbildung 5 ist die Anzahl der Rezidive in den jeweiligen Armen mit dem jeweiligen klinischen Zustand dargestellt.

Abbildung 5:

Anzahl der Patientinnen mit einem Rezidiv und ihrem jeweiligen klinischem Status

Einteilung nach Armzugehörigkeit



Bei unbekanntem Status war der klinische Zustand nicht erfasst.

Die letztlich erwähnten 51 Patientinnen (31 mit einer metastasierten Erkrankung und 20 nicht randomisierte Patientinnen) werden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

4.2. Abschnitt A: Adjuvante stammzellgestützte sequentielle Hochdosis-Chemotherapie (Arm A)

4.2.1. Verlauf der Lymphozytensubpopulationen im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung bis nach 6 und mehr Jahren

Die Werte der Gesamt-Lymphozyten, unterteilt in B- und T-Lymphozyten (hier CD4- und CD8-Zellen), Natürlichen Killerzellen, Quotienten aus CD4-Zellen/CD8-Zellen und aktivierte CD4- und CD8-Zellen, sind im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung bis 6 und mehr Jahre danach unter Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittelwertes mit Standardfehler und Standardabweichung, des Medianwertes, Minimum, Maximum und 1., 2. und 3. Perzentile in den Tabellen 13 und 14, die sich im Anhang befinden, zusammengefasst.

Bei der manuellen Übertragung der Befunde in die Access-Datenbank (digitales Laborbuch) sind einige Eingabefehler aufgetreten. Deshalb wurden 10 Werte, nicht Patientinnen, aus der Auswertung entfernt. Dabei handelte es sich um acht Werte aus dem Arm A und zwei Werte aus dem Arm B. Diese wurden für die weitere Auswertung herausgenommen und sind in den Tabellen nicht mehr enthalten. Sie werden jedoch in der graphischen Darstellung (Grafiken 44-50) der einzelnen Lymphozytenphänotypen als Box-and-Whiskers-Plots einzeln markiert. Die Grafiken 44-50 befinden sich ebenfalls im Anhang.

Die p-Werte ergeben sich aus dem Vergleich des Ausgangswertes, der dem Wert zum Zeitpunkt der Randomisierung entspricht, mit den jeweiligen Werten im Verlauf der Untersuchungen (unter Therapie, Abschluss, nach 3 bis 6 Monaten, nach 1 Jahr, nach 2 Jahren, nach 3 Jahren, nach 4 Jahren, nach 5 Jahren, nach 6 und mehr Jahren).

4.2.1.1. Verlauf der Gesamt-, T- und B-Lymphozyten

Der Mittelwert aller Lymphozyten lag zum Zeitpunkt der Randomisierung bei $1,83 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $1,43-3,03 \times 10^6$ Zellen/ml. Er fiel zu Beginn der Therapie steil ab auf $1,21 \times 10^6$ Zellen/ml, bis zum Abschluss der Therapie auf $0,96 \times 10^6$ Zellen/ml und weiterhin auf $0,92 \times 10^6$ Zellen/ml bis nach 3-6 Monaten. Danach erfolgte ein stetiger Anstieg auf $1,61 \times 10^6$ Zellen/ml im Verlauf von 3 Jahren und auf $1,75 \times 10^6$ Zellen/ml nach über 6 Jahren.

Nach 2 Jahren hatten sich die Werte mit $1,46 \times 10^6$ Zellen/ml normalisiert, wobei der Ausgangswert im Beobachtungszeitraum nicht erreicht wurde.

Diese Veränderungen im Verlauf waren bis 2 Jahre nach Therapie hoch signifikant mit einem p-Wert = 0,000.

Die T-Lymphozyten lagen zum Zeitpunkt der Randomisierung im Mittel bei $1,35 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt zwischen $0,94-2,11 \times 10^6$ Zellen/ml. Unter der Therapie kam es zu einem steilen Abfall auf $0,93 \times 10^6$ Zellen/ml. Dieser Abfall setzte sich bis zum Nachbeobachtungszeitpunkt von einem Jahr auf einen Wert von $0,68 \times 10^6$ Zellen/ml fort. Erst danach erholten sich die T-Zellen und normalisierten sich im Verlauf des zweiten bis dritten Jahres. Nach ≥ 6 Jahren lag der Mittelwert bei $1,26 \times 10^6$ Zellen/ml, also noch unterhalb des Ausgangswertes.

Diese Veränderungen waren hoch signifikant bzw. sehr signifikant ($p = 0,000$ bis 2 Jahre nach Therapie, nach 3 Jahren $p = 0,001$, nach 4 Jahren $p = 0,010$, nach 5 Jahren $p = 0,017$).

Die B-Lymphozyten lagen zum Ausgangszeitpunkt bei $0,27 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,09-0,39 \times 10^6$ Zellen/ml. Sie fielen unter der Therapie steil ab auf $0,11 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Abfall setzte sich bis zum Abschluss der Therapie auf $0,02 \times 10^6$ Zellen/ml fort. Danach erfolgte eine rasche Erholung mit einem Anstieg auf maximal $0,46 \times 10^6$ Zellen/ml 2 Jahre nach Therapie, also über den Normalbereich hinaus. Danach fielen die B-Zellen wieder ab. Sie erreichten nach 6 Jahren mit $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml etwa den Ausgangswert. Die Veränderungen waren hoch signifikant mit $p = 0,000$ bis 3-6 Monaten nach Therapie und nach 2 bis 4 Jahren.

In der Abbildung 6 ist der Verlauf der Gesamt-Lymphozyten und aufgeteilt in T- und B-Zellen in einem Liniendiagramm graphisch dargestellt.

In den Abbildungen 7, 8 und 9 sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung und p-Werten der einzelnen Zellgruppen als Balkendiagramm graphisch wiedergegeben.

Abbildung 6:

Adjuvant Arm A: Verlauf der Gesamt-Lymphozyten, der T- und B-Lymphozyten

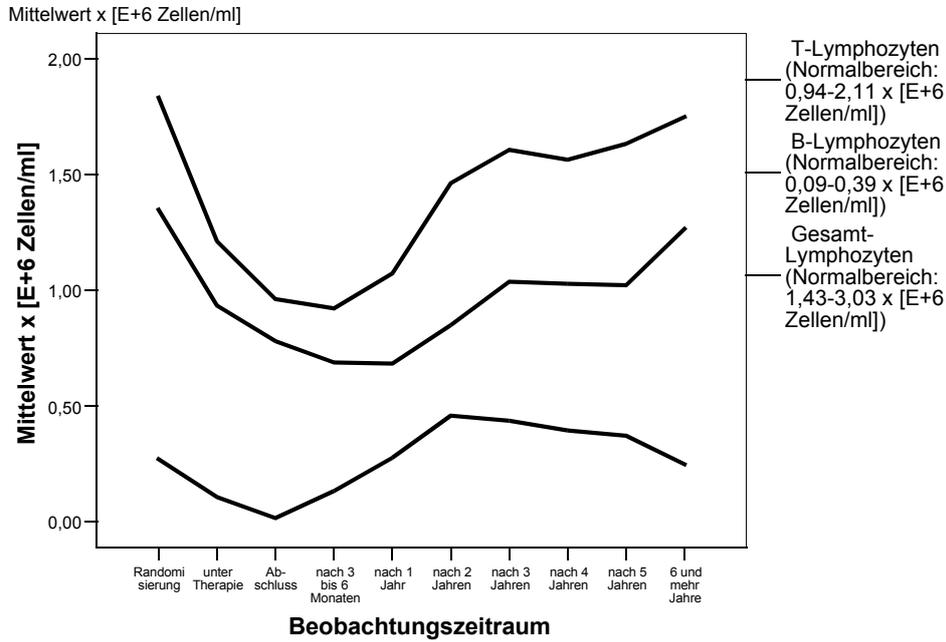


Abbildung 7:

Adjuvant Arm A: Darstellung der Gesamt-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert zu Verlaufszeitpunkten)

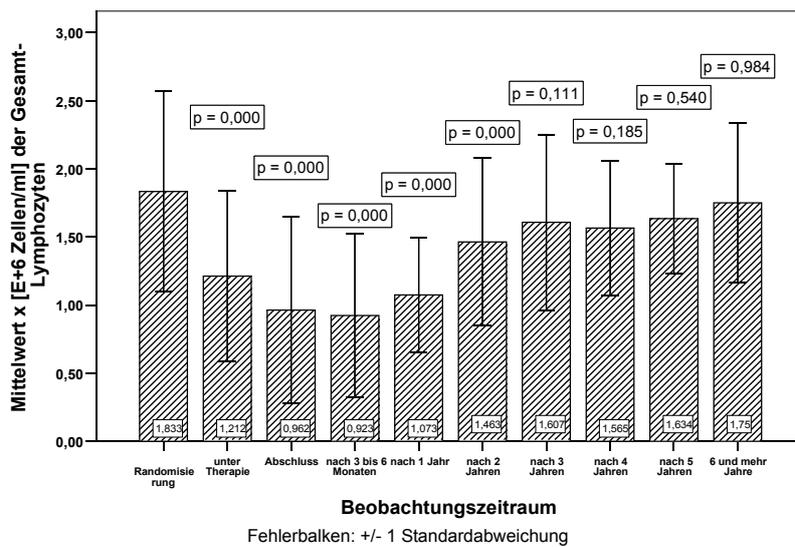


Abbildung 8:

Adjuvant Arm A: Darstellung der T-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangspunkt zu Verlaufszeitpunkten)

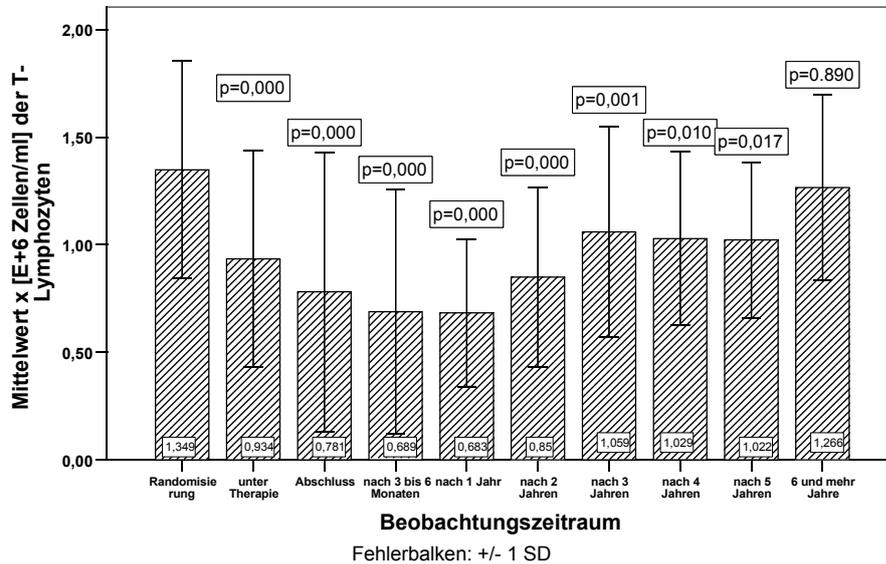
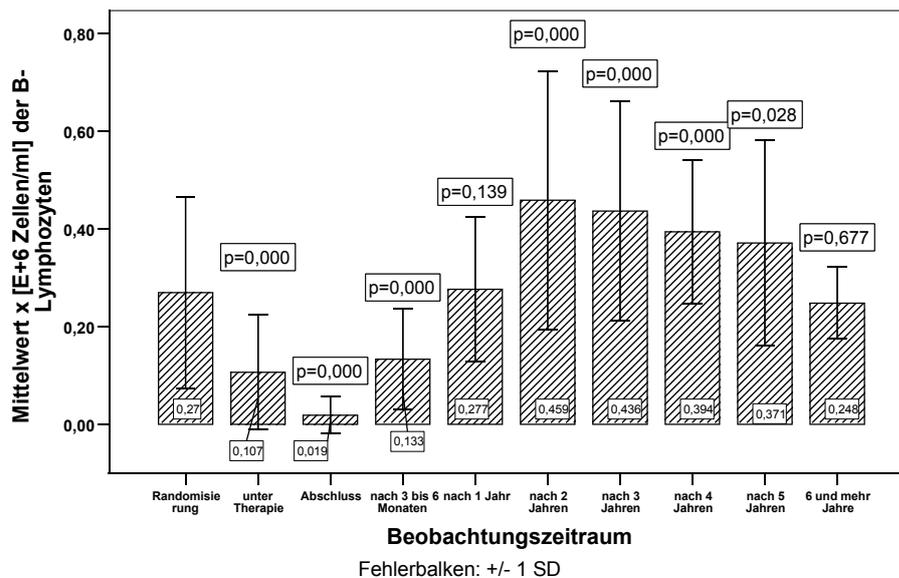


Abbildung 9:

Adjuvant Arm A: Darstellung der B-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert zu Verlaufszeitpunkten)



4.2.1.2. Verlauf der CD4- und CD8-T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen

Das Mittel der Absolutwerte der CD4-Zellen lag zum Zeitpunkt der Randomisierung bei $0,92 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,62-1,16 \times 10^6$ Zellen/ml. Unter der Therapie und bis zu deren Abschluss kam es zu einem sehr steilen Abfall. Der Wert lag bei $0,27 \times 10^6$ Zellen/ml im Mittel. Der Abfall setzte sich für weitere 3-6 Monate fort, jedoch wesentlich weniger steil, auf einen Wert von $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml. Danach erfolgte die Erholung, zunächst langsam, in der Zeit nach 1-3 Jahren rascher und nach 5 Jahren wieder langsamer. Erst nach über 6 Jahren wurde mit $0,65 \times 10^6$ Zellen/ml der Normalbereich erreicht; jedoch zu keinem Zeitpunkt der Ausgangswert. Der Verlauf war hoch signifikant mit $p = 0,000$ über den gesamten Beobachtungszeitraum bis 5 Jahre nach Randomisierung.

Die CD8-Zellen lagen zum Ausgangszeitpunkt im Mittel bei $0,39 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,28-0,78 \times 10^6$ Zellen/ml. Unter der Therapie kam es ebenfalls zum Abfall auf $0,30 \times 10^6$ Zellen/ml, jedoch weniger stark und lang anhaltend als bei den CD4-Zellen. Bereits zum Abschluss hatten sich die CD8-Zellen erholt und lagen mit $0,48 \times 10^6$ Zellen/ml oberhalb des Ausgangswertes von $0,39 \times 10^6$ Zellen/ml. Innerhalb des 1. Jahres fielen diese auf $0,37 \times 10^6$ Zellen/ml wieder ab, um dann bis 3 Jahre nach Therapie wieder anzusteigen auf $0,46 \times 10^6$ Zellen/ml und nach über 6 Jahren den Wert $0,60 \times 10^6$ Zellen/ml zu erreichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die CD8-Zellen kurz unter der Therapie abfielen, sich rasch erholten, zum Abschluss sogar oberhalb des Ausgangswertes lagen und sich auf diesem Niveau im mittleren bis oberen Normbereich hielten.

Der p-Wert war mit $0,000$ unter Therapie und bei deren Abschluss hoch signifikant. Ebenfalls signifikant waren die Veränderungen nach 3-6 Monaten mit $p = 0,017$, nach einem Jahr mit $p = 0,039$ und nach 6 Jahren mit $p = 0,009$ (höhere Werte als der Ausgangswert).

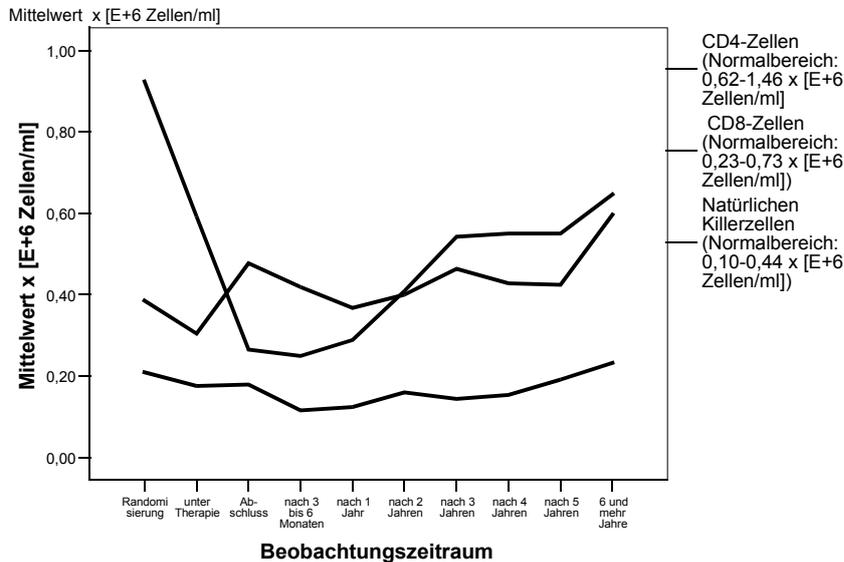
Die Natürlichen Killerzellen lagen zum Ausgangszeitpunkt im Mittel bei $0,21 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,10-0,44 \times 10^6$ Zellen/ml. Unter der Therapie kam es zunächst zu einem Abfall auf $0,18 \times 10^6$ Zellen/ml, dieses Niveau wurde bis zum Abschluss der Therapie gehalten. Erst nach 3-6 Monaten kam es zu einem steileren Abfall auf $0,11 \times 10^6$ Zellen/ml, um dann kontinuierlich auf $0,23 \times 10^6$ Zellen/ml nach 6 und mehr Jahren anzusteigen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Killerzellen zu keinem Zeitpunkt unterhalb des Normbereiches lagen.

Die Veränderungen waren nach 3-6 Monaten ($p = 0,000$), nach 1 Jahr ($p = 0,000$), nach 2 Jahren ($p = 0,005$) und nach 3 Jahren ($p = 0,003$) hoch signifikant.

In der Abbildung 10 sind die Verläufe der CD4- und CD8-Zellen und der Natürlichen Killerzellen in einem Liniendiagramm gemeinsam gezeigt.

Abbildung 10:

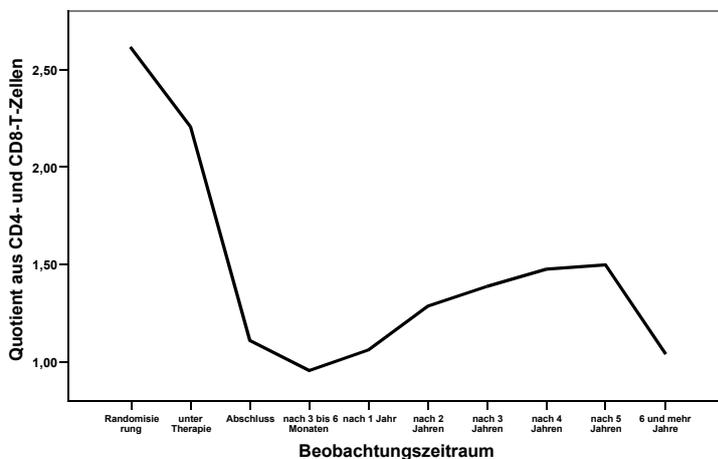
Adjuvant Arm A: Verlauf der CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen und Natürlichen Killerzellen



In der Abbildung 11 ist der Verlauf des Quotienten aus CD4-Zellen und CD8-Zellen wiedergegeben. Zu Beginn der Therapie kam es zu einem Abfall des Quotienten von 2,61 auf 2,21, der sich bis zum Abschluss der Therapie wesentlich verstärkt auf 1,11 fortsetzte und 0,96 nach 3-6 Monaten erreichte. Im Verlauf der nächsten 5 Jahre kam es zu einer Erholung auf 1,50. Der Ausgangswert wurde nie erreicht. Der Verlauf war im gesamten Beobachtungszeitraum hoch signifikant. Die p-Werte lagen bei 0,000-0,001.

Abbildung 11:

Adjuvant Arm A: Verlauf des Quotienten aus CD4- und CD8-T-Zellen



Die Abbildungen 12, 13, 14 und 15 geben die Mittelwerte mit der Standardabweichung und die p-Werte der einzelnen Phenotypen als Balkendiagramm graphisch wieder.

Abbildung 12:

Adjuvant Arm A: Darstellung der CD4-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangspunkt zu Verlaufszeitpunkten)

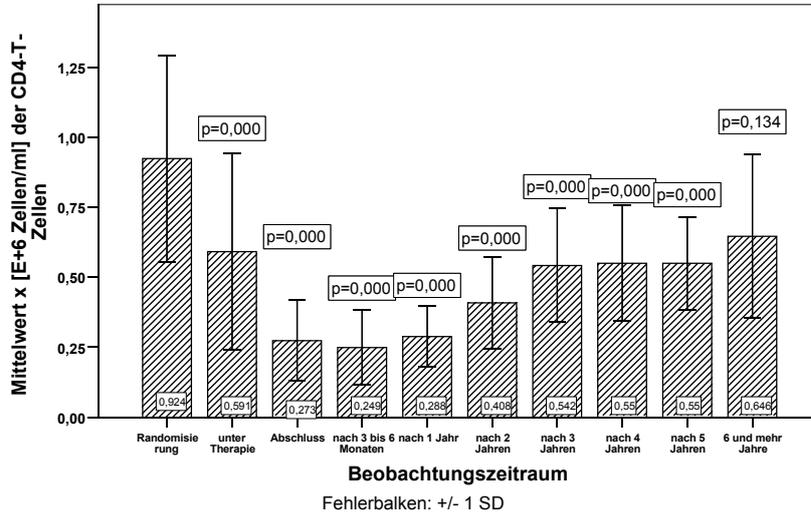


Abbildung 13:

Adjuvant Arm A: Darstellung der CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangspunkt zu Verlaufszeitpunkten)

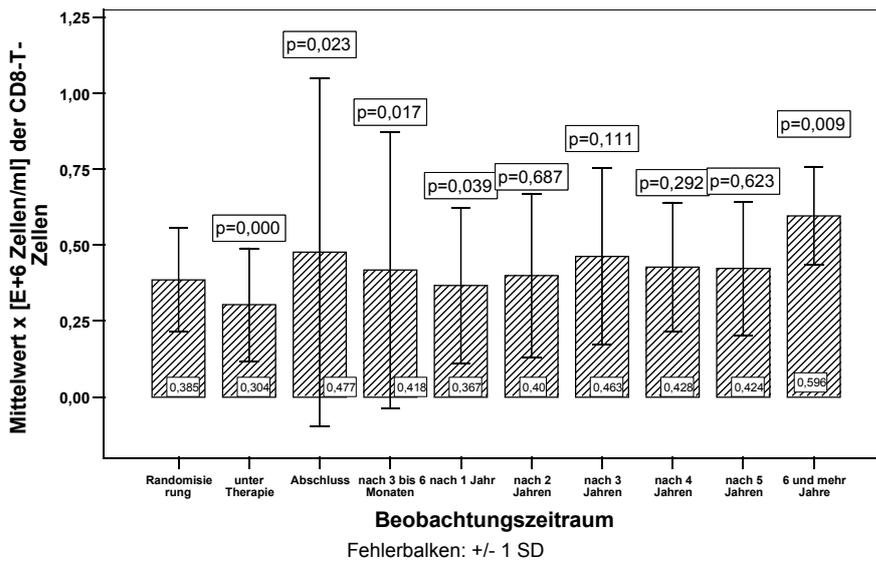


Abbildung 14:

Adjuvant Arm A: Darstellung der Natürlichen Killerzellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangspunkt zu Verlaufszeitpunkten)

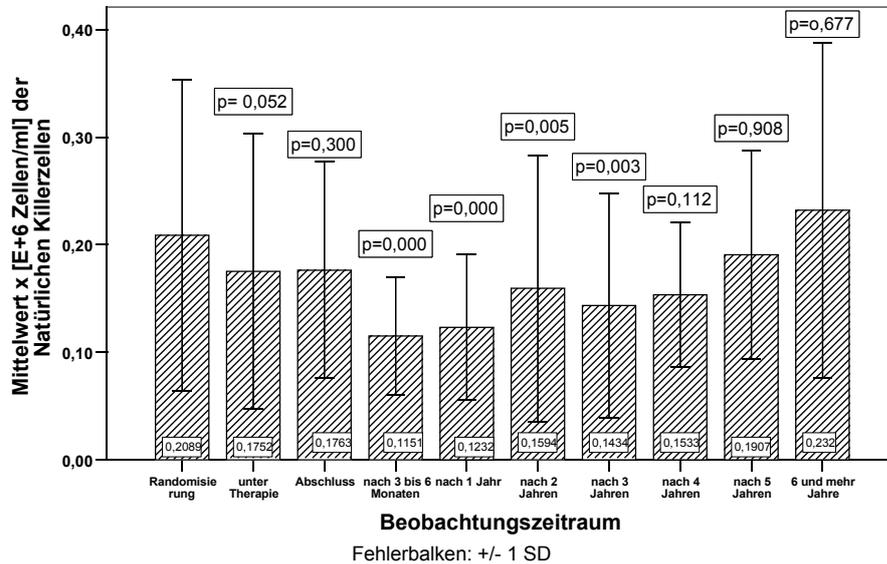
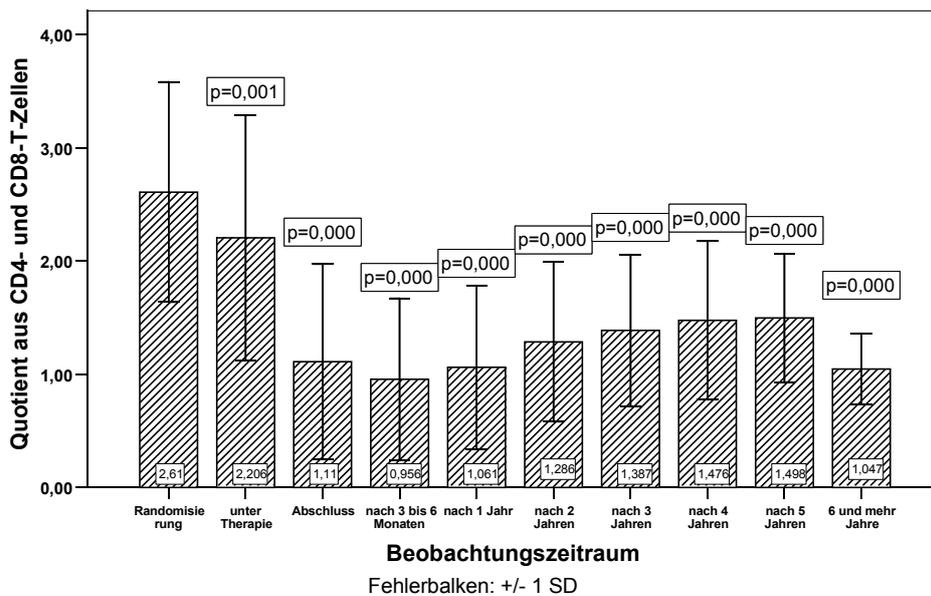


Abbildung 15:

Adjuvant Arm A: Darstellung des Quotienten aus CD4- und CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Quotient aus Anzahl der CD4-/CD8-T-Zellen mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangspunkt zu Verlaufszeitpunkten)



4.3. Abschnitt B: Adjuvante wachstumsfaktorgestützte dosisintensivierte Chemotherapie (Arm B)

4.3.1. Verlauf der Lymphozytenphenotypen im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung bis nach 6 und mehr Jahren

Die Untersuchungen sind analog zu den Untersuchungen in Abschnitt A durchgeführt worden. Tabellen 14-16 und Abbildungen 51-57 befinden sich im Anhang.

