

Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Franziska Schmidt

geboren am 23.08.1980 in Saalfeld/Saale

Gutachter

- 1. PD Dr.med. Herbert G. Sayer, Universitätsklinikum Jena, Klinik für Innere Medizin III**
- 2. Prof. Dr. med. James F. Beck, Universitätsklinikum Jena, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin**
- 3. Prof. Dr. med. Nadeszda Basara, Universitätsklinikum Leipzig, Abteilung für Hämatologie/ Onkologie**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08.02.2010

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AL	Akute Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ARA-C	Arabinosyl-Cytosin
ATG	Antithymozytenglobulin
AUL	Akute undifferenzierte Leukämie
BMT	Bone Marrow Transplantation
Bu	Busulfan
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CP	Chronische Phase
CR	Complete remission
CSA	Cyclosporin A
Cy	Cyclophosphamid
DLI	Donor lymphocyte infusion
EBMT	European Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
Eto	Etoposid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fam	Familienspender
Flu	Fludarabin
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
ges	gesamt
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GVHD	Graft-versus-host Disease
GvL	Graft-versus-leukaemia
GvT	Graft-versus-tumor
Gy/cGy	Gray/centiGray
HKT	Hämatokrit
HLA	Human leukocyte antigen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HTLV	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus

HSV	Herpes-simplex-Virus
IL	Interleukin
klass	klassisch
KG	Körpergewicht
KMT	Knochenmarktransplantation
KOF	Körperoberfläche
Mb.	Morbus
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mel	Melphalan
MHC	Major histokompatibility complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
MRD	Minimal residual disease
MTX	Methotrexat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PR	Partielle Remission
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Exzess an Blasten
RAEBt	Refraktäre Anämie mit Exzess an Blasten in Transformation
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
PBSCT	Peripheral blood stem cell transplantation
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PCP	Pneumocystis carinii-Pneumonie
red	reduziert
Rem	Remission
RIC	Reduced intensity conditioning
RT-PCR	Real-time-Polymerase chain reaction
sAML	sekundäre AML
TBI	Total body irradiation
Thio	Thiotepa
TRM	Therapy-related-mortality
Tx	Transplantation
vs.	versus
VUD	Volunteer unrelated donor
VZV	Varizella-Zoster-Virus
WR	Wachstumsrate
ZNS	Zentrales Nervensystem

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Die wichtigsten Indikationen für die allogene Stammzelltransplantation	5
Tabelle 2:	Patientendaten	31
Tabelle 3:	Normwerte der Lymphozytensubpopulationen und der CD4/CD8-Ratio	36
Tabelle 4:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation .	39
Tabelle 5:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die übertragene Stammzellmenge	39
Tabelle 6:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die übertragene CD3 ⁺ -Menge	40
Tabelle 7:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach der Spenderauswahl.....	43
Tabelle 8:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach Spendergeschlecht.....	44
Tabelle 9:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach Spendergeschlecht (Hochrisiko).....	44
Tabelle 10:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Grundkrankheit	45
Tabelle 11:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf das Krankheitsstadium.....	49
Tabelle 12:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf das Empfängeralter	49
Tabelle 13:	Geschlechtsbezogene lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation	50
Tabelle 14:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Konditionierung	55
Tabelle 15:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach GVHD-Stadium.....	56
Tabelle 16:	Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf eine CMV-Infektion	60

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Einteilung der akuten GVHD	23
Abbildung 2: Infektionsphasen nach allogener Stammzelltransplantation	25
Abbildung 3: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltrans- plantation	37
Abbildung 4: Immunrekonstitution der CD3-positiven Zellen bei Fremd- und Familien- spende nach allogener Stammzelltransplantation.....	41
Abbildung 5: Immunrekonstitution der CD8-positiven Zellen bei Fremd- und Familien- spende nach allogener Stammzelltransplantation.....	42
Abbildung 6: HLA-Kompatibilität bei Fremd- und Familienspende.....	43
Abbildung 7: Immunrekonstitution der CD19-positiven Zellen bei CML und AL nach allogener Stammzelltransplantation.....	46
Abbildung 8: Immunrekonstitution der CD56-positiven Zellen bei CML und AL nach allogener Stammzelltransplantation.....	47
Abbildung 9: Immunrekonstitution der CD8-positiven Zellen bei männlichen und weiblichen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation.....	51
Abbildung 10: Immunrekonstitution der CD4-positiven Zellen nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Konditionierung.....	53
Abbildung 11: Immunrekonstitution der CD19-positiven Zellen nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Konditionierung.....	54
Abbildung 12: Auftreten der Graft-versus-Host Disease nach allogener Stammzell- transplantation.....	55
Abbildung 13: Immunrekonstitution der CD19-positiven Zellen abhängig vom Auftreten einer GVHD nach allogener Stammzelltransplantation	57
Abbildung 14: Immunrekonstitution der CD56-positiven Zellen abhängig vom Auftreten einer GVHD nach allogener Stammzelltransplantation	58
Abbildung 15: Konditionierung in den einzelnen Lebensabschnitten	72

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	v
TABELLENVERZEICHNIS.....	vii
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	viii
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Formen der Stammzelltransplantation	4
2.2 Indikationen für Stammzelltransplantationen	4
2.3 Stammzellquellen und Stammzellgewinnung	9
2.4 Der Haupthistokompatibilitätskomplex	12
2.5 Konditionierungsregime	13
2.5.1 Neue Konditionierungsregime	16
2.6 Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation	18
2.7 Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation	20
2.7.1 Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion (Host-versus-Graft)	20
2.7.2 Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host)	21
2.7.3 Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation	24
2.7.4 Rezidive nach allogener Stammzelltransplantation	27
2.7.5 Minimale Reststerkrankung	28
3 ZIELE DER ARBEIT	29
4 METHODIK	30
4.1 Patienten	30
4.1.1 Vorbereitende Protokolle für die allogene Stammzelltransplantation	32
4.1.2 Supportive Care	32
4.1.3 Prophylaxe gegen die Graft-versus-Host Disease	33
4.1.4 Stammzellquellen und Stammzellverarbeitung	33
4.2 Methoden	33
4.2.1 Grundlagen für die Charakterisierung von Lymphozyten anhand des Phänotypus	34
4.2.2 Analyse von Lymphozytensubpopulationen aus dem peripheren Blut	34
4.2.3 Normalwerte der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut	35
4.2.4 Statistische Analyse	36
5 ERGEBNISSE	37
5.1 Immunrekonstitution der lymphozytären Zellreihen nach allogener Stammzelltransplantation	37

5.2	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Anzahl an transplantierten Stammzellen (CD34 ⁺)	39
5.3	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Anzahl an transplantierten CD3-positiven Spenderzellen	40
5.4	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger	40
5.5	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Geschlecht des Spenders	44
5.6	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Grundkrankheit	45
5.7	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Krankheitsstadium	48
5.8	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Alter des Empfängers	49
5.9	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Geschlecht des Empfängers	50
5.10	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Konditionierung	52
5.11	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Auftreten der Graft-versus-Host Disease	55
5.12	Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Auftreten einer CMV-Infektion	59
6	DISKUSSION	61
6.1	Einführung	61
6.2	Diskussion der Ergebnisse	62
6.3	Perspektiven	78
7	SCHLUSSFOLGERUNG	79
8	LITERATURVERZEICHNIS	81
9	ANHANG	96
9.1	Lebenslauf	96
9.2	Danksagungen	97
9.3	Ehrenwörtliche Erklärung	98

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die allogene Stammzelltransplantation offeriert Patienten mit hämatologischen und nicht-hämatologischen Erkrankungen nach entsprechender Indikationsstellung eine potentiell kurative Behandlungsmöglichkeit. Jedoch ist sie immer noch behaftet mit einer hohen therapieassoziierten Mortalität, die die ständige Suche nach Optimierung des Therapieregimes möglichst innerhalb klinischer Studien mehr als rechtfertigt.

Diese retrospektive Datenanalyse untersucht als prognostischen Faktor die lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation bei 71 Patienten, die zwischen 1997 und 2002 im Transplantationszentrum der Inneren Klinik II des Universitätsklinikums Jena behandelt wurden, davon 27 Frauen und 44 Männer im mittleren Alter von 42 Jahren. Hauptdiagnosen waren chronische und akute Leukämien. Es wurden hauptsächlich mobilisierte periphere Blutstammzellen als Stammzellquelle eingesetzt. Verschiedene Faktoren beeinflussen nach dem augenblicklichen Kenntnisstand das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Dies sind die Anzahl der CD34-positiven Stammzellen und CD3-positiven Zellen im Transplantat, die HLA-Kompatibilität von Spender und Empfänger, die Grunderkrankung des Patienten, der Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Transplantation, das Alter des Patienten, die Konditionierungsbehandlung sowie das Auftreten einer Unverträglichkeitsreaktion (GVHD) oder einer symptomatischen CMV-Infektion. Das Forschungskonzept dieser Arbeit untersucht und hinterfragt insbesondere modulierbare Einflussgrößen, um die Erfolgsaussichten einer allogenen Stammzelltransplantation zu verbessern. Die lymphozytäre Immunrestitution wurde dabei anhand der absoluten Zellzahlen/ μl im peripheren Blut (T-, B- und NK-Zellen) mithilfe einer standardisierten immunphänotypischen Analyse (FACS-Analyse = fluorescence activated cell sorting) vor allogener Stammzelltransplantation sowie im Verlauf zwei, drei und fünf Monate nach Transplantation aufgezeichnet. Zur Prüfung eines signifikanten Zellwachstums an den unterschiedlichen Messpunkten wurde der Test von Wilcoxon verwendet. Anhand oben genannter unterschiedlicher Einflussgrößen auf die Transplantation wurden die Patienten jeweils Kohorten zugeordnet und mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests auf mögliche Unterschiede in der Immunrestitution der Lymphozytensubgruppen überprüft: Die lymphozytäre Immunrestitution verlief in allen untersuchten Zellsubpopulationen regelhaft. CD8⁺- und CD56⁺-Zellen konnten

schon kurz nach Transplantation Normwerte erzielen. Unter dem Therapieregime der Stammzelltransplantation litten am meisten die CD19⁺-Zellen, gefolgt von den CD4⁺-Zellen. Patienten mit akuten Leukämien zeigten hinsichtlich der Immunrestitution bessere Ergebnisse nach Transplantation, als Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie. Älteren Patienten (> 50 Jahre) und Patienten mit Komorbiditäten kann eine Transplantation ermöglicht werden, vorausgesetzt das Konditionierungsregime ist dem Risikoprofil angepasst. Eine reduzierte Konditionierung ist der klassischen Konditionierung hinsichtlich einer schnelleren lymphozytären Immunrestitution zu bevorzugen. Es wurde insgesamt ein verringertes Auftreten einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GVHD), insbesondere auch schwerer Formen nach dosisreduzierter Konditionierung, beobachtet. 40% der Patienten entwickelten nach Transplantation eine schwere GVHD der Grade 2 bis 4. Risikofaktoren waren ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium, HLA-Inkompatibilität, akute Leukosen, Prophylaxe mit CSA allein oder in Kombination mit MMF. Die Haupteffektorzellen der GVHD und einer symptomatischen CMV-Infektion sind CD8⁺-Zellen. Dies ist hervorzuheben, da das eingesetzte Antithymozytenglobulin (ATG) zur GVHD-Prophylaxe bei dosisreduzierter Konditionierung laut unseren Daten vornehmlich auf CD4⁺-Zellen wirkt. 30% der Transplantierten entwickelten eine symptomatische CMV-Infektion. Der symptomatisch werdenden CMV-Infektion geht wahrscheinlich eine CD4⁺-Zelldepression voraus. Für Patienten mit einem vollkompatiblen Familienspender konnte eine verbesserte lymphozytäre Immunrestitution sowie eine geringere GVHD-Inzidenz gezeigt werden. Das Empfängergeschlecht, die Anzahl von CD34-positiven Stammzellen und CD3⁺-Lymphozyten im Transplantat hatten insgesamt keinen wesentlichen Einfluss auf die Immunrestitution.

Diese Arbeit stellt zusammenfassend den klinisch bedeutsamen Vorteil einer dosisangepassten reduzierten Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation heraus. Damit können auch Patienten höheren Lebensalters und/oder mit Komorbiditäten einer allogenen Stammzelltransplantation zugeführt werden. Durch eine dosisreduzierte Konditionierung kann bei erhaltenem therapeutischem Antileukämie-Effekt eine Senkung der Gesamtmortalität und eine gute Langzeitüberlebensrate erzielt werden. Dies scheint sich in der beschleunigten Entwicklung der lymphozytären Zellreihen (=Immunrestitution) nach Transplantation zu zeigen.

2 EINLEITUNG

Die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen wurde erstmals im Jahre 1968 bei zwei Patienten mit einem angeborenen schweren Immundefekt durchgeführt. Das Prinzip, eine maligne bzw. insuffiziente Hämatopoese eines Patienten mit der Verpflanzung von gesunden Stammzellen eines Spenders zu therapieren, war damit eine praktische klinische Option geworden. Seitdem findet eine ständige Erweiterung des Indikationsbereiches für Stammzelltransplantationen statt. Die Anwendung der Stammzelltransplantation ist immer noch verbunden mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität und rechtfertigt eine spezialisierte klinische Einheit. 2006 wurden allein in Europa 25050 allogene und autologe hämatopoetische Stammzelltransplantationen durchgeführt, 21335 davon als Ersttransplantationen (Gratwohl et al. 2007).

Alle Blutzellen eines Individuums gehen aus einer kleinen Anzahl langlebiger Stammzellen hervor, die im Knochenmark des Erwachsenen sowie in der fetalen Leber und Milz ansässig sind. Morphologisch sind sie von weißen Blutzellen nicht zu unterscheiden, exprimieren jedoch das CD34⁺-Oberflächenantigen, welches mit Hilfe spezieller Selektionsmarker identifiziert werden kann.

Hämatopoetische Stammzellen sind fähig, sich unter Erhalt einer Pluripotenz selbst zu replizieren oder in erythroide, myeloide, megakaryozytische und lymphoide Linien (sogenannte „committed cells“) überzugehen. Reifen Stammzellen heran, ist dies durch einen schrittweisen Verlust ihrer Differenzierungsmöglichkeiten gekennzeichnet. Maximow postulierte im Jahre 1909 erstmals die Pluripotenz von hämatopoetischen Stammzellen und legte somit den Grundstein für die Idee der Knochenmarktransplantation als Therapie von malignen und nicht-malignen Erkrankungen. Seien sie körpereigen oder auch gespendet, können Stammzellen die gesamte Hämatopoese und Lymphopoese eines Menschen nach besonderer Vorbehandlung andauernd rekonstituieren.

Es konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen Zugang zu vielen Geweben haben und in der Lage sind, auch andere Gewebezellen auszudifferenzieren (Übersicht bei Kasper et al. 2001). Dabei spielt vermutlich der Vorgang der Transdifferenzierung eine große Rolle.

2.1 Formen der Stammzelltransplantation

Man unterscheidet bei der Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen, ob es sich um eine Eigenspende handelt (autologe Stammzelltransplantation) oder diese von einem anderen Individuum (allogene Stammzelltransplantation) stammen. Dabei dient die allogene Transplantation dem totalen Ersatz des körpereigenen hämatolymphopoetischen Systems durch körperfremde Zellen vom Spendertyp (z.B. von Geschwistern, anderen Familienmitgliedern, Fremd Spendern oder von Plazentarestblut). Sie ist aufwendiger und risikoreicher als eine autologe Transplantation, da die körperfremden Spenderstammzellen auch langfristig vom Empfänger toleriert werden müssen. Durch eine Konditionierungstherapie und einen Graft-versus-Tumor-Effekt (GVT/GVL), der nur durch eingebrachte körperfremde immunkompetente Zellen erzielt werden kann (Kienast et al. 2002), ist die allogene Stammzelltransplantation aber auch tumorreduktiver. Demnach zeigt die allogene Transplantation weniger Rezidive, ist aber mit einer höheren Mortalität behaftet als die autologe Transplantation. Die günstigste allogene Übertragungsform ist die „syngene“ Transplantation, bei der Stammzellen des anderen Zwillinges ohne genetische Abweichung übertragen werden können. 2006 waren 50% der allogenen Transplantate in Europa von HLA-identischen Geschwistern, 5% von anderen Familienmitgliedern, 0,5% vom syngenetischen Zwilling und 44% von unverwandten freiwilligen Spendern (Gratwohl et al. 2007).

Die autologe Transplantation kann die Aplasiezeit nach Hochdosisradio- und Chemotherapie durch eine im Vorfeld gewonnene „Stammzellreserve“ überbrücken und dadurch eine 4-30fache Dosisintensivierung der zytoreduktiven Vortherapie ermöglichen. Dabei ist die Therapieintensität mit der Tumorreduktion eng korreliert. Vorteilhaft an dieser Transplantationsform ist, dass keine Probleme mit der Verfügbarkeit von Spendern auftreten und es aufgrund der Gewebeverträglichkeit weniger Komplikationen nach Transplantationen gibt.

2006 waren 39% der Stammzelltransplantationen in Europa allogene und 61% autolog (Gratwohl et al. 2007).

2.2 Indikationen für Stammzelltransplantationen

Bei der Indikationsstellung zur Stammzelltransplantation müssen im Besonderen die Diagnose, das Krankheitsstadium und das Patientenalter berücksichtigt werden.

Grundsätzlich kann vermerkt werden, dass für autologe Transplantationen zirka 60 bis 70 Jahre und für allogene Transplantationen mit verwandten oder unverwandten Spendern 60 bis 65 Jahre als Altersgrenze empfohlen wird. Natürlich sollten diese Grenzen im Einzelfall individuell verschoben werden.

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Indikationen für die allogene Stammzelltransplantation.

Grunderkrankung	Zeitpunkt der allogenen Stammzelltransplantation
AML	1. CR (Familienspender, falls initial keine zytogenetisch günstige AML-Form), 2. und 3. CR, Rezidiv und Nichtansprechen auf Induktionstherapie
ALL	1. CR nur bei Hochrisikopatienten und Höchststrisikopatienten (z.B. bcr/abl-positive ALL), ansonsten 2. und 3. CR, Rezidiv
CML	bei Nichtansprechen einer Imatinib-Therapie, Entstehung einer Tyrosinkinaseinhibitorresistenz, Blastenkrise nach Erzielen der 2. chronischen Phase, Versagen einer Fludarabin-haltigen Therapie
CLL	bei raschem Rezidiv , schlechtem Therapieansprechen
NHL lymphoblastisch hoch-,niedrig-und mittelgradig maligne	wie ALL in fortgeschrittenen Stadien, wenn keine autologe Transplantation möglich
Morbus Hodgkin	1. Rezidiv , 2. und 3. CR, Nichtansprechen auf Therapie, keine autologe Transplantation möglich
Multiples Myelom	< 55 Lebensjahre, bei Nichtansprechen auf die first-line-Therapie
MDS	1. oder 2. CR bei RA, RARS, RAEB, CMML, RAEBt, sAML
Aplastische Anämie	<45 Lebensjahre

Tabelle 1: Die wichtigsten Indikationen für die allogene Stammzelltransplantation

Autologe Transplantationen kommen weiterhin für Patienten mit soliden Tumoren (z.B. Bronchialkarzinome, Keimzelltumore) nach Therapieintensivierung und bei Autoimmunkrankheiten wie rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose in Betracht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Haupteinsatzgebiete für die Transplantation von Stammzellen 2006 bei den Leukämien (32%, davon 85% allogenen), den Lymphomen (56%, davon 89% autolog), bei soliden Tumoren (6%, davon 95% autolog) und nichtmalignen Erkrankungen (5%, davon 90% allogenen) lagen (Gratwohl et al. 2007).

Bezogen auf das in dieser Studie vorliegende Hauptpatientengut soll kurz auf die Leukämien als Grundkrankheit eingegangen werden:

Leukämien können auf die Veränderung einzelner klonogener Zellen zurückgeführt werden und auf verschiedenen Ebenen der hämatopoetischen Differenzierung stattfinden.

Die **chronische myeloische Leukämie (CML)** gehört zu den myeloproliferativen Erkrankungen und hat eine Inzidenz von etwa 2/100000 Einwohner pro Jahr. Sie verläuft je nach Blastenanteil im peripheren Blut dreistufig mit der stabilen chronischen Phase (<10% Blasten, zirka sechs Jahre Dauer), der Akzelerationsphase und der Blastenkrise (>30% Blasten, meist extramedulläre Blasteninfiltration, innerhalb weniger Monate zum Tode führend). Man findet im Differenzialblutbild eine exzessive Proliferation der Granulopoese mit Linksverschiebung (Leukozytose 30×10^9 Zellen/ μl im peripheren Blut), eine Thrombozytose und eine Eosino- und Basophilie („buntes Blutbild“). Unspezifische Symptome wie Leistungsabfall, Ermüdbarkeit, Gewichtsverlust, Knochenschmerzen sowie Organomegalien prägen das klinische Bild. Nach Sicherung der Diagnose sollte umgehend mit einer Therapie begonnen werden, da die mediane Überlebenszeit der Erkrankung unter konventioneller Therapie nach Diagnose bei vier bis fünf Jahren liegt. Bis zum Ende der achtziger Jahre bestand die Initialtherapie aus Busulfan oder später aus Hydroxyurea. Die Fünf-Jahres-Überlebensraten liegen bei beiden Substanzen bei 33% bzw. 44%. Eine neue Ära der CML-Therapie wurde dann mit der Erprobung von Interferon- α durch Talpaz und Mitarbeiter eingeleitet. Patienten mit CML können, therapiert mit Interferon- α , zu 70-80% eine hämatologische Remission (Normalisierung von Blutbild, Milzgröße, Beschwerdesymptomatik), und zu 5-10% sogar eine zytogenetische Remission (Verschwinden des bcr/abl-Zellklones) erwarten. Sie überleben länger als mit herkömmlichen Chemotherapeutika, jedoch werden Rezidive beobachtet. Auch Stammzelltransplantationen wurden, wie in der vorliegenden Studie, als weitere Therapieoption durchgeführt. Das Therapieansprechen liegt bei Stammzelltransplantation in der chronischen Phase zwischen 50-70% bei einer Fünf-Jahres-Überlebensrate zwischen 40 - 70%. Bei 95% der CML-Patienten liegt die „Philadelphia-Translokation“ $t(9; 22)$ als zytogenetische Aberration zugrunde. Die Behandlung der Patienten mit dem ABL-Thyrosinkinaseinhibitor STI-571 [Imatinib (Glivec®)] führt heute bei über 90% der Patienten zu einer hämatologischen und

sogar bei 50% zu einer zytogenetischen Remission und kann auch in der Blastenkrise noch wirksam sein. Der Einsatz von Imatinib hat die Behandlung der CML revolutioniert und gilt heute als Standardtherapie.

Mit 33% nimmt die **chronische lymphatische Leukämie (CLL)** den Hauptteil aller Leukämien bei einer Inzidenz von 1,5-2,5 pro 100000 Einwohner ein. Sie wird als niedrigmalignes Non-Hodgkin-Lymphom klassifiziert. Der Altersmedian liegt bei 70 Jahren. Deletionen der Chromosomen 6,11,13,17 sowie die Trisomie 12 werden häufig als zytogenetische Aberrationen beobachtet. Es kommt zu einer langsamen Akkumulation morphologisch reif erscheinender lymphatischer Zellen im Knochenmark, im peripheren Blut und in lymphatischen Organen. Die Erkrankung zeigt sich zu 95% als B-CLL mit Panzytopenie und Antikörpermangel als Zeichen der zunehmenden Knochenmarkinsuffizienz. Gebräuchlich sind die Einteilungen nach Rai und Binet, die sich nach der Tumormasse richten. Leukozytose ($>15 \times 10^9$ Zellen/ μl peripheren Blutes), B-Symptomatik, besonders mediastinale und abdominelle Lymphknotenschwellungen, Infektanfälligkeit und Organomegalien prägen das klinische Bild. Fünf bis zehn Jahre kann je nach Stadium ein beschwerdefreies Leben möglich sein, gefolgt von einer ein- bis dreijährigen progredienten Krankheitsphase, die durch das Ausmaß der Anämie, Granulozytopenie und Thrombozytopenie bestimmt wird. Die Indikation zur chemotherapeutischen Therapie muss sorgfältig und anhand von krankheitsbedingten Komplikationen (z.B. progrediente Lymphadenopathie, massive Splenomegalie, Autoimmunhämolyse etc.), gestellt werden („watch-and-wait“-Strategie), da sie in jedem Fall palliativ ist und in Studien eine vorzeitige Therapie keinen Überlebensvorteil zeigte. Die Gabe von Chlorambucil über mehrere Monate mit oder ohne Prednisolon (sogenanntes Knospe-Schema) galt zunächst als Primärtherapie. Neue primäre Therapieoptionen bieten Purinanaloga (z.B. Fludarabin), die längere Remissionen und somit einen Zugewinn an Lebensqualität versprechen. Auch der Einsatz monoklonaler Antikörper wird erprobt (z.B. der CD20⁺-Antikörper Rituximab). Kandidaten für eine Stammzelltransplantation bei chronischer lymphatischer Leukämie sind Patienten mit ungenügendem Ansprechen oder schnellen Rezidiven nach Nukleosidanaloga-therapie (z.B. Fludarabin).

Mit einer Inzidenz von 2,3/100000 Einwohner pro Jahr kommt die **akute myeloische Leukämie (AML)** zu 80% bei Erwachsenen mit einem medianen Alter zwischen 62-64 Jahren vor. Acht Subtypen lassen sich nach der FAB-Klassifikation

unterscheiden. Häufig werden zytogenetische Aberrationen der Chromosomen 5, 7 und 11 [$t(8; 21)$, $t(15; 17)$, Inversion 16] gefunden. Behandlungsziel der Induktionstherapie muss immer die komplette Remission (CR) sein. Eine Normalisierung des Blutbildes und eine zytologische Remission (<5% leukämische Zellpopulationen im Knochenmark) werden angestrebt. Als Goldstandard der Induktionstherapie dient Cytosin-Arabinosid (ARA-C) kombiniert mit Antracyclin (meist Daunorubicin). Eine Remissionsrate von bis zu 75-80 % kann so erreicht werden. Diese Therapieform wird aber nur bei Patienten bis 65 Jahren aufgrund des Nebenwirkungsprofils angeraten. Eine Postremissionstherapie ist unerlässlich, da der leukämische Klon keinesfalls endgültig eliminiert ist. Die aggressive Polychemotherapie der akuten Leukämien hat in den letzten Jahren Fortschritte gemacht und kann das mediane Überleben der Patienten von drei bis vier Monaten auf eineinhalb bis zwei Jahre verlängern. Jedoch erleiden viele Patienten mit AML oder mit Hochrisiko-ALL immer noch leukämische Rezidive und versterben. Drei Therapieoptionen bestehen nach initialer Induktionstherapie: eine intensivierte Erhaltungs-/Konsolidierungstherapie (10-20% Letalität), eine autologe Stammzelltransplantation (weniger Rezidive, aber kein Überlebensvorteil gegenüber konventioneller Chemotherapie) oder die allogene Stammzelltransplantation. Bei akuter myeloischer Leukämie sollte in der ersten Komplettremission möglichst mit einem Familienspender transplantiert werden, es sei denn, es liegt ein günstiger Subtyp vor (siehe Tabelle 1). Nur 20-40% der AML-Patienten erreichen nach Polychemotherapie ein rezidivfreies Langzeitüberleben, wobei mit einer Stammzelltransplantation in der ersten Vollremission 40-70% der Patienten drei bis vier Jahre rezidivfrei überleben (Schaefer et al. 1991, Heil et al. 2002). Transplantiert man im Rezidiv lassen sich nur zirka 20% der Patienten heilen. Im Allgemeinen hat die Stammzelltransplantation das höhere antileukämische Potential, da sie auch im Rezidiv noch „heilen“ kann, was mit der konventionellen Chemotherapie in der Regel nicht gelingt.