4.3.1.1 Verlauf der Gesamt-, T- und B-Lymphozyten

Der Durchschnitt aller Lymphozyten lag zum Zeitpunkt der Randomisierung, der als Ausgangszeitpunkt dient, bei $1,73 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $1,43-3,03 \times 10^6$ Zellen/ml. Sie fielen zu Beginn der Therapie langsam auf $1,55 \times 10^6$ Zellen/ml ab, dann steil auf $0,98 \times 10^6$ Zellen/ml bis zum Abschluss der Therapie (hoch signifikant mit $p=0,000$) und dann langsam auf $0,92 \times 10^6$ Zellen/ml 3-6 Monaten nach Therapie (hoch signifikant mit $p=0,000$). In den anschließenden 2,5 Jahren stiegen sie auf $1,76 \times 10^6$ Zellen/ml an, mit einem weiteren Anstieg auf $2,13 \times 10^6$ Zellen/ml nach 5 Jahren ($p=0,033$) und einem steilen Abfall nach 6 und mehr Jahren auf $1,65 \times 10^6$ Zellen/ml. In dem Zeitraum zwischen dem Ende der Therapie und nach 2 Jahren lagen die Gesamtzellen unterhalb des Normalbereiches. Zwischen dem 2. und 3. Jahr erholten sie sich wieder in den Normalbereich und erreichten den Ausgangswert. Sie lagen zu keinem Zeitpunkt oberhalb des Normbereiches.

Die T-Lymphozyten lagen zum Zeitpunkt der Randomisierung im Mittel bei $1,31 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt zwischen $0,94-2,11 \times 10^6$ Zellen/ml. Zu Beginn der Therapie kam es zunächst zu einem langsamen Abfall auf $1,24 \times 10^6$ Zellen/ml, der sich im Verlauf zu einem steilen Abfall mit $0,85 \times 10^6$ Zellen/ml zum Ende der Therapie entwickelte. Der Abfall setzte sich bis 3-6 Monaten nach Therapie auf $0,74 \times 10^6$ Zellen/ml fort. Danach stiegen die Zellen bis zum Beobachtungszeitpunkt 5 Jahre kontinuierlich an auf $1,44 \times 10^6$ Zellen/ml, also bis oberhalb des Ausgangswertes von $1,31 \times 10^6$ Zellen/ml. Anschließend fielen sie erneut auf $1,22 \times 10^6$ Zellen/ml ab. Die T-Lymphozyten lagen in dem Zeitraum zwischen dem Ende der Therapie und ein Jahr danach unterhalb des Normbereiches (hoch signifikant mit $p=0,000$). Nach etwa 2 Jahren hatten sie sich erholt, waren mit $0,99 \times 10^6$ Zellen/ml in den Normalbereich gelangt (jedoch unterhalb des Ausgangswertes signifikant mit $p=0,004$) und blieben im Verlauf der Untersuchungen im Referenzbereich.

Die B-Lymphozyten lagen zum Ausgangszeitpunkt bei $0,23 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,09-0,39 \times 10^6$ Zellen/ml. Sie fielen bis zum Abschluss relativ kontinuierlich auf $0,04 \times 10^6$ Zellen/ml ab, um dann wieder kontinuierlich im Verlauf der nächsten 3 Jahre auf $0,38 \times 10^6$ Zellen/ml, also oberhalb des Ausgangswertes anzusteigen. Bis nach 4 Jahren fielen sie wieder auf $0,28 \times 10^6$ Zellen/ml ab, stiegen dann auf $0,49 \times 10^6$ Zellen/ml nach 5 Jahren und lagen damit erstmals oberhalb des Normbereiches. Nach 6 und mehr Jahren fielen sie dann auf $0,30 \times 10^6$ Zellen/ml erneut in den Normalbereich ab. Sie lagen nur zum Zeitpunkt Abschluss unterhalb des Normalbereiches, zum Zeitpunkt nach 5 Jahren oberhalb, sonst innerhalb des Normalbereiches. Der gesamte Verlauf war signifikant mit p-Werten zwischen 0,000-0,025 außer nach dem 1. Jahr ($p=0,143$) und 4. Jahr ($p=0,056$).

In der Abbildung 16 ist der Verlauf der Gesamt-Lymphozyten und aufgeteilt in T- und B-Zellen gemeinsam in einem Liniendiagramm graphisch dargestellt.

In den Abbildungen 17, 18 und 19 sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung und p-Werten der einzelnen Zellgruppen als Balkendiagramm graphisch wiedergegeben.

Abbildung 16:

Adjuvant Arm B: Verlauf der Gesamt-Lymphozyten, der T- und B-Lymphozyten

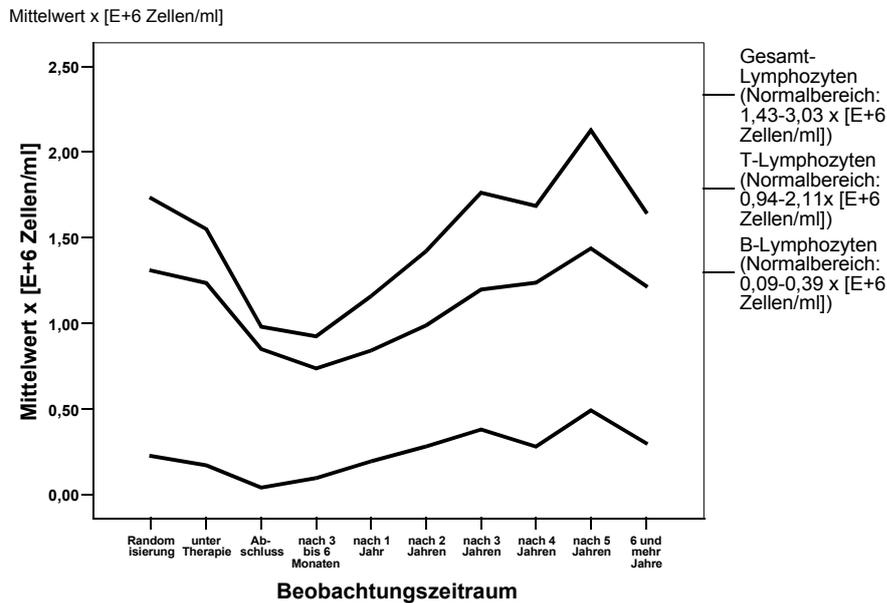


Abbildung 17:

Adjuvant Arm B: Darstellung der Gesamt-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert mit Verlaufszeitpunkten)

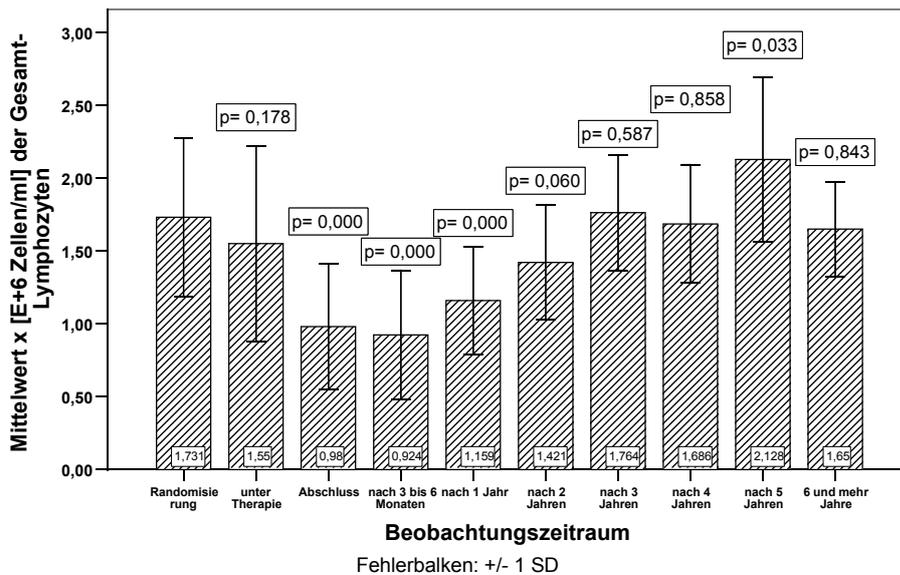


Abbildung 18:

Adjuvant Arm B: Darstellung der T-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert mit Verlaufszeitpunkten)

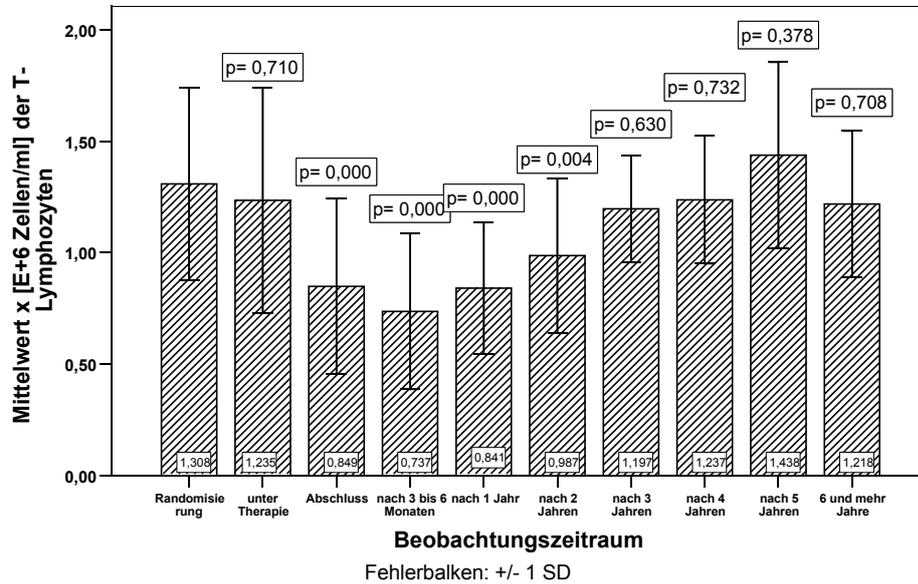
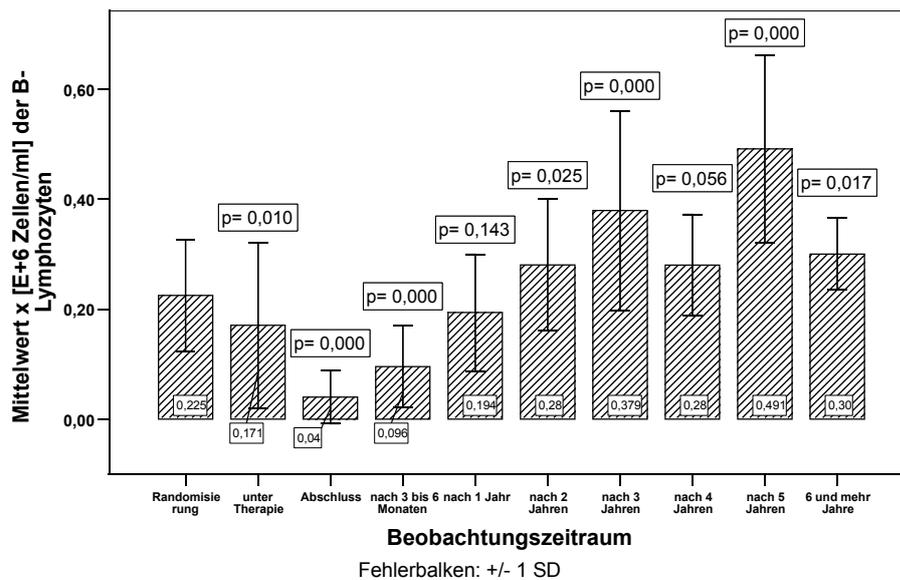


Abbildung 19:

Adjuvant Arm B: Darstellung der B-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert mit Verlaufszeitpunkten)



4.3.1.2. Verlauf der CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen

Die Anzahl der CD4-T-Zellen lag zum Ausgangszeitpunkt im Durchschnitt bei $0,81 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,62-1,16 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Anzahl der CD4-T-Zellen fiel steil auf $0,53 \times 10^6$ Zellen/ml zum Ende der Therapie ab. Der Abfall setzte sich bis 3-6 Monaten nach Ende der Therapie auf $0,43 \times 10^6$ Zellen/ml fort. Erst danach erholten sie sich kontinuierlich bis auf $0,86 \times 10^6$ Zellen/ml nach 5 Jahren. Im dem Zeitraum vom Abschluss der Therapie bis 2 Jahre danach war der Verlauf hoch signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert mit $p=0,000-0,001$. Nach 3 Jahren wurde mit $0,69 \times 10^6$ Zellen/ml der Normalbereich erreicht. Zu keinem Zeitpunkt lagen die Werte oberhalb des Normalbereiches.

Die CD8-T-Zellen lagen zum Ausgangszeitpunkt im Mittel bei $0,43 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,23-0,73 \times 10^6$ Zellen/ml. Sie fielen kontinuierlich ab, bis zum Abschluss der Therapie und bis 3-6 Monaten nach Beendigung der Therapie auf $0,26 \times 10^6$ Zellen/ml. Dieser Abfall ist signifikant mit $p=0,000-0,047$. Danach erholen sie sich, stiegen kontinuierlich bis 5 Jahre nach Therapie auf $0,52 \times 10^6$ Zellen/ml an und lagen damit oberhalb des Ausgangswertes. Bereits nach einem Jahr hatten sie sich erholt und lagen im Normalbereich. Nach 6 und mehr Jahren war ebenfalls wie bei den CD4-T-Zellen ein Abfall zu verzeichnen. Sie fielen auf $0,40 \times 10^6$ Zellen/ml ab. Zu keinem Zeitpunkt lagen sie außerhalb des Normbereiches.

Die Natürlichen Killerzellen lagen zum Ausgangszeitpunkt im Mittel bei $0,20 \times 10^6$ Zellen/ml. Der Normalbereich liegt bei $0,10-0,44 \times 10^6$ Zellen/ml. Sie fielen unter der Therapie bis deren Abschluss auf $0,097 \times 10^6$ Zellen/ml (signifikant mit $p=0,000$), also knapp unterhalb des Normalbereiches, ab. Im Anschluss erholten sich die Killerzellen kontinuierlich und erreichten bereits nach 3-6 Monaten nach Therapie mit $0,10 \times 10^6$ Zellen/ml den unteren Normbereich. Bis ein Jahr nach Therapie war diese Erholungsphase signifikant mit $p=0,000-0,008$. Ihr Maximum erreichten sie nach 6 und mehr Jahren mit $0,17 \times 10^6$ Zellen/ml. Damit lagen sie aber unterhalb des Ausgangswertes von $0,20 \times 10^6$ Zellen/ml. Sie lagen nur zum Zeitpunkt des Therapieabschlusses außerhalb des Normbereiches.

In der Abbildung 20 wurde der Verlauf der CD4-T-Zellen, der CD8-T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen in einem Liniendiagramm graphisch dargestellt.

In den Abbildungen 21, 21 und 22 wurden die Mittelwerte mit der Standardabweichung und p-Werten der einzelnen Zellgruppen als Balkendiagramm graphisch wiedergegeben.

Abbildung 20:

Adjuvant Arm B: Verlauf der CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen und Natürlichen Killerzellen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml]

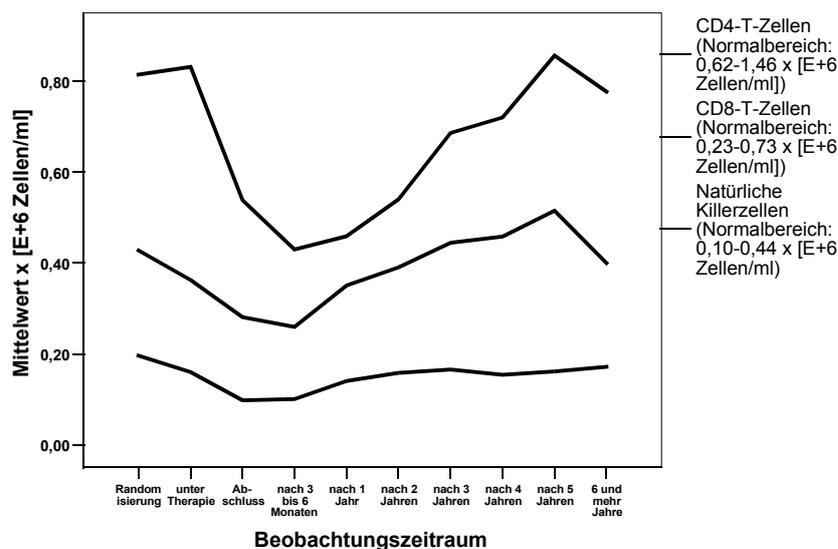


Abbildung 21:

Adjuvant Arm B: Darstellung der CD4-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich des Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert mit Verlaufszeitpunkten)

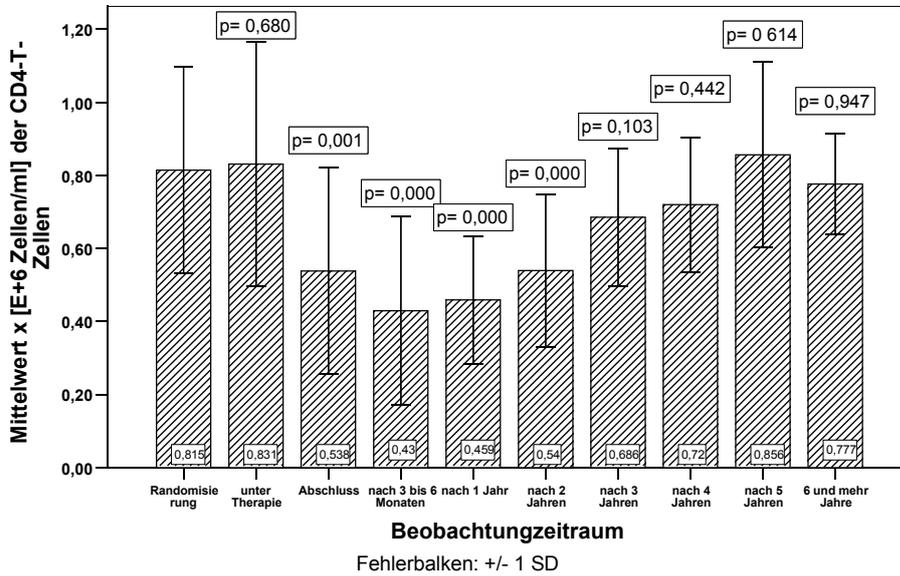


Abbildung 22:

Adjuvant Arm B: Darstellung der CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert mit Verlaufszeitpunkten)

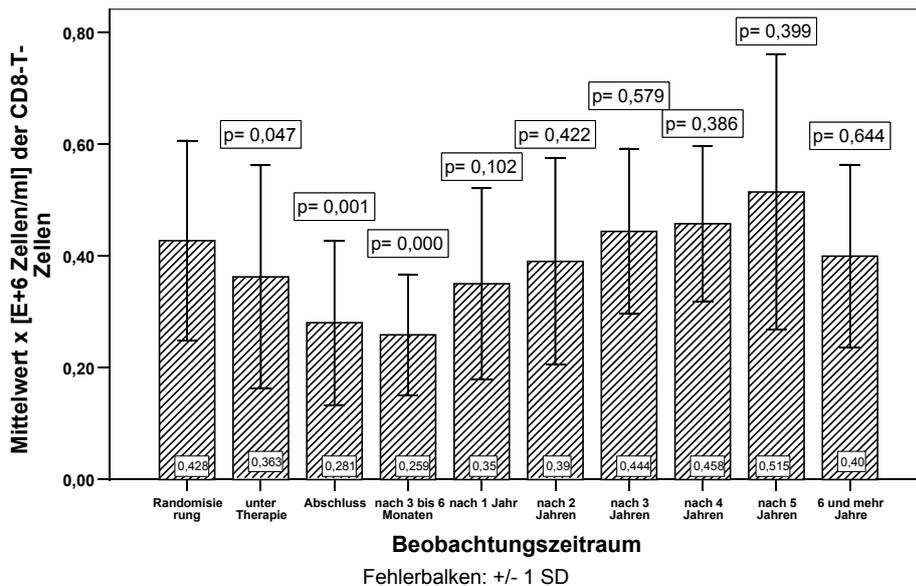
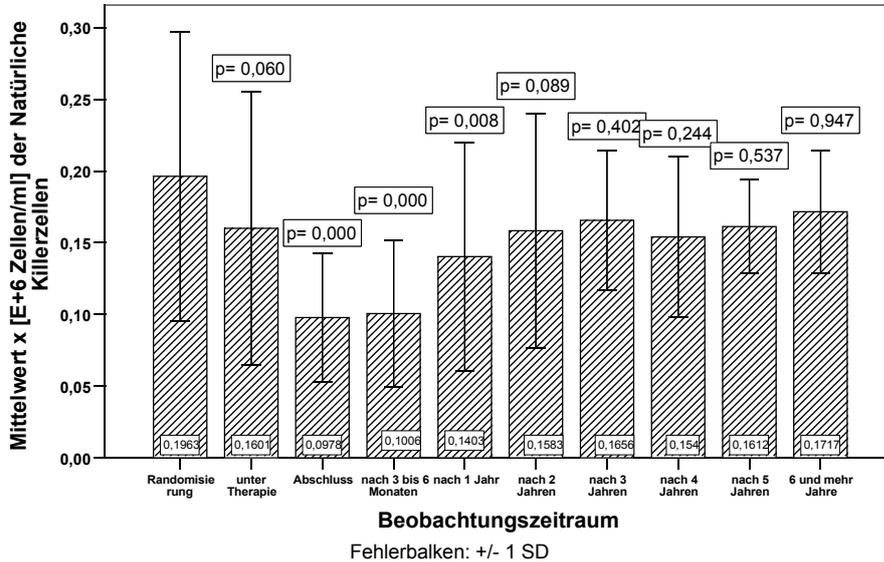


Abbildung 23:

Adjuvant Arm B: Darstellung der Natürlichen Killerzellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert mit Verlaufszeitpunkten)



Der Quotient aus der Zellanzahl der CD4-T- und CD8-T-Zellen lag zum Ausgangszeitpunkt bei 2,12 im Mittel. Zu Beginn der Therapie kam es zu einem leichten Anstieg auf 2,45, dem ein kontinuierlicher Abfall bis ein Jahr nach Therapie folgte. Zum Abschluss lag der Wert bei 2,03, nach einem Jahr bei 1,53. Danach folgte eine Erholung mit Anstieg auf 1,95 zwischen dem 5. und 6. Jahr. Zwischen dem 3. und 4. gab es einen kleinen Knick mit einem Abfall von 1,72 auf 1,65. Der Ausgangswert von 2,12 wurde nicht erreicht. Signifikant war der Abfall nach dem 1. Jahr mit $p=0,004$, zu dieser Zeit war die Zellzahl am geringsten, und der Erholungsbeginn im 2. Jahr mit $p=0,005$.