Die **akute lymphatische Leukämie (ALL)** besitzt eine Gesamtinzidenz von 1,1/100000 Einwohner pro Jahr und ist am häufigsten im Kindesalter. Ein zweiter Häufigkeitsgipfel liegt im Alter über 80 Jahren. Man unterscheidet anhand biologischer, klinischer und prognostischer Merkmale verschiedene Subtypen. Die ALL zeigt sich meist durch die zunehmende Knochenmarkinsuffizienz in einer rasanten Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit Thrombozytopenie (Petechien, Zahnfleischbluten), Granulozytopenie (Infektionen) und Anämie (Blässe,

Tachykardie, Müdigkeit). Die meisten Patienten weisen eine Leukozytose (>10000 Zellen/ μl im peripheren Blut) mit leukämischen Blasten auf. Verschiedene Organe wie Milz, Leber, Niere und ZNS können leukämisch infiltriert werden. Unbehandelt verläuft die ALL über wenige Monate letal. Entscheidend für die Diagnosestellung und Subtypenbestimmung ist die Immunphänotypisierung mit monoklonalen Antikörpern. Mittels Zytogenetik können prognostisch wichtige numerische oder strukturelle Aberrationen [z.B. $t(9;22)$; $t(4;11)$] identifiziert werden. Die Kombinationschemotherapie in mehreren Zyklen (Induktion, Konsolidation und Erhaltung) dient als Standardtherapie. Eine Induktionstherapie soll die Blastenzahl rasch reduzieren und beinhaltet ein Steroid (z.B. Dexamethason), ein Anthrazyklin (meist Daunorubicin) und Vincristin, zusätzlich häufig L-Asparaginase. Zur frühen Intensivierung können Cyclophosphamid, Cytarabin und Mercaptopurin eingesetzt werden. Anschließend folgt die risikoadaptierte Konsolidierungstherapie mit der zyklischen Gabe wechselnder Zytostatikakombinationen. Patienten mit Standardrisiko erhalten eine zyklische Konsolidationstherapie mit Methotrexat/ L-Asparaginase, Cyclophosphamid/Cytarabin, VM26[®](Temiposid)/Cytarabin sowie anschließend eine Reinduktionstherapie. Nach dem ersten Konsolidierungszyklus können autologe Stammzellen asserviert werden. Hoch- und Höchststrisikopatienten sollten jetzt einer allogenen Stammzelltransplantation zugeführt werden oder alternativ einen weiteren Konsolidierungszyklus mit anschließender autologer Transplantation erhalten. Letztlich erfolgt eine Erhaltungstherapie mit Methotrexat und 6-Mercaptopurin bis zu einer Gesamttherapiedauer von 2,5 Jahren. 30-40% der Patienten erreichen ein rezidivfreies Langzeitüberleben nach Polychemotherapie. Ein signifikanter Vorteil der Stammzelltransplantation gegenüber der Chemotherapie konnte nur im ersten Rezidiv und bei Hochrisiko-ALL nachgewiesen werden. Die Therapie der ALL umfasst zusätzlich eine intrathekale Chemotherapie und die lokale prophylaktische ZNS-Bestrahlung (Hölzer et al. 2002). Bei bcr/abl-positiven ALL-Patienten (zirka $\frac{1}{3}$) wird heutzutage zeitgleich mit der Polychemotherapie der Thyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Glivec[®]) gegeben, da dadurch die Remissionsrate signifikant erhöht werden konnte (Drucker 2001).

2.3 Stammzellquellen und Stammzellgewinnung

Es ist heute möglich, Stammzellen phänotypisch anhand von spezifischen Oberflächenmarkern (Cluster of differentiation) wie CD34^+ oder c-kit, Sca-1, lin^- ,

Thy1^{low}-Expression und zellstoffwechselfertigen Enzymen (5-FU-Resistenz, Rhodamine^{dull}) zu charakterisieren. Im Stammzellpool befinden sich sowohl Stammzellen für das Langzeitengraftment, „Progenitorzellen“ für das Mittel- und Kurzzeitengraftment, als auch „Mature-Cells“ für das Kurzzeitengraftment (McNiece et al. 1998). Heute können Stammzellen aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut und aus der Nabelschnur gewonnen werden. Der Anteil an CD34-positiven Zellen im Knochenmark liegt bei nur 1-2%, im Nabelschnurblut bei 0,8-1,2% und im peripheren Blut bei 0,1-0,2% (Link 1997).

Die direkte Gewinnung von Knochenmark eines Spenders ist nicht unbedingt alterslimitiert, bedarf jedoch einer genauen klinischen Anamnese, insbesondere über Impfungen, Bluttransfusionen, Reisen in tropische Länder, Allergien und Risikofaktoren für Infektionen, Autoimmunkrankheiten oder Krebserkrankungen. Bei weiblichen Spendern sollten zusätzlich die Geburtenzahl und eventuelle Aborte als Hinweis auf mögliche Alloimmunisierungen vermerkt werden. Klinische, apparative (EKG, Röntgen-Thorax) und laborchemische Untersuchungen (Blutbild, Kreatinin, Harnstoff, Transaminasen, Gerinnung) sind vonnöten, um die Spende als tauglich zu verifizieren. Spezielle Laborteste beziehen sich weiterhin auf HLA-Typisierung, Blutgruppe und Rhesusfaktor sowie Serumantikörpernachweise gegen Infektionskrankheiten (HIV, HTLV, Hepatitis, CMV, EBV, Gonokokken, Toxoplas-mose). Die Knochenmarkgewinnung erfolgt dann durch Punktion der Spina iliaca posterior mittels Aspiration unter Vollnarkose. Maximal werden 15-20ml/kg Knochenmark gewonnen. Die minimale erforderliche Zellzahl beträgt 2×10^8 mononukleäre Zellen (MNC) pro kg Körpergewicht des Spenders. Bei der Stammzellübertragung wird das Knochenmark über zirka zwei Stunden in den Patienten als Empfänger intravenös infundiert (sogenannter Tag 0). Die Stammzellen sollten nach der Entnahme nicht länger als zirka 24 Stunden bis zur Transplantation aufbewahrt werden. Jahrzehntlang stellte das Knochenmark die einzige Quelle für Stammzellen dar. Schon vor 30 Jahren wurden erste Versuche gemacht, peripheres Blut anstelle von Knochenmark zur Transplantation einzusetzen (Reiffers et al. 1998). Mit Gabe von Zytokinen wie G-CSF (GM-CSF, aber auch IL-3, KL oder FLT3L) oder Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid lässt sich die Ausschüttung von Stammzellen in das peripheren Blut drastisch steigern. Die adhäsiven Interaktionen zwischen Knochenmarkstroma und hämatopoetischen Stammzellen werden gelöst und die physiologische Retention aufgehoben. Die Möglichkeit, Stammzellen aus

dem Knochenmark in das periphere Blut zu mobilisieren und so die Stammzellausbeute zehnfach zu erhöhen, hat dazu geführt, dass seit den neunziger Jahren die Anzahl an Transplantationen mit peripheren Blutstammzellen stetig steigt. Beispielsweise wurden 2006 98% der autologen und 71% der allogenen Transplantationen mit peripheren Blutstammzellen anstelle von Knochenmarkstammzellen durchgeführt (Gratwohl et al. 2006). Bei der Sammlung der peripheren Blutstammzellen (PBSC) entfällt die Vollnarkose für den Spender. Somit erscheint die PBSTCT vorteilhaft für Spender und Empfänger zu sein. Es bedarf beim Spender lediglich einer subkutanen Injektion von G-CSF (10-12 µg/kgKG/Tag). Angelehnt an die Laborwerte erfolgt am fünften Tag („Stammzellpeak“) und an den folgenden Tagen eine Leukapherese der mobilisierten mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Während der drei- bis fünfstündigen Apherese wird unter Antikoagulation das Blut nach Zellgröße und -dichte mit Hilfe einer Zellseparationsmaschine in seine Elemente aufgetrennt. Es werden drei- bis fünfmal 10^8 mononukleäre Zellen/kg Körpergewicht des Spenders gewonnen. Die verbleibenden Blutbestandteile werden rückinfundiert (Reiffers et al. 1998). Insgesamt wird eine Zielmenge von größer 2×10^6 CD34⁺- Zellen pro kgKG des Empfängers nach mehreren Apheresen angestrebt. Nachteilig für den Spender können sich darauffolgende passagere Thrombozytopenien auswirken. Mögliche Nebenwirkungen der subkutanen Injektionen sind Kopf- und Knochenschmerzen, Müdigkeit und Übelkeit. Nachteilige Langzeiteffekte der G-CSF-Gaben sind bisher nicht bewiesen.

Blutstammzelltransplantate zeigen den Vorteil der schnelleren Rekonstitution der Hämatopoese des Empfängers, das heißt einer kürzeren Aplasie nach Transplantation (Hertenstein et al. 2004 , Storek et al. 2001, Pavletic et al. 1998, Ottinger et al. 1996) und lassen damit auch eine Reduktion der behandlungsassoziierten Mortalität (TRM) und eine schnellere Rekonvaleszenz erwarten (Reiffers et al. 1998). Bei Transplantation von peripheren Blutstammzellen werden aber auch Nachteile beobachtet: Durch die zehnfach erhöhte Anzahl an Lymphozyten im Transplantat scheint das Risiko für die akute und chronische Graft-versus-Host Disease erhöht. In einer großen Studie der EBMT wird eine erhöhte Inzidenz der akuten GVHD (55% vs. 39%) und auch der chronischen GVHD (73% vs. 53%) nach Transplantation dokumentiert (Schmitz et al. 2000). Es konnte keine erhöhte Inzidenz der GVHD-bedingten Mortalität festgestellt werden. Eine Manipulation des

Transplantates durch T- Zeldepletion muss kritisch diskutiert werden. Vorteil der erhöhten T-Zellinfusion ist nämlich auch ein Graft-versus-Tumor-Effekt, der sich in einer geringeren Infektanfälligkeit und Rezidivrate bemerkbar macht (Trentschel et al. 2001, Storek et al. 2001).

Eine weitere Quelle von hämatopoetischen Stammzellen stellt Nabelschnurrestblut dar. Bisher ist die Anwendung von Nabelschnurrestblut bei erwachsenen Patienten aufgrund der kleinen Stammzellausbeute begrenzt.

2.4 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC-Antigene) wurden Anfang der 50er Jahre entdeckt und sind auf dem Chromosom 6 lokalisiert. Sie kodieren für Proteine, die für die immunologische Individualität des Menschen, für die Regulation immunologischer Vorgänge und für die Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen verantwortlich sind. Die Genprodukte des HLA-Komplexes werden auf der Zelloberfläche nahezu aller kernhaltigen humanen Zellen exprimiert und sind für das Erkennen körpereigener und körperfremder Antigene wichtig. Weil Antikörper gegen Leukozytenoberflächenantigene technisch am einfachsten dargestellt werden konnten, bezeichnet man sie auch als „humane Leukozyten-Antigene“ (HLA). Das MHC - System zeichnet sich durch einen starken Polymorphismus aus. So gibt es eine große Anzahl an verschiedenen HLA-Phänotypen. Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung unterscheidet man Klasse I und Klasse II - Antigene.

Die Klasse I -Antigene sind Glykoproteine und bilden einen Komplex aus drei benachbarten Genorten: HLA-A, -B und -C, werden von fast allen Körperzellen exprimiert und sind starke Transplantationsantigene, die vor allem mit zytotoxischen T-Zellen in Wechselwirkung treten. Treffen T-Zellen auf ein körpereigenes Antigen in der MHC-Grube einer nicht-antigenpräsentierenden Zelle, werden sie ausgeschaltet und tolerieren das Antigen. Dieses verhindert die Reaktion von T-Zellen auf körpereigene Antigene. Innerhalb der Zelle synthetisierte Antigene oder virale Proteine können jedoch auch MHC- Klasse I - Moleküle binden und auf die Zelloberfläche gelangen. Zytotoxische T-Zellen werden durch Reaktion mit den MHC-I-Peptidkomplexen aktiviert und können über die Sekretion von lytischen Enzymen nun diese Zellen lysieren.

Die MHC-Klasse II - Antigene HLA-D bilden einen Komplex, zu dem HLA-DR, -DQ und -DP-Antigene gehören. Klasse-II- Antigene werden nur auf

antigenpräsentierenden Zellen (B-Zellen, dendritischen Zellen und stimulierten Makrophagen) exprimiert und treten im Rahmen einer Immunreaktion in Wechselwirkung mit T-Helferzellen. Exogene Antigene verschmelzen nach Aufnahme in die Zelle mit synthetisierten MHC-II-Molekülen und erscheinen ebenso gebunden an der Zelloberfläche. Hier werden T-Helferzellen aktiviert und zur Zytokinsekretion angeregt. Diese stimulieren dann auch B-Zellen zur Antikörperbildung (Pralle 1991, S.46).

HLA-Kompatibilität (matching) zwischen Spender und Empfänger ist ein Hauptfaktor für eine erfolgreiche Transplantation. HLA-Inkompatibilität (mismatch) ist ein Risikofaktor für das Auftreten einer Graft-versus-Host Disease, für eine erhöhte Infektanfälligkeit und für eine Abstoßung des Transplantates (graft failure) beim Empfänger (Apperley 1998, S.36). Eine Übereinstimmung in den HLA-Merkmalen hat sich demzufolge in der Stammzelltransplantation als essentiell erwiesen. Es wird verständlich, dass bevorzugt HLA-genotypisch identische Geschwister oder "optimal" syngene Zwillinge als Knochenmarkspender ausgewählt werden (Schaefer 1991, S.13). Nur zirka 25% der Patienten finden, besonders aufgrund der immer kleiner werdenden Familiengrößen, einen HLA-identischen verwandten Spender („full house matching“). So mussten neue Möglichkeiten erschlossen werden, um Patienten eine Transplantation zu ermöglichen. Mit zirka 80%iger Wahrscheinlichkeit gelingt es heute freiwillige Stammzellspender (volunteer unrelated donors), die nicht mit dem Empfänger verwandt sind oder nur teilweise HLA-identisch sind, ausfindig zu machen. Die Spenderauswahl bei VUDs basiert ebenso auf der Bestimmung der HLA -A, -B, -C, -DR und neuerdings auch -DQ - Antigene. Dies geschieht mit serologischen, biochemischen und molekular-genetischen Testverfahren. Zur Absicherung der Gewebeverträglichkeit wird auch noch teilweise ein MLC-Test (mixed lymphocyte culture) zwischen den Lymphozyten von Patient und Spender durchgeführt.

2.5 Konditionierungsregime

Unter einer Konditionierung versteht man die Vorbehandlung des Empfängers zur Stammzelltransplantation. Sie setzt unmittelbar vor der geplanten Transplantation und möglichst nach Erreichen einer kompletten Remission von der malignen Grunderkrankung ein. Als meist hochdosierte Radiochemo- oder kombinierte Chemotherapie hat sie zum Ziel, den malignen Zellklon endgültig zu eliminieren und

Platz für das Transplantat zu schaffen (Schaefer 1991, S.27). Die Vorbehandlung zur allogenen Transplantation umfasst zusätzlich eine starke immunablativ Komponente, um einer Transplantatabstoßung entgegenzuwirken. Man geht davon aus, dass die empfangenen Stammzellen bestimmte Nischen im Knochenmarkstroma besetzen müssen, um proliferieren und sich differenzieren zu können (Apperley 1998, S.99). Das Knochenmark setzt sich nicht nur aus blutbildenden Zellen zusammen, sondern auch aus akzessorischen und stromalen Zellen (Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und Adipozyten), die zusammen durch Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen das unerlässliche „Mikroenvironment“ (Twardzik et al. 2002, Kasper et al. 2001) für die blutbildenden Zellen bilden und ein Erkennen und Besetzen der Nischen („Homing“) durch die transplantierten Stammzellen ermöglichen.

Frühe vorbereitende myeloablativ Konditionierungsregime bestanden nur aus einer Ganzkörperbestrahlung (Thomas et al. 1982). Eine Ganzkörperbestrahlung hat vor allem zum Ziel, klonale maligne Zellen abzutöten, eine Immuntoleranz für das Transplantat zu schaffen sowie durch Eradikation des Empfänger Knochenmarkes Raum für das Transplantat bereitzustellen. Lymphoide und myeloide Zellen sind äußerst radiosensitiv (Belka et al. 2001). Schwere Nebenwirkungen der Ganzkörperbestrahlung sind die interstitielle Pneumonitis, die Lebervenenverschlusskrankheit, Katarakte sowie Funktionsstörungen der Keimdrüsen und der Schilddrüse. Aufgrund der hohen Rezidivrate unter alleiniger Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation) wurde in den frühen 70er Jahren mit Cyclophosphamid (Cy) kombiniert. Cyclophosphamid zeichnet sich durch seine antineoplastische Wirkung aus und beugt dem Tumorlyse-Syndrom nach TBI vor. Es wirkt aber allein nicht ausreichend myeloablativ und zeigt einen insuffizienten Antitumoreffekt, wie Studien von Santos (1983) und Graw (1974) belegen konnten. Jeweils 60mg/kgKG Cyclophosphamid an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, gefolgt von 12 Gy fraktionierter TBI (Clift et al. 1999, 1991), wurde zum Standardregime bis in die heutige Zeit. Eine Erhöhung der Strahlengesamtdosis über 12 Gy bewirkt kein verbessertes Überleben, aber eine erhöhte Toxizität (Belka et al. 2001). Die TBI wird heute meist fraktioniert an mehreren Tagen verabreicht. Es können so höhere Gesamtdosen erreicht werden. Sie ist verträglicher und nebenwirkungsärmer für den Patienten. Eine Bevorzugung einer Non-TBI-Konditionierung oder einer TBI-

Konditionierung konnte bisher in randomisierten Studien nicht vollständig geklärt werden (Belka et al. 1992).

Santos et al. entwickelten 1983 durch das Fehlen adäquater Möglichkeiten zur Ganzkörperbestrahlung ein Regime aus Busulfan (16mg/kgKG) kombiniert mit Cyclophosphamid (120mg/kgKG) über vier Tage. Im Vergleich zu Cyclophosphamid plus TBI bei CML-Patienten waren die Ergebnisse hinsichtlich des Langzeitüberlebens und der Rezidivrate annähernd gleich (Kröger et al. 2001). Auch bei der AML hat sich eine gemeinsame chemotherapeutische Vorbehandlung mit Busulfan und Cyclophosphamid als wirksam erwiesen (Schaefer 1998, S. 27). Das Cy/Bu- Protokoll ist die weitverbreitete myeloablative Alternative zur TBI/Cy-Gabe. Andere Substanzen wurden zur Konditionierung in zahlreichen Studien erprobt: Zander beispielsweise kombinierte 1987 Cyclophosphamid (1,5g/m²KOF Tag 1 bis 4), Carmustin (300mg/m²KOF Tag 1) und Etoposid (100mg/m² KOF in 6 Dosen alle 12 Stunden). Graw et al. (1974) kombinierte Cyclophosphamid und Cytosinarabinosid mit 6-Thioguanin (100mg/m²KOF Tag 1-7) und Carmustin (200mg/m²KOF als Einzeldosis) (Copelan et al. 1992).

Das Auftreten von Rezidiven nach Transplantation und der verstärkte Einsatz „unverwandter Transplantate“(VUD) führte besonders in den achtziger Jahren zu der Idee, die Konditionierungstherapie zu intensivieren. Die therapieassoziierte Toxizität stieg dadurch jedoch in einen nicht-akzeptablen Bereich. Es kam zu einer Zunahme der therapieassoziierten Mortalität (TRM), die Zeitspanne des rezidivfreien Überlebens blieb jedoch unverändert oder verschlechterte sich sogar (Apperley 1998, S. 99).

Supraletal dosiert ist eine Konditionierungstherapie direkt toxisch für jedes Organsystem und somit mit einer erheblichen therapieassoziierten Mortalität verbunden. Schäden im Bereich kleiner Gefäßendothelien können durch die Aktivierung von Zytokin-, Bradykinin-, Kallikrein-, Komplement- und Gerinnungskaskaden ausgelöst werden. Oropharyngeale und gastrointestinale Komplikationen werden in Form einer Mukositis (Inzidenz 90%) bis hin zur Nekrosenbildung gesehen. Als hepatische Komplikation (Inzidenz 10-50%) kann eine Lebervenenverschlusskrankheit (VOD) auftreten, die sich durch Hepatomegalie, Ödemneigung, Aszites und Bilirubinanstieg im Serum bemerkbar macht. Die Hauptnebenwirkung von Cyclophosphamid ist die hämorrhagische Zystitis (Inzidenz 30%), deshalb wird jede Gabe mit 2-Mercaptoethansulfonat-Natrium (Mesna) zum

Blasenschleimhautschutz kombiniert. Schädigungen der Nieren bis hin zur Insuffizienz, Schädigungen der Lunge (bis zu 20% z.B. nicht-infektiöse Pneumonie) und des Herzens (5% z.B. Niedervoltage, Perikarditis, Tamponade, Fehlfunktion) können konditionierungsbedingt in der Frühphase nach Transplantation auftreten (Trentschel et al. 2001).

2.5.1 Neue Konditionierungsregime

Die hohe therapieassoziierte Mortalität beschränkte den Einsatzbereich der Stammzelltransplantation mit oben genannten myeloablativen Vorbehandlungen auf jüngere Patienten unter 50 Jahren. Jedoch liegt das mittlere Alter für den Hauptindikationsbereich (AML) zwischen 65 und 70 Jahren, so dass die Mehrheit der Patienten nicht transplantiert werden konnte. Auch Patienten mit diversen Komorbiditäten (z.B. Diabetes mellitus, Arterielle Hypertonie, Lungen- und Lebererkrankungen) sollten einer Transplantation zugänglich sein. Mitte der siebziger Jahre beobachtete Thomas et al., dass Patienten in reduziertem Allgemeinzustand ein schlechteres Überleben nach Transplantation zeigten (Diaconescu et al. 2005). Die Vergangenheit hatte gezeigt, dass die Heilung eines hämatologischen Malignoms nicht allein durch Hochdosischemotherapie erzielt wird, sondern auch durch einen Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt. Ziel musste es sein, effektiv wirkende, aber weniger toxische Regime zu entwickeln, die einen Rückgang der TRM sowie positive Langzeitergebnisse bewirken.

Schlussfolgernd wurden „dosisreduzierte Konditionierungsprotokolle“ (RIC) entwickelt (Giralt et al. 1997, Slavin et al. 1998, Khouri et al. 1998) sowie sogenannte „non-myeloablative Regime“ (Sykes et al. 1999, Childs et al. 1999, Spitzer et al. 2000, Childs et al. 2000, McSweeney et al. 2001), zeitweise auch „Minitransplantation“ genannt. Sie beinhalten Substanzen, die toxisch für Tumor- und Stammzellen sind, aber im Vergleich zur konventionellen Konditionierungstherapie dosisreduziert verabreicht werden. Es wird dabei auf eine komplette Zerstörung des Empfänger Knochenmarks durch eine intensive toxische Konditionierungsbehandlung verzichtet. Diese Regime basieren vor allem auf dem Graft-versus-Tumor-Effekt zur Tumoreradikation. Die transplantatassoziierte Frühmortalität konnte so minimiert werden. Es wurde gezeigt, dass auch eine deutlich reduzierte Konditionierungstherapie zu einem Angehen des Transplantates führen kann, wenn eine immunablative Komponente in der Vorbehandlung enthalten ist. Ein

geschädigtes Empfängerimmunsystem ermöglicht dem transplantierten Immunsystem dann ein Anwachsen. Vier Hauptgruppen neuer Konditionierungsprotokolle werden unterschieden (Bacigalupo 2002):

Nach dem „Storb Modell“ der Seattle-Gruppe wird eine niedrigdosierte Einzeldosis-Ganzkörperbestrahlung von 200cGy verabreicht. Varianten wurden unter anderem mit Zugabe von Fludarabin (90 bis 120mg/m² KOF), von der French Group (500cGy+60mg/kgKG Cy), von der Münchner-Gruppe (500cGy, Cy 60mg/kgKG, Flu 90mg/m²KOF), von der Genoa-Gruppe (100cGy+Thiotepa 10mg/kgKG + Cy 100mg/kgKG) und letztlich bei Myelompatienten (Melphalan 200mg/m²KOF+200cGy +Flu 90mg/m²KOF) erprobt. Fludarabin wirkt antileukämisch und ist effektiv immunsupprimierend. Modelle nach dem „Storb-Schema“ ermöglichen ein Engraftment, beeinflussen sowohl die Empfängerhämatopoese als auch den malignen Zellklon. Ein Chimerismus kann in den ersten drei Monaten im peripheren Blut erreicht werden. Während sich der GVL-Effekt entwickelt, wird die Empfängerhämatopoese schrittweise durch die des Spenders ersetzt.

Nach einer Publikation von Slavin et al. 1998 werden Busulfan (8mg/kgKG), Fludarabin (125mg/m²KOF) und Antithymozytenglobulin als Konditionierungstherapie verwendet. Die Züricher-Gruppe reduzierte die Busulfandosis (4mg/kgKG) und erhöhte die Fludarabindosis (150mg/m²KOF). In Frankreich wurde die ursprüngliche Busulfandosis mit 150mg/m²KOF Fludarabin und 120mg/kgKG Cyclophosphamid kombiniert. Das „Slavin-Modell“ unterscheidet sich vom Storb-Modell dahingehend, dass Busulfan im Gegensatz zu Fludarabin die Hämatopoese des Empfängers vollständig zerstören kann. Weniger „graft failure“ treten unter Busulfan auf, aber dafür ist die Toxizität des Regimes erhöht.

Eine weitere Konditionierungsart wurde durch Martinelli und Aversa et al. (1994) publiziert. Hierbei wird Thiotepa 10mg/kgKG mit Cyclophosphamid 100mg/kgKG kombiniert. Variationen mit Thiotepa plus 60mg/kgKG Cy und 60mg/m²KOF Fludarabin für Lymphompatienten (Corradini et al. 2002) oder Thiotepa plus Fludarabin 120mg/m²KOF für Myelodysplasiepatienten wurden ebenfalls erprobt.

McKinnon (1995) schlug erstmals eine Zusammenstellung von Melphalan (140mg/m²KOF), Fludarabin (140mg/m²KOF) und Campath1H zur dosisreduzierten Konditionierungstherapie vor allogener Stammzelltransplantation vor.

Alle vier Konditionierungsansätze zeigen eine TRM zwischen 14-15% und ermöglichen eine allogene Transplantation bei älteren Patienten. Reduzierte

Konditionierungsregime neigen aber dazu, gemischte Chimerismen, d.h. ein Nebeneinander von Spender- und Empfängerhämatopoese auszubilden. Viele Programme verlangten danach, die Immunsuppression vor dem 60.Tag nach Transplantation aufzugeben oder eine Spenderlymphozyteninfusion (DLI) einzuleiten, um den Immuneffekt auf den Empfänger zu maximieren. Das kann aber auch eine schwere GVHD provozieren. Unbeantwortet bleiben bis jetzt Fragen nach dem optimalen RIC-Regime und welches RIC spezifisch auf die jeweiligen Krankheitsbilder wirkt (Bacigalupo et al. 2002). 2005 wurden fast ein Drittel der Stammzelltransplantationen in Europa nach „reduced-intensity“-Regimen durchgeführt, jedoch ist ihr Einsatz in den Ländern unterschiedlich (10-80%) verbreitet (Gratwohl 2006).

Zusammenfassend geht seit den neunziger Jahren der Trend zur Reduktion der therapieassoziierten Mortalität. Das Potential konventioneller Chemotherapien bei Leukämien scheint limitiert und erschöpft. Teilweise sind die Dosierungen soweit intensiviert worden, dass nur noch durch Rückgabe vorher gewonnener autologer Stammzellen eine rechtzeitige Rekonstitution der Knochenmarkfunktion möglich ist. Es müssen in Zukunft zielgerichtete Behandlungsmethoden entwickelt werden, da selbst durch eine Dosisescalation nicht alle Leukämiezellen zerstört werden können. Das Transplantationsfeld befindet sich daher in ständiger Erweiterung vom Standard-TBI/Cy-Regime plus Knochenmark zu vielen verschiedenen Konditionierungsregimen, gefolgt von manipulierten Transplantaten (Bacigalupo et al. 2000).

2.6 Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

Die der Stammzelltransplantation vorausgehende, meist kombinierte Radio- und Chemotherapie, zerstört die zelluläre und humorale Immunität des Empfängers definitiv (Schaefer 1991, S.23). Die Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation ist abhängig von der Grunderkrankung, der Toxizität der Vorbehandlung, der HLA-Übereinstimmung und vom Stammzell- und T-Zellgehalt des Transplantates (Hassan et al. 1997). Auch das Empfängeralter und die Thymusfunktion beeinflussen die Immunrekonstitution. Besonders wesentlich wird die Restauration der einzelnen Blutzellkomponenten vom Auftreten einer Graft-versus-Host Disease und von Infektionen nach Transplantation beeinflusst. Nach allogener Transplantation besteht ein schweres und protrahiertes Immundefektsyndrom (Trenschel et al. 2001) mindestens über ein Jahr (Stachel et

al. 1999). Die Transplantation muss den Empfänger sowohl mit liniendeterminierten Progenitoren für die frühe Rekonstitution sowie mit primitiven Progenitoren für die Langzeitrekonstitution versorgen (Reiffers et al. 1998, S. 157). Beide sind im CD34⁺-Transplantationspool enthalten. Bevor ein Engraftment einsetzt, kommt es nach Stammzellübertragung zu einer obligatorischen sieben- bis vierzehntägigen Proliferationsstagnation der empfangenen Zellen, die diese Zeitspanne für „Homing“ und Differenzierung benötigen (To et al. 1997). Die langsame „Dreilini-Regeneration“ der Lympho- und Hämatopoese zeigt sich zuerst 14-28 Tage nach Transplantation („take“). Granulozyten und Thrombozyten zeigen normalerweise eine schnelle funktionelle Normalisierung bereits in der Frühphase nach Transplantation und verifizieren ein erfolgreiches Angehen des Transplantates (Engraftment). Dieses ist dokumentiert, wenn spätestens am Tag 28 nach Transplantation im peripheren Blut >500 Granulozyten/ μ l gemessen werden und durch chromosomale oder molekulargenetische Untersuchungen ein Chimerismus nachgewiesen werden kann. Das bedeutet, dass spezifische Merkmale des Spenders in der Hämatopoese des Empfängers parallel neben den Merkmalen des Empfängers in den übrigen Geweben existieren. Innerhalb von zwei bis drei Monaten erreichen die peripheren Lymphozytenzahlen meist Normalwerte, typischerweise überwiegen zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) vor T-Helferzellen (CD4⁺) (KMT Schaefer 1991, S. 24). Es kommt so zu einer Inversion der CD4⁺/CD8⁺-Ratio (EBMT handbook 1998, S. 192) bis zu einem halben Jahr nach Transplantation. CD8⁺-Zellen proliferieren schneller als CD3⁺- und CD4⁺- Zellen. Auch die NK-Zellproliferation ist gesteigert. Sie erreichen schon im ersten Monat nach Transplantation Normalwerte (Apperley 1998, S.192). Funktionell prolongiert beeinträchtigt bleiben B-Lymphozyten (CD19⁺), besonders wenn eine GVHD auftritt (Schaefer 1991, S.25). B-Lymphozyten erreichen erst nach zirka einem Jahr posttransplantationem Normalwerte. Die Antikörperproduktion bleibt lange Zeit gestört.

Man spricht von einem „graft failure“, wenn am Tag 28 nach Transplantation im peripheren Blut weniger als 500 Granulozyten/ μ l nachgewiesen werden können und die Knochenmarkpunktion ein leeres Knochenmark zeigt. Ursächlich für das fehlende Angehen des Transplantates können Störungen im Bereich des Knochenmarkmikroenvironmentes durch Virusinfekte, ausgeprägte Myelofibrosen oder myelosuppressive Therapienebenwirkungen sein. Auch eine quantitativ und

qualitativ mangelnde Anzahl an transplantierten Stammzellen kann ein Nichtangehen des Transplantates beim Empfänger bewirken (Schaefer 1991, S. 15).

Eine Abstoßung des Transplantates (graft rejection) erkennt man nach Erreichen der „Granulozytenschwelle“ an einem Wiederabfall der Leukozytenzahlen im peripheren Blut unter 500 Granulozyten/ μ l im Verlauf (Stachel et al.1999).

2.7 Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation

Abhängig vom Alter des Patienten, der Konditionierungstherapie und vom Krankheitsstatus beträgt die Mortalität 5-20% innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation (Einsele et al. 2001). Transplantatabstoßung, die akute und chronische Graft-versus-Host Disease und das Auftreten von Infektionen bilden die Hauptkomplikationen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Diese werden durch die zwei- bis vierwöchige Panzytopenieperiode direkt nach der Transplantation begünstigt. Der Unterschied zwischen anderen immunsupprimierten Patienten und Transplantierten ist der ständig schwelende Immunkonflikt zwischen Spender- und Empfängerzellen, der seinen Anteil zur regimeassoziierten Mortalität (TRM) leistet.

2.7.1 Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion (Host-versus-Graft)

Nach der Stammzellübertragung können residuelle Empfängerzellen mit Transplantatzellen interagieren (Wirt-gegen-Transplantat-Reaktion) und den Erfolg der Transplantation gefährden. Eine derartige aktive Transplantatzerstörung durch verbliebene Empfängerzellen (graft rejection, Transplantatabstoßung) tritt häufig bei T-Zelldepletion des Transplantates, Transplantation bei aplastischer Anämie und bei nicht-voll-HLA-identischer Transplantation auf. Bedeutsam sind bei der Transplantatabstoßung sowohl reaktive Empfängerzellen, als auch lymphatische Spenderzellen. Eine verminderte Abstoßungsrate kann durch intensiviert immunosuppressive Vorbehandlung, als auch durch eine Transfusion von angereicherten Spenderlymphozyten (DLI) unmittelbar nach Transplantation erreicht werden. Da das Abstoßungsrisiko mit der Anzahl der nicht übereinstimmenden Antigene des MHC steigt (Schaefer 1998, S. 17), ist der Grad der Übereinstimmung in den Antigenstrukturen zwischen Spender und Empfänger somit entscheidend für das Angehen des Transplantates und die immunologische Rekonstitution des Empfängers. In den späten fünfziger Jahren verfestigte sich durch Tierversuche und

enttäuschende erste klinische Versuche die Hypothese der „bidirektionalen allogenetischen Barriere“ (Diakonescu et al. 2004). Eine Übertragung von fremden Spenderzellen erwies sich in den Anfängen als schwierig, weil es bei vielen Patienten entweder zu einer Abstoßung des Transplantates durch Empfängerzellen oder zu einer GVHD durch Spenderzellen kam. Die Entwicklung intensiver Konditionierungsregime zur Myeloablation, stark immunsupprimierender Substanzen zur Prophylaxe der GVHD sowie die Entdeckung, dass der Grad der Übereinstimmung im Haupthistokompatibilitätskomplex eng mit beiden Komplikationen korreliert, ließ die „bidirektionale Barriere“ fallen. Die Stammzelltransplantation wurde zu einer effektiven Therapiealternative für lebensbedrohende maligne und nicht-maligne hämatologische Erkrankungen.

2.7.2 Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host)

Ein Transplantat umfasst nicht nur hämatopoetische und stromale Zellen, sondern auch kompetente lymphatische Spenderzellen, die mit den Antigenstrukturen des Empfängers reagieren können. Voraussetzungen für eine „Graft-versus-Host Reaktion“ (GVHD) sind eine Nichtübereinstimmung von Histokompatibilitätsantigenen zwischen Spender und Empfänger, Spenderzellen, die eine gerichtete Immunantwort gegen körperfremde Empfängergewebemerkmale aufbauen können und ein Empfängerimmunsystem, das unfähig ist, das Transplantat (und die GVHD-induzierenden Zellen) abzustößen.

Eine akute Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GVHD) tritt innerhalb der ersten 60 bis 100 Tage nach Transplantation auf und wird häufig zirka 20 Tage nach Stammzellgabe durch den Anstieg der peripheren Blutzellwerte auffällig. Bei HLA-inkompatibler Transplantation beobachtet man die Erstmanifestation („onset“) auch schon in einem kürzeren Zeitraum. Wie auch die Transplantatabstoßung ist das Erscheinen einer GVHD wesentlich an den Grad der Übereinstimmung im HLA-Muster geknüpft. Bei 40% liegt das Risiko für das Auftreten einer akuten GVHD Grad 2-4 nach HLA-vollidentischer Transplantation und steigt bei einer Antigenendifferenz auf 60%, auf 70% bei zwei und auf 90% bei drei Antigenendifferenzen im HLA-A, -B und HLA-DR-Bereich mit einem verwandten Spender. Mismatches bei HLA-A, -B-Loci und den Antigenen des HLA-D-Komplexes scheinen dabei gleichwertig zu sein (Schaefer 1991, S.19 und 80). Heute konnte durch eine größere Auswahl an Spendern sowie gezielte DNA-Typisierungsmethoden erreicht werden, dass bei HLA-

identischen Fremd Spendern im Vergleich zu HLA-identischen Familienspendern nur noch ein gering erhöhtes Risiko besteht, eine schwere GVHD zu entwickeln (Trentschel et al. 2001).

Die akute GVHD-Reaktion wird vom T-Lymphozyten des Spenders getragen. Jedoch ist die Frage, welche Subpopulationen genau beteiligt sind, noch strittig. Eine Erniedrigung des T-Zellgehaltes (T-Zelldepletion) auf ca. 0,1-1 % der ursprünglichen T-Zellmenge im Transplantat kann das Risiko für das Auftreten einer akuten GVHD auf eine Gesamtinzidenz von ca. 5-10% (Schaefer 1991, S.84) drastisch senken. Dies wird aber mit einer erhöhten Abstoßungs- und Infektionsrate erkaufte (1% vs. 15-35%) und führt zu einem höheren Rezidivrisiko durch Verlust des Spender-versus-Leukämie-Effektes (Schaefer 1991, S. 17). Darüber hinaus entwickeln Patienten mit T-Zelldepletierter Spende häufiger einen gemischten Chimerismus. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, dass die Abstoßungsrate und das Auftreten einer akuten GVHD zueinander invers sind, was die prophylaktischen und therapeutischen Ansätze hinsichtlich der GVHD schwierig gestaltet und eines genauen Abwägens bedarf.

Die Zielorgane der akuten GVHD sind vor allem Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt. Initial erscheinen erythematös-makulöse Exantheme besonders an Handinnenflächen und Fußsohlen sowie kleinfleckige Effloreszenzen an Körperstamm, Extremitäten und Gesicht bis hin zur Erythrodermie. Eine hepatische Beteiligung zeigt sich mit cholestatischem Ikterus und kann in einem akuten Leberversagen mit Aszites, Enzephalopathie und hämorrhagischer Diathese münden. Anhand des Bilirubinspiegels kann die Leberbeteiligung graduiert werden. Begleitend können Fieber, Tachykardie, Körperschwäche und Gewichtsverlust auftreten. Wässrige, teils blutige Diarrhoe mit starken Flüssigkeits- und Eiweißverlusten, Tenesmen bis hin zum paralytischen Ileus können das klinische Bild prägen.

Die Schweregrade 3 bis 4 der akuten GVHD sind mit einer eindeutig höheren Patientensterblichkeit verbunden. Die häufigste Todesursache für Patienten mit GVHD sind Infektionen, insbesondere bei Reaktivierung von Zytomegalie - oder Herpesviren. Circa 50% der Patienten mit einer GVHD der Grade 2 bis 4 versterben innerhalb von zwei Jahren an infektiösen Komplikationen.

Klinisch und prognostisch bedarf die akute GVHD einer Stadieneinteilung die in Abbildung 1 wiedergegeben ist.

Einteilung akuter GVHD nach Schwere – IBMTR

Haut			Leber		Darm	
Index	Stadium	Exanthem	Stadium	Bili (mg/dl)	Stadium	Volumen
A	1	< 25%	0	< 2	0	< 500 ml/d
B	2	25-50%	1-2	2-5	1-2	550-1500
C	3	> 50%	3	5-15	3	> 1500
D	4	Bullae	4	> 15	4	Schmerz, Ileus

Abbildung 1: Einteilung der akuten GVHD nach Glucksberg et al.

Die chronische GVHD zeigt sich im Allgemeinen frühestens am Tag 100 nach Transplantation. Sie schließt sich meist an eine akute GVHD an (sekundär chronische GVHD), zu 20-30% ist sie jedoch Erstmanifestation einer Unverträglichkeitsreaktion (Schaefer 1991, S.90). Diese „de-novo-GVHD“ ist prognostisch günstiger. Die Gesamtinzidenz für ihr Auftreten liegt bei 30-50%. Die akute GVHD stellt den Hauptrisikofaktor für eine chronische GVHD dar und ihre Vermeidung ist somit die beste Prävention. Sie kann limitiert nur die Haut und/oder die Leber betreffen. Ist sie ausgedehnt (extensive) chronisch kommt es zu einer generalisierten Haut- und Leberbeteiligung. Manifestationen sind ödematöse Hautrötungen, livide, pigmentierte oder schuppige Hautareale, Epidermisatrophie, lichenoider Reaktion der Mundschleimhaut und ein Sicca-Syndrom. Bilirubin- und Leberenzym erhöhungen sowie Dysphagie und Motilitätsstörungen des Ösophagus kommen vor. Gelenkkontraktionen, Gewichtsverlust sowie rekurrende Infektionen werden beobachtet. Neuerdings wird die alte Einteilung in akute und chronische GVHD in Frage gestellt, da sich seit Einführung der peripheren Blutstammzellen die Grenze zwischen klinisch akut und chronisch verwischt. Bei nicht ausreichender medikamentöser Immunsuppression des Patienten kann es immer wieder zur Verschlimmerung der klinischen Symptome kommen, insbesondere bei der PBSZT. Dafür ist wahrscheinlich die erhöhte T-Zellanzahl im Transplantat verantwortlich (Ferrara et al. 1999).

Zur GVHD-Prophylaxe wurde posttransplantationem seit Beginn der 80er Jahre der Antimetabolit Methotrexat (MTX) eingesetzt: klassisch intravenös 15mg/m²KOF am ersten Tag, 10mg/m² KOF an den Tagen 3,6 und 11 und dann wöchentlich bis zum Tag 102. Nebenwirkungen der MTX-Therapie zeigen sich an Lunge und Leber.

Zusätzlich wird das hämatopoetische System aufgrund seiner Hämatotoxizität beeinträchtigt. Basierend auf Tierversuchen (Storb et al. 1993) konnten Vorteile bei Kombination von Methotrexat mit Cyclosporin A oder Tacrolimus aufgezeigt werden. Cyclosporin A wirkt im Gegensatz zu MTX spezifisch inhibierend auf die T-Zellproliferation und Differenzierung in zytotoxische T-Zellen sowie inhibierend auf die Interleukin-2-Produktion. Besonders Nephrotoxizität, arterielle Hypertonie, Hirsutismus und Störungen des Nervensystems fallen als Nebenwirkungen ins Gewicht. Cyclosporin wird am Tag vor der Transplantation in einer Dosis von 3-5 mg/kgKG eingesetzt und danach anhand des aktuellen Serumspiegels dosiert. Eine kombinierte Prophylaxe mit MTX und Cyclosporin A findet weltweit als Standard Anerkennung.

Weiterhin wurden Kombinationen von Cyclosporin und dem Purinsynthesehemmer Mycophenolate Mofetil (MMF) erprobt (Bornhäuser et al. 1999).

Bei Auftreten einer akuten GVHD, besonders leichten Grades, ist eine Therapie mit Kortikosteroiden (2mg/kgKG bis 10mg/kgKG) Erfolg versprechend. Kortikosteroide wirken besonders hemmend auf den Tumornekrosefaktor- α , der ein wichtiger Mediator der akuten GVHD ist. Die kortikoidrefraktäre akute GVHD hat eine Mortalität von näherungsweise 80% (Apperley 1998, S.126-128). Die GVHD Grade 3 bis 4 können den Einsatz von Antithymozytenglobulin oder spezifischen monoklonalen Antikörpern erforderlich machen. Zusätzlich muss symptomatisch behandelt werden.

Die Therapie der chronischen GVHD umfasst eine Kombination aus Prednisolon, Cyclosporin A und gegebenenfalls MMF. Eine immunsuppressive Therapiestrategie ist jedoch immer individuell angepasst (EBMT handbook 1998, S.128).

2.7.3 Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation

Komplikationen nach Transplantation sind in einem wesentlichen Anteil infektiös bedingt und ursächlich für deren hohe Mortalität und Morbidität (Storek et al. 2001). Besonders in den ersten sechs Monaten nach Transplantation können schwere Infektionen auftreten. Auch noch Jahre danach sind Infektionen, die bis zum Tode führen können, möglich. Ausschlaggebend für die Anfälligkeit eines Transplantierten sind besonders die verlangsamte Immunrekonstitution und vorherige Immunsuppression. Eine GVHD, sei sie akut oder chronisch, sowie ihre immunsuppressive Behandlung stellen weitere Risikofaktoren für das Auftreten von

Infektionen dar. Eine strenge medikamentöse Infektprophylaxe mittels antiviralen (Aciclovir gegen HSV, Ganciclovir gegen CMV), antifungiziden (Fluconazol/Voriconazol gegen Aspergillus, Candida; Cotrimoxazol gegen *Pneumocystis carinii*) und antibakteriellen (meist Chinolone) Substanzen ist somit vonnöten. In der Frühphase nach Transplantation ist eine Filterung von Raumluft und Wasser, die Sterilisation der Nahrung, beschränkter Zutritt zu den Patienten, spezielle Reinigungsmaßnahmen für Patienten, Personal und Räumlichkeiten unterstützend. Drei Phasen der Infektanfälligkeit nach allogener Transplantation lassen sich im ersten Jahr nach allogener Transplantation abgrenzen und sind in Abbildung 2 veranschaulicht.

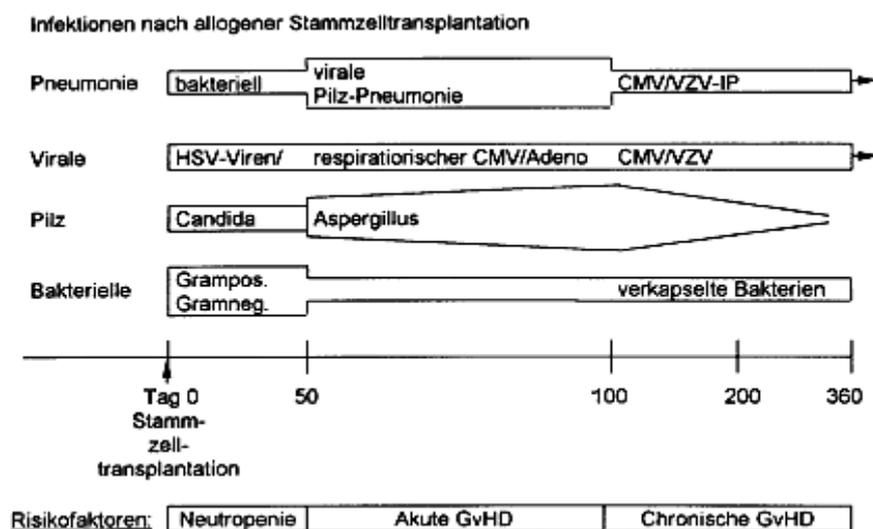


Abbildung 2: Infektionsphasen nach allogener Stammzelltransplantation nach Trentschel et al. (2001)

Die erste Phase (Tag 30 bis 50) nach Transplantation ist durch eine Aplasie des Knochenmarkes gekennzeichnet. Neutropenie, Schrankenstörung der Haut und Schleimhäute sowie Funktionsstörungen der immunkompetenten Zellen (besonders der Makrophagen, NK- und T-Zellen) bedingen eine Anfälligkeit gegenüber grampositiven (z.B. Staphylokokken, Streptokokken, Corynebakterien) und gramnegativen Bakterien (z.B. *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*), *Candida*- und Herpes Simplex-Infektionen. Besonders die Mukositis dominiert das Bild. Als Frühzeichen einer Infektion findet sich häufig neutropenisches Fieber. Die Inzidenz bakterieller Infekte kann durch den Einsatz von Lamina-Airflow-Einheiten deutlich reduziert werden.

Danach schließt sich eine zweite Phase (Tag 50 bis 100) an, die nach der Rekonstitution der Granulozyten auftritt. Eine akute GVHD wirkt erschwerend. Hierbei fallen besonders Infekte mit verkapselten Bakterien, Aspergillus, Zytomegalie- und Adenovireninfektionen auf. Lungenentzündungen werden nun weniger von Bakterien, sondern vielmehr von Viren und Pilzen ausgelöst.

Die letzte Phase, die zirka vom Tag 100 bis 365 nach Stammzelltransplantation abläuft, ist vor allem durch einen B-Zelldefekt gekennzeichnet. Hier kann eine chronische GVHD auftreten. CMV, Varizella-Zoster-Virus, verkapselte Bakterien und Aspergillus können die Erreger sein. Lungenentzündungen werden bevorzugt von CMV, VZV oder *Pneumocystis carinii* bedingt (Bartsch 1996, S. 20).

Die CMV-Infektion ist besonders bis zum Tag 100 nach Transplantation von Bedeutung. Eine GVHD, Transplantatmaterial vom unverwandten Spender und/oder nicht-komplett HLA-identischen Familienspender können für das Auftreten einer CMV-Infektion prädisponieren. Die Gabe von CMV-seronegativen Transplantaten und Blutprodukten für einen CMV-seronegativen Empfänger kann in dieser Konstellation eine symptomatische CMV-Infektion verhindern. Die Inzidenz der symptomatischen CMV-Infektion nach allogener Transplantation liegt bei 50% (versus 5% bei autologer Tx). Eine CMV-Infektion kann sich in Form einer interstitiellen Pneumonie, einer Hepatitis oder einer Enteritis manifestieren, selten treten Enzephalitis, Retinitis oder Adrenitis auf. Besonders die ersten drei der genannten Erkrankungen weisen bei nicht schnell eingeleiteter und adäquater Therapie eine erhebliche Mortalität bis zu 70% (interstitielle Pneumonitis) auf, da sie therapeutisch schwer beherrscht werden können. Neben der antiviralen Prophylaxe existieren heute sensitive diagnostische Methoden, eine symptomatisch werdende CMV-Infektion frühzeitig zu erkennen und vor ihrem Ausbruch zu therapieren. Eine CMV-Infektion wird anhand des CMV-pp65-Antigens in Leukozyten oder mittels einer PCR zur Detektion der CMV-DNA im peripheren Blut nachgewiesen. Eine Therapie mit Ganciclovir oder Foscarnet kann so noch vor klinischer Manifestation (sogenannte „preemptive Therapie“) eingeleitet werden. Als Therapeutikum bei bereits eingetretener CMV-Infektion eignen sich Ganciclovir und Immunglobuline intravenös.

2.7.4 Rezidive nach allogener Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation führt bei über 90% der Patienten mit malignen und nicht-malignen hämatologischen Krankheiten unmittelbar zu Remissionen. Ein Rückfall in die maligne Grunderkrankung ist eine häufige Ursache für ein Therapieversagen nach Transplantation. Die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv innerhalb von drei Jahren nach Transplantation liegt bei den Leukämien in einem frühen Krankheitsstadium zwischen 10-30%. In fortgeschrittenen Stadien liegt die Rezidivwahrscheinlichkeit schon zwischen 20-70%. Der Hauptanteil der Rezidive geht von residuellen Zellen des Empfängers aus. Das Risiko für ein Rezidiv ist nach autologer Stammzelltransplantation höher, entweder durch residuelle maligne Zellen, die die Konditionierung überlebt haben oder durch eine Transplantatkontamination mit Tumorzellen. Das Risiko des Wiederauftretens der leukämischen Grunderkrankung ist deutlich geringer nach allogener Transplantation. Dabei besteht wiederum ein geringeres Risiko bei allogener Transplantation mit unverwandtem Spender als nach Transplantation von genetisch identischem Knochenmark (Weiden et al. 1981, Gale et al. 1994). Das legt die Vermutung nahe, dass es Faktoren geben muss, die besonders der allogenen Transplantation einen antileukämischen Effekt verleihen (GVL). Man kann davon ausgehen, dass Spender-T-Zellen, eventuell auch NK-Zellen, für den GVL-Effekt verantwortlich sind. Untermuert wird diese Hypothese beispielsweise dadurch, dass Patienten mit akuter oder chronischer GVHD ein vermindertes Rezidivrisiko haben (Weiden et al. 1979, 1981) und das Auftreten einer Graft-versus-Host Disease begünstigend auf das krankheitsfreie Überleben nach Transplantation wirkt. So haben Patienten ohne GVHD oder mit T-Zelldepletierter Spende ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines leukämischen Rezidivs (Martin et al. 1991, Marmont et al. 1991). Das unterstreicht die Rolle der T-Zellen bei der Bekämpfung der malignen Grundkrankheit. Bis heute lassen sich GVHD und GVL-Effekt durch Unkenntnis der genauen Pathophysiologie nicht streng voneinander differenzieren. Ziel muss also sein, die Graft-versus-Host-Reaktion zu minimieren und den Graft-versus-Leukemia-Effekt gleichzeitig zu erhalten.

Zur Behandlung des Rezidivs gibt es mehrere Strategien. Eine Zurücknahme der Immunsuppression sowie eine Chemo-und/oder Radiotherapie zum Erreichen einer erneuten Remission können die Antwort sein. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF) sowie Zytokine (Interferon- α , Interleukin-2) wurden erprobt. Der

Erfolg von Zweittransplantationen ist vor allem vom Zweitintervall zur ersten Transplantation abhängig. Sie bedeutet eine zusätzliche Toxizität für den Empfänger, eine erneute Belastung für den Spender (Bartsch 1996, S. 34) und zusätzlich wenig Aussicht auf Erfolg. Das leukämiefreie Überleben über drei Jahre liegt bei 20% und ist besonders schlecht bei Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien und frühem Rezidiv.