In der Abbildung 24 wurde der Verlauf in einem Liniendiagramm gezeigt. In der Abbildung 25 wurden die Mittelwerte mit der Standardabweichung und p-Werten des Quotienten als Balkendiagramm dargestellt.

Abbildung 24:

Verlauf des Quotienten aus CD4-T- und CD8-T-Zellen

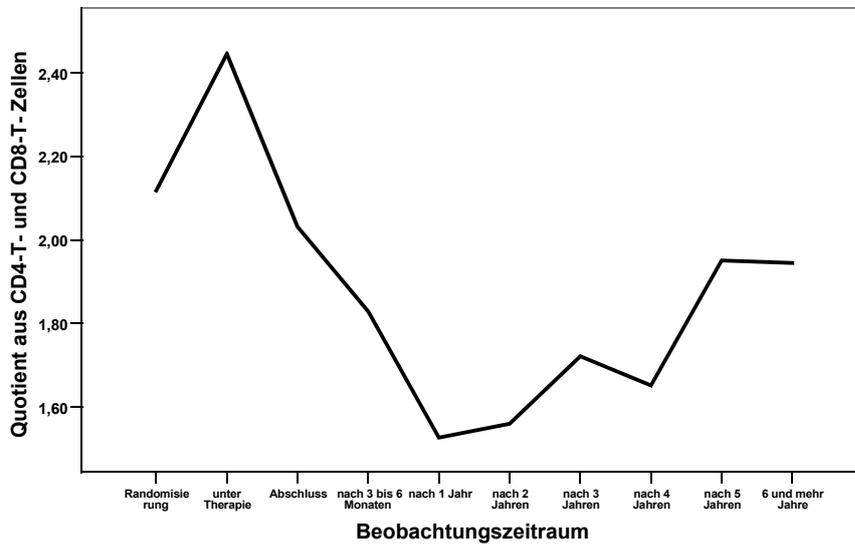
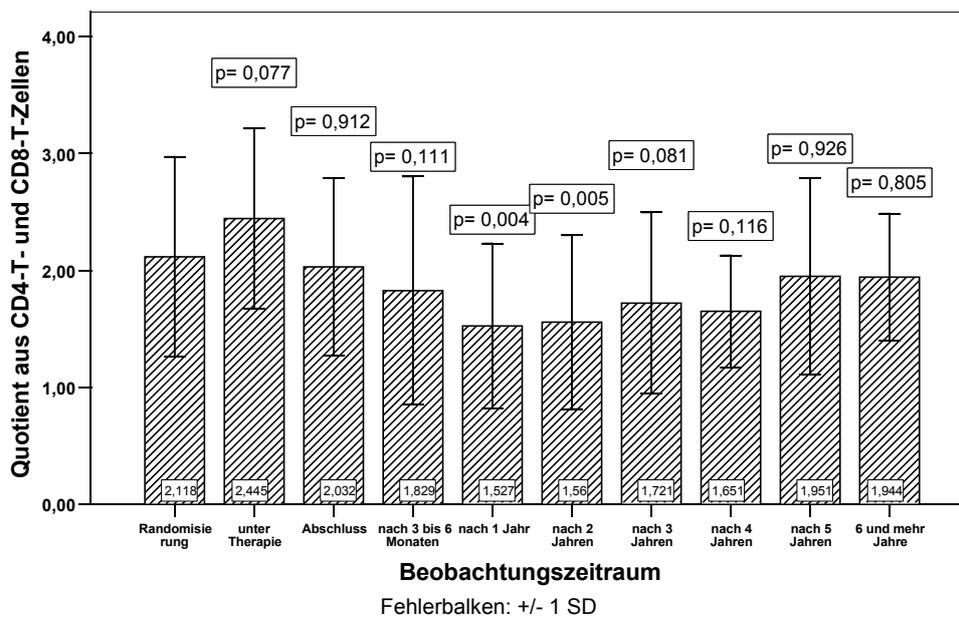


Abbildung 25:

Adjuvant Arm B: Darstellung des Quotienten aus CD4-T- und CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Quotient aus CD4-T-/CD8-T-Zellen mit Angabe der Standardabweichung und des p-Wertes (Vergleich Zeitpunkt Randomisierung = Ausgangswert mit Verlaufszeitpunkten)



4.4. Vergleich Phenotyp der Lymphozyten im adjuvanten Therapiearm A und B: Verlauf von der Randomisierung bis zur Beobachtung 6 und mehr Jahre danach

In den Tabellen 6-12 werden die Anzahl der Fälle, der Mittlere Rang und der Mittelwert in Arm A und Arm B unterteilt, sowie der p-Wert für den Vergleich Arm A mit Arm B dargestellt. In den Abbildungen 26-32 sind die Mittelwerte unter Angabe der p-Werte graphisch dargestellt.

4.4.1. Verlauf der Gesamt-Lymphozyten

Die Gesamt-Lymphozyten fielen unterschiedlich unter der Therapie in beiden Armen ab. Der Abfall zu Beginn der Therapie war im Arm A wesentlich stärker ausgeprägt als im Arm B mit einer p-Value von $p=0,001$. Die niedrigsten Werte waren bis 6 Monate nach Therapie in den beiden Armen nachweisbar. In den folgenden Jahren erholten sich die Zellen kontinuierlich. Im Arm A erreichten sie nach 2 Jahren mit $1,46 \times 10^6$ Zellen/ml den Normalbereich. In Arm B wurde dieser zwischen dem 2. und 3. Jahr erreicht, also etwas später. Nach 3 Jahren lagen die Werte im Arm B höher als im Arm A. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr.

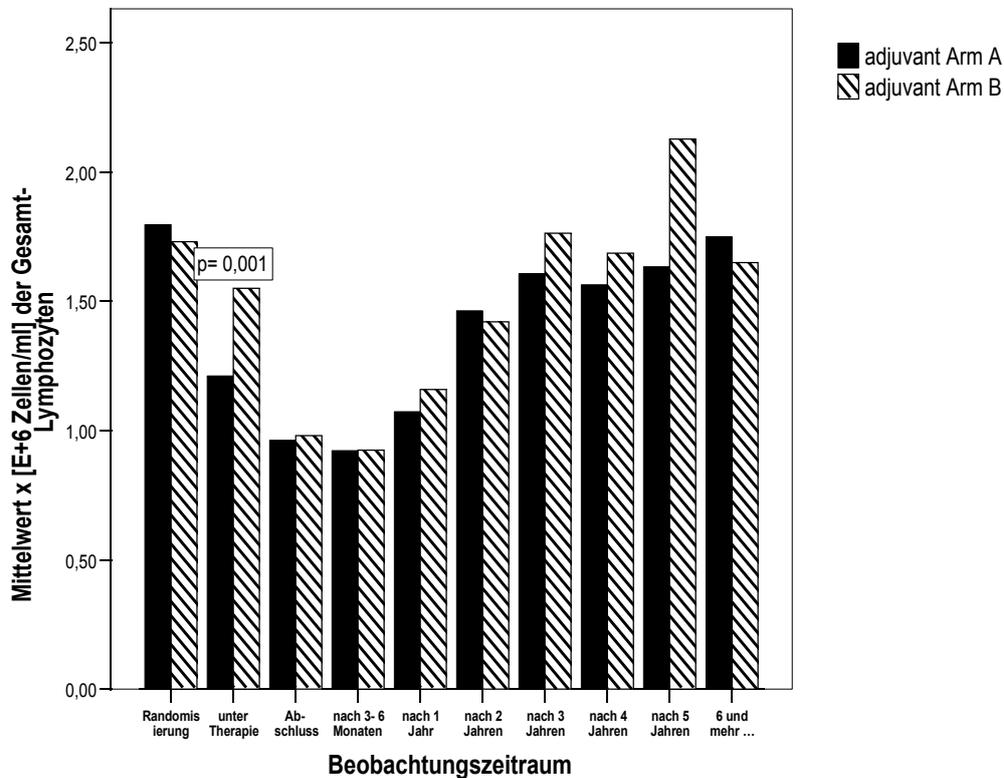
Die Ergebnisse der Auswertung im 5. und 6. Jahr werden in den Tabellen aufgeführt, aber nicht diskutiert, da für eine statistische Auswertung die Anzahl zu klein ist.

Tabelle 6: Vergleich adjuvant Arm A und B: Verlauf der Gesamt-Lymphozyten							
Mittelwert x 10^6 Zellen/ml (Normalbereich $1,43-3,03 \times 10^6$ Zellen/ml)							
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes zwischen Arm A und B							
Beobachtungs-zeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	Arm B Mittelwert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	73	51,58	1,8333	1,7307	28	49,48	0,747
unter Therapie	158	100,35	1,2119	1,5503	60	133,59	0,001
Abschluss	70	49,31	0,9623	0,9803	32	56,28	0,270
3-6 Monate	59	41,50	0,9227	0,9242	26	46,40	0,399
1 Jahr	99	67,13	1,0734	1,1590	42	80,12	0,084
2 Jahr	85	62,23	1,4634	1,4212	42	67,58	0,441
3 Jahr	35	25,09	1,6071	1,7635	20	33,10	0,074
4 Jahr	24	16,63	1,5646	1,6860	10	19,60	0,445
5 Jahr	14	9,43	1,6336	2,1275	8	15,13	0,050
≥ 6 Jahr	5	6,00	1,7500	1,6500	6	6,00	1,000

Abbildung 26:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung der Gesamt-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der signifikanten p-Werte (Vergleich der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte beider Arme miteinander), Normalbereich 1,43-3,03 x [E+6 Zellen/ml]



4.4.2. Verlauf der T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten fielen in beiden Armen unter der Therapie ab, jedoch unterschiedlich stark, unterschiedlich schnell und lang. Der Abfall war zu Beginn der Therapie im Arm A sehr ausgeprägt, verringerte sich dann bis zum Abschluss der Therapie und blieb für ein Jahr danach niedrig.

Im Arm B fiel der Abfall initial geringer aus, der Unterschied zu Arm A war hoch signifikant mit $p=0,000$. Dann erfolgte hier der Abfall sehr steil bis zum Abschluss und bis < 6 Monate nach Therapie, um dann langsam anzusteigen. Die Erholungsphase setzte im Arm B also mindestens ein halbes Jahr vor Arm A ein.

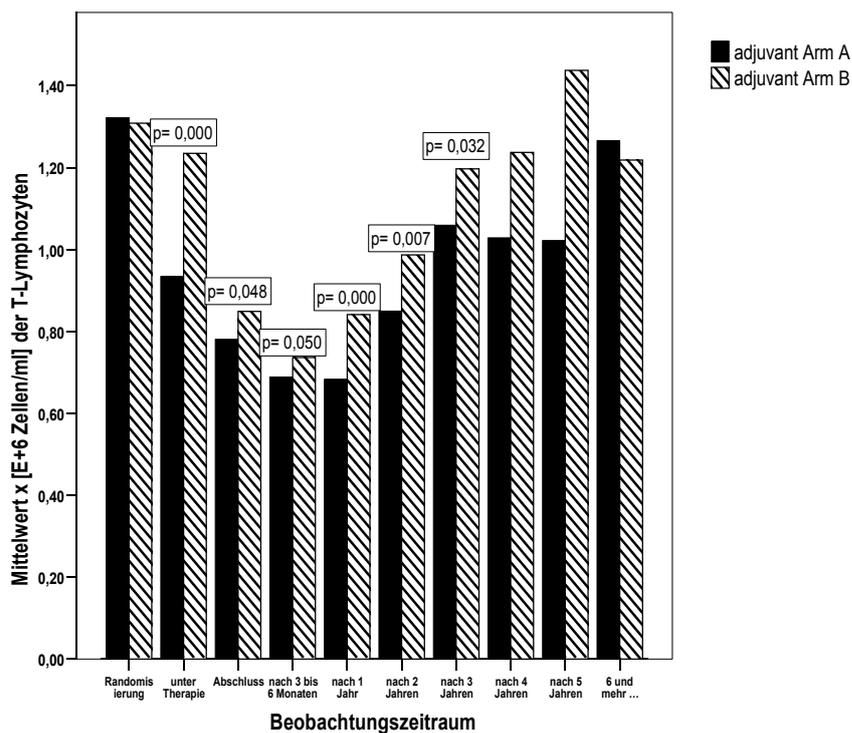
Auch in der Erholungsphase waren die Unterschiede zwischen Arm A und B hoch signifikant. Die T-Lymphozyten erreichten im Arm A zwischen dem 2. und 3. Jahr den unteren Normbereich, im Arm B bereits zwischen dem 1. und 2. Jahr, also bereits ein Jahr früher. Außerdem ergaben sich signifikante Erhöhungen im Arm B gegenüber Arm A bis drei Jahre nach Ende der Therapie. Der Ausgangswert wurde in Arm A in der Beobachtungszeit nicht wieder erreicht, im Arm B nach 5 Jahren.

Tabelle 7: Vergleich adjuvant Arm A und B: Verlauf der T-Lymphozyten							
Mittelwert x 10 ⁶ Zellen/ml (Normalbereich 0,94-2,11 x 10 ⁶ Zellen/ml)							
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes zwischen Arm A und B							
Beobachtungs-zeit- raum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittel- wert	Arm B Mittel- wert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	73	51,21	1,3486	1,3084	28	50,46	0,909
unter Therapie	158	98,59	0,9344	1,2350	60	138,24	0,000
Abschluss	70	47,58	0,7809	0,8489	32	60,08	0,048
3-6 Monate	59	39,52	0,6887	0,7366	26	50,90	0,050
1 Jahr	99	63,20	0,6834	0,8410	42	89,38	0,000
2 Jahr	85	57,78	0,8497	0,9869	42	76,60	0,007
3 Jahr	36	25,03	1,0595	1,1970	20	34,75	0,032
4 Jahr	24	15,88	1,0288	1,2370	10	21,40	0,148
5 Jahr	14	9,25	1,0221	1,4375	8	15,44	0,029
≥ 6 Jahr	5	4,80	1,2660	1,2183	6	5,25	0,931

Abbildung 27:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung der T-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der signifikanten p-Werte (Vergleich der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte beider Arme miteinander), Normalbereich 0,94-2,11 x [E+6 Zellen/ml]



4.4.3. Verlauf der B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten fielen in beiden Armen unterschiedlich bis zum Therapieabschluss ab. Im Arm A nahmen die Werte signifikant stärker und schneller ab als im Arm B ($p=0,001$ und $p=0,000$). In der anschließenden Erholungsphase stiegen die Werte im Arm A stärker und schneller als in Arm B an. Sie erreichten bereits nach 6 Monaten den Normbereich und nach einem Jahr den Ausgangswert. Auch im Arm B wurde der Normbereich nach 3-6 Monaten erreicht, jedoch der Ausgangswert erst zwischen dem 1. und 2. Jahr. Der Unterschied zwischen Arm A und B war signifikant bis zum 4. Jahr nach Therapieabschluss.

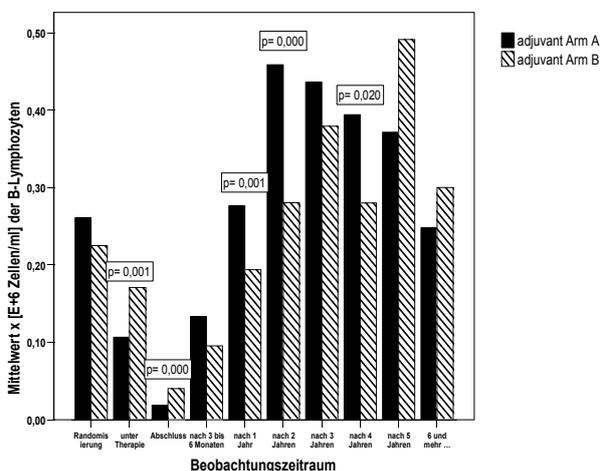
Zwischen dem 1. und 4. Jahr stiegen die B-Lymphozyten im Arm A an bis oberhalb des Normbereiches mit einem Maximum von $0,46 \times 10^6/\text{ml}$ nach 2 Jahren, signifikant zu Arm B mit $p=0,000$. Nach 5 Jahren wurde der Normbereich erreicht.

Tabelle 8: Vergleich adjuvant Arm A und B: Verlauf der B-Lymphozyten							
Mittelwert $\times 10^6$ Zellen/ml (Normalbereich $0,09-0,39 \times 10^6$ Zellen/ml) Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes zwischen Arm A und B							
Beobachtungszeitpunkt	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	Arm B Mittelwert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	73	52,06	0,2697	0,2250	28	48,23	0,556
unter Therapie	158	100,66	0,1066	0,1706	60	132,78	0,001
Abschluss	71	43,44	0,0188	0,0402	32	70,98	0,000
3-6 Monate	59	45,76	0,1333	0,0955	26	36,73	0,120
1 Jahr	99	78,34	0,2765	0,1938	42	53,69	0,001
2 Jahr	85	73,05	0,4587	0,2805	42	45,68	0,000
3 Jahr	35	29,30	0,4364	0,3793	20	25,73	0,426
4 Jahr	24	20,06	0,3942	0,2800	10	11,35	0,020
5 Jahr	14	9,86	0,3714	0,4913	8	14,38	0,127
≥ 6 Jahr	5	4,20	0,2480	0,3000	6	7,50	0,126

Abbildung 28:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung der B-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert $\times [E+6 \text{ Zellen/ml}]$ mit Angabe der signifikanten p-Werte (Vergleich der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte beider Arme miteinander, Normalbereich $0,09-0,39 \times [E+6 \text{ Zellen/ml}]$)



4.4.4. Verlauf der CD4-T-Zellen

Wenn die T-Zellen in die Untergruppen der CD4- und CD8-Zellen unterteilt werden, ergeben sich signifikante Veränderungen.

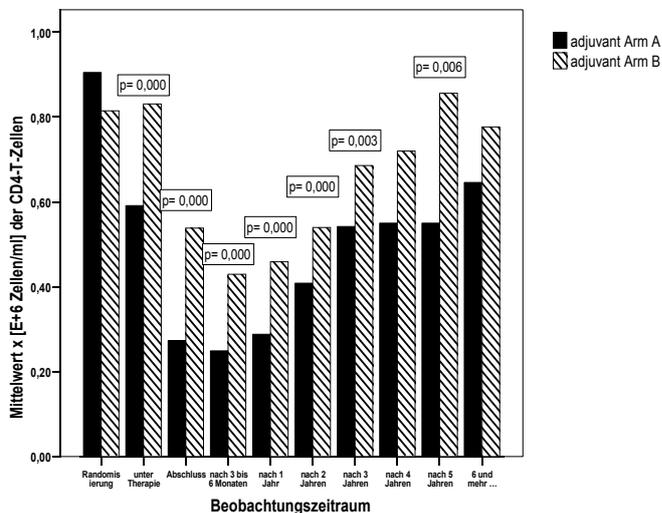
Auffallend ist der große Verlust dieser Zellen im Arm A. Die vor Beginn der Therapie gemessene Anzahl der CD4-T-Zellen wurde bis zum Abschluss der Beobachtung nicht wieder erreicht. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der CD4-T-Zellen im Arm B kurze Zeit nach Beendigung der Therapie (≤ 6 Monate) wieder an und erreichte fast die Ausgangswerte, war zumindest drei Jahre nach Beendigung der Therapie stabil. Der Unterschied zwischen Arm A und B war zu jeder Zeit signifikant mit einer höheren CD4-T-Zellen-Anzahl im Arm B.

Tabelle 9: Vergleich adjuvant Arm A und B: Verlauf der CD4-T-Zellen							
Mittelwert x 10^6 Zellen/ml (Normbereich $0,62-1,46 \times 10^6$ Zellen/ml) Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes zwischen Arm A und B							
Beobachtungszeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	Arm B Mittelwert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	73	52,82	0,9237	0,8145	28	46,25	0,313
unter Therapie	158	96,74	0,5913	0,8311	60	143,09	0,000
Abschluss	71	42,29	0,2734	0,5381	32	73,55	0,000
3-6 Monate	59	34,81	0,2490	0,4296	26	61,58	0,000
1 Jahr	99	58,29	0,2880	0,4590	42	100,95	0,000
2 Jahr	85	55,16	0,4085	0,5398	42	81,89	0,000
3 Jahr	36	23,69	0,5420	0,6857	20	37,15	0,003
4 Jahr	24	15,40	0,5500	0,7200	10	22,55	0,055
5 Jahr	14	8,71	0,5500	0,8563	8	16,38	0,006
≥ 6 Jahr	5	5,40	0,6460	0,7767	6	6,50	0,662

Abbildung 29:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung der CD4-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x $[E+6 \text{ Zellen/ml}]$ mit Angabe der signifikanten p-Werte (Vergleich der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte beider Arme miteinander); Normalbereich $0,62-1,46 \times [E+6 \text{ Zellen/ml}]$



4.4.5. Verlauf der CD8-T-Zellen

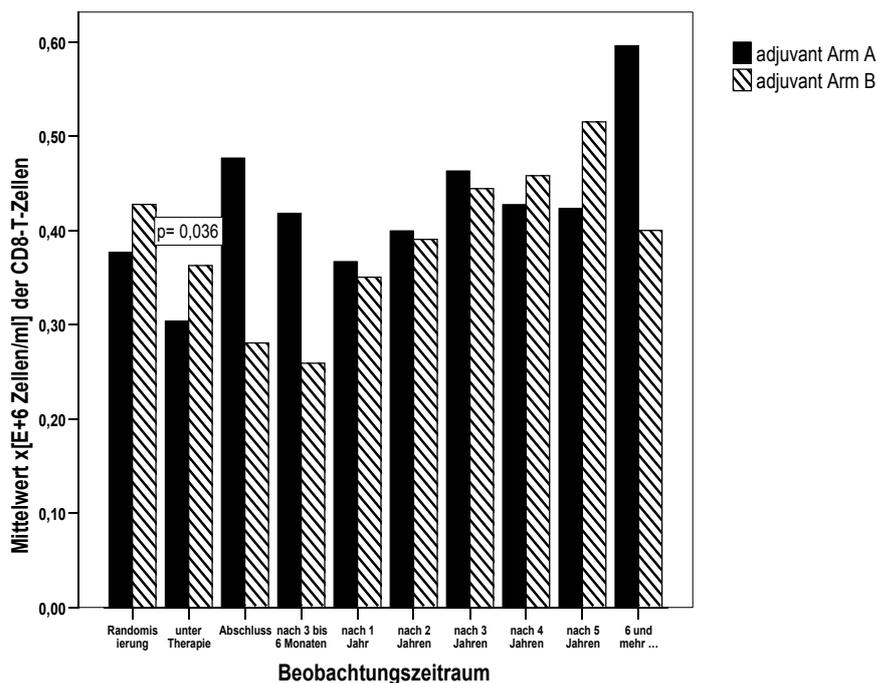
Im Gegensatz zu den CD4-T-Zellen erfolgte im Arm A kein ausgeprägter Abfall der CD8-T-Zellen.

Tabelle 10: Vergleich adjuvant Arm A und B: Verlauf der CD8-T-Zellen							
Mittelwert x 10 ⁶ Zellen/ml (Normalbereich 0,23-0,73 x 10 ⁶ Zellen/ml) Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes zwischen Arm A und B							
Beobachtungszeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	Arm B Mittelwert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	73	48,87	0,3852	0,4276	28	56,55	0,238
unter Therapie	158	103,98	0,3039	0,3628	60	124,03	0,036
Abschluss	70	51,65	0,4767	0,2807	32	51,17	0,940
3-6 Monate	59	44,21	0,4183	0,2591	26	40,25	0,495
1 Jahr	99	69,73	0,3669	0,3504	42	73,99	0,571
2 Jahr	85	62,89	0,3996	0,3905	42	66,25	0,628
3 Jahr	36	27,92	0,4631	0,4443	20	29,55	0,719
4 Jahr	24	16,60	0,4275	0,4580	10	19,65	0,423
5 Jahr	14	10,32	0,4236	0,5150	8	13,56	0,267
≥ 6 Jahr	5	8,00	0,5960	0,4000	6	4,33	0,082

Abbildung 30:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung der CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der signifikanten p-Werte (Vergleich der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte beider Arme miteinander), Normalbereich 0,23-0,73 x [E+6 Zellen/ml]



4.4.6. Verlauf des Quotienten aus der Zellanzahl der CD4- und CD8-T-Zellen

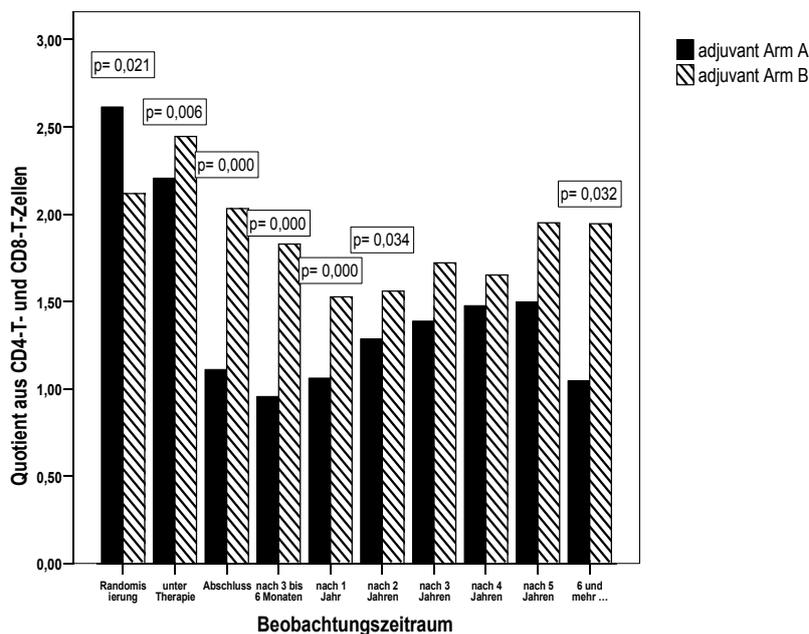
Der Verlauf des Quotienten aus CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen spiegelt die schon beschriebene Situation bei den CD4-T- und CD8-T-Zellen wieder. Ein starker Abfall der CD4-T-Zellen im Arm A lässt den Quotienten abfallen, während im Arm B die CD4-T-Zellen nicht derartigen Schwankungen unterworfen waren.

Tabelle 11: Vergleich adjuvant Arm A und B: Verlauf des Quotienten aus CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen							
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes zwischen Arm A und B							
Beobachtungszeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	Arm B Mittelwert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	73	55,17	2,6096	2,1179	28	40,13	0,021
unter Therapie	158	101,85	2,2060	2,4451	59	128,15	0,006
Abschluss	71	41,99	1,1104	2,0316	32	74,20	0,000
3-6 Monate	58	34,09	0,9560	1,8285	26	61,25	0,000
1 Jahr	99	61,32	1,0615	1,5265	42	93,81	0,000
2 Jahr	85	59,12	1,2861	1,5596	42	73,87	0,034
3 Jahr	36	25,85	1,3874	1,7213	20	33,28	0,102
4 Jahr	24	16,08	1,4759	1,6515	10	20,90	0,209
5 Jahr	14	10,14	1,4977	1,9508	8	13,88	0,212
≥ 6 Jahr	5	3,20	1,0466	1,9445	4	7,25	0,032

Abbildung 31:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung des Quotienten aus CD4-T- und CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

Vergleich des Quotienten aus CD4- und CD8-T-Zellen mit Angabe der signifikanten p-Werte (Vergleich der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte beider Arme miteinander)



4.4.7. Verlauf der Natürlichen Killerzellen

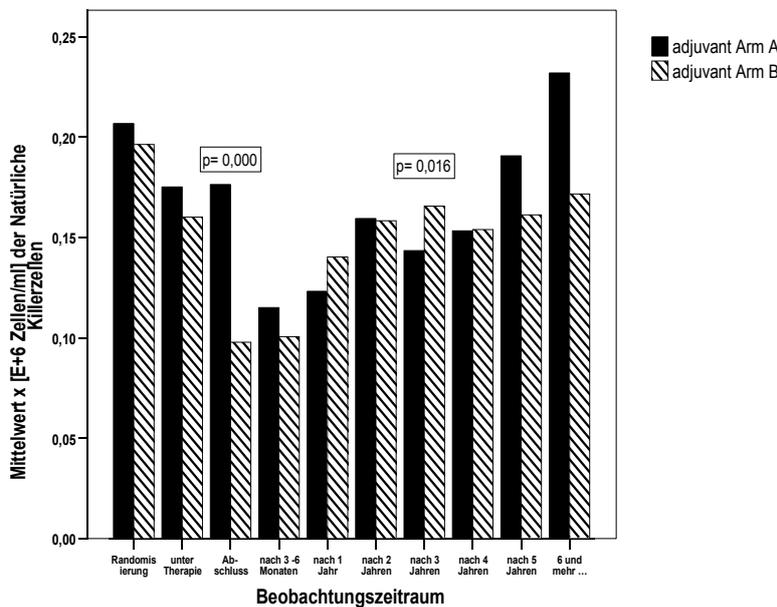
Die Natürlichen Killerzellen erreichen im Arm B den niedrigsten Wert nach Abschluss der Therapie, um dann wieder anzusteigen und nach 3-6 Monaten den Normbereich zu erreichen. Im Arm A kam es zu einem Abfall bis 6 Monaten nach Therapieabschluss. Danach erfolgte ein stetiger Anstieg. Der Unterschied zwischen den Armen war beim Abschluss der Therapie hoch signifikant.

Tabelle 12: Vergleich adjuvant Arm A und B: Verlauf der Natürlichen Killerzellen							
Mittelwert x 10 ⁶ Zellen/ml (Normalbereich 0,10-0,44 x 10 ⁶ Zellen/ml)							
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes zwischen Arm A und B							
Beobachtungs-zeit- raum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mit- tel- wert	Arm B Mittel- wert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	73	50,92	0,2089	0,1963	28	51,21	0,964
unter Therapie	158	110,72	0,1752	0,1601	60	106,28	0,641
Abschluss	71	60,14	0,1763	0,0978	32	33,94	0,000
3-6 Monate	59	44,77	0,1151	0,1006	26	38,98	0,318
1 Jahr	99	68,46	0,1232	0,1403	42	76,98	0,257
2 Jahr	85	61,89	0,1594	0,1583	42	68,26	0,358
3 Jahr	36	24,61	0,1434	0,1656	20	35,50	0,016
4 Jahr	24	17,04	0,1533	0,1540	10	18,60	0,696
5 Jahr	14	11,93	0,1907	0,1613	8	10,75	0,714
≥ 6 Jahr	5	6,50	0,2320	0,1717	6	5,58	0,662

Abbildung 32:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung der Natürlichen Killerzellen im Verlauf der Untersuchungen

Mittelwert x [E+6 Zellen/ml] mit Angabe der signifikanten p-Werte (Vergleich der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte beider Arme miteinander), Normalbereich 0,10-0,44 x [E+6 Zellen/ml]



4.5. Vergleich der CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen in Arm A und Arm B bei Patientinnen mit einem Rezidiv

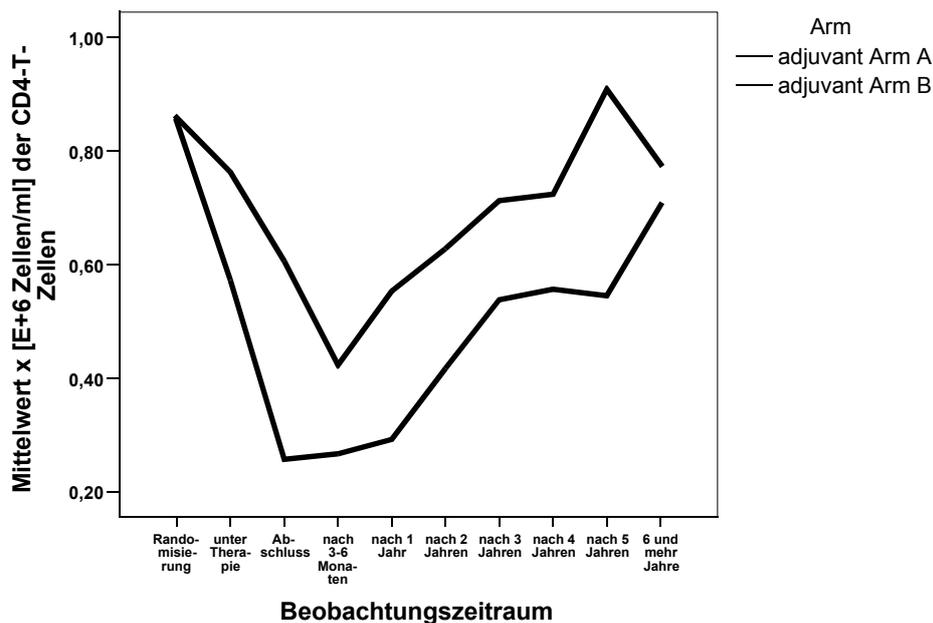
In den Tabellen 17-22 des Anhanges werden die Anzahl der Fälle, der Mittlere Rang und der Mittelwert sowie die p-Werte nach den Therapiearmen in Arm A und Arm B unterteilt dargestellt. Der Zeitpunkt der Randomisierung ist der Ausgangswert, der mit dem jeweiligen Beobachtungszeitpunkt im jeweiligen Arm verglichen wird.

4.5.1. Verlauf der CD4-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv und zum Zeitpunkt der Auswertung lebend

Bei der Unterteilung der T-Zellen in die Untergruppen der CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen ergeben sich hoch signifikante Veränderungen im Vergleich beider Therapiearme bei Patientinnen, die ein Rezidiv in der Beobachtungszeit entwickeln und am Leben sind. Auffallend ist der Verlust an CD4-T-Zellen im Arm A. Die vor Beginn der Therapie gemessene Anzahl der CD4-T-Zellen wurde bis zum Abschluss der Beobachtung nicht wieder erreicht. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der CD4-T-Zellen im Arm B kurze Zeit nach Beendigung der Therapie (≤ 6 Monate) wieder an und erreichte die Ausgangswerte fast, bzw. war zumindest drei Jahre nach Beendigung der Therapie stabil. Der Unterschied zwischen Arm A und B war zu jeder Zeit signifikant mit einer erhöhten CD4-T-Zellen-Anzahl im Arm B.

Abbildung 33:

Vergleich adjuvant Arm A und Arm B bei lebenden Patientinnen mit einem Rezidiv: Darstellung der CD4-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

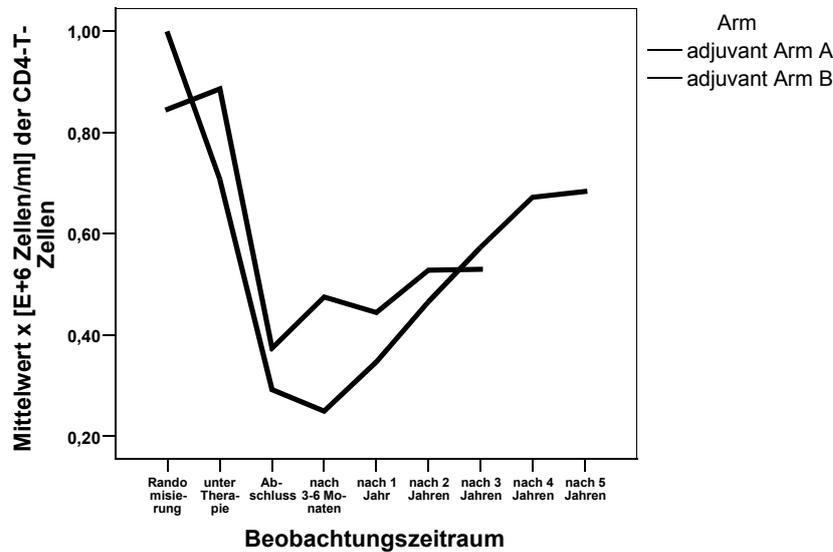


4.5.2. Verlauf der CD4-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben

Bei Patientinnen, die ein Rezidiv entwickelten und verstarben, kam es in beiden Armen zu einem Abfall der CD4-T-Zellen unter der Therapie, mit einem anfänglichen Anstieg in Arm B. Nach Beendigung der Therapie stieg im Arm B die Anzahl der CD4-T-Zellen an, etwas später (≤ 6 Monaten) im Arm A und erreichten in beiden Armen nach 3 Jahren nicht die Ausgangswerte. Die Unterschiede im Vergleich beider Arme waren nicht signifikant.

Abbildung 34:

Vergleich adjuvant Arm A und B bei verstorbenen Patienten mit einem Rezidiv: Darstellung der CD4-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

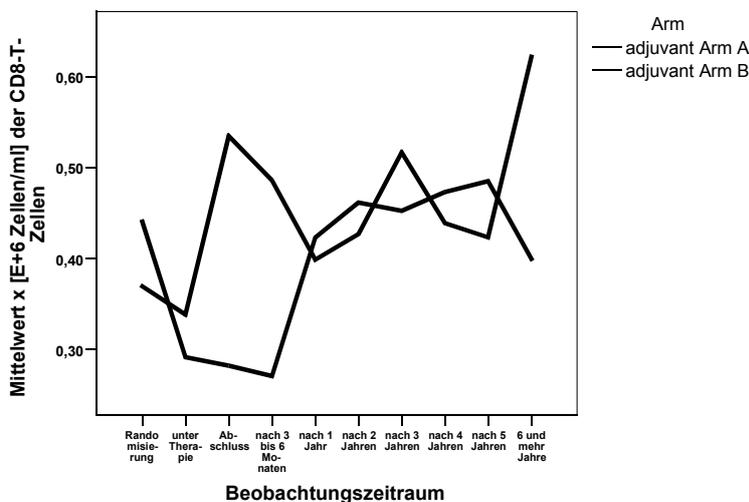


4.5.3. Verlauf der CD8-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv und zum Zeitpunkt der Auswertung lebend

Im Gegensatz zu den CD4-T-Zellen erfolgte in Arm A kein ausgeprägter Abfall der CD8-T-Zellen. In Arm B kam es zu einem ausgeprägten Abfall der CD8-T-Zellen. Kurz nach Beendigung der Therapie erreichte die Anzahl den Ausgangswert und blieb nach einem Jahr stabil. Die Unterschiede waren im Vergleich beider Arme nicht signifikant.

Abbildung 35:

Vergleich adjuvant Arm A und B bei lebenden Patientinnen mit einem Rezidiv: Darstellung der CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

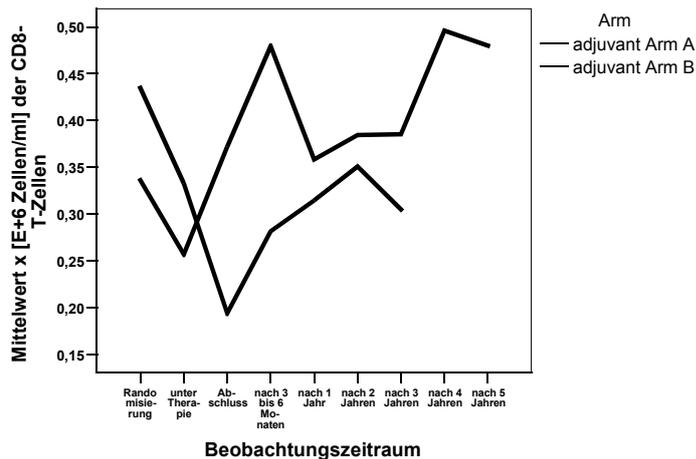


4.5.4. Verlauf der CD8-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben

Auch bei diesen Patientinnen erfolgte im Gegensatz zu den CD4-T-Zellen in Arm A kein ausgeprägter Abfall der CD8-T-Zellen. Im Arm B kam es zu einem ausgeprägten Abfall der CD8-T-Zellen. Kurz nach Beendigung der Therapie stieg die Zellzahl wieder an und erreichte jedoch den Ausgangswert nicht. Diese Unterschiede waren im Vergleich beider Arme nicht signifikant.

Abbildung 36:

Vergleich adjuvant Arm A und B bei verstorbenen Patienten mit einem Rezidiv: Darstellung der CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

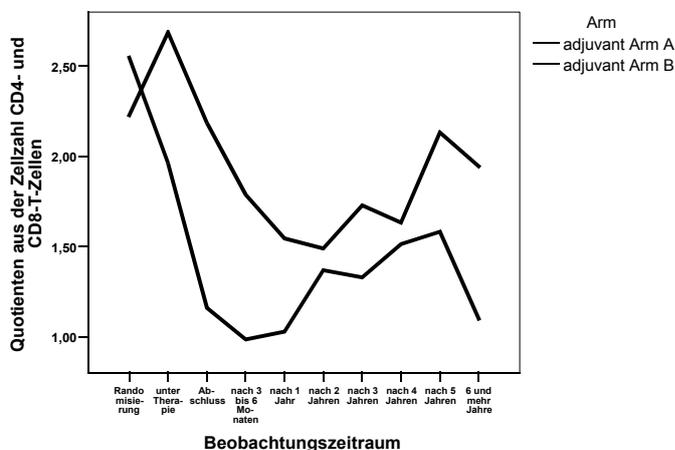


4.5.5. Verlauf des Quotienten aus der Zellzahl der CD4- und CD8-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv und zum Zeitpunkt der Auswertung lebend

Der Verlauf des Quotienten aus der Zellzahl der CD4- und CD8-T-Zellen spiegelt die schon beschriebene Situation bei den CD4-T- und CD8-T-Zellen wieder. Ein starker Abfall der CD4-T-Zellen im Arm A lässt den Quotienten abfallen, während im Arm B die CD4-T-Zellen nicht derartigen Schwankungen unterworfen waren. Diese Veränderungen sind ein Jahr nach Therapie hoch signifikant.

Abbildung 37:

Vergleich adjuvant Arm A und B bei lebenden Patientinnen mit einem Rezidiv: Darstellung des Quotienten aus der Zellzahl CD4- und CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen

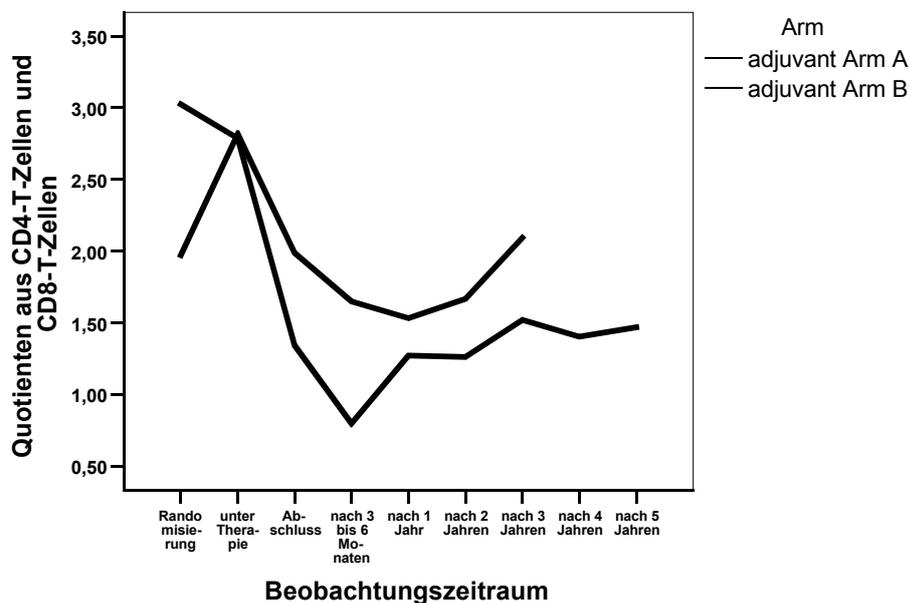


4.5.6. Verlauf des Quotienten aus der Zellzahl der CD4- und CD8-T-Zellen bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben

Der Verlauf aus CD4- zu CD8-T-Zellen spiegelt die schon beschriebene Situation bei den CD4-T- und CD8-T-Zellen wieder. Nach einem anfänglichen Anstieg des Quotienten aus CD4-T-Zellen/CD8-T-Zellen im Arm B kam es zu einem Abfall des Quotienten. Kurz nach Beendigung der Therapie stieg der Quotient wieder an und erreichte nach 3 Jahren den Ausgangswert. Im Arm A bedingt durch den Abfall der Anzahl der CD4-T-Zellen sank der Quotient bis 6 Monaten nach Ende der Therapie und stieg nur leicht an, erreichte nicht den Ausgangswert. Die Unterschiede im Vergleich beider Arme waren jedoch nicht signifikant.

Abbildung 38:

Vergleich adjuvant Arm A und B bei verstorbenen Patienten mit einem Rezidiv: Darstellung des Quotienten aus CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchungen



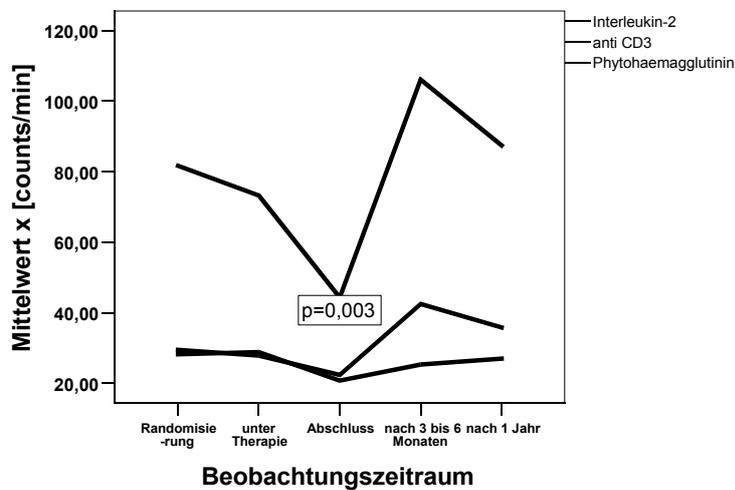
4.6. Darstellung der in vitro Funktionsteste der Lymphozyten im Therapiearm A und B: Vergleich der beiden Arme und deren Verlauf von der Randomisierung bis ein Jahr danach

In den Tabellen 23-28 des Anhanges werden die Anzahl der Fälle, der Mittlere Rang und der Mittelwert sowie die p-Werte nach den Therapiearmen in Arm A und Arm B unterteilt dargestellt. Der Zeitpunkt der Randomisierung ist Ausgangswert, der mit dem jeweiligen Beobachtungszeitpunkt im jeweiligen Arm verglichen wird. Da der mittlere Rang der Randomisierung je nach Beobachtungszeitpunkt variiert, wird dieser in den Tabellen 23-28 mit einem Sternchen * versehen.

Für den Arm A werden in der Abbildung 39 die Funktionsteste im Verlauf der Untersuchung bis nach 1 Jahr graphisch dargestellt.

Abbildung 39:

Adjuvant Arm A: Darstellung der in vitro Funktionsteste im Verlauf der Untersuchungen

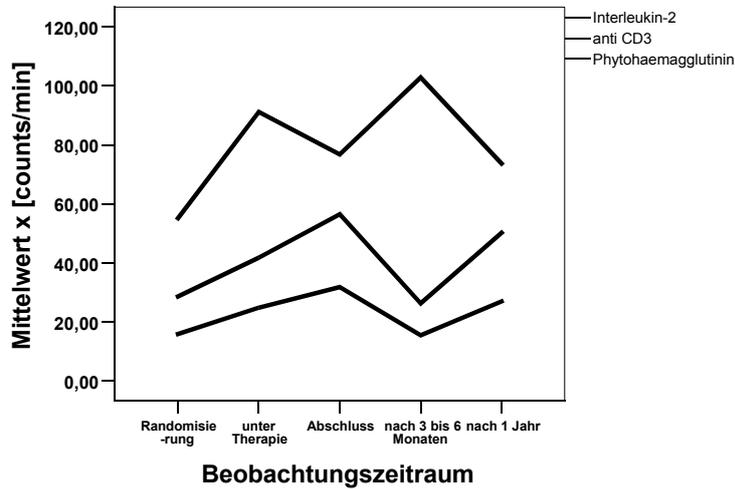


Unter der Hochdosischemotherapie kam es zu einem Abfall der Fähigkeit der Lymphozyten auf unspezifische (Phytohaemagglutinin) und spezifische (IL-2 und anti-CD3) Stimulation mit Wachstum zu reagieren. Signifikant war dies mit einem p-Wert =0,003 zum Abschluss der Therapie unter Stimulation mit Phytohaemagglutinin. Nach etwa 6 Monaten waren die Ausgangswerte wieder erreicht.

Für den Arm B werden in der Abbildung 40 die Funktionsteste im Verlauf der Untersuchung bis nach 1 Jahr graphisch dargestellt.

Abbildung 40:

Adjuvant Arm B: Darstellung der in vitro Funktionsteste im Verlauf der Untersuchungen



Im Gegensatz zu Arm A verbesserte sich die Funktion der stimulierten Lymphozyten im Arm B unter der Therapie. Dieses war jedoch nicht signifikant.