Die Kenntnis des Graft-versus-Tumor-Effektes führte zur Erprobung von Spenderlymphozyteninfusionen (DLI), wenn hämatologische Erkrankungen nach Stammzelltransplantation rezidivieren. Sie wird möglich durch den bestehenden Chimerismus und die damit verbundene Toleranz gegenüber Spenderlymphozyten. Komplette Remissionen können, abhängig von Krankheitsstadium und Vorerkrankungen, besonders bei der CML erreicht werden (Kolb et al. 1995, Slavin et al. 1995, Apperley 1998, S.169-181).

2.7.5 Minimale Resterkrankung

Die „minimal residual disease“ ist der verbleibende Teil an malignen Zellen im Körper nach Erreichen der kompletten Remission (CR), die mittels konventionellen diagnostischen Methoden wie Knochenmarkzytologie (Lichtmikroskopie) oder Zytogenetik (Chromosomenanalyse) nachgewiesen werden kann. Auch immunzytochemische Techniken, klonogene Kulturassays und molekulare Tests wie PCR wurden erprobt. Als besonders wertvoll hat sich die Beobachtung der MRD für die CML erwiesen. Allein der qualitative Nachweis ist jedoch nicht ausreichend, um Rezidive vorhersagen zu können. Es kommt daher die quantitative Bestimmung von bcr/abl-mRNA-Mengen mittels „real-time“-PCR zum Einsatz. Beispielsweise kann eine bcr/abl-exprimierende leukämische Zelle/ μl im peripheren Blut unter 10^6 normalen Zellen durch PCR nachgewiesen werden. Residuelle Zellen können so im Therapieverlauf mit hoher Sensitivität verfolgt und der Beginn der Rezidivtherapie festgelegt werden, da ein Anstieg der mRNA-Mengen dem hämatologischen Rezidiv einige Monate vorausgeht. Eine DLI kann effektiv gegen eine MRD sein, aber nicht wenn der verbleibende Tumor sehr groß oder schnell progredient ist. Sie ist ineffektiv bei Patienten, die keine GVHD entwickelt haben und sogar gefährlich bei schwerer GVHD. DLI wirkt gut bei CML, eher mäßig bei AML und ist nur wenig effektiv bei ALL-Patienten (Apperley 1998, S.183-187).

3 ZIELE DER ARBEIT

Die erfolgreiche allogene Stammzelltransplantation und damit auch die Immunrekonstitution sind von vielen Faktoren abhängig, von denen nur einige direkt beeinflussbar sind. Alle beobachteten Einflussfaktoren wurden unter der Fragestellung der regelhaften lymphozytären Immunrekonstitution untersucht, da diese für die Prognose des Patienten mitentscheidend ist.

Folgende Fragen sollen mit der Datenanalyse und Diskussion der Ergebnisse geprüft und beantwortet werden:

- 3.1. Verläuft die Immunrekonstitution der lymphozytären Zellreihen nach allogener Stammzelltransplantation regelhaft? Gibt es dabei linienspezifische Unterschiede?
- 3.2. Bewirkt eine höhere Anzahl an Stammzellen (CD34⁺-Zellen) im Transplantat eine verbesserte Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation?
- 3.3. Welche Auswirkungen hat die Anzahl an transplantierten CD3⁺-Zellen auf die Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation?
- 3.4. Welche Rolle spielt die HLA-Kompatibilität bei der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation?
- 3.5. Ist die regelrechte Immunrekonstitution vom Geschlecht des Spenders abhängig?
- 3.6. Inwieweit beeinflusst die zur Transplantation führende Grunderkrankung die folgende Immunrekonstitution?
- 3.7. Bewirkt ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium eine schlechtere Immunrekonstitution nach Transplantation?
- 3.8. Ist das Alter des Empfängers ein Risiko für eine unzureichende oder verlangsamte Immunrekonstitution?
- 3.9. Hat das Empfängergeschlecht Einfluss auf die Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation?
- 3.10. Welchen Einfluss hat die Konditionierung auf die Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation?
- 3.11. Wird die Immunrekonstitution durch das Auftreten einer Graft-versus-Host Disease nach Stammzelltransplantation beeinflusst?
- 3.12. Welche Wirkung hat das Auftreten einer CMV-Infektion auf die Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation?

4 METHODIK

4.1 Patienten

Die vorliegende retrospektive Analyse beobachtet 71 Patienten, die zwischen Juli 1997 und Oktober 2002 eine allogene Stammzelltransplantation im Transplantationszentrum der Inneren Klinik II des Universitätsklinikums Jena erhielten, 27 Frauen und 44 Männer im mittleren Alter von 42 Jahren (range 18-61 Jahre). Indikationen für die Transplantation waren in 28 Fällen eine Chronische Myeloische Leukämie, in 33 Fällen eine akute Leukämie (2/33 ALL, 31/33 AML) und in 10 Fällen andere maligne Erkrankungen (2/10 Myelodysplastisches Syndrom, 4/10 Plasmozytom, 3/10 Non-Hodgkin-Lymphom, 1/10 Morbus Hodgkin). Als Stammzellquelle dienten in 67 Fällen mobilisierte periphere Blutstammzellen und in 4 Fällen Knochenmarkstammzellen.

Wichtige klinische Angaben zu den untersuchten Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Merkmal	Gruppen	Patientenanzahl (n= 71)
Empfängergeschlecht	männlich	44
	weiblich	27
Grunderkrankung	CML	28
	AML	31
	ALL	2
	MDS	2
	Plasmozytom	4
	NHL	3
	Morbus Hodgkin	1
Erkrankungsstadium	1. Remission (CR)	11
	Fortgeschrittenes Krankheitsstadium	60
Empfängeralter	<40 Lebensjahre	30
	>40 Lebensjahre	41
Stammzellquelle	PBSZT	67
	BMT	4
Konditionierung	klassisch myeloablativ	38
	TBI/Cy	28
	Bu/Cy	6
	red.TBI/Cy/Flu	2

	TBI/Cy/Eto	1
	TBI/Cy/Thio	1
	dosisreduziert/non-myeloablativ	33
	Flu/Bu/ATG	23
	Flu/BU	1
	TBI/Cy/ATG	2
	Mel/Flu/ATG	4
	TBI	2
	TBI/Flu	1
GVHD-Prophylaxe	CSA	17
	CSA/MTX	26
	CSA/MMF	15
	CSA/MTX/MMF	12
	Prograf/MMF	1
GVHD in den ersten 100 Tagen nach Transplantation	Grad 0	19
	Grad 1	23
	Grad 2	24
	Grad 3	4
	Grad 4	1
Spendergeschlecht	weiblich	22
	männlich	49
HLA-Kompatibilität	Familienspender	33
	HLA-identisch	23
	HLA-mismatch	10
	Fremdspender (VUD)	38
	HLA-identisch	37
	HLA-mismatch	1
CD34⁺-Zellmenge im Transplantat	<6 x 10 ⁶ Zellen/kgKG des Spenders	25
	>6 x 10 ⁶ Zellen/kgKG des Spenders	45
	unbekannt	1
CD3⁺- Zellmenge im Transplantat	>300 x 10 ⁶ Zellen/kgKG des Spenders	24
	<300 x 10 ⁶ Zellen/kgKG des Spenders	36
	unbekannt	11
CMV-Infektion	Ja	21
	Nein	50

Tabelle 2: Patientendaten

4.1.1 Vorbereitende Protokolle für die allogene Stammzelltransplantation

Im Vorfeld wurden die Patienten unterschiedlich für die anstehende Transplantation vorbereitet. 38 Patienten wurden klassisch myeloablativ konditioniert. Der Hauptteil dieser Gruppe (28/38) erhielt Ganzkörperbestrahlung (insgesamt 12 Gy, Tag -7 bis -4, 6 Fraktionen à 2 Gy) und Cyclophosphamid (60mg/kgKG des Empfängers intravenös an den Tagen -3 und -2), daneben zwei Patienten (2/38) mit erweitertem Regime (plus Etoposid oder Thiotepa). Im Falle des Einsatzes reduzierter TBI (8 Gy à 4 Fraktionen) erhielten die Patienten zusätzlich Fludarabin vor der Transplantation (2/38). Sechs Patienten (6/38) wurden mit einer Kombination aus Busulfan (4mg/kgKG des Empfängers per os an den Tagen -7 bis -4) und danach mit Cyclophosphamid (60mg/kgKG des Empfängers intravenös an den Tagen -3 und -2) behandelt.

In nahezu allen Fällen der dosisreduzierten Konditionierung (23/33) bestand die Kombination aus Fludarabin (30mg/m² KOF intravenös an den Tagen -10 bis -5), Busulfan (4mg/kgKG des Empfängers per os am Tag -6 und -5) und ATG (10mg/kgKG des Empfängers intravenös an den Tagen -4 bis -1). Zwei Patienten der dosisreduziert behandelten Gruppe (2/33) wurden bestrahlt (1 x TBI à 2 Gy), ein Patient erhielt zusätzlich Fludarabin (30mg/m²KOF, an den Tagen -4 bis -2). Weiterhin kamen Kombinationen von TBI, Cyclophosphamid und ATG in zwei Fällen (2/33), Melphalan, Fludarabin und ATG in vier Fällen (4/33) und einmal Fludarabin plus Busulfan (1/33) zum Einsatz.

In beiden Gruppen lag der Altersmedian bei 42 Jahren (myeloablativ zwischen 18-58 Jahren, dosisreduziert zwischen 20-60 Jahren).

4.1.2 Supportive Care

Beide Gruppen erhielten einheitliche Supportivstandards während des stationären Aufenthaltes. Dies umfasste die infektiologische medikamentöse Prophylaxe, sowie die Supportivmaßnahmen mit Gabe von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten bei Anämie (HKT < 25%) und Thrombozytopenie (<20000/µl im peripheren Blut).

4.1.3 Prophylaxe gegen die Graft-versus-Host Disease

Alle Patienten erhielten eine GVHD-Prophylaxe mit Cyclosporin A (17 Patienten CSA mono) in einer Anfangsdosis von 3mg/kgKG des Empfängers ab Tag -1 als kontinuierliche Infusion über 24 Stunden, die dann im Verlauf an den Serumspiegel angepasst wurde. Patienten mit GVHD-Risikofaktoren (z.B. HLA-mismatch oder VUD) erhielten zusätzlich MMF (11 Fälle). In 26 Fällen wurde CSA durch MTX ergänzt und zusätzlich in 12 Fällen die Dreierkombination mit MMF eingesetzt. Bei einem Patienten wurde CSA durch Prograf ersetzt und mit MMF kombiniert.

4.1.4 Stammzellquellen und Stammzellverarbeitung

Insgesamt wurden vier Knochenmarktransplantate (range: 0,41 bis $2,45 \times 10^6$ mononukleäre Zellen/kgKG, median $2,27 \times 10^6$ Zellen/kg KG) und 67 Transplantate von mobilisierten CD34-positiven Zellen (range: 1,34 bis $23,4 \times 10^6$ Zellen/kg KG, median $7,35 \times 10^6$ Zellen/kg KG) verwendet. Alle Transplantate wurden dem Patienten unmanipuliert via ZVK unter Prämedikation mit Steroiden infundiert bzw. transplantiert.

4.2 Methoden

Basis dieser retrospektiven Analyse ist die Messung der absoluten Zellzahlen pro μl peripheren Blutes mittels FACS-Analyse zu vier unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (Tag 0 bezeichnet die Übertragung der Stammzellen in den Empfänger):

1. **vor** Transplantation (Median -14.Tag)
2. **zwei Monate** nach Tx (Median +58.Tag)
3. **drei Monate** nach Tx (Median +92.Tag)
4. **fünf Monate** nach Tx (Median +149.Tag).

Es wurden folgende Lymphozytenpopulationen bestimmt:

- a) **CD3**-positive T-Zellen
- b) **CD4**-positive Zellen (T-Helferzellen)
- c) **CD8**-positive Zellen (zytotoxische T-Zellen)
- d) **CD19**-positive Zellen (B-Zellen)
- e) **CD56**-positive Zellen (NK-Zellen).

Weiterhin wurde die **CD4/CD8** - Ratio in die Analyse miteinbezogen.

In dieser Studie wurden nur die quantitativen Zellzahlen erfasst. Aussagen über die Funktion und Reagibilität der einzelnen Zellreihen können daher nur indirekt zum Beispiel durch Registrierung der CMV-Raten gemacht werden.

4.2.1 Grundlagen für die Charakterisierung von Lymphozyten anhand des Phänotypus

Die Expression von Oberflächenantigenen auf menschlichen Lymphozyten ermöglicht deren Unterteilung in drei Hauptpopulationen: T-, B-, und NK-Zellen. Während die T- und B-Zellen Teil der spezifischen Immunantwort sind, gehören die NK-Zellen zur zellulären unspezifischen Abwehr.

Die Reifung der T-Zellen erfolgt im Thymus aus Prä-Thymozyten. Im Thymus erscheinen unter anderem die Moleküle des **CD3**-Antigenrezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche und es findet eine Aufzweigung in zwei T-Zellsubgruppen statt: je nach Expression des **CD4**- Antigenes oder des **CD8**- Antigenes in T-Helferzellen oder zytotoxische T-Zellen.

B-Zellen entstehen im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen. Schon in der ersten Entwicklungsstufe, der Progenitor-B-Zelle, sind die linienspezifischen Zellmarker **CD19** und **CD22** nachweisbar. Die weitere Prägung erfahren die B-Lymphozyten über die Zirkulation im peripheren Blut und die Ansiedlung in sekundären lymphatischen Organen.

NK-Zellen entwickeln sich vorwiegend im Knochenmark und im Thymus. In ihrer Entwicklungsphase teilen sie sich mit den T-Zellen einige Oberflächenmarker (z.B. **CD34**, **CD33**, **CD2**, **CD5**) und unterscheiden sich im reifen Zustand vor allem durch die Adhäsionsmoleküle **CD56** und **CD16**. NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen dienen im Wesentlichen dem Erkennen und Vernichten virusinfizierter sowie maligner Zellen.

4.2.2 Analyse von Lymphozytensubpopulationen aus dem peripheren Blut

Die Lymphozytensubpopulationen im peripheren venösen Blut lassen sich mittels spezifischer Antikörper, die gegen die oben genannten Oberflächenantigene gerichtet sind, gut differenzieren.

Für das Sortieren und Zählen dieser Zellen bedient man sich einem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS). Das Prinzip besteht in der Zugabe einer

Reagenz zu menschlichem Vollblut nach Erythrozytenlyse und Zentrifugieren der weißen Blutzellen. Daraufhin können die mit Fluorochrom markierten Antikörper in der Reagenz spezifisch an die Leukozytenantigene der zu untersuchenden Blutprobe binden. Es kamen folgende spezifische Antikörper dabei zur Anwendung: IgG1-FITC/IgG1-PE als Isotypenkontrolle, CD3-FITC/**CD4**-PE für T-Helferzellen, CD3-FITC/**CD8**-PE für T-Suppressorzellen, CD3-FITC/**CD19**-PE für B-Zellen und CD3-FITC/**CD16** und **CD56**-PE für NK-Zellen.

Die so gekennzeichneten Zellen durchwandern in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl das Durchflusszytometer (Gerät FACSCalibur-Becton Dickinson Heidelberg, Programm SimulSet BD). Entlang eines Laserstrahles (488nm) kommt es zu einer Lichtstreuung. Die an den Zellen gebundenen Farbstoffmoleküle werden zur Fluoreszenz angeregt. Das gestreute Licht gibt Auskunft über Größe (Vorwärtslichtstreuung) und Granularität (Seitwärtslichtstreuung) der Zellen. So ist es möglich, große Zellen mit granuliertem Zytoplasma (Granulozyten) von kleinen Zellen mit hohem Kernanteil (Lymphozyten) zu unterscheiden. Das emittierte Licht wird anhand seiner Intensität gemessen, wobei diese Intensität in etwa mit der Antigendichte auf den Zellen korreliert. Beide Farbstoffe, Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE), haben unterschiedliche Fluoreszenz-Emissionsgipfel (grün= FITC, rot= PE). Dadurch können Zellpopulationen erkannt werden, die beide Antigene exprimieren, nur eines oder völlig Antigen-negative Zellen. Die Messung im FACS und anschließende Auswertung mittels CellQuest Software (Becton Dickinson) informiert über den prozentualen Anteil und die absoluten Zellzahlen reifer menschlicher Lymphozytensubpopulationen pro μl im peripheren Blut. Dies ermöglicht zum Beispiel die genaue Verlaufskontrolle der Immunrestitution nach Transplantation, insbesondere auch beim Auftreten von Komplikationen (wie Infektionen oder auch GVHD).

Problematisch ist das, insbesondere direkt nach Transplantation oder während der GVHD die zirkulierenden Lymphozytenzahlen für die Messung zu klein sein könnten.

4.2.3 Normalwerte der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut

Die Interpretation der absoluten Zellzahlen/ μl aus dem peripheren Blut orientiert sich an den folgenden Normalwertbereichen bei gesunden Probanden (Befund MultiSet, Tabelle 3, Ermittlung durch BD Biosciences USA).

Zellpopulation	Anzahl an Zellen/ μ l im peripheren Blut	
	Minimum	Maximum
CD3 ⁺ -Zellen	690	2540
CD4 ⁺ -Zellen (T-Helferzellen)	410	1590
CD8 ⁺ -Zellen (zytotoxische T-Zellen)	190	1140
CD19 ⁺ -Zellen (B-Zellen)	90	660
CD56 ⁺ -Zellen (NK-Zellen)	90	590
CD4/CD8-Ratio	1.00	

Tabelle 3: Normwerte der Lymphozytensubpopulationen und der CD4/CD8-Ratio

4.2.4 Statistische Analyse

Als Datenmaterial dienen pro Patient und Zellreihe (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD56⁺, CD4/CD8-Ratio) jeweils Stichproben zu vier definierten unterschiedlichen Zeitpunkten: vor Transplantation sowie zwei Monate (Tag +60), drei Monate (Tag +90) und fünf Monate (Tag +150) nach allogener Stammzelltransplantation, wobei die absolute Zellzahl pro μ l peripheren Blutes vermerkt wurde. Zur statistischen Auswertung diente SPSS 11.0.

Aufgrund der asymmetrischen Verteilung der Datengruppen wurde das verteilungsunabhängige Analogon zum t-Test, der Test von Wilcoxon für gepaarte Stichproben bei der Beurteilung der Immunrekonstitution über die Zeit verwendet. Die Wachstumskurve jeder Zellreihe wurde ermittelt und auf signifikantes Wachstum zu den einzelnen Zeitpunkten geprüft sowie die einzelnen Wachstumskurven untereinander verglichen.

Anhand unterschiedlicher Kriterien (infundierte Stammzellmenge und CD3⁺-Zellzahl im Transplantat, HLA-Kompatibilität, Spendergeschlecht, Grunderkrankung, Krankheitsstadium, Empfängeralter und -geschlecht bei Transplantation, Konditionierungsform, GVHD-Auftreten und CMV-Infektion nach Transplantation) wurden diese Patienten jeweils Gruppen zugeordnet und immer im Hinblick auf mögliche Unterschiede in der Immunrekonstitution der Lymphozytensubgruppen überprüft. Beim Vergleich dieser unabhängigen Gruppen kam ein verteilungsunabhängiger Test, der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, zum Einsatz.

Weiterhin wurden die Wachstumsraten an den einzelnen Zeitpunkten berechnet.

Alle statistischen Tests wurden zweiseitig auf einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ durchgeführt. $P=0,001$ wurde als höchst signifikant eingestuft.

5 ERGEBNISSE

5.1 Immunrekonstitution der lymphozytären Zellreihen nach allogener Stammzelltransplantation

Zunächst wurde gefragt, ob die Rekonstitution der Zelllinien nach allogener Stammzelltransplantation in den Zellreihen regelhaft verläuft:

In allen drei untersuchten Zellreihen (CD3⁺-,CD8⁺-,CD4⁺-,CD19⁺-,CD56⁺-Zellen) war eine Rekonstitution der Hämatopoese am Tag +60 nach Transplantation nachweisbar. Chimärismusanalysen sind hier nicht aufgeführt, zeigten aber eine fast 100%ige Spenderhämatopoese an. Abbildung 3 fasst die Ergebnisse zusammen:

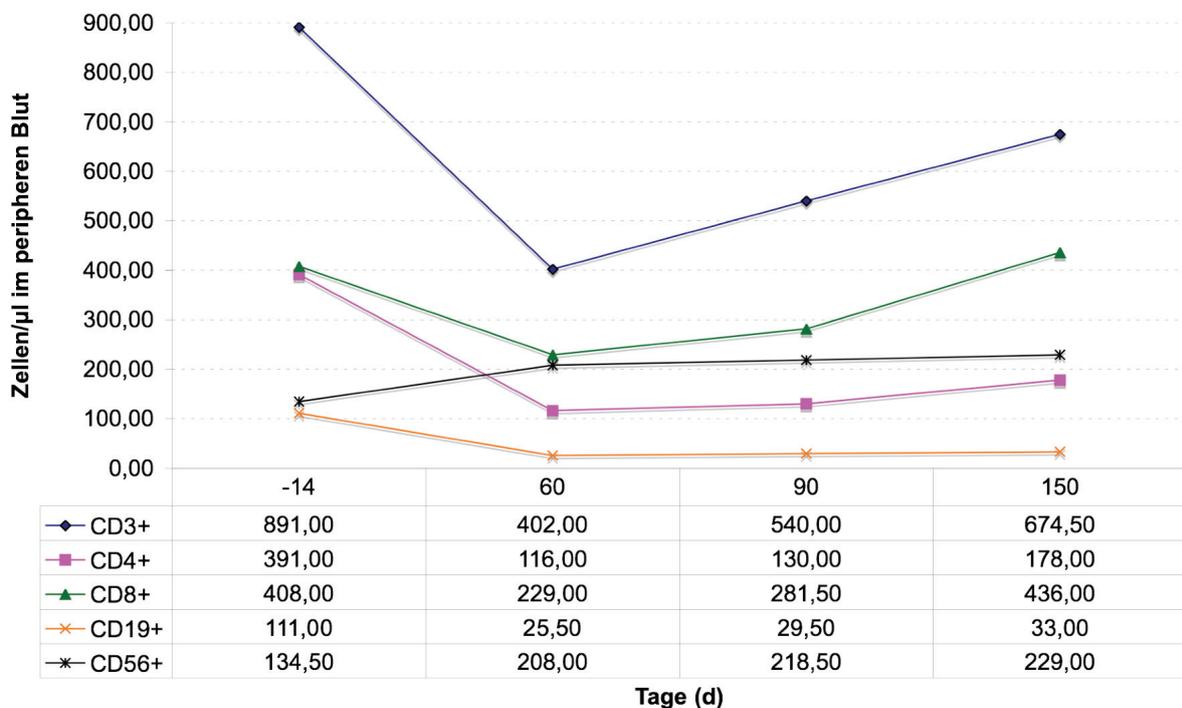


Abbildung 3: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

a) CD3-positive Zellen erreichten bis zum +150. Tag fast Normalwerte. Dabei war der Anstieg zwischen den Stichproben zu jeder Zeit signifikant ($\text{Median}_{\text{Tag}60}=402$ Zellen/ μl , $p_{\text{Tag}60/90}=0,002$; $\text{Median}_{\text{Tag}90}=540$ Zellen/ μl , $p_{\text{Tag}90/150}=0,002$; $\text{Median}_{\text{Tag}150}=674,5$ Zellen/ μl) bei einer Anstiegsrate von 168% vom +60. bis zum +150. Tag nach Transplantation. Der prozentuale Anstieg war zwischen dem +60. und +90.Tag größer als zwischen dem +90. und +150.Tag (134% versus 125%).

b) CD4-positive Zellen blieben bis zum Tag +150 weit unter der Normgrenze ($\text{Median}_{\text{Tag}60}=116$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{Tag}90}=130$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{Tag}150}=178$ Zellen/ μl), stiegen jedoch signifikant zwischen den Untersuchungszeitpunkten ($p_{\text{Tag}60/90}=0,034$, $p_{\text{Tag}90/150}=0,001$). Die Anstiegsrate zwischen dem +90. und +150.Tag war höher als zwischen dem +60. und +90.Tag (137% versus 112%). Insgesamt betrug sie 153% vom ersten bis zum dritten Stichtag.

c) CD8-positive Zellen erreichten schon in den ersten 60 Tagen nach Stammzelltransplantation Normalwerte ($\text{Median}_{\text{Tag}60}=229$ Zellen/ μl) und verdoppelten ihre Anzahl dann nahezu bis zum +150. Tag ($\text{Median}_{\text{Tag}90}=281,5$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{Tag}150}=436$ Zellen/ μl). Auch hier besteht zwischen den Untersuchungszeitpunkten ein signifikanter Anstieg dieser Zellpopulation ($p_{\text{Tag}60/90}=0,001$, $p_{\text{Tag}90/150}=0,004$). Die Wachstumsrate war bei den CD8-positiven Zellen mit 190% zwischen dem +60. und +150.Tag am höchsten, und ebenso wie bei den CD4-positiven Zellen zwischen dem +90. und +150.Tag größer als zwischen dem +60. und +90. Tag (155% versus 123%).

Dass CD8-positive Zellen besser rekonstituieren als CD4-positive Zellen, zeigt sich auch in einer bis zum 150. Tag zu beobachtenden Inversion der CD4/CD8-Ratio ($\text{Median}_{\text{Tag}60}=0,34$, $\text{Median}_{\text{Tag}90}=0,43$, $\text{Median}_{\text{Tag}150}=0,41$), die sich auch signifikant zwischen den Untersuchungszeitpunkten unterscheidet ($p_{\text{Tag}60/90}=0$, $p_{\text{Tag}90/150}=0,011$).

d) CD19-positive Zellen weisen keinen signifikanten Anstieg zwischen den Untersuchungszeitpunkten auf. Die Normgrenze wird auch am +150. Tag nicht erreicht ($\text{Median}_{\text{Tag}150}=33$ Zellen/ μl). Signifikant ist aber der Zellanstieg zwischen +60. und +150. Tag ($p_{\text{Tag}60/150}=0,008$, $\text{Median}_{\text{Tag}60}=25,5$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{Tag}90}=29,5$ Zellen/ μl). Eine Anstiegsrate von 129% zwischen 60. und 150. Tag ist zu verzeichnen, ein gewisser Anstiegstrend liegt also vor.

e) CD56-positive Zellen sind schon am +60. Tag nach Transplantation normwertig ($\text{Median}_{\text{Tag}60}=208$ Zellen/ μl). Der Anstieg ist dann bis zum +150.Tag nicht mehr signifikant ($p_{\text{Tag}60/90}=0,62$, $p_{\text{Tag}90/150}=0,84$) auf einen Median von 229 Zellen/ μl peripheren Blutes. Eine Anstiegsrate von 110% zwischen 60. und 150.Tag nach Transplantation ist zu beobachten.

Tabelle 4 veranschaulicht die absoluten Zellzahlen/ μl peripheren Blutes an den verschiedenen Messpunkten.