Die Abbildungen 41-43 geben die Veränderungen nach Stimulation mit Interleukin-2, anti-CD3 und Phytohaemagglutinin im Vergleich von Arm A und Arm B im Verlauf der Untersuchungen graphisch wieder. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Abbildung 41:

Vergleich adjuvant Arm A und B: Darstellung nach Stimulation mit Interleukin-2

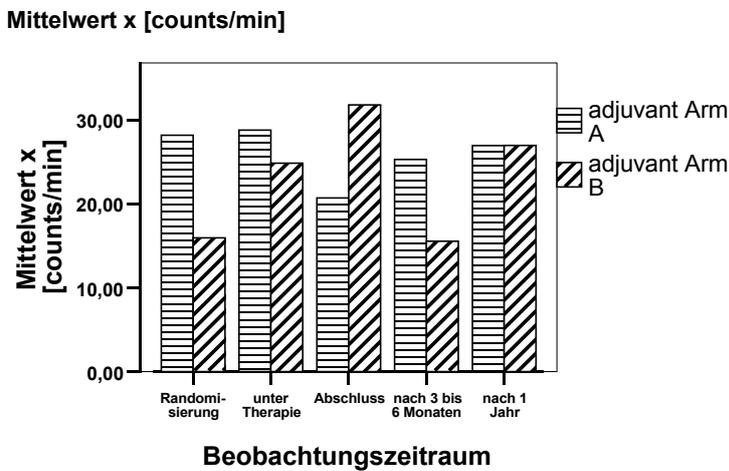


Abbildung 42:

Vergleich Arm A und B: Darstellung nach Stimulation mit anti-CD3

Mittelwert x [counts/min]

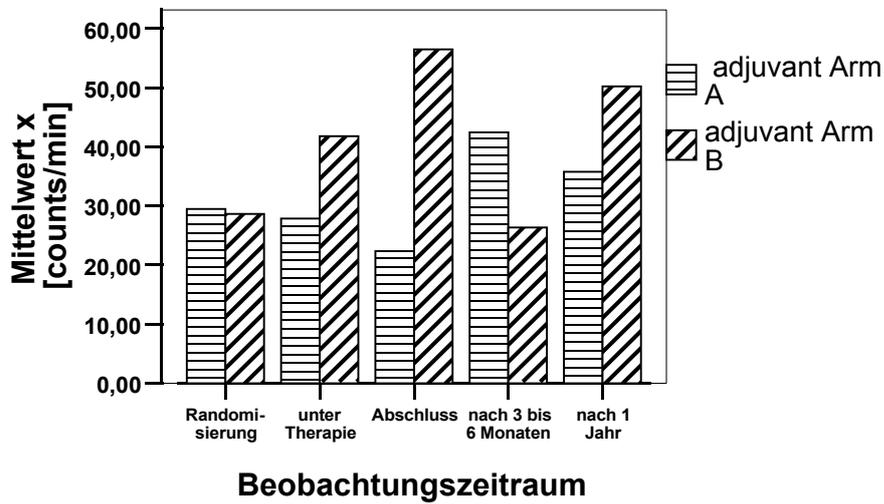
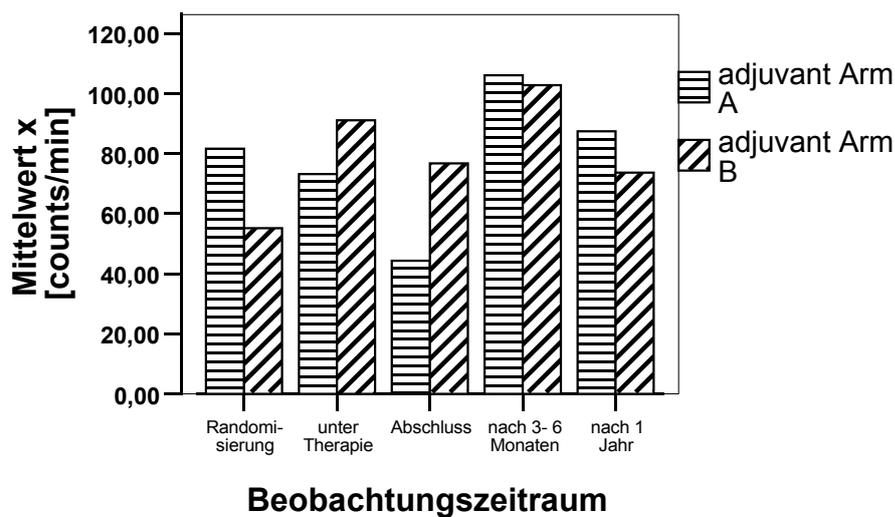


Abbildung 43:

Vergleich Arm A und B: Darstellung nach Stimulation mit Pytohaemagglutinin

Mittelwert x [counts/min]



5. Diskussion

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung und krebsbedingte Todesursache der Frau. Die Mortalität ist seit Beginn der 90er-Jahre rückläufig [2]. Trotz dieser positiven Entwicklung, bedingt durch die verbesserte Früherkennung und den Einsatz adjuvanter systemischer Therapiemaßnahmen, die zur Reduktion des Rezidiv- und Metastasierungsrisiko führen, bleiben die Ergebnisse bei Hochrisiko-Mammakarzinom-Patientinnen unbefriedigend. Ziel bleibt es durch Optimierung der adjuvanten Behandlung durch neue Hochdosischemotherapie-Kombinationen mit stärkerem Antitumor-Effekt oder durch Entwicklung neuer Substanzen und immuntherapeutische Strategien, das Rezidiv- und Metastasierungsrisiko zu senken.

Zur Stabilisierung des Immunsystems und damit einer verbesserten Voraussetzung für die körpereigene Tumorabwehr soll zum Beispiel die komplementär-medizinische Krebstherapie dienen. So war der Leukozytenabfall zwischen dem 14. und 16. Tag nach Beginn einer Chemotherapie mit Etoposid, Leucovorin und 5-Fluoruracil bei Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom, die über zehn Tage eine Polysaccharidfraktion aus *Echinacea purpurea* Zellkulturen intravenös appliziert bekommen haben, im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant geringer [69]. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen lässt sich die seit alters bekannte psychische Beeinflussung der Immunabwehr bestätigen. Schließlich enthalten Lymphozyten auch Rezeptoren für endogene Opioide wie Endorphine und Metenkephalin, welche die Reaktivität der T-Zellen und der Killerzellen steuern. Unter diesen Aspekten eines immunoneuroendokrinen Netzwerkes macht der zunehmende Einsatz der Psychotherapie bei Krankheiten mit immunologischem Bezug Sinn, zu welchen auch das Krebsleiden zählt [70, 71].

Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die den Zusammenhang zwischen sportlicher Betätigung und dem Immunsystem beschreiben [72]. Epidemiologische Beweise, die einen Zusammenhang zwischen regelmäßiger körperlicher Aktivität und einer niedrigen Inzidenz bestimmter Krebsarten aufzeigen sind häufig beschrieben worden [73]. Bewegungstraining in der Krebsnachsorge kann sich positiv auf eine Stabilisierung der mentalen Befindlichkeit auswirken. Das beeinflusst sekundär positiv immunologische Abwehrmechanismen. G. Uhlenbruck [74] beschreibt, dass moderates Ausdauertraining einen „postcanceroprotektiven“ Effekt hat, wobei besonders die Aktivierung immunologischer und psychoneuroimmunologischer Regelkreise zu beobachten seien. Damit spricht er von einer gewissen Rezidivprophylaxe.

Unter der Voraussetzung immunologischer Abwehrmechanismen zu aktivieren, wird seit mehr als zwei Dekaden die stammzellgestützten Hochdosischemotherapie bei Patientinnen mit Brustkrebs in Studien eingesetzt. Hochdosischemotherapie hat einen großen immunsuppressiven Effekt, der damit verbessert werden kann. Die Überlegenheit der stammzellgestützten Hochdosischemotherapie im Vergleich zu konventionell dosierten Chemotherapien bezogen auf rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben bleibt weiterhin kontrovers diskutiert [75], obwohl die meisten jüngeren Veröffentlichungen darauf hinweisen [76, 77].

Es ist wenig bekannt über die Wirkung einer Stammzelltransplantation bei soliden Tumoren, während eine Fülle von Daten einen entscheidenden Antitumor-Effekt des Immunsystems nach allogener oder autologer Transplantation bei bösartigen hämatologischen Erkrankungen zeigen. Bei diesen Patienten hat die Lymphozytenanzahl in der frühen Posttransplantationszeit einen prognostischen Stellenwert, bezogen auf die Tumorimmunität [78-82].

In dieser Arbeit verglichen wir die Veränderungen der Lymphozyten bei insgesamt 134 Patientinnen mit einem Hochrisikomammakarzinom (≥ 9 positiven Lymphknoten) während eines Beobachtungszeitraumes von mehr als sechs Jahren. Die Patientinnen wurden entweder mit einer stammzell- und wachstumsfaktor-gestützten sequentiellen Hochdosischemotherapie (Arm A) oder einer dosisdichten sequenziellen wachstumsfaktor-gestützten Chemotherapie (Arm B) behandelt. In beiden Armen kam es zu einem Abfall der gesamten Lymphozyten, der jedoch unterschiedlich stark ausfiel. Im Hochdosischemotherapie-Arm war dieser zu Beginn der Therapie wesentlich stärker ausgeprägt als im Vergleichsarm B und hoch signifikant mit einem p-Wert von 0,001 gegenüber den Ausgangswerten. In beiden Armen wurde nach etwa 6 Monaten die niedrigste Werte gemessen. Nach etwa 2 Jahren wurde in beiden Armen der Normalbereich erreicht. Da unseres Wissens diese Studie die erste Arbeit ist, die Veränderungen der Lymphozyten nach einer stammzell- und wachstumsfaktor-gestützten sequentiellen Hochdosis-Chemotherapie mit einer dosisdichten sequenziellen wachstumsfaktor-gestützten Chemotherapie vergleicht, wurde keine Vergleichsliteratur zu dieser Aussage gefunden.

Unterteilt man die Lymphozyten in T- und B-Lymphozyten ergeben sich signifikante Veränderungen im Vergleich beider Therapiearme miteinander.

Wir fanden, dass die T-Lymphozyten im Hochdosischemotherapie-Arm zu Beginn der Therapie signifikant abfielen. Dieser Abfall setzte sich bis etwa ein Jahr nach Beendigung der Therapie fort. Zwischen dem 2. und 3. Jahr wurden die Normalwerte, jedoch nicht die Ausgangswerte erreicht. Es wurde vielfach beschrieben, dass Hochrisiko-Patientinnen, die eine stammzellgestützte Hochdosischemotherapie erhalten, eine verlängerte Periode eines Abfalls und einer Dysfunktion der T-Zellen durchlaufen [83, 84, 85, 86, 87]. Avignan D. et al. [83] untersuchten 28 Brustkrebspatientinnen mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, die mit einer stammzellunterstützte Hochdosischemotherapie behandelt wurden. Hier dauerte der Abfall und die Normalisierung der T-Lymphozyten 6-12 Monate. Im Gegensatz dazu dauerte in unserer Studie der Zeitraum bis zur Erholung mindestens 30 Monate. Auch Sportes C. et al. [87] beschreiben eine Untersuchung von 71 Patientinnen mit Hochrisiko-Mammakarzinom oder metastasiertem Mammakarzinom, die mit stammzellgestützter Hochdosischemotherapie behandelt wurden, einen Abfall und mit einer Normalisierung nach mindestens 18 Monaten. Eine Erklärung der unterschiedlich langen Erholungszeit könnte in der Anwendung unterschiedlichen Hochdosistherapieregimen liegen. So wurden in der Studie von Sportes C. et al. [87] 3-7 Kurse Paclitaxal und Cyclophosphamid angewandt und dann eine Hochdosischemotherapie mit Melphalan und Etoposid angeschlossen. Im Gegensatz dazu wurde in unserer Studie zwei Kurse einer Induktionschemotherapie mit Epiadriamycin und Cyclophosphamid und im Anschluss eine Hochdosischemotherapie mit Epiadriamycin, Cyclophosphamid und Thiotepa angewendet. Cyclophosphamid wurde in einer Gesamtdosis von 7200 mg/ m² angewendet. Fagnoni F. et al. [88] fanden, dass bei Brustkrebspatientinnen, die mit einer autologen Stammzelltransplantation behandelt wurden, nachdem sie entweder eine Chemotherapie mit Cyclophosphamid oder Epirubicin und Paclitaxal erhielten, die PBPC-Transplantate, die nach der Behandlung mit Cyclophosphamid geerntet wurden, eine kleinere Anzahl von T-Lymphozyten mit einer größer veränderten Zusammensetzung enthielten als nach Behandlung mit Epirubicin und Paclitaxal. Gladstone DE et al. [89] beschreiben, dass Hochdosis-Cyclophosphamid hauptsächlich die naiven T-Zellen zerstören. Leider wurden initial in unserer Studie die T-Lymphozyten nur in CD4-T- und CD8-T-Zellen eingeteilt und keine memory oder naiven T-Zellen bestimmt.

Brode und Cooke [90] beschreiben eine Erhöhung der Immunantwort nach Gabe von Cyclophosphamid, je nach Zeit und Dosis der Gabe. Obwohl der Mechanismus noch nicht voll verstanden ist, nehmen die Autoren eine verstärkte Proliferation in der Erholungsphase an auf Grund verstärkter Zytokinproduktion sowie die Inhibition von Suppressorzellen. Auffallend ist, dass in unserer Studie im Standardarm B der Abfall der T-Zellen zu Beginn der Therapie langsamer war, die Erholungsphase etwa ein Jahr eher als im Hochdosischemotherapie-Arm einsetzte, also bereits zwischen dem 1. und 2. Jahr der Normalbereich und nach 5 Jahren der Ausgangswert erreicht wurde. Im Arm B wurde eine Gesamtdosis von 4200 mg/ m² Cyclophosphamid, im Arm A eine Gesamtdosis von 7200 mg/ m² Cyclophosphamid verabreicht. Es stellt sich die Frage, ob die höhere Gesamtdosis des Cyclophosphamids verantwortlich ist für diese signifikanten Unterschiede in unserer Studie bezüglich der T-Zellzahlen und deren Erholung oder ob andere Faktoren eine Rolle spielen. Pierelli L. et al. [91] beschreiben die Rolle von Wachstumsfaktoren bei der Erholung der T-Zellen nach einer Stammzelltransplantation bei Brustkrebs- und Ovarkarzinompatientinnen und vergleichen von G-CSF mit GM-CSF in einer randomisierten Studie. Sie fanden eine signifikant höhere T-Zellanzahl bei den mit G-CSF behandelten Patienten als bei den mit GM-CSF behandelten in der frühen und späten (nach 12 Monaten) Nachtransplantationsphase. Außerdem hatten die G-CSF behandelten Patientinnen eine längere Medianzeit ohne Krankheitsprogression und eine höhere T-Zellanzahl ging mit signifikant höheren Gesamtüberleben einher. Als Hochdosis-Chemotherapie wurde Carboplatin, Etoposide und Melphalan, sowie 5µg/kg Körpergewicht G-CSF oder GM-CSF subcutan bis Tag 13 nach peripherer Stammzell-Transplantation eingesetzt.

In unserer Studie wurde 5 µg/kg Körpergewicht G-CSF nach jedem Chemotherapiekurs in beiden Armen eingesetzt: im stammzellgestützten Hochdosischemotherapie-Arm ab Tag 5 bis zum Durchschreiten des Nadirs und Erreichen von Leukozytenwerten von $\geq 3,0$ G/ und im Arm B ab Tag 5-12. Abweichend von einem klassischen Phase-III-Prinzip erfolgte im Arm B durch Reduktion der Dreiwochenintervalle auf Zweiwochenintervalle eine Dosissteigerung um den Faktor 1,5. Wegen der hämatotoxischen Nebenwirkung infolge der Intervallverkürzung wurde prophylaktisch der Wachstumsfaktor G-CSF appliziert. Die Applikation von G-CSF scheint für die höheren T-Zellanzahl und deren schnellerer Erholung verantwortlich zu sein. Es wurde keine Vergleichsliteratur zu diesem Thema gefunden.

Unterteilt man die T-Lymphozyten in CD4- T- und CD8-T-Zellen ergeben sich ebenfalls signifikante Unterschiede in beiden Armen. Auffallend ist der große Verlust dieser Zellen im Hochdosischemotherapie-Arm mit hauptsächlichlichen Veränderungen bei den CD4+-T-Zellen. Die vor Beginn der Therapie gemessene Anzahl der CD4-T-Zellen wurde bis zum Abschluss der Beobachtung nicht wieder erreicht. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der CD4-T-Zellen im Arm B kurze Zeit nach Beendigung der Therapie (≤ 6 Monate) wieder an und erreichte fast die Ausgangswerte, war zumindest drei Jahre

nach Beendigung der Therapie stabil. Der Unterschied zwischen Arm A und B war zu jeder Zeit signifikant mit einer höheren CD4-T-Zellen Anzahl im Arm B.

Im Gegensatz zu den CD4-T-Zellen erfolgte in beiden Armen kein ausgeprägter Abfall der CD8-T-Zellen. Sie blieben im Normalbereich.

Der Verlauf des Quotienten aus CD4-T-Zellen zu CD8-T-Zellen spiegelt die schon beschriebene Situation bei den CD4-T- und CD8-T-Zellen wieder. Ein starker Abfall der CD4-T-Zellen im Arm A lässt den Quotienten abfallen, während im Arm B die CD4-T-Zellen nicht derartigen Schwankungen unterworfen waren.

Es wurde vielfach beschrieben, dass Hochrisiko-Patientinnen, die eine stammzellgestützte Hochdosischemotherapie erhalten, eine Inversion des Quotienten aus CD4-T-Zellen zu CD8-T-Zellen aufweisen [83, 84, 85, 86, 87].

So berichten Reimer P. et al. [86] ebenfalls von einem Abfall des Quotienten aus CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen im Vergleich zu den Werten vor der peripheren Stammzelltransplantation bedingt durch einen hauptsächlichlichen Abfall der CD4+-Helferzellen. Sportes C. et al. [87] berichtet von einem Abfall der CD8- und CD4-Zellen, wobei sich die CD8-Zellen bereits nach 3 Monaten erholen, die CD4-Zellen jedoch erst 18 Monate nach der autologen Stammzelltransplantation.

Mackall CI et al. [92] und Fagnoni FF., et al. [88] berichten ebenfalls von einer Inversion des Quotienten aus CD4-T-Zellen zu CD8-T-Zellen, welche mehrere Monate dauere. Allerdings beschreiben sie, dass dieses hauptsächlich durch eine Zunahme atypischer CD8-Zellen ausgelöst sei, bedingt durch eine kompensatorische Vermehrung von CD8+CD28-T-Zellen, deren TcR-Verschiedenheit und Immunkompetenz als vermindert beschrieben wird.

In Gegensatz dazu blieben in unserer Studie in beiden Armen die CD8-Zellen während des gesamten Beobachtungszeitraums in Normbereich. Die Inversion des Quotienten aus CD4-T-Zellen zu CD8-T-Zellen war allein durch den Abfall der CD4-Zellen bedingt. Während die zitierten Studien auf eine beschleunigte T-Zell-Erholung durch eine autologe Stammzelltransplantation nach einer Lymphopenie bedingt durch eine Hochdosischemotherapie und damit eine verbesserte Immunkompetenz der Patienten hindeuten, zeigt unsere Arbeit zwar ähnliche Verläufe im Arm A, jedoch ein signifikant schlechteres Abschneiden im Vergleich zum Arm B, insbesondere bei den T-Lymphozyten bzw. den CD4-Zellen. Unterteilt man die Patientinnen nach ihrem klinischen Status und vergleicht die CD4-T-Zellen ergeben sich für die Patientinnen mit einem Rezidiv, die am Leben sind, die bereits oben beschriebenen Veränderungen für beide Arme. Anders verhält es sich jedoch bei den Patientinnen mit einem Rezidiv, die verstorben sind. Bei diesen kommt es im Arm B zu einem steilen Abfall unter der Therapie, die CD4-T-Zellen erholen sich langsamer und bleiben unterhalb des Normalbereiches. Im Arm A ist der Abfall stärker und dauert länger. Die CD4-T-Zellen erreichen nach 4 Jahren den unteren Normalbereich. Hier scheint es eine Korrelation zwischen einer niedrigen CD4-T-Zellzahl, köpereigener Tumorabwehr und Tumorprogression zu geben.

Zambelli A et al. [93] untersuchten bei 148 Hochrisikokarzinom- oder metastasierten Brustkrebspatientinnen nach einer Hochdosischemotherapie und autologen peripheren Stammzelltransplantation infektiöse Komplikationen und die Erholung des Immunsystems. Sie fanden einen zeitverlängerten Abfall. Während sich die CD8-Zellen schneller erholten, blieben die CD4-Zellen auch nach 24 Monaten niedriger als vor der Transplantation. In dieser Studie wurde auch die in vitro Funktionsfähigkeit nach Stimulation mit Phytohaemagglutinin untersucht. Die Ausgangswerte wurden auch nach 24 Monaten nicht erreicht. Trotz verzögerter Erholung der CD4+-Zellen normalisierten sich viele T-Lymphozytenfunktionen 12 Monate nach der autologen peripheren Stammzelltransplantation.

In unserer Arbeit kam es im Arm A zu einem Verlust der in vitro Funktionsfähigkeit der Lymphozyten, sowohl nach Stimulation mit Phytohaemagglutinin als auch mit spezifischen Stimulantien (Interleukin-2 und anti-CD3). Signifikant war dieses mit einem p-Value von 0,003 zum Abschluss der Therapie unter Stimulation mit Phytohaemagglutinin. Nach etwa 6 Monaten wurden die Ausgangswerte wieder erreicht. Im Gegensatz dazu ergab sich eine nicht verschobene in vitro Funktionsfähigkeit der Lymphozyten im Arm B. Im Vergleich der Studie von Zambelli mit unserer, sollte das Augenmerk auf die niedrige Fallzahl zum einen und auch die unterschiedliche Therapieregime zum anderen gelenkt werden. In dieser Studie [93] wurde zwar 102 Hochrisiko-Mammakarzinom Patientinnen, die entweder mehr als 10 positive Lymphknoten oder mehr als 4 positive Lymphknoten und andere nachteilige prognostische Faktoren, wie große Tumorgöße, high-grade, Alter < 35 Jahre aufwiesen, behandelt, jedoch nur bei 10 Hochrisiko-Mammakarzinom Patientinnen wurden die Lymphozytenverläufe bestimmt. Zusätzlich flossen Daten von 46 metastasierten Patientinnen, die ein anderes Therapieregime erhielten, in diese Studie ein. In unserer Studie liegen Daten von 82 ausschließlich Hochrisiko-Mammakarzinom Patientinnen im Stadium II/III mit mehr als neun Lymphknoten, also einer homogenen Gruppe, vor. In unserer Studie wurde im Arm A eine Gesamtdosis von 360mg/ m² Epiadriamycin, 7200 mg/ m² Cyclophosphamid und 800 mg/ m² Thiotepa über 11 Wochen verabreicht sowie die Gabe von jeweils 5 µg/kg G-CSF (R-metHuG-CSF) s.c. ab Tag 5 bis zum Durchschreiten des Nadirs und Erreichen von Leukozytenwerten von ≥ 3,0 G/l.

Im Gegensatz dazu war das Therapieregim in der Studie von Zambelli [93] Cyclophosphamid in einer Gesamtdosis von 7000 mg/m², Thiotepa 600 mg/m² und Melphalan 160 mg/m² sowie die Gabe von 5 µg/kg Körpergewicht G-CSF, begonnen 48 h nach Ende der Chemotherapie bis eine totale Menge von > 5 x 10⁶ CD34+-Zellen/kg geerntet wurden.

Literaturrecherchen ergaben, dass im Gegensatz zu den T-Lymphozyten die Anzahl und die Funktion der B-Lymphozyten, der Natürlichen Killerzellen sowie der dendritischen Zellen durch eine Hochdosischemotherapie wenig beeinträchtigt wurden [83, 84, 85, 86]. Auch in unserer Studie bestätigte sich dieses für den Arm A, wobei wir jedoch keine B-Zell-Antikörper-Antwort, also keine Funktion, gemessen haben.