Zellreihe	- 14.Tag	+ 60.Tag	+ 90.Tag	+ 150.Tag
CD3 ⁺ -Zellen/μl	819	402 ^{*1}	540 ^{*2}	674,5
CD4 ⁺ -Zellen/μl	391	116 ^{*3}	130 ^{*4}	178
CD8 ⁺ -Zellen/μl	408	229 ^{*5}	281,5 ^{*6}	436
CD4/CD8-Ratio	1,27	0,34 ^{*7}	0,43 ^{*8}	0,41
CD19 ⁺ -Zellen/μl	111	25,5	29,5	33
CD56 ⁺ -Zellen/μl	134,5	208	218,5	229

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen p^{*1}:0,002; p^{*2}:0,002; p^{*3}:0,034; p^{*4}:0,001; p^{*5}:0,001; p^{*6}:0,004; p^{*7}: 0; p^{*8}: 0,011

Tabelle 4: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation

5.2 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Anzahl an transplantierten Stammzellen (CD34⁺)

Zweitens sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Quantität der Stammzellen (CD34⁺-native Zellen) im Transplantat die Rekonstitution der Zellen nach Transplantation beeinflusst. Zur Patientengruppeneinteilung wurde ein Grenzwert von 6×10^6 CD34⁺-Zellen/kg Körpergewicht des Spenders gewählt. Der Median lag bei $7,34 \times 10^6$ transfundierte CD34⁺-Zellen pro kgKG. 25 von 70 Patienten erhielten $< 6 \times 10^6$ CD34⁺-Zellen/kgKG, 45 von 70 Patienten $> 6 \times 10^6$ CD34⁺-Zellen/kgKG. Die absoluten Zellzahlen/μl peripheren Blutes an den verschiedenen Zeitpunkten veranschaulicht Tabelle 5:

CD34 ⁺ - Zellen/ kgKG / Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	<6x10 ⁶	>6x10 ⁶						
CD3 ⁺ -Zellen/μl	868	1046	336	387	397	566	651	669
CD4 ⁺ -Zellen/μl	337	427	89	136	126	140	128	190
CD8 ⁺ -Zellen/μl	382	401	221	223	234	316	395	413
CD4/CD8-Ratio	1,08	1,32	0,56	0,57	0,5	0,5	0,57	0,57
CD19 ⁺ -Zellen/μl	75	102	19	27	22	33	26	35
CD56 ⁺ -Zellen/μl	161	108	193	230	244	181	259	213

Tabelle 5: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die übertragene Stammzellmenge

a,b,c,d,e) Grundsätzlich bleibt zu vermerken, dass es nach Durchführung der statistischen Teste zwischen keiner Zelllinie signifikante Unterschiede im

Zellwachstum nach Stammzelltransplantation gab. Das Wachstum der CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zelllinien scheint tendenziell durch eine höhere CD34⁺-Zellanzahl im Transplantat bevorteilt zu sein.

5.3 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Anzahl an transplantierten CD3-positiven Spenderzellen

Drittens wurde untersucht, ob die quantitative Anzahl an CD3-positiven Zellen des Spenders im Transplantat Auswirkungen auf die Immunrekonstitution des Empfängers nach Transplantation hat. Zur Gruppenunterscheidung wurde hierbei ein Grenzwert von 300×10^6 CD3-positive Zellen/kg Körpergewicht des Spenders gewählt und bei 60 der 71 Patienten untersucht. Bei 24 Patienten wurden $> 300 \times 10^6$ CD3-positive Zellen/kgKG transplantiert, bei 36 Patienten $< 300 \times 10^6$ Zellen/kg Körpergewicht des Spenders.

a,b,c,d,e) Auch bei diesem statistischen Vergleich konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in der Zellanalyse nach Transplantation ausgemacht werden. Tabelle 6 veranschaulicht die Messergebnisse:

CD34 ⁺ - Zellen/ kgKG / Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	$>300 \times 10^6$	$<300 \times 10^6$	$>300 \times 10^6$	$<300 \times 10^6$	$>300 \times 10^6$	$<300 \times 10^6$	$>300 \times 10^6$	$<300 \times 10^6$
CD3 ⁺ -Zellen/μl	874,5	1031	358	341,5	448,5	540	730,5	600,5
CD4 ⁺ -Zellen/μl	346,5	554,5	110,5	113,5	117,5	151	170	178
CD8 ⁺ -Zellen/μl	406	372,5	255,5	209	244	304	436	297
CD4/CD8-Ratio	0,62^{*1}	1,54	0,42	0,68	0,46	0,5	0,58	0,56
CD19 ⁺ -Zellen/μl	103,5	111	24,5	25,5	45	32,5	40,5	37,5
CD56 ⁺ -Zellen/μl	113	130,5	273	191,5	199,5	209	239	223,5

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen $p^{*1}:0,02$

Tabelle 6: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die übertragene CD3⁺-Menge

5.4 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger

Viertens wurde weiterhin verglichen, ob das Transplantat von einem Familienspender kam (n = 33) oder von einem unverwandten freiwilligen Spender (n=38).

a) Signifikante Unterschiede finden sich bereits im Wachstum der CD3-positiven Zellen. Die Immunrekonstitution ist bereits am +60. Tag bei einer Fremdspender verzögert ($\text{Median}_{\text{VUDTag60}}=324,5$ Zellen/ μl). Bis zum +90.Tag findet sich ein eher stagnierendes Wachstum auf einen Median von 370 Zellen/ μl . Dann kommt es zu einem Wachstumssprung auf 622 Zellen/ μl bei einer Wachstumsrate von 168% zum +150.Tag. Signifikant sind diese Zellen im Vergleich zur Familienspende am +60. Tag ($p_{\text{VUD/FamTag60}}=0,036$, $\text{Median}_{\text{FamTag60}}=503$ Zellen/ μl) und am +90.Tag ($p_{\text{VUD/FamTag90}}=0,008$, $\text{Median}_{\text{FamTag90}}= 689$ Zellen/ μl) verschieden. Insgesamt können die CD3⁺-Zellen der Familienspende überdurchschnittlich gut rekonstituieren bei einer Wachstumsrate von 140% vom +60. auf den +150.Tag. CD3⁺-Zellen der Fremdtransplantate können ihren Rückstand jedoch bei einer Wachstumsrate vom 192% bis zum +150.Tag fast ausgleichen. Abbildung 4 veranschaulicht den Wachstumsverlauf der CD3⁺-Zellen der beiden verglichenen Gruppen.

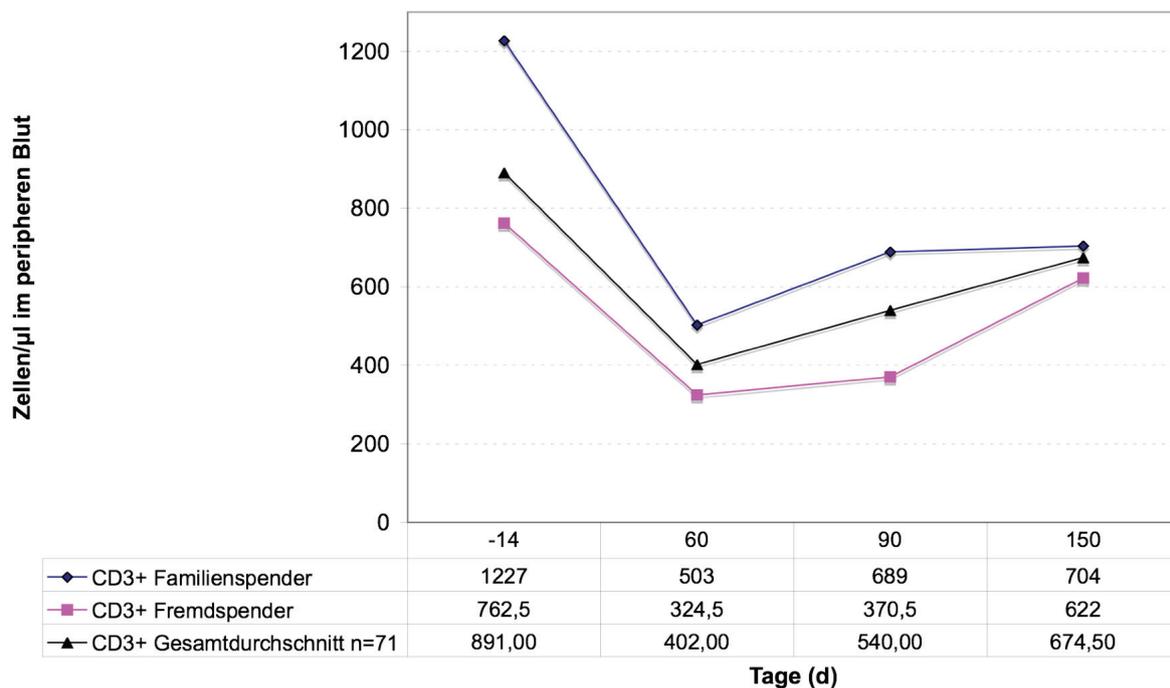


Abbildung 4: Immunrekonstitution der CD3-positiven Zellen bei Familien- und Fremdspender nach allogener Stammzelltransplantation

b) Auch im Bereich der CD4-positiven Zellen zeigen sich signifikante Unterschiede. Die Zellen aus der Fremdspender entwickeln sich schlechter. Bereits am +60.Tag und am +150.Tag sind sie signifikant niedriger messbar ($p_{\text{VUD/FamTag60}}=0,05$, $p_{\text{VUD/FamTag90}}=0,018$) als in der Familienspendergruppe ($\text{Median}_{\text{VUDTag60}}=105$ Zellen/ μl ,

Median_{VUDTag90}= 124 Zellen/ μ l, Median_{VUDTag150}= 146 Zellen/ μ l). Zellen der Familienspendergruppe sind bereits am +60. Tag anzahlmäßig so schnell repopuliert (Median_{FamTag60}=150 Zellen/ μ l) wie die Zellen der Fremdspendergruppe am +150. Tag und können bis zum +150. Tag einen Zugewinn auf 192 Zellen/ μ l peripheren Blutes verzeichnen.

c) Bei den CD8-positiven Zellen findet sich ein ähnliches Bild, veranschaulicht in Abbildung 5: Besonders am +60. (Median_{VUDTag60}=162,5 Zellen/ μ l) und +90. Tag (Median_{VUDTag90}=201,5 Zellen/ μ l) bleiben die Zellen aus der Fremdspende hinter dem Durchschnitt zurück und sind signifikant von der Vergleichsgruppe verschieden ($p_{VUD/FamTag60}$ =0,037, $p_{VUD/FamTag90}$ =0,004). Sie erreichen am +60. Tag im Gegensatz zur Familienspende auch nicht die Normgrenze. Zellen aus der Familienspende wachsen hingegen stetig und sogar überdurchschnittlich gut bis zum +150. Tag (Median_{FamTag60}=230 Zellen/ μ l, Median_{FamTag90}=387 Zellen/ μ l, Median_{FamTag150}= 510 Zellen/ μ l).

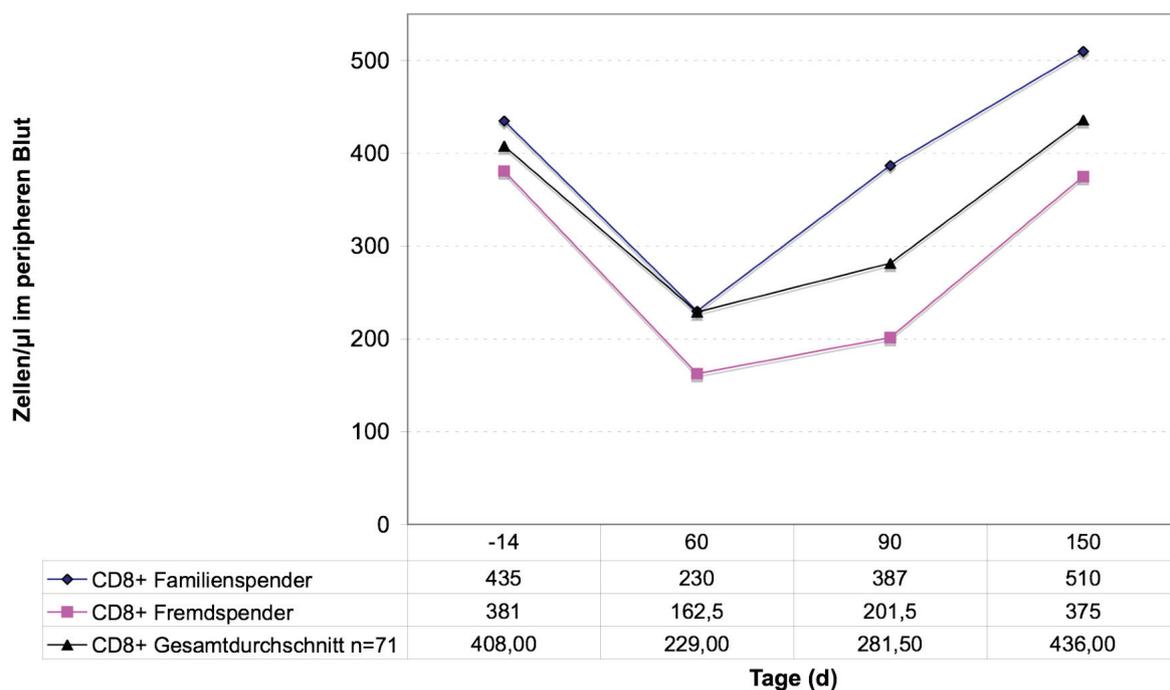


Abbildung 5: Immunrekonstitution der CD8-positiven Zellen bei Familien- und Fremdspende nach allogener Stammzelltransplantation

d) Die CD19⁺-Zellrekonstitution zeigt im Vergleich der Gruppen keine Signifikanzen, jedoch einen Trend: Zellen der Familienspendertransplantate sind bereits am +60.Tag überdurchschnittlich repopuliert (Median_{FamTag60} = 35 Zellen/ μ l) und können dieses Niveau halten (Median_{FamTag90}= 44 Zellen/ μ l, Median_{FamTag150}=35 Zellen/ μ l),

erreichen jedoch auch keine Normwerte bis zum +150.Tag. Die Zellen der Fremdspendertransplantate dagegen bleiben zunächst unter dem Durchschnitt (Median_{VUDTag60}= 20 Zellen/ μ l, Median_{VUDTag90}= 22,5 Zellen/ μ l), nähern sich ihm aber dann (Median_{VUDTag150}= 31 Zellen/ μ l).

e) Im Bereich der CD56⁺-Zellen finden sich bezüglich des Wachstums keine signifikanten Unterschiede. In beiden Gruppen wird am +60. Tag die untere Normgrenze erreicht und die Zellen stagnieren auf diesem hohem Niveau.

Tabelle 7 gibt die erhobenen Messwerte bei den beiden Gruppen wider.

Spender Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	Familie	VUD	Familie	VUD	Familie	VUD	Familie	VUD
CD3 ⁺ -Zellen/ μ l	1227* ¹	762,5	503* ⁴	324,5	689* ⁷	370,5	704	622
CD4 ⁺ -Zellen/ μ l	635* ²	302,5	150* ⁵	105	142	124	192* ⁹	146,5
CD8 ⁺ -Zellen/ μ l	435	381	230* ⁶	162,5	387* ⁸	201,5	510	375
CD4/CD8-Ratio	1,44	1,04	0,44	0,65	0,43	0,51	0,59	0,57
CD19 ⁺ -Zellen/ μ l	149* ³	69,5	35	20	44	22,5	35	31
CD56 ⁺ -Zellen/ μ l	155	125	213	208	237	200,5	217	251,5

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen p*¹:0,001; p*²: 0,00; p*³:0,039; p*⁴:0,008; p*⁵:0,05; p*⁶: 0,037; p*⁷:0,008; p*⁸: 0,004; p*⁹: 0,018

Tabelle 7: Lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach der Spenderauswahl

Abbildung 6 veranschaulicht noch einmal die Verteilung der HLA-Kompatibilität in beiden Gruppen.

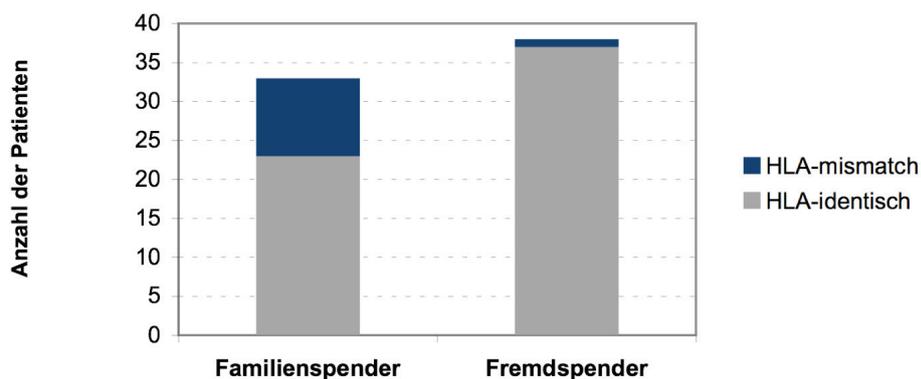


Abbildung 6: HLA-Kompatibilität bei Familien- und Fremdpende

5.5 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Geschlecht des Spenders

a,b,c,d,e) Statistisch ausgewertet wurde, ob das Geschlecht des Spenders die Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation beeinflusst: 49 Transplantate kamen von männlichen Spendern, 22 von weiblichen Spendern. Im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstum aller Zellreihen über die Zeit ausmachen. Die Immunrekonstitution verlief ähnlich der des Gesamtdurchschnittes, tabellarisch folgend wiedergegeben:

Spender Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich
CD3 ⁺ -Zellen/µl	893	1145,5	370	416,5	534	556	669	642
CD4 ⁺ -Zellen/µl	403	450,5	116	122,5	140	116,5	177	190,5
CD8 ⁺ -Zellen/µl	400	408	215	280,5	252	451,5	328	485,5
CD4/CD8-Ratio	1,3	1,11	0,61	0,45	0,52	0,42	0,57	0,59
CD19 ⁺ -Zellen/µl	81	134,5	26	22,5	29	36,5	33	47
CD56 ⁺ -Zellen/µl	131	156,5	211	202	237	190,5	228	227,5

Tabelle 8: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach Spendergeschlecht

Weiterhin wurden entsprechend der klinisch vermuteten höchsten Risikosituation bei weiblichem Spender und männlichem Empfänger diese Gruppe (n=14) und die Konstellation männlicher Spender und männlicher Empfänger (n=35) verglichen. Hinsichtlich des Zellanstieges nach Transplantation ergaben sich auch hierbei keine signifikanten Unterschiede. Tabelle 9 verdeutlicht dies:

Spender/ Empfänger Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	männlich/ männlich	weiblich/ männlich	männlich/ männlich	weiblich/ männlich	männlich/ männlich	weiblich/ männlich	männlich/ männlich	weiblich/ männlich
CD3 ⁺ -Zellen/µl	114	1156	446	588	522	712	677	857
CD4 ⁺ -Zellen/µl	457	664	145	195	183	206	200	277
CD8 ⁺ -Zellen/µl	537	447	274	359	329*¹	474	452	562
CD4/CD8-Ratio	1,11	1,64	0,88	0,85	0,82	0,56	0,82	0,65
CD19 ⁺ -Zellen/µl	279	144	52	49	59	78	62	62
CD56 ⁺ -Zellen/µl	179	150	319	220	282	291	287	245

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen: p*¹: 0,046

Tabelle 9: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach Spendergeschlecht (Hochrisiko)

5.6 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Grundkrankheit

Es sollte sechstens die Frage geklärt werden, ob die Grundkrankheit Einfluss auf die Zellentwicklung nach Transplantation hat. Es wurden 28 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie und 33 Patienten mit akuten Leukämien gegenübergestellt, dabei hatten 26 eine akute myeloische Leukämie, fünf eine sekundäre AML aus einem MDS und fünf Transplantierte eine ALL. Tabelle 10 zeigt die erhobenen Daten in den einzelnen Gruppen.

Krankheit Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	CML	AL	CML	AL	CML	AL	CML	AL
CD3 ⁺ -Zellen/ μ l	1160^{*1}	764	322	503	366	717	600,5	716
CD4 ⁺ -Zellen/ μ l	764,5^{*2}	314	117,5	126	149	138	191,5	184
CD8 ⁺ -Zellen/ μ l	403	369	165,5	162	241	403	366,5	495
CD4/CD8-Ratio	1,86^{*3}	0,69	0,76	0,57	0,66	0,43	0,76	0,57
CD19 ⁺ -Zellen/ μ l	111	56	18	28	21^{*4}	32	22,5^{*6}	50
CD56 ⁺ -Zellen/ μ l	153,5	132	182	269	179^{*5}	271	190,5^{*7}	256

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen p^{*1}: 0,01; p^{*2}: 0,00; p^{*3}:0; p^{*4}:0,05; p^{*5}:0,03; p^{*6}:0,006; p^{*7}: 0,02

Tabelle 10: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Grundkrankheit

Vergleicht man die T-Lymphozyten, so lassen sich über die Zeit anhand der statistischen Teste keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumskurven ausmachen. Jedoch zeigen sich anhand der Wachstumsraten und absoluten Zellzahlen Unterschiede und Trends.

a) CD3-positive Zellen scheinen bei AL-Patienten schneller zu repopulieren (Median_{ALTag60}= 503 Zellen/ μ l, Median_{CMLTag60}= 322 Zellen/ μ l) und können sich in der Frühphase nach Transplantation auf höherem Niveau stabilisieren (Median_{ALTag90}=717 Zellen/ μ l, Median_{CMLTag90}=366 Zellen/ μ l), dieses bei einer Anstiegssrate vom +60. auf den +90.Tag nach Transplantation von 143% bei AL-Patienten versus 114% bei CML-Patienten. CML-Patienten können dieses Defizit jedoch dann bis zum +150. Tag beinahe ausgleichen (Median_{CMLTag150}=601 Zellen/ μ l, WR_{Tag60/90}=164,1%), während das Wachstum bei AL-Patienten stagniert (Median_{ALTag150}=716 Zellen/ μ l, WR_{Tag90/150}=99,9%). AL-Patienten erreichen am Ende des Beobachtungszeitraumes Normwerte.

b) CD4-positive Zellen verhalten sich in beiden Gruppen annähernd gleich und ähnlich der Wachstumskurve aller einundsiebzig Patienten. Normwerte werden in beiden Gruppen am +150.Tag nicht erreicht.

c) Der tendenzielle Unterschied wird wieder bei den CD8⁺-Zellen deutlich: Bei AL-Patienten können sich diese, schon ausgehend von einem höheren Ausgangswert am +60.Tag ($\text{Median}_{\text{ALTag60}}=262$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{CMLTag60}}=165$ Zellen/ μl) besser rekonstituieren, als bei CML-Patienten ($\text{Median}_{\text{ALTag90}}=403$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{CMLTag90}}=241$ Zellen/ μl). Am +150.Tag jedoch wird diese verzögerte Rekonstitution von den CML-Patienten annähernd wieder wettgemacht: Bei einer Anstiegsrate von 152% (versus 123% bei AL) vom +90. Tag an werden im Median 366,5 Zellen/ μl am +150. Tag erreicht, während bei AL-Patienten das Wachstum verlangsamt ist ($\text{Median}_{\text{ALTag150}}=495$ Zellen/ μl). AL-Patienten erreichen am +60.Tag bereits Normwerte, während CML-Patienten diese am +90.Tag erreichen.

d) Signifikanzen finden sich beim Vergleich der CD19⁺-Zellpopulation. Abbildung 7 veranschaulicht den Zelllinienverlauf in beiden Gruppen.

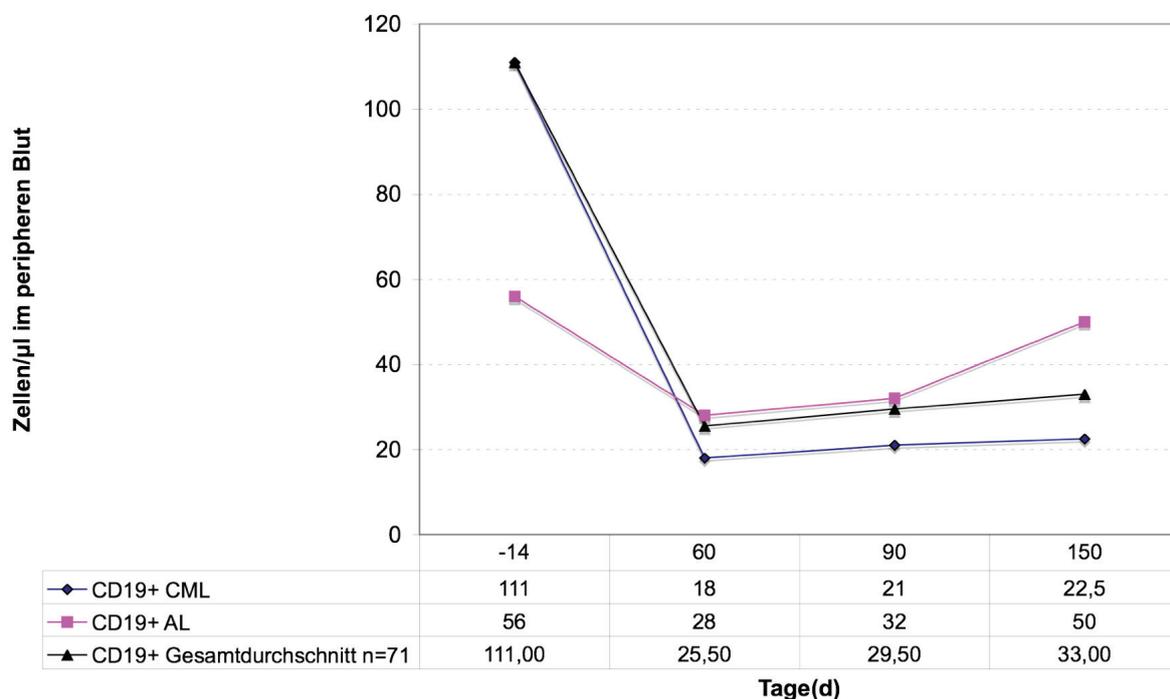


Abbildung 7: Immunrekonstitution der CD19-positiven Zellen bei CML und AL nach allogener Stammzelltransplantation

CD19⁺-Zellen von AL-Patienten sind zu jedem Messzeitpunkt überdurchschnittlich angestiegen ($\text{Median}_{\text{ALTag60}} = 28$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{ALTag90}} = 32$ Zellen/ μl ,

Median_{ALTag150} = 50 Zellen/ μ l) und am +90. und +150.Tag signifikant höher als bei CML-Patienten ($p_{AL/CMLTag90} = 0,05$, $p_{AL/CMLTag150} = 0,03$). CD19⁺-Zellen von CML-Patienten bleiben über den Beobachtungszeitraum sogar unter dem Gesamtdurchschnitt der Transplantierten (Median_{CMLTag60} = 18 Zellen/ μ l, Median_{CMLTag90} = 21 Zellen/ μ l, Median_{CMLTag150} = 22,5 Zellen/ μ l) und zeigen keinen signifikanten Anstieg zwischen den Messzeitpunkten. 178,1% beträgt die Wachstumsrate zwischen dem +60. und +150.Tag bei AL-Patienten, 125% bei CML-Patienten. Normwerte erreichen jedoch beide Patientengruppen am Ende des Beobachtungszeitraumes nicht.

e) Bei den CD56-positiven Zellen finden sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der beiden Patientengruppen. Abbildung 8 veranschaulicht die CD56⁺-Zellrekonstitution bei CML- und AML-Patienten im Vergleich.