Die Natürlichen Killerzellen blieben im Arm A zu jeder Zeit im Normalbereich. Es kam unter der Therapie zu einem nicht signifikanten Abfall, der sich bis 6 Monaten nach Therapie fortsetzte. Im Arm B dagegen kam es zu einem signifikanten Abfall am Ende der Therapie. Der Wert lag etwas unterhalb des Normalbereiches, während die weiteren Messungen sich im Normalbereich befanden. Die B-Lymphozyten fielen ebenfalls hoch signifikant stärker und schneller im Arm A als im Arm B ab. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten erholten sie sich jedoch im Arm A signifikant stärker und schneller. Bereits nach 6 Monaten erreichten sie den Normalbereich und nach einem Jahr den Ausgangswert. Im Arm B wurde der Normalbereich auch nach 6 Monaten erreicht, der Ausgangswert jedoch zwischen dem 1. und 2. Jahr. Hier scheint ein Zusammenhang mit der autologen peripheren Stammzelltransplantation zu bestehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zu Veränderungen des Immunsystems unter einer adjuvanten Chemotherapie bei Patientinnen mit einem Hochrisikomammakarzinom kam. Im Arm A kam es zu einem Abfall der T-Lymphozyten, der CD4-T-Zellen, während die CD8-T-Zellen im Normalbereich blieben. Die B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen waren weniger stark verändert. Vergleicht man die Veränderungen im stammzell- und wachstumsfaktorgestützten sequentiellen Hochdosischemotherapie-Arm mit den Veränderungen im dosisdichten sequenziellen wachstumsfaktorgestützten Chemotherapiearm, sind die Veränderungen im Hochdosischemotherapie-Arm trotz peripherer Stammzelltransplantation gravierender. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die langsame Erholung des Immunsystems nach Chemotherapie und Transplantation nicht ideal für eine Immuntherapie sind. Die periphere Stammzellgabe hilft wahrscheinlich die Anzahl von Neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach Hochdosischemotherapie zu verbessern. Das zelluläre Immunsystem scheint – zumindest in unserem Regim – nicht besser aktiviert zu werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der Universitäts-Frauenklinik der Heinrich Heine Universität Düsseldorf wurden 403 Brustkrebs-Patientinnen entweder mit einer stammzell- und wachstumsfaktorgestützten sequentiellen Hochdosistherapie (Arm A) oder mit einer wachstumsfaktorgestützten dosisintensivierten Chemotherapie (Arm B) in einer prospektiven randomisierten Untersuchung zur Therapieoptimierung behandelt. Die Patientinnen befanden sich im Stadium II / III mit mehr als neun positiven Lymphknoten.

Im onkologisch immunologischen Labor der Frauenklinik wurden immunologische Parameter von 134 Patientinnen dieser Studie untersucht, indem die Veränderungen der Subpopulationen der PBL und die funktionelle Kapazität dieser Zellen für mehr als sechs Jahre untersucht und verfolgt wurden. Zweiundachtzig (61%) Frauen erhielten die stammzellgestützte Hochdosistherapie und 52 (39%) die wachstumsfaktor-gestützte dosisintensivierte Chemotherapie. Die erhaltenen Daten wurden auf der einen Seite verglichen zwischen den Gruppen A und B und auf der anderen Seite mit dem klinischen Status der Patientinnen.

Vergleich der Gruppen A und B

In beiden Armen kam es zu einem Abfall der gesamten Lymphozyten, der jedoch unterschiedlich stark ausfiel. Im Arm A war dieser zu Beginn der Therapie wesentlich stärker ausgeprägt als im Arm B und hoch signifikant mit einem p-Wert = 0,001 gegenüber den Ausgangswerten. In beiden Armen wurden nach etwa 6 Monaten die niedrigste Werte gemessen. Nach etwa 2 Jahren wurde in beiden Armen der Normalbereich erreicht. Unterteilt man die Lymphozyten in B- und T-Lymphozyten ergeben sich signifikante Veränderungen im Vergleich beider Therapiearme miteinander. Die T-Lymphozyten fallen im Arm A zu Beginn der Therapie signifikant ab. Dieser Abfall setzt sich etwa bis ein Jahr nach Beendigung der Therapie fort. Zwischen dem 2. und 3. Jahr werden die Normwerte, jedoch nicht die Ausgangswerte, erreicht. Im Arm B ist der Abfall zu Beginn der Therapie langsamer, die Erholungsphase setzt etwa ein Jahr eher ein, bereits zwischen dem 1. und 2. Jahr wird der Normalbereich und nach 5 Jahren der Ausgangswert erreicht. Die B-Lymphozyten fallen ebenfalls hoch signifikant stärker und schneller im Arm A als im Arm B ab. Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten erholten sie sich jedoch im Arm A signifikant stärker und schneller. Bereits nach 6 Monaten erreichten sie den Normalbereich und nach einem Jahr den Ausgangswert. Im Arm B wurde der Normalbereich ebenfalls nach 6 Monaten erreicht, der Ausgangswert jedoch zwischen dem 1. und 2. Jahr. Unterteilt man die T-Lymphozyten in CD4-T- und CD8-T-Zellen ergeben sich ebenfalls signifikante Unterschiede in beiden Armen. Auffallend ist der große Verlust dieser Zellen im Arm A. Die vor Beginn der Therapie gemessene Anzahl der CD4-T-Zellen wurde bis zum Abschluss der Beobachtung nicht wieder erreicht. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der CD4-T-Zellen im Arm B kurze Zeit nach Beendigung der Therapie (≤ 6 Monate) wieder an und erreichte fast die Ausgangswerte, war zumindest drei Jahre nach Beendigung der Therapie stabil. Der Unterschied zwischen Arm A und B war zu jeder Zeit signifikant mit einer höheren CD4-T-Zell Zahl im Arm B. Im Gegensatz zu den CD4-T-Zellen erfolgte in beiden Armen kein ausgeprägter Abfall der CD8-T-Zellen. Die Natürlichen Killerzellen lagen im Arm A zu jeder Zeit im Normalbereich. Es kam unter der Therapie zu einem Abfall, der sich bis 6 Monate nach Ende der Therapie fortsetzte. Erst nach 6 und mehr Jahren wurde der Ausgangswert erreicht. Auch im Arm B kam es zu einem Abfall. Dieser war zum Ende der Therapie signifikant erniedrigt mit einem p-Wert von $p=0,000$. Die weiteren Messungen ergaben Werte im Normalbereich. In der Gruppe A kam es zu einem Verlust der in vitro Funktionsfähigkeit der Lymphozyten, sowohl nach Stimulation mit unspezifischen (Phytohaemagglutinin) als auch mit spezifischen Stimulantien (Interleukin-2 und anti-CD3). Signifikant war dieses mit einer p-Value=0,003 zum Abschluss der Therapie unter Stimulation mit Phytohaemagglutinin. Nach etwa 6 Monaten wurden die Ausgangswerte wieder erreicht. Im Gegensatz dazu ergab sich eine bessere in vitro Funktionsfähigkeit der Lymphozyten im Arm B.

Der Bezug zum klinischen Status

In der Gruppe A haben 49 Patientinnen (60%) ein Rezidiv entwickelt und 36 (73%) davon sind noch am Leben. In der Gruppe B haben 32 (61%) ein Rezidiv entwickelt und 16 (50%) sind am Leben. Drei Patientinnen sind in ihrem klinischen Status nicht erfasst worden. Die auffallendsten Unterschiede beim immunologischen Testen werden im Vergleich der Gruppen lebende und verstorbene Patientinnen erreicht. Im Arm B kommt es zu einem steilen Abfall der Zellen unter der Therapie, die CD4-T-Zellen erholen sich langsamer und bleiben unterhalb des Normalbereiches. Im Arm A ist der Abfall noch stärker und dauert länger als in der Gruppe, die überlebte. Die CD4-T-Zellen erreichen nach 4 Jahren den unteren Normalbereich.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Tyczynski JE (2002) Breast Cancer in Europe. Fact Sheet, European Network of Cancer Registries (ENCR).
2. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland Hrsg. In Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut: Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trend. Saarbrücken 2006, 52.
3. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N et al.: The decrease in breast cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 2007; 356: 1670-1674.
4. Jemal A, Ward E, Thun MJ: Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R28.
5. Siegmund-Schulze N, Zylka-Menhorn V, Leinmüller R, Meyer R: Hormontherapie und Brustkrebs. Ein Blick auf die Datenlage. *Dtsch Arztebl* 2008; 105(6): A260-266.
6. Clarke CA, Glaser SL, Uratsu CS, Selby JV, Kishi LH, Herrinton LJ: Recent declines in hormone therapy utilization and breast cancer incidence: clinical and population based evidence. *J Clin Oncol* 2006; 24: E49.
7. Fischer B, Slack N, Kartrych D et al.: Ten year follow up results of patients with carcinoma of the breast in a co-operative clinical trial. *Surg Gynecol Obstet* 1975; 140: 528-534.
8. Sloane JP, Amendoeira I, Apostolikas N et al.: Guidelines for pathology- supplement to European guidelines for quality assurance in mammography screening. Report by the Pathology Working Group of the European Community. *Pathologie* 1997; 18: 71-88.
9. Singletary ES, Allred C, Ashley P et al.: Revision of the American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3576-3577.
10. Janni W, Rack B, Schindlbeck C et al.: The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005; 103: 884-891.
11. Verosi U, Salvadori B, Luini A et al.: Breast conservation in a safe method in patient with small cancer of the breast. Long-term results of three randomized trials on 1973 patients. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1574-1579.
12. Kuehn T, Bembenek A, Decke T et al.: A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 2005; 103: 451-461.
13. Kreienberg R, Kopp I, Lorenz W et al.: Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. Eine nationale S3-Richtlinie. Fassung Juli 2004. <http://info.krebsgesellschaft.de>
14. Leitlinie zur Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Version 2003. Organkommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologischer Onkologie (AGO). <http://www.ago-online.de>
15. Ellis MJ, Coop A, Singh B et al.: Letrozole is more effective neoadjuvant endocrinotherapy than tamoxifen for Erb-1- and/or Erb-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2000; 19: 3808-3816.
16. Fischer B, Bryant J, Wolmark N et al.: Effekt of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* (1998), 16: 2672-2685.

17. Mamounas EP: NSABP Protocol B-27. Preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide followed by preoperative or postoperative docetaxal. *Oncology (Huntingt)*1997; 11 (Suppl.6): 37-40.
18. Early Breast Cancer Trialists' Cooperative Group: Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2000; 355: 1757-1770.
19. Gerber B, Semrau S, Sautter-Bühl ML, Hatmann K, Fietkau K: Bestrahlung des Mammakarzinoms während der primär Behandlung. *Dtsch Arztebl* 2004; 44: A 2962-2968.
20. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD et al.: Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3357-3365.
21. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ: Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* (2005), 16: 1569-1583.
22. Remmele W, Stegner HE.: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987; 8: 138-140.
23. Goss PE, Ingle JN, Martino S et al.: A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:1793-1802.
24. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists' Group: Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002; 356: 2131-2127.
25. Levine MN, Pritchard KI, Bramwell VH et al.: Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: Update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5166-5170.
26. Early Breast Cancer Trialists' Cooperative Group: Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 352: 930-942.
27. Möbus V, Untch M, Du Bois A et al.: Dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin (E), paclitaxal (T) and cyclophosphamide (C) (ETC) is superior to conventional dosed chemotherapy in high-risk breast cancer patients. First results of an AGO-trial. *Proc ASCO* 2004; Abstract 513.
28. Citron ML, Berry DA, Cirincione C et al.: Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1431-1439.
29. Goldstein LJ, O'Neill A, Sparano J et al.: E2197: Phase III AT (doxorubicin/docetaxal) versus AC (doxorubicin/cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive and high risk node negative breast cancer. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 2005; 24: 512.
30. Gianni L, Baselga J, Eiermann W et al.: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer (ECTO): Improved freedom from progression (FFP) from adding paclitaxal(T) to doxorubicin (A) followed by cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil (CMF). *Proc Amer Soc Clin Oncol* 2005; 24: 513.
31. Palli D, Russo A, Saieva C et al.: Intensive versus clinical follow-up after treatment of primary breast cancer: 10-year update of a randomized trial. National Research Council Project on Breast Cancer Follow-up. *JAMA* 1999; 281: 1586.
32. Greenberg P, Hortobagyi GN, Smith TL et al.: Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer, *J Clin Oncol* (1996),14: 2197-2205.

33. Mouridson H, Gershanovich M, Sun Y et al.: Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: Results of a phase II study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2596-2606.
34. Osborne CK, Pipen J, Jones SE et al.: Double-blind randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: Results of the North American trial. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3386-3385.
35. Klijn JGM, Beex LVAM, Mauriac L et al.: Combined treatment with buserelin and tamoxifen in premenopausal metastatic breast cancer: a randomized study. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92: 903-911.
36. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Skak S et al.: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J. Med* 2001; 344: 783-792.
37. Sledge GW, Neuberg D, Bernardo P et al.: Phase II trial of doxorubicin, paclitaxel and the combination of doxorubicin and paclitaxel as front-line chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 588-592.
38. Heidemann E, Minckwitz GV, Holländer N et al.: Mitoxantrone plus docetaxel versus single agent mitoxantrone in metastatic breast cancer: Results of a multicenter randomized trial. *Proc. Amer. Soc. Onc.* 2004; 23: 637.
39. O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S et al.: Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: phase II trial results. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2812-2823.
40. Merlano MC, Bertelli G, Garrone O et al.: Maintenance therapy with letrozole after first-line chemotherapy in advanced breast cancer. The MANTLE trial. *Proc Amer Soc Clin Oncol* 2002; 21: Abstract 1996.
41. Kloke O, Klassen U, Oberhoff C et al.: Maintenance treatment with medroxyprogesterone acetate in patients with advanced breast cancer responding to chemotherapy: Results of a randomized trial. Essen Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 55: 51-59.
42. Coley W: The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). London: John Bale & Sons Publishers 1909: 1-48.
43. Overwijk WW, Lee DS, Surman DR et al.: Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2982-2987.
44. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV: Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6: 443-446.
45. Flieger D, Renoth S, Beier I, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf I: Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol* 2000; 204: 55-63.
46. Shan D, Ledbetter JA, Press OW: Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48: 673-683.
47. Dillman RO: Antibodies as cytotoxic therapy. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1497-1515.
48. Mendelsohn J, Baselga J: The EGF receptor family as target for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19: 6550-6565.
49. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al.: Phase 1 studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18: 904-914.

50. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V et al.: Antiangiogenetic and antitumor activity anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3739-3747.
51. Mit Zustimmung von Roses RE, Paulson EC, Anupama Sharma, Schueller JE et al: HER-2/neu over-expression as a predictor for the transition in situ to invasive breast cancer.
52. Saghatchian M, Guepratte S, Hacene K, Neumann R, Floiras JL, Pichon MF: Serum HER-2 extracellular domain: relationship with clinicobiological presentation and prognostic value before and after primary treatment in 701 breast cancer patients. *Int J Biol Markers* 2004; 19 (1): 14-22.
53. Burstein HJ et al.: Clinical activity of Trastuzumab and Vinorelbine in women with HER“-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2722-2730.
54. Piccart-Gebhart MJ, Procter MR, Leyland-Jones B et al.: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-1672.
55. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al.: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER“-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1673-1684.
56. Cohen IR: Discrimination and dialogue in the immune system. *Sem Immunol* 2000; 12:215-219.
57. Sahin U, Türeci Ö, Pfreundschuh M: Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 709-716.
58. Trowsdale J: Genomic structure and function of the MHC. *Trends Genet* 1993; 9: 117-122.
59. Swain S: T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 1983; 74: 129-142.
60. Germain RN: T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr Biol* 1997; 7: 640-644.
61. Altman J, Moss PAH, Goulder P et al.: Direct visualization and phenotypic analysis of virus-specific T-lymphocytes in HIV-infected individuals. *Science* 1996; 274: 94-96.
62. Weiss C., Jelkmann W.: Abwehrfunktion des Blutes. In: Schmidt R.F., Thews G. (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. 25. Auflage. Springer-Verlag; Berlin; 1993: 447-450.
63. Check I.J., Humer R.L., Rosenberg K.D., Hirsch A.L.: Prediction of survival of gynecological cancer based on immunological tests. *Cancer Research* 1980; 40: 4612-4616
64. Koldovsky U., Perschmann U., Deepke I.: Bilanz einer langjährigen Studie an Lymphozyten-Subpopulationen bei Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren
In : Koldovsky, U. (Hrsg.): *Tumorimmunologie in der Gynäkologie*.
W. Zuckschwerdt Verlag; München; 1994: 138-141.
65. Prestwich RJ, Errington F, Hatfield P et al.: The immune system: is it relevant to cancer development, progression and treatment ? *Clin Oncol* 2008; 20 (2): 101-112.
66. Ostwald J, Dommerich S, Schulz U, Kramp B: Long-term changes in peripheral blood leukocyte and lymphocyte populations in ENT-carcinoma patients. A flow cytometric study in 346 ENT-carcinoma patients and 31 healthy controls. *HNO* 2004; 52 (8): 685-692.
67. Sivkova N, Grigorov L, Kreissig I: Changes in the immune status in patients with basal cell carcinoma of the eyelids of various TNM stages. *Der Ophthalmologe* 1994; 91 (6): 820-823.
68. Vahrson H, Li L, Pralle H: Immunologic studies in patients with ovarian carcinoma during radio-chemotherapy. 1. Studies of lymphocyte subpopulations. *Stahlentherapie und Onkologie* 1991; 167 (11): 643-650.
69. Melchart D., Clemm C., Weber B., Draczynski T., et al.: Polysaccharides isolated from *Echinacea purpurea* herba cell cultures to counteract undesired effects of Chemotherapy-a pilot study, *Phytotherapy Research* 2002; 16:138-142.

70. Riede U.N., Schaefer H.E.: Immunpathologie, Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme-Verlag, 4. Auflage, 1995:206.
71. Neises M., Ditz S., Scheck T., Schiller A., Nebe C.T.: Teilnehmerinnen und Ablehnerinnen einer Interventionsgruppe nach Mammakarzinom unterscheiden sich in Lebensqualität, Krankheitsbewältigung und immunologischen Funktionsuntersuchungen, Zentralblatt für Gynäkologie 2001; 123:27-36.
72. Hutnick NA., Williams NI, Kraemer WJ., et al.: Exercise and lymphocyte activation following chemotherapy for breast cancer, *Me Sci Sports Exerc.* 2005; 37(11): 1827-1835.
73. Mackinnon L.T., Exercise and Cancer, *Advances in exercise immunology, Human Kinetics*, 1999:274.
74. Uhlenbruck G., Bewegungstraining in der Krebsnachsorge – Einfluß auf immunologische und psychologische Parameter, *Forum Deutsche Krebsgesellschaft*, 2001; 2:34-36.
75. Nieto Y., Jones RB., Shpall EJ. : High-dose chemotherapy for breast cancer: is another look warranted? *Curr Opin Oncol* 2004;16: 114-119.
76. Farquhar C., Basser R., Marjoribanks J., Lethaby A.: High-dose chemotherapy and autologous bone marrow or stem cell transplantation versus conventional chemotherapy for women with early poor prognosis breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003: CD003139.
77. Nitz U., Mohrmann S., Fischer J. et al.: Comparison of rapidly cycled tandem high-dose chemotherapy plus peripheral-blood stem-cell support versus dose-dense conventional chemotherapy for adjuvant treatment of high-risk breast cancer: results of a multicentre phase III trial. *Lancet* 2005; 366: 1935-1944.
78. Powles R., Singhal S., Treleaven J., et al.: Identification of patients who may benefit from prophylactic immunotherapy after bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia on the basis of lymphocyte recovery early after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 24: 1249-1255.
79. Pavletic ZS., Joshi SS., Pirucello SJ., et al: Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 33-41.
80. Porrata LF., Gertz MA., Inwards DJ., et al.: Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; 98: 579-585.
81. Porrata LF., Inwards DJ, Micallef JN., et al.: Early lymphocyte recovery post autologous hematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 2002; 117: 629-633.
82. Porrata LF., Litzow MR., Tereffi A., et al.: Early lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Leukemia (Baltimore)* 2002; 16:1311-1318.
83. Avigan D., Wu Z., Joyce R., et al.: Immune reconstitution following high-dose chemotherapy with stem cell rescue in patient with advanced breast cancer. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:169-176.
84. Shpall EJ., LeMaistre CF., Holland K., et al.: A prospective randomized trial of buffy coat versus CD34-selected autologous bone marrow support in high-risk cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Blood* 1997; 90: 4313-4320.
85. Galy a., Rudraraju S., Baynes R., Klein J.: Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets after autologous cd34+ cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 24:1249-1255.
86. Reimer P., Kunzmann V., Weissinger F., et al: Immune reconstitution after high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral stem cell transplantation. *Blood* 2000; 96 (11 Part1): 402a-403a.

87. Sportes C., McCarthy NJ., Hakim F., et al: Establishing a platform for immunotherapy: clinical outcome and study of immune reconstitution after high-dose chemotherapy with progenitor cell support in breast cancer patients. *Biology of Blood & Marrow Transplantation* 2005; 11(6): 472-483.
88. Fagnoni F., Lozza L., Zibera C., et al.: Cytotoxic chemotherapy preceding apheresis of blood progenitor cells can affect the early reconstitution phase of naive T cells after autologous transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2003 ; 31: 31-38.
89. Gladstone DE, Golightly MG, Brannagan TH.: High dose cyclophosphamide preferentially targets naive T (CD45/CD4/RA+) cells in CIPD and MS patients. *Journal of Neuroimmunologie* 2007; 190(1-2):121-126.
90. Brode S. et Cooke A.: Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev Immunol.* 2008; 28(2): 109-126.
91. Pierelli L., Perillo A., Ferrandina G., et al.: The role of growthfactor administration and T-cell recovery after peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of solid tumors: results of a randomized comparison of G-CSF and GM-CSF. *Transfusion* 2001; 41(12): 1577-1585.
92. Mackall CL, Fleisher TA., Brown MR, et al.: Distinctions between CD8+ and CD4+T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997; 89: 3700-3707.
93. Zambelli A., Montagna D., Da Parda GA., et al. : Evaluation of infectious complication and immun recovery following high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in 148 breast cancer patients. *Anticancer Research* 2002; 22: 3701-3708.

8. Anhang

8.1. Anhang zu 2.4. Adjuvante endokrine Therapie

Kasten 1 Immunreaktiver Score nach Remmele [22]	
- Färbeintensität (SI) - Prozentsatz positiver Zellen (PP)	- 0 entspricht „negativ“ - 0 entspricht „negativ“
- Färbeintensität (SI) - Prozentsatz positiver Zellen (PP)	1 entspricht „schwach“ 1 entspricht „ ≤ 10 Potenz“
- Färbeintensität (SI) - Prozentsatz positiver Zellen (PP)	2 entspricht „mäßig“ 2 entspricht 10-50Prozent“
- Färbeintensität (SI) - Prozentsatz positiver Zellen (PP)	3 entspricht „stark positiv“ 3 entspricht „51-80 Prozent“
- Prozentsatz positiver Zellen (PP)	4 entspricht „ > 80 Prozent“

8.2. Anhang zu 3.1. Patientinnenkollektiv

Kasten 2 Allgemeinzustand nach ECOG/WHO	
Grad	Allgemeinzustand
0	Patient ist in der Lage alle normalen Aktivitäten ohne Einschränkung auszuführen
1	Patient ist in physisch belastenden Tätigkeiten eingeschränkt, jedoch ambulant und in der Lage, Arbeiten zu verrichten
2	Patient ist ambulant und kann sich selbst versorgen, jedoch keinerlei Arbeiten verrichten; < 50% der Wachstunden bettlägrig oder an einen Stuhl gebunden
3	Patient ist nur eingeschränkt fähig, sich selbst zu versorgen; > 50% der Wachstunden bettlägrig oder an einen Stuhl gebunden
4	Patient ist vollständig behindert, kann sich selbst nicht versorgen und muß ständig liegen oder sitzen

8.3. Anhang zu 4.2. Abschnitt A: Adjuvanter stammzellgestützter sequentieller Hochdosis-Chemotherapie-Arm (Arm A)

Tabelle 13: Adjuvante Chemotherapie Arm A: Darstellung der Gesamt-Lymphozyten, T- und B-Lymphozyten im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung, unter der Therapie, Abschluss und der Nachsorge von nach 3-6 Monaten bis nach 6 und mehr Jahren unter Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittelwertes mit Standardfehler und Standardabweichung, des Medianwertes, Minimum, Maximum und 1., 2. und 3. Perzentile. Mittelwerte [$\times 10^6$ Zellen/ml]					
Beobachtungs-zeitraum		Gesamt-Lymphozyten	T-Lymphozyten	B-Lymphozyten	
Randomisierung	N	73	73	73	
	Mittelwert	1,8333	1,3486	,2697	
	Standardfehler des Mittelwertes	,08601	,05913	,02291	
	Median	1,6400	1,2300	,2067	
	Standardabweichung	,73485	,50519	,19571	
	Minimum	,81	,66	,04	
	Maximum	4,51	3,26	,95	
	Perzentile	25	1,3400	,9750	,1500
		50	1,6400	1,2300	,2067
		75	2,2000	1,5900	,3100
unter Therapie	N	158	158	158	
	Mittelwert	1,2119	,9344	,1066	
	Standardfehler des Mittelwertes	,04959	,03990	,00931	
	Median	1,0900	,8450	,0600	
	Standardabweichung	,62334	,50151	,11702	
	Minimum	,20	,08	,00	
	Maximum	3,45	2,97	,62	
	Perzentile	25	,7275	,5500	,0200
		50	1,0900	,8450	,0600
		75	1,6750	1,2225	,1725
Abschluss	N	70	70	71	
	Mittelwert	,9623	,7809	,0188	
	Standardfehler des Mittelwertes	,08188	,07755	,00446	
	Median	,7600	,5300	,0100	
	Standardabweichung	,68505	,64882	,03759	
	Minimum	,21	,14	,00	
	Maximum	3,81	3,28	,24	
	Perzentile	25	,5000	,3500	,0000
		50	,7600	,5300	,0100
		75	1,2950	1,0885	,0100
nach 3 bis 6 Monaten	N	59	59	59	
	Mittelwert	,9227	,6887	,1333	
	Standardfehler des Mittelwertes	,07779	,07403	,01339	
	Median	,7900	,5500	,1200	
	Standardabweichung	,59751	,56867	,10289	
	Minimum	,30	,17	,00	
	Maximum	2,98	2,71	,51	
	Perzentile	25	,5600	,3100	,0500
		50	,7900	,5500	,1200

nach 1 Jahr		75	1,0400	,7900	,1900
	N		99	99	99
	Mittelwert		1,0734	,6834	,2765
	Standardfehler des Mittelwertes		,04235	,03443	,01494
	Median		,9800	,6100	,2400
	Standardabweichung		,42138	,34258	,14869
	Minimum		,40	,24	,04
	Maximum		2,63	2,10	,75
nach 2 Jahren	Perzentile	25	,7600	,4400	,1700
		50	,9800	,6100	,2400
		75	1,3300	,8200	,3600
	N		85	85	85
	Mittelwert		1,4634	,8497	,4587
	Standardfehler des Mittelwertes		,06666	,04515	,02872
	Median		1,2900	,8000	,4300
	Standardabweichung		,61462	,41628	,26482
nach 3 Jahren	Minimum		,25	,10	,11
	Maximum		4,09	3,07	1,31
	Perzentile	25	1,0350	,5700	,2500
		50	1,2900	,8000	,4300
		75	1,7250	1,0400	,5500
	N		35	36	35
	Mittelwert		1,6071	1,0595	,4364
	Standardfehler des Mittelwertes		,10901	,08136	,03800
nach 4 Jahren	Median		1,5700	,9300	,3600
	Standardabweichung		,64491	,48817	,22482
	Minimum		,79	,48	,13
	Maximum		4,40	3,21	,94
	Perzentile	25	1,2000	,7879	,2400
		50	1,5700	,9300	,3600
		75	1,8100	1,2700	,6100
	N		24	24	24
nach 5 Jahren	Mittelwert		1,5646	1,0288	,3942
	Standardfehler des Mittelwertes		,10136	,08209	,02997
	Median		1,5250	1,0500	,3850
	Standardabweichung		,49658	,40214	,14682
	Minimum		,64	,25	,19
	Maximum		2,51	1,81	,75
	Perzentile	25	1,1850	,7700	,2850
		50	1,5250	1,0500	,3850
nach 5 Jahren		75	1,9575	1,3375	,4200
	N		14	14	14
	Mittelwert		1,6336	1,0221	,3714
	Standardfehler des Mittelwertes		,10687	,09643	,05621
	Median		1,5950	,9850	,3100
	Standardabweichung		,39988	,36081	,21031
	Minimum		1,02	,56	,11
	Maximum		2,23	1,76	,89
nach 5 Jahren	Perzentile	25	1,2700	,7125	,2150
		50	1,5950	,9850	,3100

6 und mehr Jahre	N	75	2,1125	1,2825	,5175
			5	5	5
	Mittelwert		1,7500	1,2660	,2480
	Standardfehler des Mittelwertes		,26106	,19354	,03292
	Median		2,0800	1,3900	,2700
	Standardabweichung		,58374	,43276	,07362
	Minimum		,92	,69	,12
	Maximum		2,21	1,71	,31
	Perzentile	25	1,1350	,8200	,1950
		50	2,0800	1,3900	,2700
75		2,2000	1,6500	,2900	

Tabelle 14:
Adjuvante Chemotherapie Arm A:
Darstellung der CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen, des Quotienten aus CD4- und CD8-T-Zellen und der
Natürlichen Killerzellen im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung, unter der Therapie,
Abschluss und der Nachsorge von nach 3-6 Monaten bis nach 6 und mehr Jahren unter Angabe der Anzahl
der Fälle, des Mittelwertes mit Standardfehler und Standardabweichung, des Medianwertes, Minimum, Maxi-
imum und 1., 2. und 3. Perzentile.
Mittelwerte [$\times 10^6$ Zellen/ml]

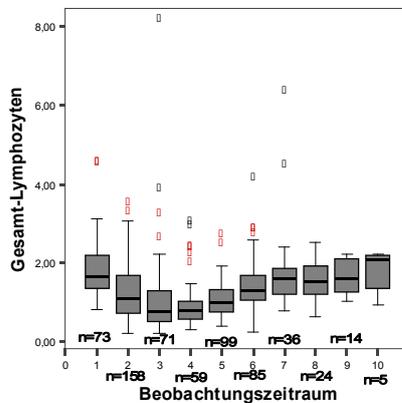
Beobachtungs-			CD4-Zel-	CD8-Zel-	CD4/CD8	Natürlichen Kil-
zeitraum			len	len		lerzellen
Randomisierung	N		73	73	73	73
	Mittelwert		,9237	,3852	2,6096	,2089
	Standardfehler des Mittelwertes		,04314	,02003	,11389	,01692
	Median		,8800	,3700	2,5000	,1800
	Standardabweichung		,36857	,17118	,97311	,14455
	Minimum		,31	,10	,72	,03
	Maximum		2,28	,98	5,40	,77
	Perzentile	25	,6750	,2750	1,9327	,1000
		50	,8800	,3700	2,5000	,1800
		75	1,1150	,4366	3,0923	,2600
unter Therapie	N		158	158	158	158
	Mittelwert		,5913	,3039	2,2060	,1752
	Standardfehler des Mittelwertes		,02793	,01476	,08609	,01017
	Median		,5300	,2700	2,0370	,1400
	Standardabweichung		,35113	,18555	1,08218	,12782
	Minimum		,03	,03	,27	,02
	Maximum		2,07	1,02	5,68	,92
	Perzentile	25	,3200	,1600	1,4217	,0975
		50	,5300	,2700	2,0370	,1400
		75	,7800	,4025	2,7098	,2200
Abschluss	N		71	70	71	71
	Mittelwert		,2734	,4767	1,1104	,1763
	Standardfehler des Mittelwertes		,01709	,06837	,10230	,01193

	Median		,2400	,2200	1,0000	,1600
	Standardabweichung		,14398	,57203	,86200	,10054
	Minimum		,05	,05	,08	,00
	Maximum		,89	2,90	4,27	,56
	Perzentile	25	,1800	,1200	,4773	,1000
		50	,2400	,2200	1,0000	,1600
		75	,3400	,7180	1,4211	,2400
nach 3 bis 6 Monaten	N		59	59	58	59
	Mittelwert		,2490	,4183	,9560	,1151
	Standardfehler des Mittelwertes		,01733	,05915	,09388	,00709
	Median		,2300	,2700	,8583	,1000
	Standardabweichung		,13309	,45435	,71494	,05447
	Minimum		,09	,01	,23	,04
	Maximum		,95	2,17	5,00	,29
	Perzentile	25	,1600	,1500	,5150	,0800
		50	,2300	,2700	,8583	,1000
		75	,2816	,5000	1,1135	,1400
nach 1 Jahr	N		99	99	99	99
	Mittelwert		,2880	,3669	1,0615	,1232
	Standardfehler des Mittelwertes		,01085	,02563	,07255	,00679
	Median		,2700	,3000	,8636	,1100
	Standardabweichung		,10796	,25498	,72183	,06756
	Minimum		,12	,05	,28	,01
	Maximum		,68	1,37	4,80	,37
	Perzentile	25	,2100	,2000	,6071	,0800
		50	,2700	,3000	,8636	,1100
		75	,3500	,4500	1,2800	,1400
nach 2 Jahren	N		85	85	85	85
	Mittelwert		,4085	,3996	1,2861	,1594
	Standardfehler des Mittelwertes		,01760	,02929	,07651	,01344
	Median		,3800	,3400	1,1200	,1300
	Standardabweichung		,16228	,27004	,70541	,12388
	Minimum		,06	,03	,31	,02
	Maximum		1,10	1,76	4,20	,88
	Perzentile	25	,3050	,2350	,8721	,1000
		50	,3800	,3400	1,1200	,1300
		75	,5150	,4939	1,5331	,1858
nach 3 Jahren	N		36	36	36	36
	Mittelwert		,5420	,4631	1,3874	,1434
	Standardfehler des Mittelwertes		,03389	,04849	,11162	,01740
	Median		,4950	,4300	1,2833	,1350
	Standardabweichung		,20334	,29092	,66972	,10439
	Minimum		,25	,09	,52	,06
	Maximum		1,19	1,80	4,44	,69
	Perzentile	25	,4100	,2900	,9577	,0810
		50	,4950	,4300	1,2833	,1350

		75	,6225	,5450	1,6330	,1650
nach 4 Jahren	N	24	24	24	24	
	Mittelwert		,5500	,4275	1,4759	,1533
	Standardfehler des Mittelwertes		,04227	,04343	,14279	,01373
	Median		,5100	,4050	1,2973	,1300
	Standardabweichung		,20707	,21277	,69951	,06729
	Minimum		,15	,09	,78	,09
	Maximum		,91	,90	4,08	,36
	Perzentile	25	,4325	,3025	,9838	,1125
		50	,5100	,4050	1,2973	,1300
		75	,7100	,5225	1,7575	,1700
nach 5 Jahren	N	14	14	14	14	
	Mittelwert		,5500	,4236	1,4977	,1907
	Standardfehler des Mittelwertes		,04414	,05866	,15147	,02590
	Median		,5200	,3950	1,4755	,1500
	Standardabweichung		,16516	,21950	,56674	,09691
	Minimum		,29	,16	,82	,08
	Maximum		,82	,98	2,81	,37
	Perzentile	25	,4175	,2550	,9884	,1200
		50	,5200	,3950	1,4755	,1500
		75	,7225	,5550	1,8032	,2850
6 und mehr Jahre	N	5	5	5	5	
	Mittelwert		,6460	,5960	1,0466	,2320
	Standardfehler des Mittelwertes		,13056	,07264	,13958	,06967
	Median		,7100	,6200	1,0597	,2000
	Standardabweichung		,29194	,16242	,31212	,15579
	Minimum		,28	,39	,72	,08
	Maximum		,95	,81	1,53	,46
	Perzentile	25	,3450	,4400	,7773	,0950
		50	,7100	,6200	1,0597	,2000
		75	,9150	,7400	1,3093	,3850

Abbildung 44:

Adjuvant Arm A: Darstellung der Mittelwerte der Gesamt-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10⁶ Zellen/ml]

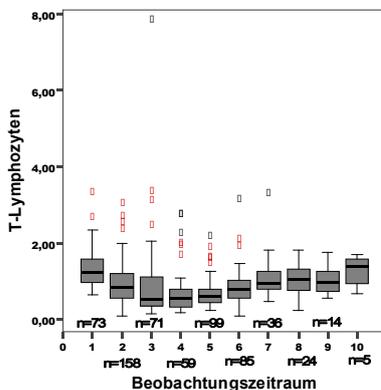


- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N =** Anzahl der Fälle

Der Ausreißer von 8,12 x 10⁶/ml zum Zeitpunkt Abschluss und 6,30 x 10⁶/ml nach 3 Jahren wurden für die weitere Auswertung herausgenommen. Die restlichen Werte lagen zum Zeitpunkt Abschluss bei 0,21-3,81 x 10⁶/ml und zum Zeitpunkt nach 3 Jahren bei 0,77-4,40 x 10⁶/ml.

Abbildung 45:

Adjuvant Arm A: Darstellung der Mittelwerte der T-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10⁶ Zellen/ml]

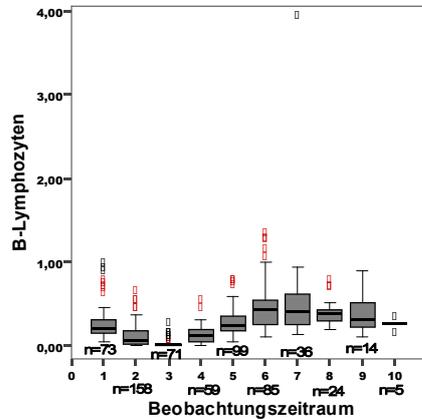


- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N =** Anzahl der Fälle

Bei dem Ausreißer von 7,8 x 10⁶/ml zum Zeitpunkt Abschluss handelt es sich um einen Eingabefehler. Dieser Wert wurde für die weitere Betrachtung herausgenommen. Die anderen Werte für die T-Lymphozyten lagen zum Zeitpunkt Abschluss zwischen 0,14 – 3,28 x 10⁶/ml. Bei diesem Ausreißer handelt es sich um die gleiche Patientin, die zum Zeitpunkt Abschluss Gesamt-Lymphozyten in Höhe von 8,12 x 10⁶/ml hatte.

Abbildung 46:

Adjuvant Arm A: Darstellung der Mittelwerte der B-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10⁶ Zellen/ml]

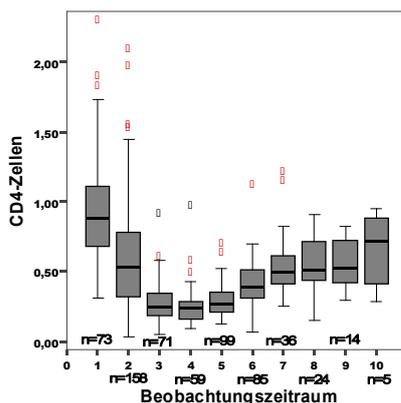


- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N** = Anzahl der Fälle

Bei dem Extremwert von 3,91 x 10⁶/ml zum Zeitpunkt nach 3 Jahren handelt es sich ebenfalls um einen Eingabefehler. Auch dieser Wert wurde für die weitere Auswertung herausgenommen. Die Gesamt-Lymphozyten dieser Patientin zu diesem Zeitpunkt hatten den Wert 6,30 x 10⁶/ml. Wie bereits oben erweht wurde dieser Wert für die weitere Beurteilung heraus genommen. Die anderen Werte zu diesem Verlaufszeitpunkt lagen zwischen 0,13 und 0,94 x 10⁶/ml.

Abbildung 47:

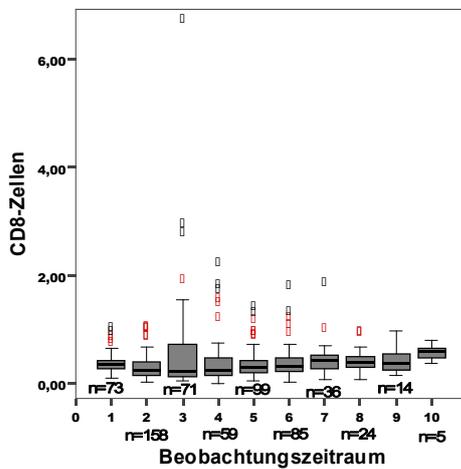
Adjuvant Arm A: Darstellung der Mittelwerte der CD4-T-Zellen im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10⁶ Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N** = Anzahl der Fälle

Abbildung 48:

Adjuvant Arm A: Darstellung der Mittelwerte der CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10^6 Zellen/ml]



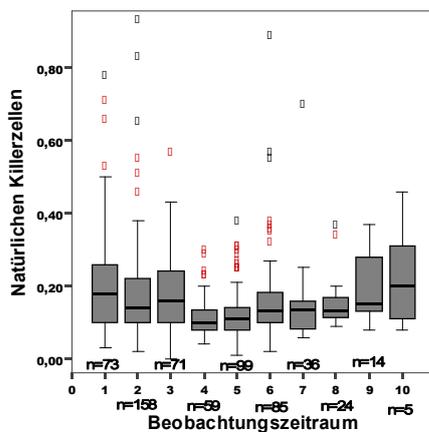
- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N = Anzahl der Fälle**

Bei

dem Extremwert von $6,66 \times 10^6$ /ml zum Zeitpunkt Abschluss handelte es sich um einen Eingabefehler. Dieser wurde ebenfalls für die weitere Auswertung herausgenommen. Die Gesamt-Lymphozyten und T-Lymphozyten dieser Patienten zum Zeitpunkt Abschluss wurden ebenfalls herausgenommen. Die restlichen Werte lagen zu diesem Zeitpunkt zwischen $0,05$ und $2,90 \times 10^6$ /ml.

Abbildung 49:

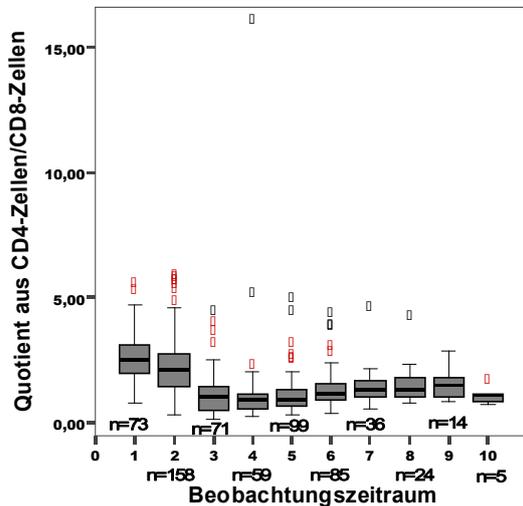
Adjuvant Arm A: Darstellung der Mittelwerte der Natürlichen Killerzellen im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10^6 Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N = Anzahl der Fälle**

Abbildung 50:

Adjuvant Arm A: Darstellung des Quotienten aus der Zellanzahl von CD4- und CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchung



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
 1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
 6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach \geq 6 Jahren
- **N** = Anzahl der Fälle

Der Extremwert von $16,0 \times 10^6/\text{ml}$ zum Zeitpunkt nach 3 Monaten wurde für die weitere Auswertung herausgenommen, da es sich ebenfalls um einen Eingabefehler handelte.

8.4. Anhang zu 4.3. Abschnitt B: Adjuvanter wachstumsfaktorgestützter dosisintensivierter Chemotherapie-Arm (Arm B)

Tabelle 15: Adjuvante Chemotherapie Arm B: Darstellung der Gesamt-Lymphozyten, T- und B-Lymphozyten im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung, unter Therapie, Abschluss und Nachbeobachtzeit von nach 3 bis 6 Monaten bis nach 6 und mehr Jahren unter Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittelwertes mit Standardfehler und Standardabweichung, des Medianwertes, Minimum, Maximum, 1., 2. und 3. Perzentile. Mittelwerte [x 10⁶ Zellen/ml]					
Beobachtungszeitraum		Gesamt-Lymphozyten	T-Lymphozyten	B-Lymphozyten	
Randomisierung	N	28	28	28	
	Mittelwert	1,7307	1,3084	,2250	
	Standardfehler des Mittelwertes	,10267	,08168	,01921	
	Median	1,5900	1,2000	,1950	
	Standardabweichung	,54330	,43220	,10163	
	Minimum	,83	,57	,12	
	Maximum	2,78	2,28	,53	
	Perzentile	25	1,3900	1,0625	,1500
		50	1,5900	1,2000	,1950
		75	2,1375	1,6003	,2795
	unter Therapie	N	60	60	60
		Mittelwert	1,5503	1,2350	,1706
		Standardfehler des Mittelwertes	,08666	,06520	,01945
Median		1,5000	1,2200	,1400	
Standardabweichung		,67125	,50503	,15069	
Minimum		,24	,23	,01	
Maximum		3,76	2,82	,65	
Perzentile		25	1,1275	,9175	,0500
		50	1,5000	1,2200	,1400
		75	1,9475	1,5975	,2400
Abschluss		N	32	32	32
		Mittelwert	,9803	,8489	,0402
		Standardfehler des Mittelwertes	,07602	,06946	,00859
	Median	,8900	,7250	,0300	
	Standardabweichung	,43005	,39292	,04860	
	Minimum	,32	,19	,00	
	Maximum	1,91	1,67	,21	
	Perzentile	25	,5925	,5300	,0100
		50	,8900	,7250	,0300
		75	1,3100	1,1750	,0400
	nach 3 bis 6 Monaten	N	26	26	26
		Mittelwert	,9242	,7366	,0955
		Standardfehler des Mittelwertes	,08707	,06858	,01450
Median		,8300	,6850	,0700	
Standardabweichung		,44395	,34968	,07392	
Minimum		,44	,37	,02	
Maximum		2,68	2,01	,35	
Perzentile		25	,7025	,4920	,0500

		50	,8300	,6850	,0700
		75	1,1050	,8175	,1325
nach 1 Jahr	N		42	42	42
	Mittelwert		1,1590	,8410	,1938
	Standardfehler des Mittelwertes		,05742	,04577	,01636
	Median		1,1500	,7981	,1850
	Standardabweichung		,37215	,29662	,10605
	Minimum		,13	,08	,04
	Maximum		2,01	1,55	,51
	Perzentile	25	,9400	,6350	,1100
		50	1,1500	,7981	,1850
		75	1,3650	1,0900	,2600
nach 2 Jahren	N		42	42	42
	Mittelwert		1,4212	,9869	,2805
	Standardfehler des Mittelwertes		,06096	,05352	,01852
	Median		1,4700	1,0050	,2750
	Standardabweichung		,39507	,34682	,12000
	Minimum		,22	,10	,04
	Maximum		2,22	1,62	,60
	Perzentile	25	1,1625	,7350	,2175
		50	1,4700	1,0050	,2750
		75	1,6625	1,2700	,3525
nach 3 Jahren	N		20	20	20
	Mittelwert		1,7635	1,1970	,3793
	Standardfehler des Mittelwertes		,08837	,05373	,04059
	Median		1,7950	1,2250	,3325
	Standardabweichung		,39519	,24030	,18155
	Minimum		1,09	,83	,14
	Maximum		2,61	1,77	,80
	Perzentile	25	1,4625	1,0450	,2278
		50	1,7950	1,2250	,3325
		75	2,0375	1,3200	,4775
nach 4 Jahren	N		10	10	10
	Mittelwert		1,6860	1,2370	,2800
	Standardfehler des Mittelwertes		,12866	,09065	,02925
	Median		1,6900	1,2800	,2700
	Standardabweichung		,40686	,28667	,09250
	Minimum		,97	,71	,17
	Maximum		2,19	1,55	,44
	Perzentile	25	1,4500	1,1125	,2000
		50	1,6900	1,2800	,2700
		75	2,0600	1,4475	,3600
nach 5 Jahren	N		8	8	8
	Mittelwert		2,1275	1,4375	,4913
	Standardfehler des Mittelwertes		,19871	,14733	,06016
	Median		1,8450	1,2950	,4600
	Standardabweichung		,56203	,41671	,17016
	Minimum		1,68	1,01	,28
	Maximum		3,15	2,21	,85

6 und mehr Jahre	Perzentile	25	1,7625	1,1750	,3775
		50	1,8450	1,2950	,4600
		75	2,6725	1,8025	,5525
	N	6	6	6	
	Mittelwert		1,6500	1,2183	,3000
	Standardfehler des Mittelwertes		,13221	,13350	,02671
	Median		1,5300	1,1300	,3150
	Standardabweichung		,32385	,32701	,06542
	Minimum		1,40	,92	,18
	Maximum		2,24	1,75	,36
	Perzentile	25	1,4000	,9200	,2625
		50	1,5300	1,1300	,3150
		75	1,9100	1,5325	,3450

Tabelle 16:
Adjuvante Chemotherapie Arm B:
Darstellung der CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen, des Quotienten aus CD4- zu CD8-T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen im Beobachtungszeitraum von der Randomisierung, unter Therapie, Abschluss bis zur Nachbeobachtungszeit von nach 3 bis 6 Monaten bis 6 und mehr Jahren unter Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittelwertes mit Standardfehler und Standardabweichung, des Medianwertes, Minimum, Maximum, der 1., 2., und 3. Perzentile. Mittelwerte [x 10⁶ Zellen/ml]

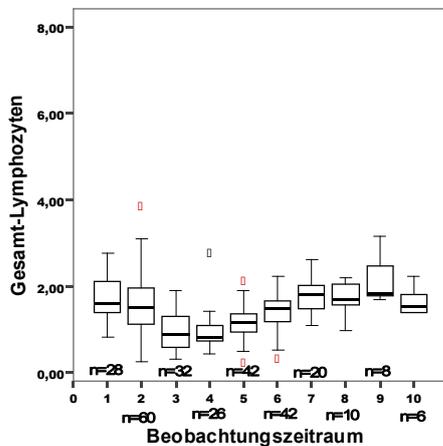
Beobachtungszeitraum		CD4-Zellen	CD8-Zellen	CD4/CD8	Natürliche Killerzellen	
Randomisierung	N	28	28	28	28	
	Mittelwert	,8145	,4276	2,1179	,1963	
	Standardfehler des Mittelwertes	,05341	,03385	,16157	,01905	
	Median	,7550	,3913	2,0836	,1750	
	Standardabweichung	,28261	,17911	,85495	,10081	
	Minimum	,32	,15	,60	,07	
	Maximum	1,45	,79	3,92	,52	
	Perzentile	25	,6475	,2925	1,5400	,1291
		50	,7550	,3913	2,0836	,1750
		75	1,0175	,5115	2,5629	,2375
	unter Therapie	N	60	60	59	60
		Mittelwert	,8311	,3628	2,4451	,1601
		Standardfehler des Mittelwertes	,04324	,02580	,10017	,01233
		Median	,8200	,2950	2,3191	,1450
Standardabweichung		,33490	,19981	,76940	,09547	
Minimum		,14	,08	,77	,02	
Maximum		1,62	1,02	4,64	,50	
Perzentile		25	,6050	,2300	1,8696	,0900
		50	,8200	,2950	2,3191	,1450
		75	1,0850	,4700	2,8621	,2075
Abschluss	N	32	32	32	32	
	Mittelwert	,5381	,2807	2,0316	,0978	
	Standardfehler des Mittelwertes	,04997	,02601	,13439	,00794	
	Median	,4600	,2450	2,0667	,0950	
	Standardabweichung	,28269	,14714	,76020	,04489	