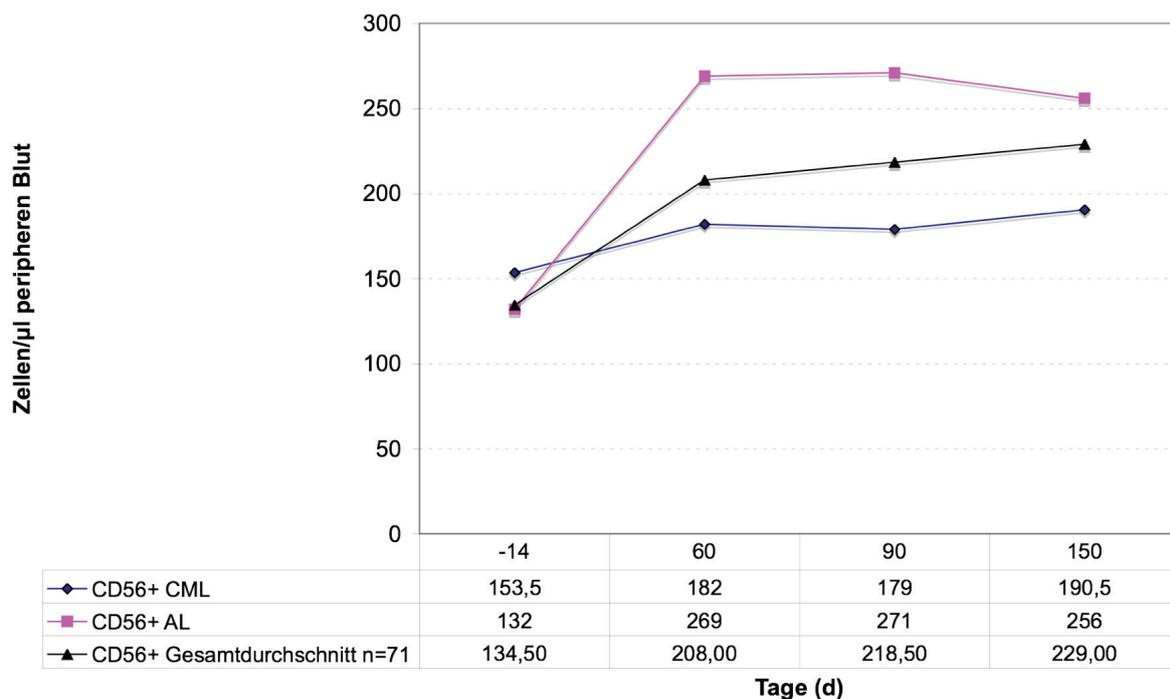


Abbildung 8: Immunrekonstitution der CD56-positiven Zellen bei CML und AL nach allogener Stammzelltransplantation

Normwerte erreichen beide Patientengruppen bereits am +60.Tag nach Transplantation (Median_{ALTag60} = 269 Zellen/ μ l, Median_{CMLTag60} = 182 Zellen/ μ l). Auffällig ist, dass Patienten der CML-Gruppe eine unter dem Gesamtdurchschnitt bleibenden Anstieg an CD56⁺-Zellen (Median_{CMLTag90} = 179 Zellen/ μ l, Median_{CMLTag150} = 190,5 Zellen/ μ l) aufweisen und verlangsamt repopulieren ($WR_{CMLTag60/150} = 104,7\%$)

Besonders am +90. und +150. Tag sind AL-Patienten signifikant ($p_{AL/CMLTag90}=0,006$, $p_{AL/CMLTag150}=0,02$) im CD56⁺-Zellwachstum begünstigt (Median_{ALTag90}=271 Zellen/ μ l, Median_{ALTag150}=256 Zellen/ μ l) und halten sich auf etwa gleichem Niveau ab dem +60. Tag ($WR_{ALTag60/150}=95,2\%$).

5.7 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Krankheitsstadium

Ausgehend von der Annahme, dass Patienten transplantiert in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (advanced) eine langsamere Immunrekonstitution zeigen, wurden zum Vergleich zwei Patientengruppen gebildet, wobei der ersten Gruppe Patienten zugeordnet wurden, die sich in der ersten Komplettremission befanden oder in der chronischen Phase der CML transplantiert wurden (n=11). Alle anderen Patienten mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien (n=60) wurden der zweiten Patientengruppe zugeteilt. Nur rund fünfzehn Prozent des Patientengutes erhielten demnach frühzeitig eine Transplantation.

In allen beobachteten Zellreihen waren über die Zeit keine statistisch signifikanten Unterschiede zu beobachten, jedoch einige Auffälligkeiten zeigten hinsichtlich der Wachstumsraten:

a) CD3-positive Zellen entwickelten sich nach Transplantation in fortgeschrittenen Krankheitsstadien annähernd wie der Gesamtdurchschnitt (Median_{Tag60}=411 Zellen/ μ l, Median_{Tag90}=544,5 Zellen/ μ l, Median_{Tag150}=692 Zellen/ μ l) und wuchsen zu allen Zeitpunkten signifikant ($p_{Tag60/90}=0,005$, $p_{Tag90/150}=0,004$, $p_{Tag60/150}=0$). Im Gegensatz zu den Zellen der Remissionsgruppe, die nicht signifikant anstiegen und unter dem Durchschnitt blieben (Median_{Tag60}=334 Zellen/ μ l, Median_{Tag90}=411 Zellen/ μ l, Median_{Tag150}=472 Zellen/ μ l).

b) Das Wachstum der CD4⁺-Zellen war nicht signifikant verschieden in beiden Gruppen.

c) Dieser Trend eines verbesserten Zellanstieges in der Fortgeschrittenengruppe spiegelt sich vor allem im CD8⁺-Zellwachstum in beiden Gruppen wider, wobei CD8⁺-Zellen der Fortgeschrittenengruppe eine Wachstumsrate von 184% versus 166% in der Remissionsgruppe vom +60. auf den +150. Tag aufweisen.

d) Auch das CD19⁺-Zellwachstum der Remissionsgruppe erscheint verzögert bei einer negativen Wachstumsrate vom +60. auf den +150.Tag von 96% (versus 164,7% in der Fortgeschrittenengruppe).

e) Bei den CD56⁺-Zellen ließen sich keine Unterschiede im Wachstum ausmachen. Tabelle 11 zeigt die erhobenen Daten der Zellentwicklung bezogen auf das Krankheitsstadium.

Stadium Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	Rem	advanced	Rem	advanced	Rem	advanced	Rem	advanced
CD3 ⁺ -Zellen/µl	1117	885	334	411	411	544,5	472	692
CD4 ⁺ -Zellen/µl	757^{*1}	352,5	160	116	142	130	260	168,5
CD8 ⁺ -Zellen/µl	376	406	212	237,5	252	281,5	352	436
CD4/CD8-Ratio	1,65^{*2}	1,06	1,28	0,47	0,8	0,47	0,57	0,57
CD19 ⁺ -Zellen/µl	73	111	24	25,5	19	31	23	42
CD56 ⁺ -Zellen/µl	166	130,5	201	229,5	177	240	213	239

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen p^{*1}: 0,01; p^{*2}: 0,01

Tabelle 11: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf das Krankheitsstadium

5.8 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Alter des Empfängers

Der Median für das Empfängeralter lag bei den 71 Patienten bei 43 Jahren, der jüngste Patient wurde mit 18 Jahren, der Älteste mit 61 Jahren transplantiert. Gegenübergestellt wurden eine Gruppe unter/gleich 40 Jahren (n=30) und eine Gruppe Patienten über 40 Jahren (n=41). Die erhobenen Messwerte sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

a,b,c) Bei der Rekonstitution der T-Lymphozyten fanden sich keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen.

Empfänger- alter Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	< 40 Jahre	>40Jahre	< 40 Jahre	>40 Jahre	< 40 Jahre	>40 Jahre	< 40 Jahre	>40 Jahre
CD3 ⁺ -Zellen/µl	816^{*1}	1146	353	459	529	575	642,5	654
CD4 ⁺ -Zellen/µl	329	448	132,5	105	130	140	188,5	159,5
CD8 ⁺ -Zellen/µl	364^{*2}	431	216,5	228	266	265	375	461
CD4/CD8-Ratio	1,2	1,03	0,67	0,42	0,55	0,46	0,66^{*5}	0,55
CD19 ⁺ -Zellen/µl	120	81	24	25	23,5	33	28^{*4}	52
CD56 ⁺ -Zellen/µl	107,5	155	196	213	165^{*3}	245	199	259

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen p^{*1}:0,027; p^{*2}: 0,037; p^{*3}:0,028; p^{*4}:0,05; p^{*5}:0,057

Tabelle 12: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf das Empfängeralter

d) Auffälligkeiten fanden sich im Bereich der CD19⁺-Lymphozyten. Diese waren am Tag 150 bei den älteren Patienten signifikant höher als bei den Jüngeren ($p_{\text{Tag150}, <40/>40}=0,05$, $\text{Median}_{\text{Tag150}, <40}=28$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{Tag150}, >40}=52$ Zellen/ μl), bei einer Wachstumsrate von 208% vom +60. auf den +150.Tag (vs. $\text{WR}_{<40}=117\%$).

e) Auch die CD56-positiven Zellen scheinen bei den älteren Patienten besser zu rekonstituieren bei einer Signifikanz am +90.Tag ($p_{\text{Tag90}, <40/>40}=0,028$, $\text{Median}_{\text{Tag90}, <40}=165$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{Tag90}, >40}=245$ Zellen/ μl). Normwerte werden jedoch bereits am +60.Tag von beiden Gruppen erlangt ($\text{Median}_{\text{Tag60}, <40}=196$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{Tag60}, >40}=213$ Zellen/ μl). Bei Patienten in der jüngeren Altersklasse bleiben die Zellen an jedem Untersuchungszeitpunkt unter dem Durchschnitt bei einer CD56⁺-Wachstumsrate von 101,5% vom +60. auf den +150.Tag (versus $\text{WR}_{\text{Tag60/150}, >40}=121,6\%$).

5.9 Beeinflussung der lymphozytären Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Geschlecht des Empfängers

27 weibliche und 44 männliche Patienten wurden transplantiert. Vergleicht man diese zwei Gruppen hinsichtlich der Zelllinienentwicklung miteinander, zeichnen sich Trends ab. Tabelle 13 veranschaulicht die erhobenen Daten:

Geschlecht/ Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich	weiblich	männlich
CD3 ⁺ -Zellen/ μl	1174	891	459	372	716^{*1}	471,5	717	617
CD4 ⁺ -Zellen/ μl	474	352,5	129	115,5	161	129,5	179	182
CD8 ⁺ -Zellen/ μl	382	426	230	218	418^{*2}	240	511	341,5
CD4/CD8-Ratio	1,3	1,07	0,46	0,57	0,43	0,5	0,43	0,6
CD19 ⁺ -Zellen/ μl	85	96,5	24	26	25	31	27	46
CD56 ⁺ -Zellen/ μl	149	136	191	221	244	209	249	225

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen $p^{*1}: 0,05$; $p^{*2}: 0,04$

Tabelle 13: Geschlechtsbezogene lymphozytäre Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation

a) CD3-positive Zellen erreichen bei weiblichen Patienten bereits am +90. Tag Normwerte ($\text{Median}_{\text{Tag150}} = 717$ Zellen/ μl), wohingegen männliche Patienten unter dem Normwert bleiben ($\text{Median}_{\text{Tag150}} = 471,5$ Zellen/ μl , $p_{\text{Tag150}} = 0,05$). Insgesamt übersteigen die CD3-positiven Zellen der weiblichen Patienten den Median der CD3⁺- Zellen insgesamt ($n = 71$). Das resultiert hauptsächlich aus dem signifikanten

Unterschied der CD8⁺- Zellen am +90. Tag zwischen den Geschlechtern ($p_{\text{Tag90}} = 0,04$, $\text{Median}_{\text{wTag90}} = 418 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$, $\text{Median}_{\text{mTag90}} = 240 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$).

b) Bei den CD4⁺-Zellen ergeben sich bei beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellreihenentwicklung.

c) CD8⁺-Zellen wachsen bei den weiblichen Patienten vom +60. zum +150.Tag um 222%, während bei den männlichen Patienten eine Wachstumsrate von 157% zu verzeichnen ist. Dies ist auch an der weiterbestehenden Inversion der CD4/CD8-Ratio bei den weiblichen Patienten sichtbar ($\text{Median}_{\text{RatioWTag150}} = 0,43$, $\text{Median}_{\text{RatioMTag150}} = 0,6$), der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Abbildung 9 stellt die Ergebnisse grafisch dar.

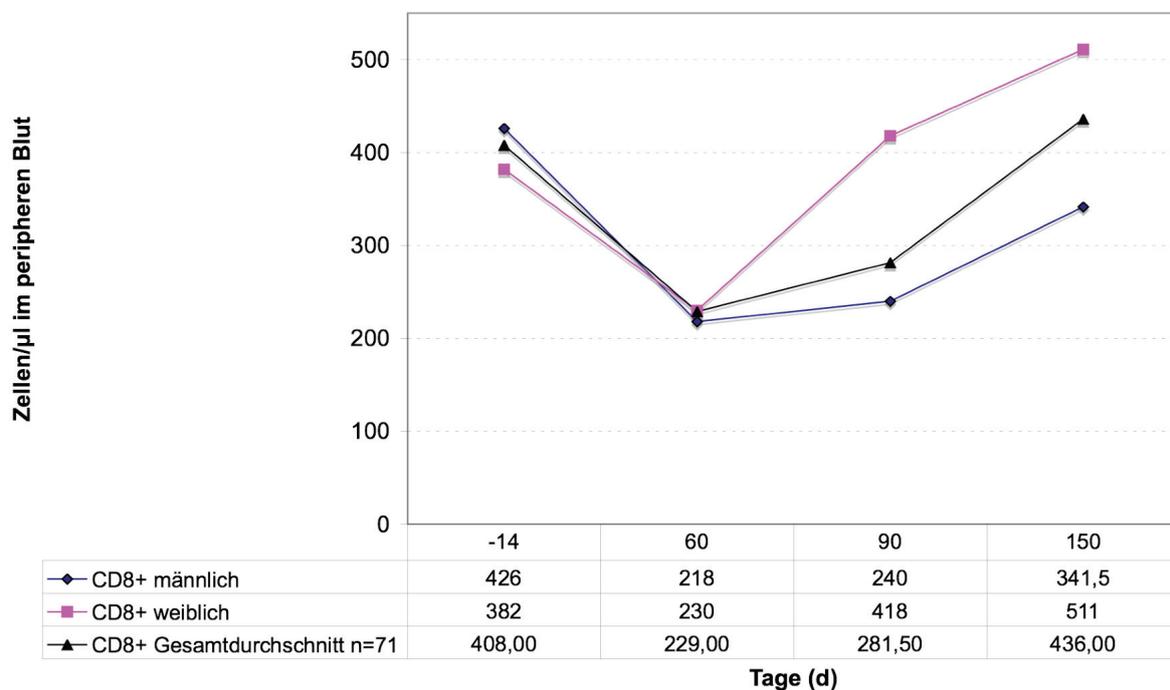


Abbildung 9: Immunrekonstitution der CD8-positiven Zellen bei männlichen und weiblichen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation

Anders verhält es sich bei den

d) CD19-positiven Zellen: Hier nähert sich der Zeitverlauf der „weiblichen Zelllinie“ dem Median aller Patienten an ($\text{Median}_{\text{wTag60}} = 24 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$, $\text{Median}_{\text{wTag90}} = 25 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$, $\text{Median}_{\text{wTag150}} = 27 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$, $\text{WR}_{\text{wTag60/150}} = 113\%$), während der Trend bei den männlichen Patienten besonders am +150.Tag auf ein verbessertes Wachstum hin weist ($\text{Median}_{\text{mTag60}} = 26 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$, $\text{Median}_{\text{mTag90}} = 91 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$, $\text{Median}_{\text{mTag150}} = 46 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$, $\text{WR}_{\text{mTag60/150}} = 177\%$).

e) Die CD56-positiven Zellen nähern sich bei beiden Geschlechtern nach Transplantation der Wachstumskurve der Gesamtheit des Patientengutes an und zeigen keine signifikanten Unterschiede.

5.10 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch die Konditionierung

Die chemotherapeutische Vorbereitung zur allogenen Stammzelltransplantation ist seit ihren Anfängen in ständiger Diskussion und Gegenstand vieler klinischer Studien. Sie liefert den Hauptanteil der therapieassoziierten Mortalität und bedarf daher näherer Betrachtung.

Hinsichtlich der Konditionierung wurden zwei Patientengruppen verglichen. In der ersten Gruppe (n=38) wurden die Patienten klassisch myeloablativ konditioniert. In jedem Therapieprotokoll fand sich TBI und/oder Cyclophosphamid (näheres siehe Patienten und Methoden). In einer zweiten Gruppe wurden Patienten mit dosisreduzierter Konditionierung (n=33) zusammengefasst, dabei erhielt der Hauptteil (23/33) Fludarabin, Cyclophosphamid und Antithymozytenglobulin im Vorfeld.

a) Das Wachstum der CD3⁺-Zellen war in beiden Gruppen über die Zeit annähernd gleich und nicht signifikant voneinander verschieden. Lediglich die Wachstumsrate von 179,2% vom +60. auf dem +150. Tag bei den myeloablativ Konditionierten ist gegenüber der Vergleichsgruppe erhöht ($WR_{\text{redTag60/150}}=140,4\%$). Das lässt sich mit den absoluten Zellzahlen am +60. Tag erklären, die in der dosisreduzierten Konditionierungsgruppe höher lagen ($\text{Median}_{\text{klassTag60}}=335$ Zellen/ μl vs. $\text{Median}_{\text{redTag60}}=471$ Zellen/ μl).

b) Die Zellen der CD4⁺-Zellpopulation sind zu allen vier Untersuchungszeitpunkten signifikant ($p_{\text{klass/redTag60}}=0,018$, $p_{\text{klass/redTag90}}=0,045$, $p_{\text{klass/redTag150}}=0,009$) voneinander verschieden. Zwar zeigt sich in allen beiden Gruppen ein Wachstum, jedoch repopulieren die Zellen der klassisch Konditionierten zu allen Zeitpunkten besser und sogar über dem Gesamtdurchschnitt ($\text{Median}_{\text{klassTag60}}=155$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{klassTag90}}=172,5$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{klassTag150}}=228,5$ Zellen/ μl). CD4⁺-Zellen der dosisreduziert Konditionierten bleiben im Gegensatz hinter der ersten Gruppe und dem Gesamtdurchschnitt zurück ($\text{Median}_{\text{redTag60}}=97,5$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{redTag90}}=116,5$ Zellen/ μl , $\text{Median}_{\text{redTag150}}=137,5$ Zellen/ μl). Abbildung 10 veranschaulicht dies:

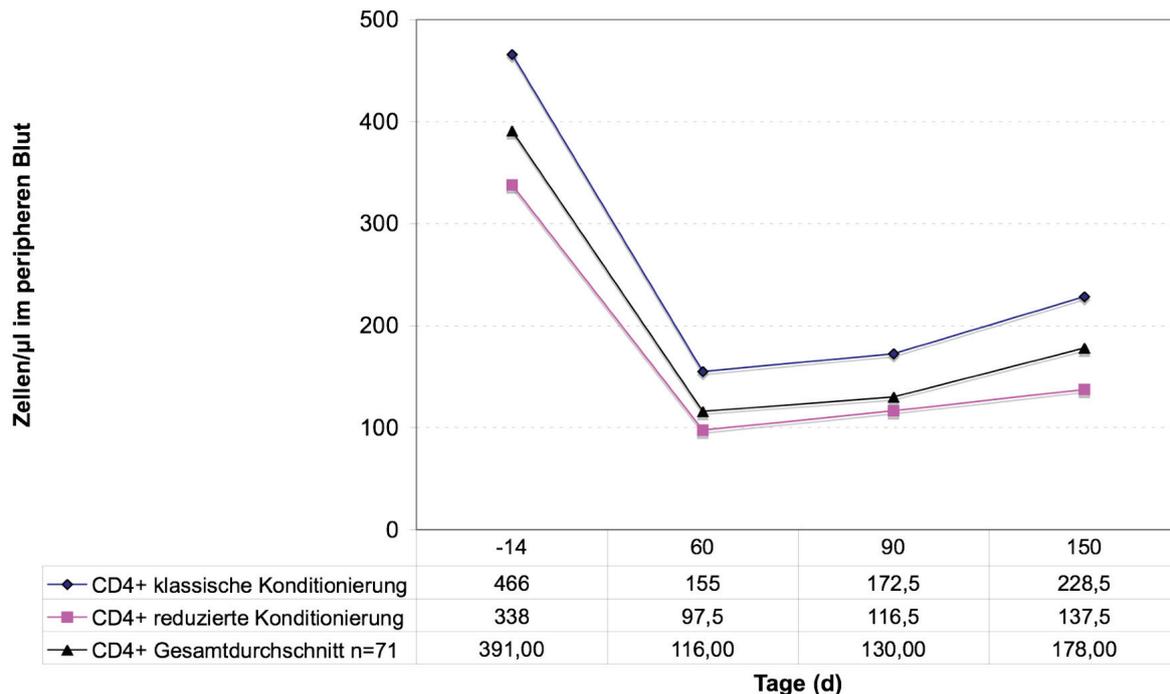


Abbildung 10: Immunrekonstitution der CD4-positiven Zellen nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Konditionierung

c) Bezogen auf die CD8⁺-Zellen zeichnet sich jedoch ein anderes Bild ab: Signifikant höher sind die Zellen bei reduzierter Konditionierung schon am +60. Tag nach Transplantation (Median_{redTag60}=287,5 Zellen/µl vs. Median_{klassTag60}=162,5 Zellen/µl, $p_{\text{klass/redTag60}}=0,05$). Dieser Trend setzt sich bis zum +150.Tag fort (Median_{redTag90}=305,5 Zellen/µl vs. Median_{klassTag90}=258,5 Zellen/µl, Median_{redTag150}=456,5 Zellen/µl vs. Median_{klassTag150}=353,5 Zellen/µl).

Dieses Bild spiegelt sich zu allen vier Untersuchungszeitpunkten signifikant auch in der CD4/CD8-Ratio wider. Die Erniedrigung der CD4⁺-Zellen und Erhöhung der CD8⁺-Zellen führt zu einer stärkeren Inversion in der dosisreduziert konditionierten Gruppe am +60. (Median_{red}=0,36 vs. Median_{klass}=1,51), +90. (Median_{red}=0,37 vs. Median_{klass}=0,74) und +150. Tag (Median_{red}=0,33 vs. Median_{klass}=0,76). Alle Vergleiche waren signifikant ($p_{\text{klass/redTag60}}=0$, $p_{\text{klass/redTag90}}=0,003$, $p_{\text{klass/redTag150}}=0$).

d) Deutliche Unterschiede in beiden Gruppen gab es auch im CD19⁺-Zellwachstum. Bei reduzierter Konditionierung waren die CD19⁺-Zellen am +60. Tag schon doppelt so stark vertreten (Median_{redTag60}=45,5 Zellen/µl) als in der Vergleichsgruppe (Median_{klassTag60}=19,5 Zellen/µl) und signifikant verschieden ($p_{\text{klass/red}}=0,007$). Auch am +90. (Median_{redTag90}=50 Zellen/µl vs. Median_{klassTag90}=20 Zellen/µl) und am +150. Tag (Median_{redTag150}=22,5 Zellen/µl vs. Median_{klassTag150}=59,5 Zellen/µl) sind die

CD19⁺-Zellen der dosisreduziert Konditionierten signifikant stärker gewachsen ($p_{\text{klass/redTag90}}=0$, $p_{\text{klass/redTag150}}=0$) als in der Vergleichsgruppe der myeloablativ Konditionierten. Außerdem rekonstituieren die Zellen der reduziert Konditionierten zu jedem Untersuchungszeitpunkt besser als der Gesamtdurchschnitt, wohingegen die Zellen der Vergleichsgruppe dahinter zurückbleiben. Abbildung 11 verdeutlicht dies.

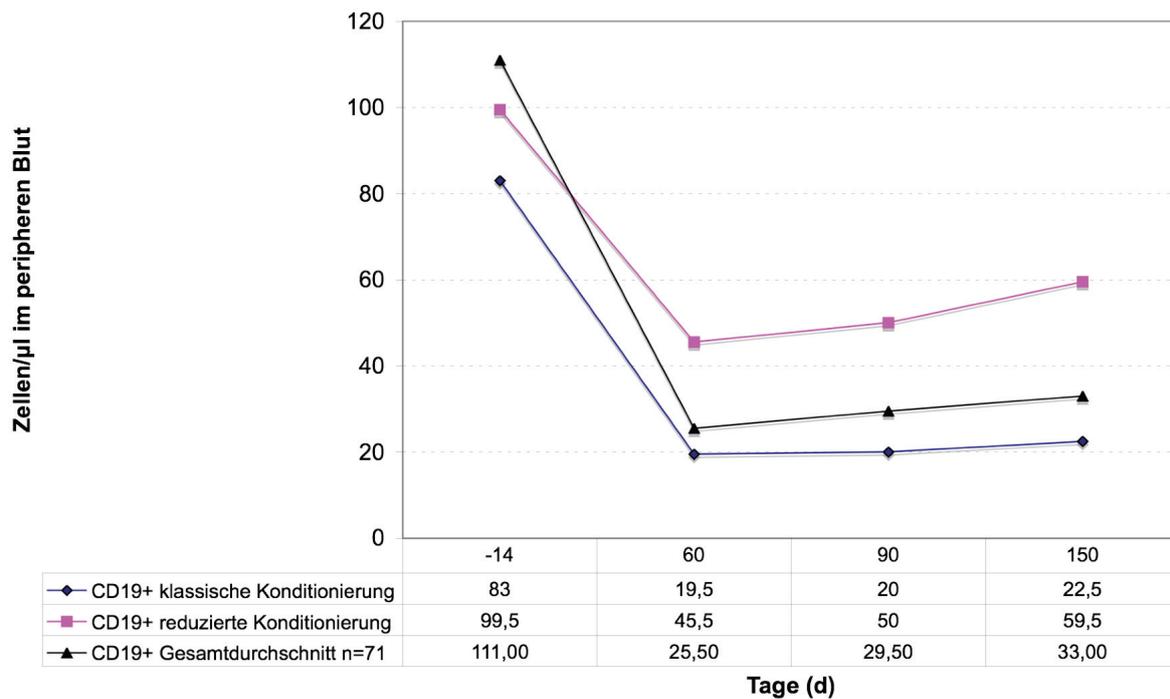


Abbildung 11: Immunrekonstitution der CD19-positiven Zellen nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Konditionierung

e) Beim Wachstum der CD56⁺-Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild: Am +60. (Median_{red}=304,5 Zellen/µl vs. Median_{klass}=178,5 Zellen/µl) und +90. Tag (Median_{red}=288,5 Zellen/µl vs. Median_{klass}= 181,5 Zellen/µl) sind die CD56⁺-Zellen signifikant höher ($p_{\text{klass/redTag60}}=0,017$, $p_{\text{klass/redTag90}}=0,002$) als bei den dosisreduziert Konditionierten. Auch am +150. Tag zeigt sich dieser signifikante Unterschied (Median_{redTag150}=259 Zellen/µl, Median_{klassTag150}=199,5 Zellen/µl, $p_{\text{klass/redTag150}}= 0,019$) im schlechteren Wachstum der CD56⁺-Zellen bei myeloablativ Konditionierten. Auffällig ist, dass die Anstiegsrate (85%) und damit auch die absoluten CD56⁺-Zellzahlen bei dosisreduziert Konditionierten nach dem +60. Tag rückläufig sind. Beide Vergleichsgruppen können von Beginn des Beobachtungszeitraumes an Normwerte erreichen.

Tabelle 14 gibt alle Messdaten der Zellreihen nach Konditionierung wieder.

Konditionierung Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	ablative	reduziert	ablative	reduziert	ablative	reduziert	ablative	reduziert
CD3 ⁺ -Zellen/μl	1031	874,5	335	471	534	540,5	652,5	661,5
CD4 ⁺ -Zellen/μl	466^{*1}	338	155^{*3}	97,5	172,5^{*8}	116,5	228,5^{*12}	137,5
CD8 ⁺ -Zellen/μl	384,5	416,5	162,5^{*4}	287,5	258,5	305,5	353,5	456,5
CD4/CD8-Ratio	1,51^{*2}	0,66	1,51^{*7}	0,37	0,74^{*11}	0,37	0,76^{*15}	0,33
CD19 ⁺ -Zellen/μl	83	99,5	19,5^{*5}	45,5	20^{*9}	50	22,5^{*13}	59,5
CD56 ⁺ -Zellen/μl	159	125	178,5^{*6}	304,5	181,5^{*10}	288,5	199,5^{*14}	259

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanzen p^{*1}: 0,0059; p^{*2}: 0,009; p^{*3}:0,018; p^{*4}:0,053; p^{*5}:0,007; p^{*6}:0,017; p^{*7}: 0,00; p^{*8}: 0,045; p^{*9}: 0,00; p^{*10}:0,002; p^{*11}: 0,003; p^{*12}: 0,009; p^{*13}:0,00; p^{*14}: 0,019; p^{*15}: 0,00

Tabelle 14: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf die Konditionierung

5.11 Beeinflussung der lymphozytären Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Auftreten der Graft-versus-Host Disease

Bei Zweiundvierzig der Transplantierten trat keine Graft-versus-Host Disease (Grad 0, n=19) oder nur eine leichte GVHD vom Grad 1 (n=23) auf. Der Altersmedian lag in dieser Gruppe bei 43 Jahren. Neunundzwanzig Patienten waren von einer schweren GVHD der Grade 2 (n=24), 3 (n=4) und 4 (n=1) betroffen (Grafisch dargestellt in Abbildung 12). Der Altersmedian lag in dieser Gruppe bei 42 Jahren.

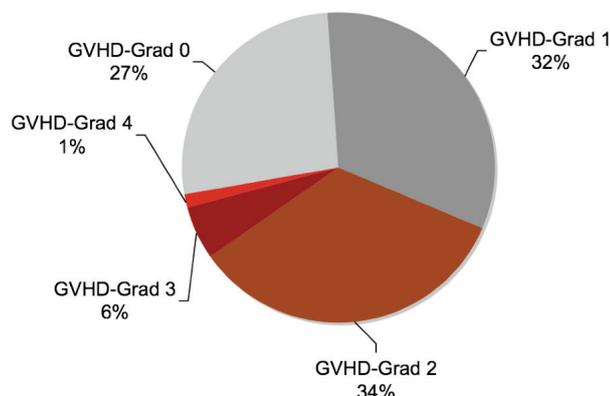


Abbildung 12: Auftreten der Graft-versus-Host Disease nach allogener Stammzelltransplantation

Grad 0 und 1 wurden einer gemeinsamen Gruppe zugeordnet, da es zwischen den beiden keine signifikanten Unterschiede im Zellvergleich gab. Dies entspricht auch dem klinischen Aspekt.

Tabelle 15 zeigt alle erhobenen Messdaten der beiden Gruppen.

GVHD-Grad Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	0 - 1	2 - 4	0 - 1	2 - 4	0 - 1	2 - 4	0 - 1	2 - 4
CD3 ⁺ -Zellen/ μ l	1006,5	893	447	336	530	718	618,5	807
CD4 ⁺ -Zellen/ μ l	441,5	307	125,5	116	126,5	161	187	179
CD8 ⁺ -Zellen/ μ l	397	411	247,5	136	263	395	404	467
CD4/CD8-Ratio	1,00	1,27	0,43	0,69	0,51	0,43	0,56	0,57
CD19 ⁺ -Zellen/ μ l	79	102	41^{*1}	13	45	22	52,5^{*3}	21
CD56 ⁺ -Zellen/ μ l	153,5	120	254^{*2}	171	227	200	229	213

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanz p^{*1}: 0,001; p^{*2}: 0,03; p^{*3}: 0,018

Tabelle 15: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation unterschieden nach dem GVHD-Stadium

a) Betrachtet man die Entwicklung der CD3⁺-Zellen nach Transplantation fällt zunächst auf, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Zelllinienentwicklung zwischen leichter/bzw. fehlender GVHD-Ausprägung und schwerer GVHD gibt. Jedoch machen sich besonders bei der Betrachtung der Zellanstiegsraten Unterschiede bemerkbar. CD3-positive Zellen der ersten Patientengruppe (Grad 0 und 1) entwickeln sich bis zum +150. Tag nahezu ähnlich dem Gesamtdurchschnitt aller einundsiebzig Patienten (Median_{0/1GVHDTag60}= 447 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag90}= 530 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag150}= 618,5 Zellen/ μ l) bei einer Anstiegsrate von 138,4% vom +60. auf den +150.Tag. Bei Patienten mit schwerer GVHD (Grad 2-4) steigen die Zellen vom zunächst niedrigerem Niveau am +60. Tag (Median_{2-4GVHDTag60}= 336 Zellen/ μ l) auf einen Median von 718 Zellen/ μ l am +90.Tag. Bei einer Anstiegsrate von 240 % (vs.138,4%) zwischen dem +60. zum +150.Tag erreichen sie am +150. Tag einen Median von 807 Zellen/ μ l. Dabei liegt der eigentliche Wachstumsschub zwischen dem +60. und +90. Tag (WR 214%).

b) CD4-positive Zellen nähern sich in ihrem Wachstum einander an (Median_{0/1GVHDTag60}=125,5 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag90}=126,5 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag150}=187 Zellen/ μ l, Median_{2-4GVHD60}=116 Zellen/ μ l, Median_{2-4GVHDTag90}=161 Zellen/ μ l, Median_{2-4GVHDTag150}=179 Zellen/ μ l), so dass die Ursache für

die quantitativen Unterschiede bei den CD3-positiven Zellen eher bei den CD8⁺-Zellen zu suchen sind:

c) CD8⁺-Zellen der ersten Gruppe nähern sich erneut dem Gesamtdurchschnitt an (Median_{0/1GVHDTag60} = 247,5 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag90} = 263 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag150} = 404 Zellen/ μ l). Findet sich jedoch eine schwere GVHD, so bleiben die Zellen zunächst unter dem Gesamtdurchschnitt zurück (Median_{2-4GVHDTag60} = 136 Zellen/ μ l, Inversion der Ratio auf 0,69), dann kommt es jedoch zu einem Wachstumssprung zum +90. Tag hin (Median_{2-4GVHDTag90} = 395 Zellen/ μ l) bei einer Anstiegsrate von 290,4% (vs. 106,4% bei GVHD Grad 0-1). Mit 467 Zellen/ μ l (Median) am +150.Tag gleicht sich der Anstieg schließlich wieder an. Der Normwert für CD8-positive Zellen wird also am +60. Tag nur von den Patienten erreicht, die keine oder nur eine leichte GVHD (Grad 1) ausbildeten. Insgesamt steht eine Wachstumsrate von 343% vom +60. auf den +150. Tag bei schwerer GVHD, einem Anstieg von 163,2% bei GVHD Grad 0 bis 1 entgegen.

d) Signifikanzen finden sich beim CD19⁺-Zellwachstum. In Abbildung 13 ist der Zelllinienverlauf beider Gruppen grafisch dargestellt.

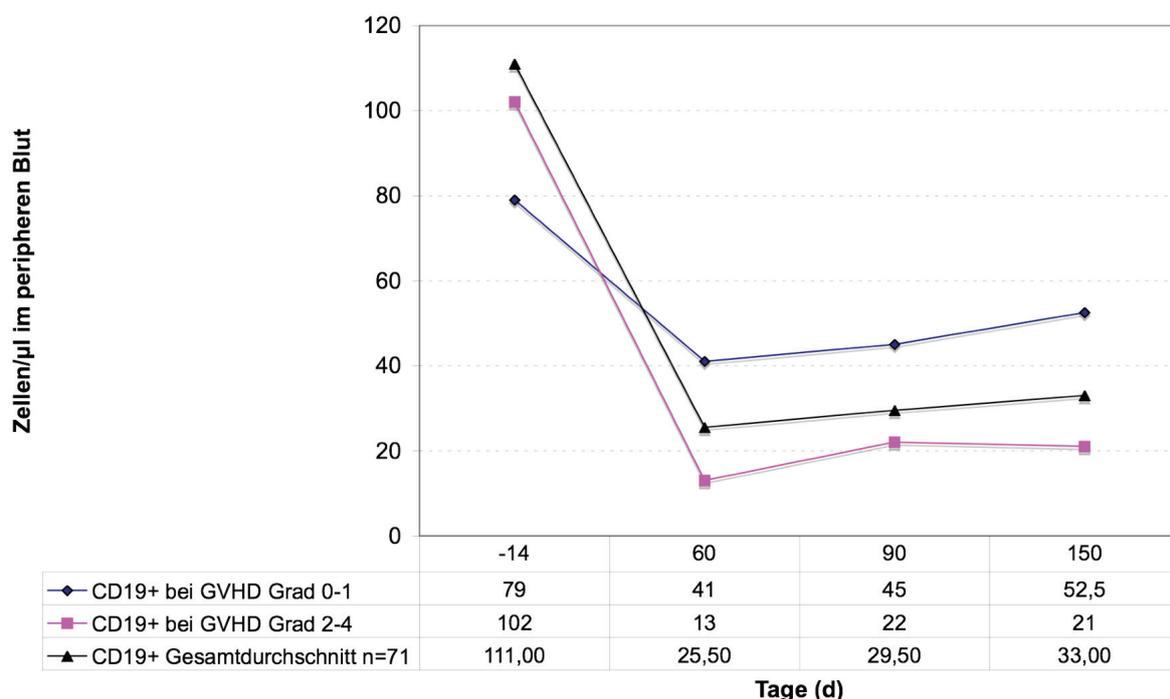


Abbildung 13: Immunrekonstitution der CD19-positiven Zellen abhängig vom Auftreten einer GVHD nach allogener Stammzelltransplantation

Unter dem Gesamtdurchschnitt (n=71) blieben Patienten in ihrem CD19⁺-Zellwachstum über den gesamten Beobachtungszeitraum, wenn eine schwere

GVHD auftrat (Median_{2-4GVHDTag60}= 13 Zellen/ μ l, Median_{2-4GVHDTag90}= 22 Zellen/ μ l, Median_{2-4GVHDTag150}=21 Zellen/ μ l). CD19⁺-Zellen, die keinem oder nur einem geringen GVHD-Einfluss ausgesetzt waren, konnten über die Zeit besser rekonstituieren (Median_{0/1GVHDTag60}=41 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag90}= 45 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag150}= 52,5 Zellen/ μ l) und übertrafen in ihrem Wachstum sogar den Gesamtdurchschnitt schon ab dem +60. Tag. Signifikante Unterschiede zeigten sich am +60. (p=0,001) und am +150. Tag (p=0,003). Normwerte konnten jedoch von keiner der beiden Gruppen erreicht werden.

e) CD56⁺-Zellen, die nicht oder nur durch eine leichte GVHD beeinflusst werden, zeigen ein ähnliches Wachstum wie der Gesamtdurchschnitt (Median_{0/1GVHDTag60}= 254 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag90}= 227 Zellen/ μ l, Median_{0/1GVHDTag150}= 229 Zellen/ μ l) und stagnieren nach Erreichen des Normalwertes auf annähernd gleichem Niveau. In Abbildung 14 lässt sich der Zelllinienverlauf verfolgen.

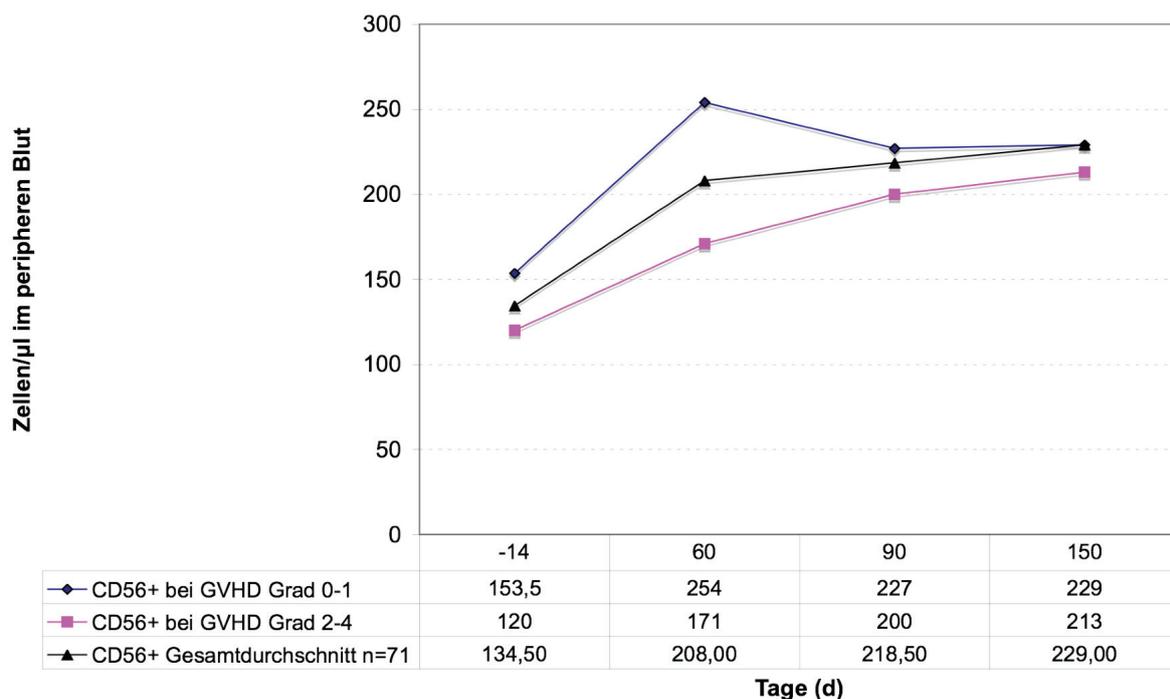


Abbildung 14: Immunrekonstitution der CD56-positiven Zellen abhängig vom Auftreten einer GVHD nach allogener Stammzelltransplantation

Auffällig ist, dass am +60. Tag nach Transplantation CD56-positive Zellen bei schwerer GVHD signifikant in ihrem Wachstum zurückbleiben (Median_{2-4GVHDTag60}=171 Zellen/ μ l, p_{0/1 vs. 2-4} = 0,012). Dieser Rückstand wird aber bis zum +90. Tag aufgeholt (Median_{2-4GVHDTag60}= 200 Zellen/ μ l) und bleibt dann ausgeglichen (Median_{2-4GVHDTag150} = 213 Zellen/ μ l). CD56⁺-Zellen sind auch in dieser Gruppe zu

jeder Zeit normwertig und haben eine positive Wachstumsbilanz vom +60. auf den +150.Tag ($WR_{2-4GVHD}=125\%$ vs. $WR_{0/1GVHD} = 90\%$).

5.12 Beeinflussung der lymphozytären Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation durch das Auftreten einer CMV-Infektion

21 Patienten von 71 entwickelten nach der Transplantation eine laborchemisch nachgewiesene Zytomegalievirusinfektion. 50 Patienten blieben infektionsfrei. Betrachtet man die T-Zellen beider Gruppen im Vergleich fällt Folgendes auf:

a) CD3-positive Zellen wachsen bis zum +90. Tag in beiden Gruppen ähnlich und nähern sich dem Wachstum des Durchschnittes aller Patienten ($Median_{CMVTag60}=334$ Zellen/ μ l, $Median_{ohneCMVTag60}=426$ Zellen/ μ l, $Median_{CMVTag90}=555$ Zellen/ μ l, $Median_{ohneCMVTag90}=533$ Zellen/ μ l). Nur am +150. Tag zeigen Patienten mit symptomatischer CMV-Infektion einen signifikanten Wachstumssprung ($p_{CMV/ohne}=0,01$) auf einen Median von 850 Zellen/ μ l ($WR_{Tag60/150}=254\%$), während CD3⁺-Zellen von Patienten ohne CMV-Infektion nur einen Median von 600 Zellen/ μ l am +150.Tag erreichen ($WR_{Tag60/150}=141\%$). Das Wachstum der CD3-positiven Zellen unter einer CMV-Infektion ist zwischen den Zeitpunkten stets signifikant ($p_{Tag60/90}=0,005$, $p_{Tag90/150}=0,003$, $p_{Tag60/150}=0$). Ohne CMV ist der Zuwachs an CD3⁺-Zellen nur zwischen +60. und +150.Tag signifikant ($p_{Tag60/150}=0,004$).

b) CD4-positive Zellen verhalten sich in ihrem Wachstum bis zum +150.Tag in beiden Gruppen annähernd gleich und sind nur am +60. Tag signifikant ($p=0,02$) voneinander verschieden ($Median_{CMVTag60}=97$ Zellen/ μ l, $Median_{ohneCMVTag60}=139,5$ Zellen/ μ l). CD4⁺-Zellen bei CMV-Infektion unterscheiden sich an jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant ($Median_{CMVTag90}=126$ Zellen/ μ l, $Median_{CMVTag150}=177$ Zellen/ μ l, $p_{Tag60/90}=0,017$, $p_{Tag90/150}=0,011$, $p_{Tag60/150}=0,001$) bei einer Wachstumsrate von 182,5% vom +60. auf den +150.Tag. Ohne CMV-Infektion findet sich dagegen eine Wachstumsrate von 130,5% ($Median_{ohneCMVTag90}=141$ Zellen/ μ l, $Median_{ohneCMVTag150}=182$ Zellen/ μ l).

c) Deutlich werden die Gruppenunterschiede bei der Auswertung der CD8-positiven Zellen: In der Gruppe ohne CMV nähert sich die Wachstumskurve bis zum +150. Tag der Grundgesamtheit, die Zellen erreichen bereits am +60. Tag Normwerte bei einer Wachstumsrate von 120% vom +60. auf den +150.Tag ($Median_{ohneCMVTag60}=218$ Zellen/ μ l, $Median_{ohneCMVTag90}=240$ Zellen/ μ l, $Median_{ohneCMVTag150}=263$ Zellen/ μ l). In der CMV-Gruppe jedoch zeigt sich am +90. Tag ein Wachstumssprung ($Median_{CMVTag90}=500$ Zellen/ μ l, $WR_{Tag60/90}=191\%$), der sich bis zum +150. Tag fortsetzt

(Median_{CMVTag150}= 713 Zellen/ μ l, WR_{Tag90/150}=143%). Insgesamt steht eine Wachstumsrate vom +60. auf den +150.Tag von 272% in der CMV-Gruppe, einer Wachstumsrate von 121% in der CMV-freien Gruppe gegenüber. Dabei sind die Zellen am +150. Tag in beiden Gruppen signifikant voneinander verschieden ($p=0$). Das Verhältnis der CD4⁺- zu CD8⁺-Zellen wird in der Ratio deutlich. Diese ist zu allen drei Zeitpunkten signifikant verschieden ($p_{\text{Tag60}}=0$, $p_{\text{Tag90}}=0,01$, $p_{\text{Tag150}}=0$) und weist in der CMV-Gruppe über die Zeit eine deutliche Inversion zugunsten der CD8⁺-Zellen auf (Median_{RatioCMVTag60}=0,28 vs. 0,69, Median_{RatioCMVTag90}=0,38 vs. 0,59, Median_{RatioCMVTag150}=0,26 vs. 0,67).

d) Bei der Betrachtung des CD19⁺-Zellwachstums fällt ein Niveauunterschied auf. Am +60. Tag sind die Zellen unter CMV-Infektion signifikant ($p=0$) niedriger als in der CMV-freien Gruppe (Median_{CMVTag60}= 12 Zellen/ μ l, Median_{ohneCMVTag60}= 34 Zellen/ μ l). Die CD19⁺-Zellen der CMV-Gruppe können diesen Rückstand jedoch bis zum +150. Tag mit einer Wachstumsrate von 367% wettmachen (Median_{CMVTag90}= 19 Zellen/ μ l, Median_{CMVTag150}= 44 Zellen/ μ l). Die CD19⁺-Zellrekonstitution in der CMV-freien Gruppe stagniert dagegen ab dem +60. Tag auf niedrigem Niveau (Median_{ohneCMVTag90}=36,5 Zellen/ μ l, Median_{ohneCMVTag150}=32,5 Zellen/ μ l). Beide Gruppen bleiben bis zum +150. Tag unter dem Normwert.

e) CD56⁺-Zellen unterscheiden sich in ihrem Wachstum zwischen den Gruppen nicht signifikant und nähern sich dem der Gesamtheit mit Erreichen des Normwertes bereits am +60. Tag.

Tabelle 16 zeigt die Messdaten der Zellrekonstitution unter CMV-Einfluss.

CMV Zelllinie	- 14.Tag		+ 60.Tag		+ 90.Tag		+ 150.Tag	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein
CD3 ⁺ -Zellen/ μ l	1146	945	334	426	555	533	850^{*6}	600,5
CD4 ⁺ -Zellen/ μ l	325	431	97^{*2}	139,5	126	141	177	182
CD8 ⁺ -Zellen/ μ l	482	372,5	262	218	500	240	713^{*7}	263
CD4/CD8-Ratio	0,62^{*1}	1,37	0,28^{*4}	0,69	0,38^{*5}	0,59	0,26^{*8}	0,67
CD19 ⁺ -Zellen/ μ l	75	103	12^{*3}	34	19	36,5	44	32,5
CD56 ⁺ -Zellen/ μ l	99	153,5	191	229,5	200	241	195	255

* die fettunterlegten Zahlen bezeichnen Signifikanz $p^{*1}:0,02$; $p^{*2}: 0,02$; $p^{*3}:0,00$; $p^{*4}:0,00$; $p^{*5}:0,00$; $p^{*6}:0,01$; $p^{*7}: 0,00$; $p^{*8}: 0,01$

Tabelle 16: Lymphozytäre Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation bezogen auf eine CMV-Infektion

6 DISKUSSION

6.1 Einführung

Die erfolgreiche allogene Stammzelltransplantation und damit auch die Immunrekonstitution sind von vielen Einflussfaktoren abhängig, von denen einige in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollen.

Vor der Stammzelltransplantation bringt der Patient einige nicht beeinflussbare Faktoren mit ein, wie sein Geschlecht und Alter sowie die bestehende maligne Grunderkrankung. Beeinflussbare Transplantationsbedingungen wie zum Beispiel die quantitative Zusammensetzung des Transplantates (Anzahl der transfundierten CD34⁺-Zellen und CD3⁺-Zellen), die Qualität des Transplantates (Auswahl des Spenders nach HLA-Typ und Geschlecht) und das Stadium der Grunderkrankung können sich auf den Transplantationsverlauf auswirken.

Besonders die Wahl der Konditionierung ist für den Transplantationserfolg entscheidend, da bei der Behandlungsauswahl immer eine Gradwanderung zwischen Toxizität der verabreichten Therapeutika und erhoffter Eliminierung der malignen Grunderkrankung besteht. Daher befindet sich die Frage nach der „richtigen“ Konditionierung in aktueller Diskussion, klinischer Erprobung und zieht auch in dieser Studie das Hauptaugenmerk auf sich.

Wichtige gefährliche Komplikationen für den Patienten, die besonders im ersten Jahr nach Stammzelltransplantation auftreten, sind Infektionen (z.B. CMV) oder Immunreaktionen des Transplantates gegen den Empfänger (GVHD), wobei hier nur die akute GVHD aufgrund des gewählten Untersuchungszeitraumes bis zum +150.Tag geprüft werden konnte.

Alle beobachteten Einflussfaktoren wurden unter der Fragestellung der regelhaften lymphozytären Immunrekonstitution untersucht, da diese für die Prognose des Patienten mitentscheidend ist. Dabei ist besonders die Frühphase nach Transplantation zu beachten, da hier der Patient durch einen annähernd vollständigen Verlust der Immunkompetenz besonders gefährdet ist. Eine längerfristige Einschränkung der Immunkompetenz erhöht das Risiko für Infektionen und damit auch der therapieassoziierten Mortalität. Die granulozytäre Immunrekonstitution wurde in dieser Studie vernachlässigt, da diese laut Literatur in den meisten Fällen bereits 14 Tage nach Transplantation nachweisbar ist und komplikationslos verläuft (Champlin et al. 2000). Bei unseren Patienten war dieser

„Leukozytentake“ (>1000 Leukozyten/ μ l peripheren Blutes) durchschnittlich am +13.Tag zu verzeichnen, am +17. Tag waren im Mittel größer 20000 Thrombozyten/ μ l nachweisbar.

Einige Studien wurden zur Rekonstitution der Lymphozyten nach allogener Stammzelltransplantation bereits durchgeführt. Problematisch im Vergleich dieser Studien ist jedoch die große Heterogenität bezüglich der Konditionierungsregime, Transplantatzusammensetzung, Spenderauswahl und posttransplantärer Immunsuppression.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Das in der Studie untersuchte Patientengut (n=71) zeigte in allen Fällen ein regelhaftes Angehen des Transplantates mit Messbarkeit aller lymphozytären Zellreihen am +60.Tag nach Transplantation. Einen Anstieg der absoluten Zellzahlen bis zum +150.Tag war bei den CD3⁺- ($WR_{\text{Tag60/150}}$ 167%), den CD4⁺- ($WR_{\text{Tag60/150}}$ 154%), den CD8⁺- ($WR_{\text{Tag60/150}}$ 190%) und den CD19⁺-Zellen ($WR_{\text{Tag60/150}}$ 129%) zu verzeichnen. Dabei war der Anstieg der CD3-positiven Zellen zwischen den Stichtagen immer signifikant, bei den CD19⁺-Zellen nur zwischen dem +60.und +150.Tag. Am schnellsten rekonstituierten CD3⁺- und CD8⁺-Zellen, dann CD56- positive Zellen, dann CD4⁺-und zum Schluss CD19⁺-Zellen. Unter Normalbedingungen sollten gemessen an der absoluten Zellzahl am meisten CD3⁺-, dann CD4⁺-, dann CD8⁺- und zuletzt zirka gleiche Zahlen an CD19⁺-und CD56⁺-Zellen im peripheren Blut vorhanden sein. Die Zellreihen verhalten sich posttransplantationem untereinander also nicht „normal“. Normwertig waren am +150. Tag nur die Zellwerte für CD8⁺-Zellen und für CD56⁺-Zellen, die diesen Normwert bereits am +60.Tag erreichten. Grundsätzlich kann man also vermerken, das CD8- positive Zellen und CD56- positive Zellen nach Transplantation am besten rekonstituieren, ja sogar relativ unbeeinflusst von den Rahmenbedingungen. Auch dass CD3⁺-Zellen annähernd Normwerte bis zum +150. Tag erreichen, lässt sich sicher nur anhand des guten CD8⁺-Zellwachstums erklären. Am meisten durch die Transplantationsbedingungen in Mitleidenschaft gezogen werden CD4⁺-Zellen und CD19⁺-Zellen, die noch am +150.Tag keine Normwerte erreichen. Dies spiegelt sich auch in der CD4/CD8-Ratio wider, die eine Inversion < 1 bis zum +150.Tag zeigt. Die Ergebnisse zur lymphozytären Immunrekonstitution unserer Studie unterstützen damit die Daten aus der Literatur (Pavletic et al. 1998, Shenoy et al. 1999, Rondelli

et al. 2000, Heining et al. 2007). Dass insbesondere die frühe Zellrecovery nach Transplantation positiv mit dem Langzeitüberleben korreliert (Pavletic et al. 1998), könnte eine Stimulation der Lymphopoese mit Wachstumsfaktoren oder Interleukinen posttransplantationem sinnvoll erscheinen lassen, beziehungsweise eine Stratifizierung für Interventionen über eine Studienuntersuchung anregen.