	Minimum		,08	,10	,71	,03
	Maximum		1,07	,59	3,25	,21
	Perzentile	25	,3250	,1600	1,4157	,0600
		50	,4600	,2450	2,0667	,0950
		75	,7677	,3525	2,7471	,1300
nach 3 bis 6 Monaten	N		26	26	26	26
	Mittelwert		,4296	,2591	1,8285	,1006
	Standardfehler des Mittelwertes		,05071	,02120	,19118	,01002
	Median		,3650	,2400	1,6756	,1000
	Standardabweichung		,25859	,10809	,97485	,05108
	Minimum		,20	,11	,56	,02
	Maximum		1,47	,51	4,55	,27
	Perzentile	25	,2814	,1677	1,1342	,0600
		50	,3650	,2400	1,6756	,1000
		75	,5100	,3525	2,0297	,1300
nach 1 Jahr	N		42	42	42	42
	Mittelwert		,4590	,3504	1,5265	,1403
	Standardfehler des Mittelwertes		,02692	,02637	,10886	,01229
	Median		,4479	,3400	1,3529	,1200
	Standardabweichung		,17444	,17089	,70548	,07967
	Minimum		,05	,03	,49	,01
	Maximum		,83	,82	3,15	,41
	Perzentile	25	,3399	,2150	,9943	,0875
		50	,4479	,3400	1,3529	,1200
		75	,5850	,4730	2,0139	,1925
nach 2 Jahren	N		42	42	42	42
	Mittelwert		,5398	,3905	1,5596	,1583
	Standardfehler des Mittelwertes		,03218	,02852	,11465	,01257
	Median		,5400	,3350	1,2046	,1350
	Standardabweichung		,20852	,18484	,74302	,08145
	Minimum		,04	,05	,56	,04
	Maximum		1,14	,81	3,64	,48
	Perzentile	25	,3900	,2500	1,0342	,1075
		50	,5400	,3350	1,2046	,1350
		75	,6725	,5525	2,1544	,1925
nach 3 Jahren	N		20	20	20	20
	Mittelwert		,6857	,4443	1,7213	,1656
	Standardfehler des Mittelwertes		,04223	,03314	,17336	,01087
	Median		,6800	,4400	1,5089	,1550
	Standardabweichung		,18886	,14821	,77531	,04859
	Minimum		,35	,21	,80	,09
	Maximum		1,15	,70	3,24	,29
	Perzentile	25	,6000	,3100	1,1162	,1267
		50	,6800	,4400	1,5089	,1550
		75	,8000	,5825	2,1715	,1900
nach 4 Jahren	N		10	10	10	10
	Mittelwert		,7200	,4580	1,6515	,1540
	Standardfehler des Mittelwertes		,05835	,04381	,15125	,01765

	Median		,7400	,5050	1,5779	,1400
	Standardabweichung		,18451	,13855	,47829	,05582
	Minimum		,43	,24	1,10	,08
	Maximum		,98	,67	2,53	,26
	Perzentile	25	,5875	,3400	1,2355	,1200
		50	,7400	,5050	1,5779	,1400
		75	,8575	,5500	2,0087	,1850
nach 5 Jahren	N		8	8	8	8
	Mittelwert		,8563	,5150	1,9508	,1613
	Standardfehler des Mittelwertes		,08988	,08703	,29632	,01156
	Median		,8300	,4200	2,3971	,1750
	Standardabweichung		,25422	,24617	,83812	,03271
	Minimum		,49	,29	,68	,12
	Maximum		1,35	1,00	2,87	,20
	Perzentile	25	,7125	,3225	1,0725	,1225
		50	,8300	,4200	2,3971	,1750
		75	,9950	,6900	2,5476	,1875
6 und mehr Jahre	N		6	6	4	6
	Mittelwert		,7767	,4000	1,9445	,1717
	Standardfehler des Mittelwertes		,05566	,06683	,27179	,01740
	Median		,7800	,3100	1,9444	,1850
	Standardabweichung		,13633	,16371	,54358	,04262
	Minimum		,64	,28	1,37	,09
	Maximum		1,01	,63	2,52	,20
	Perzentile	25	,6400	,2800	1,4305	,1500
		50	,7800	,3100	1,9444	,1850
		75	,8600	,6000	2,4585	,2000

Abbildung 51:

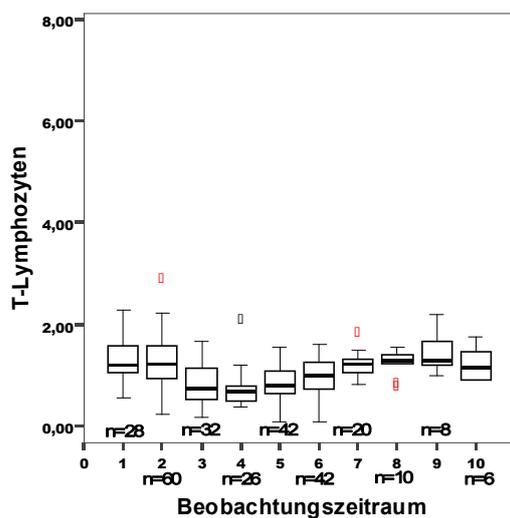
Adjuvant Arm B: Darstellung der Mittelwerte der Gesamt-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10^6 Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach \geq 6 Jahren
- **N = Anzahl der Fälle**

Abbildung 52:

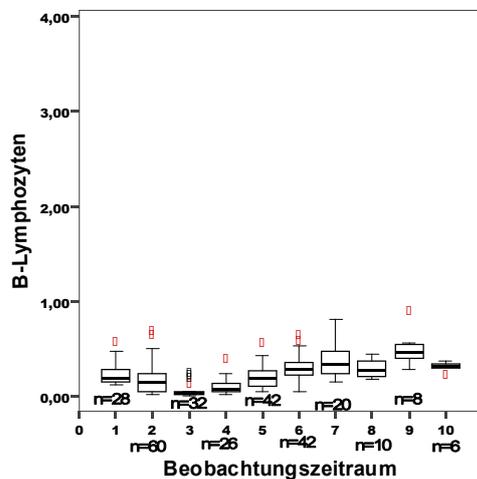
Adjuvant Arm B: Darstellung der Mittelwerte der T-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10^6 Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach \geq 6 Jahren
- **N = Anzahl der Fälle**

Abbildung 53:

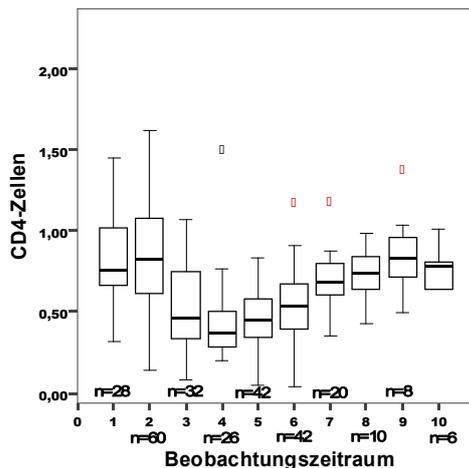
Adjuvant Arm B: Darstellung der Mittelwerte der B-Lymphozyten im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10^6 Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach \geq 6 Jahren
- **N = Anzahl der Fälle**

Abbildung 54:

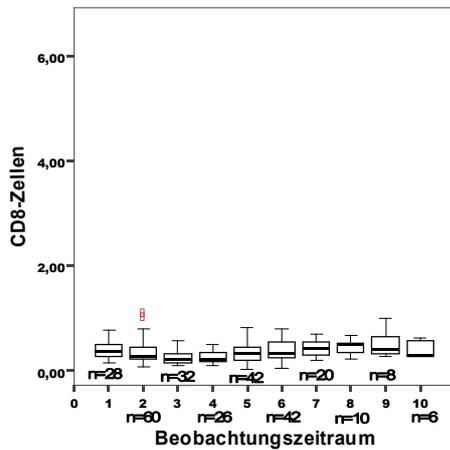
Adjuvant Arm B: Darstellung der Mittelwerte der CD4-T-Zellen im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10^6 Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach \geq 6 Jahren
- **N = Anzahl der Fälle**

Abbildung 55:

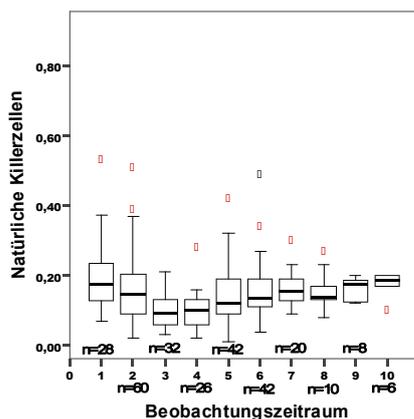
Adjuvant Arm B: Darstellung der Mittelwerte der CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10⁶ Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N** = Anzahl der Fälle

Abbildung 56:

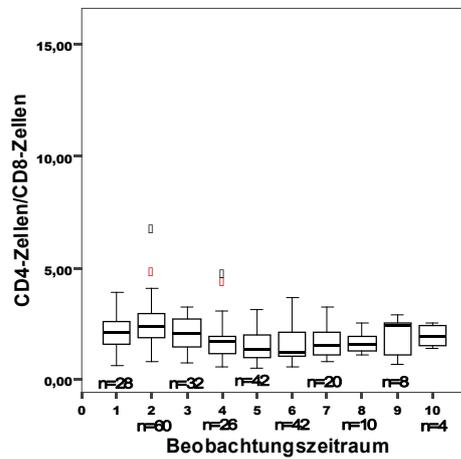
Adjuvant Arm B: Darstellung der Mittelwerte der Natürlichen Killerzellen im Verlauf der Untersuchung
Mittelwert x [10⁹ Zellen/ml]



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N** = Anzahl der Fälle

Abbildung 57:

Adjuvant Arm B: Darstellung Quotienten aus der Zellanzahl der CD4- und CD8-T-Zellen im Verlauf der Untersuchung



- ***= Ausreißer:**
- Werte, die mehr als 3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **0= Extremwerte:** Werte, die zwischen 1,5-3 Boxlängen von einem Ende der Box entfernt liegen
- **Whisker:** zeigen die Distanz vom Ende der Box zu den größten oder kleinsten Werten an, die weniger als 1,5 Boxlängen von beiden Enden der Box entfernt liegen
- **Box:** untere Begrenzung 1.Quartile, Medianlinie, obere Begrenzung 3.Quartiel
- **Beobachtungszeitraum:**
 1 = Randomisierung, 2 = unter Therapie, 3 = Abschluss, 4 = nach 3-6 Monaten, 5 = nach 1 Jahr,
 6 = nach 2 Jahren, 7 = nach 3 Jahren, 8 = nach 4 Jahren, 9 = nach 5 Jahren, 10 = nach ≥ 6 Jahren
- **N = Anzahl der Fälle**

Der Extremwert $6,54 \times 10^6/\text{ml}$ unter der Therapie wurde für die weitere Auswertung herausgenommen. Die weiteren Werte lagen zu diesem Zeitpunkt zwischen $0,77-4,64 \times 10^6/\text{ml}$.

8.5. Anhang zu 4.5. Vergleich der CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen in Arm A und Arm B bei Patientinnen mit einem Rezidiv

Tabelle 17:
Vergleich adjuvant Arm A und B bei Patientinnen mit einem Rezidiv und zum Zeitpunkt der Auswertung lebend:
Verlauf der CD4-T-Zellen

Mittelwert x 10⁶ Zellen/ml (Normalbereich 0,62-1,46 x 10⁶ Zellen/ml)
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes (Vergleich beider Arme zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt)

Beobachtungs-zeit- raum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittel- wert	Arm B Mittel- wert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	32	21,14	0,8526	0,8590	10	22,65	0,738
unter Therapie	72	43,67	0,5726	0,7629	24	63,00	0,003
Abschluss	35	19,54	0,2571	0,6062	13	37,85	0,000
3-6 Monate	25	14,50	0,2669	0,4230	10	26,75	0,001
1 Jahr	47	25,14	0,2923	0,5535	16	52,16	0,000
2 Jahr	45	26,28	0,4169	0,6280	20	48,13	0,000
3 Jahr	21	14,33	0,5382	0,7128	16	25,13	0,002
4 Jahr	15	10,10	0,5567	0,7238	8	15,56	0,065
5 Jahr	8	5,06	0,5450	0,9086	7	11,36	0,004
≥ 6 Jahr	4	5,50	0,7050	0,7767	6	5,50	1,000

Tabelle 18:
Vergleich adjuvant Arm A und B bei Patientinnen mit einem Rezidiv und zum Zeitpunkt der Auswertung lebend:
Verlauf der CD8-T-Zellen

Mittelwert x 10⁶ Zellen/ml (Normalbereich 0,23-0,73 x 10⁶ Zellen/ml)
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes (Vergleich beider Arme zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt)

Beobachtungs-zeit- raum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittel- wert	Arm B Mittel- wert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	32	20,50	0,3697	0,4410	10	22,65	0,358
unter Therapie	72	48,81	0,3386	0,2917	24	47,58	0,852
Abschluss	35	24,03	0,5354	0,2823	13	25,77	0,702
3-6 Monate	25	18,72	0,4865	0,2710	10	16,20	0,529
1 Jahr	47	30,80	0,3992	0,4236	16	35,53	0,372
2 Jahr	45	39,19	0,4272	0,4620	20	39,33	0,072
3 Jahr	21	19,21	0,5172	0,4529	16	18,72	0,892
4 Jahr	15	10,97	0,4393	0,4738	8	13,94	0,325
5 Jahr	8	7,31	0,4238	0,4857	7	8,79	0,536
≥ 6 Jahr	4	7,75	0,6225	0,4000	6	4,00	0,067

Tabelle 19:
Vergleich adjuvant Arm A und B bei Patientinnen mit einem Rezidiv und zum Zeitpunkt der Auswertung lebend: Verlauf des Quotienten aus der Zellzahl CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen

Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes (Vergleich beider Arme zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt)

Beobachtungs-zeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	Arm B Mittelwert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	32	22,53	2,5478	2,2281	10	18,20	0,343
unter Therapie	72	41,38	1,9630	2,6872	24	69,88	0,000
Abschluss	35	20,09	1,1596	2,1846	13	25,77	0,000
3-6 Monate	24	13,96	0,9846	1,7873	10	26,00	0,001
1 Jahr	47	27,26	1,0277	1,5443	16	45,94	0,000
2 Jahr	45	30,69	1,3686	1,4891	20	38,20	0,139
3 Jahr	21	15,79	1,3292	1,7280	16	23,22	0,037
4 Jahr	15	11,07	1,5123	1,6322	8	13,75	0,392
5 Jahr	8	6,25	1,5817	2,1322	7	10,00	0,121
≥ 6 Jahr	4	11,00	1,0991	1,9445	6	25,00	0,057

Tabelle 20:
Vergleich adjuvant Arm A und B bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben: Verlauf der CD4-T-Zellen

Mittelwert x 10⁶ Zellen/ml (Normalbereich 0,62-1,46 x 10⁶ Zellen/ml)

Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes (Vergleich beider Arme zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt)

Beobachtungs-zeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	Arm B Mittelwert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	13	142,50	0,9946	0,8460	6	7,92	0,282
unter Therapie	25	15,90	0,7072	0,8860	9	21,94	0,120
Abschluss	11	7,68	0,2922	0,3741	5	10,30	0,320
3-6 Monate	12	8,58	0,2499	0,4750	6	11,33	0,335
1 Jahr	13	10,31	0,3469	0,4446	10	14,20	0,186
2 Jahr	20	14,28	0,4655	0,5280	10	17,95	0,286
3 Jahr	11	7,14	0,5727	0,5300	2	6,25	0,769
4 Jahr	5	3,00	0,6720	-----	0	0,00	-----

Tabelle 21:
Vergleich adjuvant Arm A und B bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben: Ver-

lauf der CD8-T-Zellen							
Mittelwert x 10 ⁶ Zellen/ml (Normalbereich 0,23-0,73 x 10 ⁶ Zellen/ml)							
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes (Vergleich beider Arme zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt)							
Beobachtungs-zeit- raum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittel- wert	Arm B Mittel- wert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	13	7,81	0,3362	0,4349	6	14,75	0,009
unter Therapie	25	15,98	0,2571	0,3329	9	21,72	0,140
Abschluss	11	8,73	0,3720	0,1942	5	8,00	0,827
3-6 Monate	12	10,38	0,4796	0,2817	6	7,75	0,335
1 Jahr	13	11,85	0,3585	0,3146	10	12,20	0,927
2 Jahr	20	16,63	0,3845	0,3510	10	13,25	0,328
3 Jahr	11	7,41	0,3855	0,3050	2	4,75	0,410
4 Jahr	5	3,00	0,4960	-----	0	0,00	-----

Tabelle 22: Vergleich adjuvant Arm A und B bei Patientinnen mit einem Rezidiv, die im Beobachtungszeitraum verstarben: Ver- lauf des Quotienten aus der Zellzahl CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen							
Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes (Vergleich beider Arme zum jeweiligen Beob- achtungszeitpunkt)							
Beobachtungs-zeit- raum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittel- wert	Arm B Mittel- wert	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	p-Werte
Randomisierung	13	12,38	3,0246	1,9729	6	4,83	0,005
unter Therapie	25	17,42	2,7873	2,8172	9	17,72	0,939
Abschluss	11	7,32	1,3450	1,98,78	5	11,10	0,145
3-6 Monate	12	7,92	0,7983	1,6502	6	12,67	0,083
1 Jahr	13	10,00	1,2726	1,5326	10	14,60	0,115
2 Jahr	20	14,03	1,2626	1,6681	10	18,45	0,198
3 Jahr	11	6,91	1,5217	2,0940	2	7,50	0,923
4 Jahr	5	3,00	1,4043	-----	0	0,00	-----

8.6. Anhang zu 4.6. Darstellung der in vitro Funktionsteste der Lymphozyten im Therapiearm A und B: Vergleich der beiden Arme und deren Verlauf von der Randomisierung bis ein Jahr danach

Tabelle 23:
Adjuvant Arm A: Darstellung der in vitro Funktionsteste nach Stimulation mit Interleukin-2

Mittelwert x [counts/min], Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes

Beobachtungs-zeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	p-Werte
Randomisierung	58	*	28,2871	
unter Therapie	18	44,22	28,8277	0,208
Abschluss	43	49,28	20,7356	0,611
3-6 Monate	43	55,07	25,3266	0,229
1 Jahr	54	61,11	26,9706	0,147

Tabelle 24:
Adjuvant Arm A: Darstellung der in vitro Funktionsteste nach Stimulation mit anti- CD3

Mittelwert x [counts/min], Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes

Beobachtungs-zeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	p-Werte
Randomisierung	58	*	29,2802	
unter Therapie	18	34,11	27,8499	0,334
Abschluss	43	44,51	22,3367	0,055
3-6 Monate	43	52,86	42,4488	0,583
1 Jahr	54	58,57	35,7850	0,514

Tabelle 25:
Adjuvant Arm A: Darstellung der in vitro Funktionsteste nach Stimulation mit Phytohaemagglutinin

Mittelwert x [counts/min], Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes

Beobachtungs-zeitraum	Arm A Anzahl	Arm A Mittlerer Rang	Arm A Mittelwert	p-Werte
Randomisierung	58	*	81,6464	
unter Therapie	18	32,78	73,2426	0,208
Abschluss	43	41,02	44,3227	0,003
3-6 Monate	43	57,33	106,1152	0,062
1 Jahr	54	60,19	87,4464	0,247

Tabelle 26:

Adjuvant Arm B: Darstellung der in vitro Funktionsteste nach Stimulation mit Interleukin-2				
Mittelwert x [counts/min], Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes				
Beobachtungs-zeit-raum	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	Arm B Mittelwert	p-Werte
Randomisierung	22	*	15,9746	
unter Therapie	21	25,48	24,8789	0,076
Abschluss	21	24,52	31,8436	0,198
3-6 Monate	17	19,24	15,5593	0,726
1 Jahr	18	22,78	26,9928	0,274

Tabelle 27: Adjuvant Arm B: Darstellung der in vitro Funktionsteste nach Stimulation mit anti- CD3				
Mittelwert x [counts/min], Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes				
Beobachtungs-zeit-raum	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	Arm B Mittelwert	p-Werte
Randomisierung	22	*	28,6367	
unter Therapie	21	24,81	41,7826	0,152
Abschluss	21	25,43	56,5054	0,080
3-6 Monate	17	19,35	26,3477	0,769
1 Jahr	18	23,11	50,2452	0,209

Tabelle 28: Adjuvant Arm B: Darstellung der in vitro Funktionsteste nach Stimulation mit Phytohaemagglutinin				
Mittelwert x [counts/min], Angabe der Anzahl der Fälle, des Mittleren Ranges und des p-Wertes				
Beobachtungs-zeit-raum	Arm B Anzahl	Arm B Mittlerer Rang	Arm B Mittelwert	p-Werte
Randomisierung	22	*	55,2219	
unter Therapie	21	25,62	91,1294	0,065
Abschluss	21	24,00	76,7884	0,308
3-6 Monate	17	24,00	102,8093	0,055
1 Jahr	18	22,78	73,6826	0,274

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:	Nevim Karaoglu, geboren am 02.06.1969 in Bayburt/Türkei, geschieden, eine Tochter im Alter von 3 Jahren, deutsche Staatsangehörigkeit
Persönliches Ziel:	Fachärztin für Innere Medizin und Psychosomatische Medizin
Schul- und Berufsausbildung:	
1977-1989	Grundschule und Gymnasium in Hamburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1989-1992	Berufsfachschule für Physiotherapie an den Universitätskliniken Hamburg-Eppendorf Abschluss: Staatsexamen
Hochschulbildung:	
1992-1999	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
22.03.1995	Physikum
21.03.1996	1. Staatsexamen
30.03.1998	2. Staatsexamen
11.05.1999	3. Staatsexamen
Berufstätigkeit/Praktika:	
07/2007-heute	Weiterbildungsassistentin in der Psychosomatischen Klinik Bad Bramstedt
04/2004-06/2007	Weiterbildungsassistentin in den Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf <ul style="list-style-type: none">• Erfahrungen auf der multidisziplinären Intensivstation inkl. Intermediate Care und Stroke Unit• Erfahrungen auf der zentralen interdisziplinären Aufnahme- station• Betreuung onkologischer Patienten aus dem onkologi- schem MVZ des Hauses• Einsatz als Ärztin im Rettungsdienst• von 11/2005-06/2007 in Elternzeit
01/2000-03/2004	Ärztin im Praktikum und Weiterbildungsassistentin im St. Mar- tinus Krankenhaus Düsseldorf <ul style="list-style-type: none">• Stationäre Versorgung von Patienten aus dem gesamten Spektrum der Inneren Medizin einschließlich Intensivstation und Ambulanz• Selbstständige Tätigkeit in der diabetischen Fußambulanz• Betreuung von adipösen Patientin in einem Gewichtsreduk- tionsprogramm (Optifast)• Dozententätigkeit in der Krankenpflegeschule
04/1998-03/1999	Praktisches Jahr: <ul style="list-style-type: none">• Prof. Dr. Sandmann, Chirurgische Klinik und Poliklinik, HHU Düsseldorf• Prof. Dr. Dr. Tress, Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, HHU Düsseldorf• Prof. Dr. Atabay, Abteilung für Innere Medizin, Ege Univer- sität/Izmir

1993-1999

Physiotherapeutische Tätigkeit neben dem Studium:

- Teilzeittätigkeit in der Rotkreuzklinik Würzburg
- Tätigkeit in Physiotherapiepraxen mit orthopädischen, chirurgischen, neurologischen Schwerpunkten und Schmerzpatienten
- Leitung von Gruppen für orthopädischer Rückenschule und funktioneller Gymnastik

Zusatzqualifikationen:

- Fachkunde im Strahlenschutz
- Fachkunde Rettungsdienst
- Grundkurs Abdomensonographie
- Grundkurs farbkodierte Duplexsonographie
- Kurs Intensivmedizin
- Basiskurs Aktuelle Schrittmachertherapie
- Grundlagen Echokardiographie
- Neuromedizinisches Fortbildungszentrum Bad Harsfeld: Kreuzschmerz, Kopfschmerz, Periost- und Kolonbehandlung
- Manuelle Medizin T1- und E1-Kurs
- Orthopädische Rückenschule

Sprachkenntnisse:

Türkisch, Englisch

Hobbys:

Yoga, Nordic Walking, Lesen