In der Vergangenheit war die **Stammzellausbeute** (CD34⁺- Stammzellanzahl im Transplantat) aus dem Knochenmark begrenzt. Die zunehmende Verwendung von mobilisierten Stammzellen aus dem peripheren Blut eröffnet jedoch neue Perspektiven. Studien zeigten, dass stammzellangereicherte Transplantate die Zeit bis zum Transplantatanwachsen verkürzen und die Immunrekonstitution dadurch beschleunigen können (Shpall et al. 1998, Uchida et al. 1998). Anhand von Tierversuchen konnten Chen und Kollegen (2004) nachweisen, dass insbesondere T- und B-Zellen ein schnelleres Wachstum zeigen und die Wachstumsgeschwindigkeit mit der infundierten Stammzellendosis positiv korreliert ist. Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine hohe Stammzellendosis die Thymopoese, also auch das T-Zellrepertoire und die T-Zelldiversität fördert, begründet durch einen höheren Input an lymphoiden Stammzellen und T-Precursorzellen in den Thymus. Bereits 67 Patienten erhielten in dieser Datensammlung periphere Blutstammzellen und nur vier Patienten ein Knochenmarkstransplantat. Die infundierte CD34⁺-Menge zeigte in keiner der Zelllinien einen signifikanten Unterschied der Zellentwicklung nach Transplantation, dabei wurden zwei Gruppen gebildet mit einer Stammzellgabe kleiner (n=25) und größer (n=45) 6×10^6 CD34⁺-Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers. Tendenziell scheinen CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen in ihrem Wachstum bei höherer Stammzellmenge bevorteilt zu sein. Das betrifft vor allem den +60. und +90.Tag posttransplantationem. Bezüglich des „Leukozytentakes“ finden sich nur minimale Unterschiede (+12,5 Tage bei Infusion $<6 \times 10^6$ Zellen/kgKG vs. +13 Tage bei Infusion $>6 \times 10^6$ Zellen/kgKG). Ebenso waren in beiden Gruppen am durchschnittlich +14.Tag >20000 Thrombozyten pro μ l Blut bestimmbar. Laut unserer Studie ist eine erhöhte Stammzellmenge im Transplantat nicht signifikant gleichbedeutend mit einer schnelleren Immunrekonstitution, schadet dieser jedoch auch nicht. Transplantate mit geringeren Stammzellmengen, besonders auch aus dem Knochenmark sind also, was auch die jahrelange klinische Anwendung beweist, genauso fähig, eine Immunkompetenz beim Empfänger zu entwickeln. Nakamura et al. (2008) konnten

statistisch belegen, dass eine CD34⁺-Zelldosis $>4,2 \times 10^6$ /kgKG eine schnellere lymphozytäre Immunrestitution am Tag +30 nach Stammzelltransplantation hervorruft und mit einem verminderten Rezidivrisiko einhergeht. Möglicherweise besteht hier ein immunvermittelter protektiver Effekt der CD34⁺-Zellen gegen ein Wiederaufflammen der malignen Grunderkrankung.

Ähnlich verhält es sich mit der infundierten **CD3⁺-Zellmenge**. Zur Gruppenunterscheidung wurde eine Zellzahl von 300×10^6 Zellen/kgKG gewählt. Auch hier waren beim Vergleich beider Gruppen ($n_{<300 \times 10^6}=24$, $n_{>300 \times 10^6}=36$) keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum auszumachen. Tendenziell war erneut ein verbessertes Wachstum von CD3⁺-, CD8⁺-, und CD19⁺-Zellen, besonders zum +150. Tag hin, bei erhöhter CD3⁺-Zellinfusion nachweisbar. Relativ unbeeinflusst blieben CD4⁺- und CD56⁺-Zellen von der höheren CD3⁺-Menge im Transplantat. Mehr CD3⁺-Zellen im Transplantat wirken sich nicht negativ auf die Zellreihenentwicklung aus. Laut Shenoy und Kollegen (1999) geht T-Zell-depletion mit einer reduzierten Immunrestitution nach Transplantation einher. Da in dieser Studie nur unmanipulierte Transplantate eingesetzt wurden, lässt sich dazu keine Aussage treffen. Nicht unerwartet verhielten sich hingegen die GVHD-Raten. Zu 70 % trat bei weniger als 300×10^6 CD3⁺-Zellen/kgKG keine GVHD oder nur eine leichte GVHD auf. Die restlichen 30 % der Patienten entwickelten nur eine GVHD vom Grad 2 und keine schweren Formen. Wurden $>300 \times 10^6$ CD3⁺-Zellen/kgKG infundiert entwickelten 51% der Patienten keine GVHD oder eine GVHD vom Grad 1. 49% der Patienten in dieser Gruppe zeigten jedoch das Bild einer GVHD vom Grad 2 bis 4, davon 27% der Grade 3 und 4. Eine höhere CD3⁺-Zellanzahl im Transplantat stellt einen Risikofaktor für das Auftreten einer GVHD und deren schweren Formen dar. Das erscheint unter dem Blickwinkel der davon in dieser Studie unbeeinflussten Immunrestitution ungünstig für das Outcome des Patienten, da die GVHD eine Hauptkomplikation nach Transplantation stellt. Diese Argumentation steht erneut im Widerstreit mit dem erwünschten GVL-Effekt, der mit zunehmender Reduktion des T-Zellgehaltes im Transplantat verloren geht. Ziel muss es also sein, die T-Zellzahl im Transplantat zu finden, die den Patienten nicht gefährdet und gleichsam im Kampf gegen den malignen Zellklon wirksam werden kann. Die frühe Immunrestitution nach Transplantation wird erstens durch die Quantität der transferierten Zellen bestimmt und zweitens durch eine Neubildung aus den Spenderstammzellen. Da T-Zellen eine Lebenszeit von Monaten bis Jahren haben, ist davon auszugehen, dass

die gezählten T-Zellen im Empfänger in der Frühphase nach Transplantation hauptsächlich dem Transplantat entstammen und nur in geringem Maße einer de-novo-Synthese aus Spenderzellen (Storek et al. 1995, Heitger et al. 1997, Castermans et al. 2008). Dumont-Girard und Kollegen (1998) fanden mittels Zellmarkern an T-Zell-depletierten Transplantaten heraus, dass die Thymusfunktion erst zirka sechs Monate nach der Transplantation einsetzt. Untermauert wird diese Hypothese durch zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass das langsame T-Zellwachstum vor allem durch die verringerte Thymusfunktion im Empfänger bestimmt wird, einerseits verursacht durch die physiologische Thymusinvolution im Alter, aber auch durch eine additive Schädigung durch die Konditionierung (Roux et al. 2000, Hakim FT 2002), GVHD-Entwicklung (Grad 2 oder höher) und zusätzlicher posttransplantärer Immunsuppression bei allogenen Transplantationen. Insbesondere die Verwendung von ATG in hohen Dosen sowie Vorbehandlung mit TBI bewirken ein verringertes CD4⁺-Zellwachstum. Die Verwendung von Steroiden zum Beispiel bei Auftreten einer GVHD hemmt die T-Zellaktivierung durch negative Effekte auf IL-1 und IL-6 (Hakki et al. 2003). Bleibt jedoch die Frage offen, warum gerade CD8⁺-Zellen trotz gleicher Differenzierung im Thymus ungestört im Wachstum bleiben. Es müssen also noch andere Faktoren existieren, die das T-Zellwachstum spezifisch beeinflussen. Im Gegensatz dazu scheinen CD56⁺-Zellen in ihrer Entwicklung nicht durch die Quantität an transfundierten Zellen limitiert zu sein, da sie in unserer Studie bereits zwei Monate nach Transplantation Normwerte erreichen und diese bis zum Beobachtungsende aufrechterhalten. Studien von Witherspoon (1995), Keever et al. (1993), Hauch et al. (1990) und Storek et al. (2001) konnten ebenso belegen, dass die CD56⁺-Zellfunktion frühzeitig nach Transplantation wiederkehrt. Mit ihrer Eigenschaft Zielzellen und insbesondere in vitro auch Tumorzellen, ohne vorherige Antigenstimulation lysieren zu können, scheinen sie nach neueren Erkenntnissen auch wichtige Effektorzellen im Kampf gegen das Tumorwachstum zu sein. Dieser Antitumoreffekt könnte besonders in der Frühphase nach Transplantation bei bestehender T-Zelldefizienz vorteilhaft zum Tragen kommen. Im Tierversuch registrierten Jiang et al. (1997) bei der Transplantation T-Zell-depletierten Knochenmarkes mit CD56⁺-Zellretention nur minimale GVHD-Raten, das heißt, dass dieser „Tumorzelllyseeffekt“ nicht mit einer Reaktion gegen Empfängergewebe erkaufte wird. Dunbar et al. (2008) konnten in einer klinischen Studie zeigen, dass eine schnelle Rekonstitution von CD56⁺-Zellen

mit einer verminderten Rezidivrate einhergeht. Hervorzuheben ist, dass diese bei dosisreduzierter Vorbehandlung nicht mit einer erhöhten GVHD-Rate assoziiert ist. Die weitere Forschung auf dem Gebiet der CD56⁺-Rekonstitution nach Transplantation könnte also neue prognostische und therapeutische Optionen eröffnen.

Die **HLA-Kompatibilität** ist für eine Stammzelltransplantation essenziell, sie beeinflusst laut Literatur das Angehen des Transplantates, das GVHD-Auftreten und die Infektionsrate. Auch diese Hypothesen wurden anhand der vorliegenden Daten untersucht. 33 Patienten erhielten eine Familienspende, davon waren 23 HLA-identisch, 10 jedoch mit einem Mismatch behaftet. Gegenübergestellt wurden 38 Patienten, die eine freiwillige unverwandte Spende erhalten hatten, wobei nur ein HLA-Mismatch auftrat. Es zeigten sich Unterschiede in der zellulären Rekonstitution je nach dem, ob ein Familien- oder Fremdspender vorlag. Dieser Unterschied zieht sich mit einer besseren Rekonstitution für Familientransplantate tendenziell durch alle Zelllinien. Signifikanzen zeigen sich aber vor allem bei den T-Lymphozyten: Im CD3⁺-Zellbereich zeigt sich ein deutlich verbessertes Wachstum, besonders in der Frühphase nach Transplantation, die absoluten Zellzahlen am +60. und +90.Tag sind signifikant besser als nach Fremdspende. Diese Beobachtung dürfte in dem verbesserten CD8⁺-Zellwachstum nach Familienspende an eben genannten Zeitpunkten basieren. CD8⁺-Zellen steigen bei Familienspendern bereits am +60. Tag signifikant höher ein und unterscheiden sich auch am +150.Tag signifikant von Fremdspendertransplantaten. Heining et al. (2007) konnten ebenfalls zeigen, dass bei Fremdspende CD4⁺-Lymphopenien nach Stammzelltransplantation beobachtet werden. Berücksichtigt man also nur die Immunrekonstitution nach Transplantation, ist also ein Familienspender, trotz HLA-Mismatch, einem Fremdspender vorzuziehen. Natürlich ist es aus klinischer Sicht so, dass erst nach Ausschluss des Vorhandenseins eines Familienspenders (HLA-identisch) eine Fremdspendersuche eingeleitet wird. Die Unterschiede in der Zellregeneration sind deutlich, problematisch ist diese Argumentation dennoch, da die unverwandte Spende zwar eine höhere Komplikationsrate trägt, schon wegen der höheren GVHD-Raten, aber im Gegenzug eine bessere Wirksamkeit gegen den malignen Zellklon zu haben scheint. Betrachtet man die GVHD-Raten in dieser Studie, so fällt auf, dass nach Familienspende zu 67% keine oder nur eine GVHD des 1. Grades auftrat. Bei Fremdspendern waren es mit 53% weniger Patienten. Trotz des Auftretens schwerer

GVHD-Stadien bei Fremd Spendern sind hier keine höheren T-Zellraten zu beobachten. GVHD kann also in diesem Fall nicht das verbesserte Zellwachstum bei Familienspendern erklären. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist auch, dass innerhalb der Familienspendergruppe bei Patienten mit HLA-identischen Transplantaten zu 78% keine oder nur eine leichte GVHD auftrat, während bei einem Mismatch dies nur zu 40% geschah. Am günstigsten auf die GVHD-Prophylaxe scheint sich die HLA-identische Familienspende auszuwirken. Hinsichtlich der zu erwartenden höheren Infektionsraten nach Fremdspende decken sich unsere Beobachtungen mit der Literatur. 76% der Transplantierten nach Familienspende entwickelten keine symptomatische CMV-Infektion, wohingegen in der Fremdspendergruppe 66% „CMV-frei“ blieben. Wichtigster Prognosefaktor für die CMV-Infektion ist jedoch nicht die HLA-Kompatibilität, sondern der Serostatus von Empfänger und Spender prätransplantationem. Bei Seronegativität beider kam es in allen Fällen (29 von 71 Patienten) nicht zu einer symptomatischen CMV-Infektion unabhängig vom HLA-Status. 44% in der Familienspendergruppe und 32% in der Fremdspendergruppe bildeten trotz Seropositivität des Spenders oder des Empfängers keine CMV-Infektion aus, so dass der Infektionsausbruch durchaus positiv zu beeinflussen ist. Eine verbesserte T-Zellimmunrekonstitution, wie sie durch eine Familienspende erreicht wird, kann dann gleichbedeutend mit einer verbesserten Immunabwehr verstanden werden. Das allgemeine Überleben unterscheidet sich bei HLA-identischer verwandter oder unverwandter Spende nach Ottinger et al. (2001) nicht. Besteht bei VUDs für HLA-Antigene eine volle Kompatibilität, so ist das Risiko für eine akute GVHD geringer als bei einer nicht-voll-HLA-identischen Situation. Ob Mismatch oder nicht, so ist die „unverwandte Spende“ immer mit einem größeren GVHD-Risiko behaftet als die Spende von einem komplett HLA-identischen Verwandten (Apperley 1998, S.38).

Des Weiteren wurde geprüft, ob das **Geschlecht des Spenders** auf die Immunrekonstitution nach Transplantation einwirkt. Es gibt Hinweise darauf, dass weibliche Spender, insbesondere durch Geburten und Aborte, vermehrt alloreaktive T-Zellen in sich tragen. In unserer Studie hat das Spendergeschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution des Empfängers, obgleich bei weiblichen Spendern, besonders bei CD8⁺- und CD19⁺-Zellen, verbesserte Wachstumsraten zum +150. Tag hin bestehen. Zu 45,5% entwickelten Empfänger weiblicher Transplantate schwere GVHD-Formen, im Gegensatz dazu nur 38,7% der

Empfänger männlicher Transplantate. Weiterhin wurden entsprechend der klinisch vermuteten höchsten Risikosituation bei weiblichem Spender und männlichem Empfänger diese Gruppe (n=14) und die Konstellation männlicher Spender und männlicher Empfänger (n=35) verglichen. Hinsichtlich des Zellanstieges nach Transplantation ergaben sich auch hierbei keine signifikanten Unterschiede. Stern et al. (2008) konnten jedoch zeigen, dass die Kombination weiblicher Spender/männlicher Empfänger mit einer Zunahme der chronischen GVHD, einer erhöhten Transplantat-assoziierten Mortalität und einem verringerten Gesamtüberleben verbunden ist. Die Rezidivrate ist geringer, jedoch unterstützen diese Aussagen die klinische Praxis weibliche Spender für männliche Empfänger zu vermeiden.

Auch muss die Frage gestellt werden, ob und wie sich die **Grunderkrankung** des Empfängers auf den Rekonstitutionsverlauf der Lymphozyten nach Transplantation auswirkt. Gegeneinander aufgewogen wurden akute Leukämien (n=33) und die chronisch myeloische Leukämie (n=28). Andere Grunderkrankungen (z.B. NHL, Mb. Hodgkin) wurden aufgrund geringer Fallzahlen vernachlässigt. Betrachtet man die T-Zellen, so gibt es keine signifikanten Unterschiede, jedoch Trends. Insgesamt scheinen CD3⁺- und CD8⁺-Zellen unter dem Therapieregime bei akuten Leukämien weniger zu leiden. Dieser Vorsprung der AL-Patienten scheint sich besonders in den ersten zwei Monaten bemerkbar zu machen, sich dann aber über den +150. Tag hinaus einander anzugleichen. CD4⁺-Zellen verhalten sich über den Beobachtungszeitraum äquivalent. Bei CD19⁺- und CD56⁺-Zellen ist der Unterschied besonders am +90. und +150.Tag nach Transplantation signifikant verschieden. Hier profitieren die Zellen von AL-Patienten von einem Wachstumsvorsprung. Akute Leukämien im Vorfeld der Transplantation scheinen also bessere Erfolge hinsichtlich der Immunrekonstitution zu versprechen. Da sich die verbesserte Immunrekonstitution vor allem auf CD19⁺-Zellen bezieht, ist das eine interessante Feststellung, da es insbesondere das problematische CD19⁺-Zellwachstum nach Transplantation zu verbessern gilt. Auch Rondelli und Kollegen (2000) machten bei einem Vergleich der Immunrekonstitution bei AML-, CML- und Plasmozytompatienten die Beobachtung, dass CML-Patienten ein schlechteres Zellwachstum zeigen, insbesondere der T-Zellpopulation. Patienten mit einer akut-leukämischen Grunderkrankung scheinen also hinsichtlich der lymphozytären Immunrekonstitution bevorteilt zu sein. Möglicherweise handelt es sich bei diesen

Beobachtungen jedoch auch um Überlagerungseffekte. 82,4% der CML-Patienten in unserer Studie erhielten eine klassische Konditionierungsbehandlung hauptsächlich mit TBI und Cyclophosphamid, während in der AL-Gruppe nur knapp 40 % der Patienten dementsprechend konditioniert wurden. Patienten mit akuter Leukämie hatten also in zirka 60% eine reduzierte Vorbehandlung, die sich laut unseren Daten insbesondere günstig auf das CD19⁺-Zellwachstum auswirkt.

Entsprechend der Hypothese, dass eine lange Krankheitsdauer und das Auftreten von Rezidiven nach Primärtherapie eine verlangsamte Immunrekonstitution posttransplantationem hervorbringen, haben wir die 11 Patienten in der ersten Remission oder in der chronischen CML-Phase, 60 Patienten mit fortgeschrittenen **Krankheitsstadien** gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede ließen sich zwischen den Zellreihen nicht ausmachen. Jedoch war das Wachstum der CD3⁺-Zellen, der CD4⁺-und CD8⁺-Zellen in der Fortgeschrittenengruppe zu allen Zeiten signifikant beschleunigt. Auch hinsichtlich des CD19⁺-Zellwachstums blieb die Remissionsgruppe erstaunlicherweise hinter der Fortgeschrittenengruppe mit einer negativen Wachstumsrate von 96% vom +60. auf den +150.Tag zurück. Nur die CD4⁺-Zellen scheinen über die Zeit tendenziell besser in der Remissionsgruppe zu populieren. Auch hinsichtlich dieser Beobachtung lässt sich alles auf einen Zusammenhang mit der Konditionierung zurückführen. Über dreiviertel der Patienten in der Remissionsgruppe wurden klassisch konditioniert, wohingegen zirka die Hälfte der Patienten in der Fortgeschrittenengruppe reduziert konditioniert wurden. Daher erklärt sich auch das schnellere Wachstum der CD8⁺-Zellen und CD19⁺-Zellen in der Fortgeschrittenengruppe. Nur die CD4⁺-Zellen repopulieren in der Remissionsgruppe tendenziell besser, vermutlich aufgrund des fehlenden Einsatzes von Antithymozytenglobulin bei klassischer Konditionierung.

Für die Stammzelltransplantation existierten bisher klar definierte Altersgrenzen. Allogen mit verwandtem Spender sollte nicht über das 50. Lebensjahr, bei unverwandtem Spender nicht über das 45. Lebensjahr hinaus transplantiert werden. Ausgehend davon war die Frage zu klären, ob höheres **Lebensalter** sich bei unserem Patientengut negativ auf die Immunrekonstitution ausgewirkt hat. Im Median lag das Lebensalter dieser Studie bei 43 Jahren. Daher wurden Patienten zwei Gruppen, einer unter/gleich 40 Lebensjahren (n=30) und einer über 40 Lebensjahren(n=41), zugeordnet. T-Lymphozyten entwickeln sich in beiden Gruppen vergleichbar nach Transplantation. Annähernd signifikant verschieden ist allein die

CD4/CD8-Ratio am +150.Tag. Dies ist anhand des quantitativ besseren Wachstums von CD8⁺-Zellen in der älteren Gruppe und des schlechteren CD4⁺-Wachstums in dieser Gruppe zu erklären. Signifikant bessere Zellzahlen zeigen jedoch CD19⁺-Zellen von älteren Patienten am +150.Tag bei einer Wachstumsrate von insgesamt 208% auf den +150.Tag. Auch zwischen den Zeitpunkten ist das Wachstum in dieser Zellgruppe bei Älteren signifikant. Bei der Betrachtung der CD56⁺-Zellen können sich diese in der älteren Patientengruppe auf höherem Niveau konsolidieren und sind signifikant am +90. Tag von den CD56⁺-Zellen jüngerer Patienten verschieden. Beide Altersklassen erreichen jedoch mit dem +60.Tag Normwerte, die CD56⁺-Zellen der Patienten unter 40 Jahren bleiben jedoch in ihrem Wachstum unter dem Gesamtdurchschnitt zurück. Bezieht man weitere wichtige Einflussfaktoren mit ein, ergibt sich folgendes Bild: Die Vergleichbarkeit in der T-Lymphozytenentwicklung lässt sich auch in der ähnlichen Verteilung von GVHD und CMV-Infektion in den Altersgruppen erkennen. Vergleicht man die Verwendung der Konditionierungsarten in beiden Gruppen, findet man Auffälligkeiten: Zu 67% wurde bei Patienten unter 40 Jahren klassisch (hauptsächlich TBI und Cyclophosphamid) konditioniert. Bei Patienten über 40 Jahren wurde zu 58% eine reduzierte Vorbehandlung gewählt, insbesondere begründet in der Tatsache, dass ältere Patienten stärker mit Komorbiditäten behaftet sind als Jüngere. Hier liegen Gründe für das verbesserte CD19⁺- und CD56⁺-Zellwachstum und die CD4⁺-Zelldepression. 76 % der Älteren erhielten Transplantate von Familienspendern, davon der Hauptteil HLA-identisch (15 von 21 Patienten). Dementgegen wurden 60% der Jüngeren durch die Hilfe von Fremdspendern transplantiert. Auch hier könnten Gründe für ein schlechteres Zellwachstum liegen. Höheres Alter stellt also für den Patienten keine Kontraindikation zur Transplantation dar, dabei scheint sich eine reduzierte Konditionierung auf die Immunrekonstitution günstig auszuwirken. Kim et al. (2007) konnten in einer Studie mit Patienten, die myeloablativ und dosisreduziert konditioniert wurden, ebenfalls den Vorteil einer dosisreduzierten Konditionierung für Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien oder höheren Alters belegen. Hier zeigte sich eine 1-Jahresüberlebensrate von 44% bei Patienten mit dosisreduzierter Vorbehandlung, im Vergleich zu 15% bei Patienten mit myeloablativer Vorbehandlung.

Weiterhin konnten wir feststellen, dass das **Geschlecht des Empfängers** keinen wesentlichen Einfluss auf die Rekonstitution der lymphozytären Zelllinien zu haben

scheint. Signifikant verschieden war lediglich das CD8⁺-Zellwachstum am +90. Tag. Im Mittel 418 Zellen/ μ l bei weiblichen Patienten standen hier 240 Zellen/ μ l bei männlichen Patienten entgegen. Ursächlich hierfür könnte sein, dass bei weiblichen Patienten zu 44 % eine GVHD der Grade 2-4 auftrat, wohingegen bei den Männern 39% diese GVHD-Stadien ausbildeten. Diese stärkere Neigung zu schweren GVHD-Erkrankungen lässt sich mit den höheren CD8⁺-Werten in Zusammenhang bringen. Die Ausbildung einer CMV-Infektion jedoch nicht. 32% der Männer (14 von 44 Patienten) entwickelten eine symptomatische CMV-Infektion, bei den Frauen waren es mit 26% (7 von 27 Patienten) weniger.

Die Frage nach der effektivsten **Konditionierung** war in der Vergangenheit und Gegenwart Basis zahlreicher klinischer Studien (Schetelig et al. 2004, Sorrow et al. 2004, Baron et al. 2004, Diaconescu et al. 2004, Saito et al. 2003, Petersen et al. 2003, Slavin et al. 1998, Subirà et al. 2003 etc.). Verschiedene Forschungsgruppen haben bereits gezeigt, dass die Applikation hochimmunsuppressiver Medikamente einschließlich Fludarabin, ATG oder Niedrigdosisradiatio in ein langanhaltendes Engraftment der Empfängerzellen münden können (Giralt et al. 1997 und 2001, McSweeney et al. 2001, Khouri et al. 1998, Slavin et al. 1998, Sykes et al. 1997). Wir verglichen in unserer Studie Patienten die klassisch myeloablativ konditioniert wurden (n=38) mit denen, die eine sogenannte dosisreduzierte Konditionierung erhielten (n=33). Der Altersmedian lag in beiden Gruppen bei 42 bis 43 Jahren. Man findet signifikante Unterschiede in der Zellrekonstitution, wenn die Konditionierung verschieden ist. CD8⁺-Zellen sind am +60. Tag, CD19⁺-und CD56⁺-Zellen zusätzlich am +90. und +150. Tag signifikant stärker angewachsen, wenn reduziert konditioniert wurde. Diese Beobachtung konnte auch von Baron und Kollegen (2004) in einer Studie mit reduzierter Konditionierung von 120 Patienten gemacht werden. Eine reduzierte Konditionierung scheint sich positiv auf die Zellentwicklung auszuwirken. Begründet ist dies durch eine stärkere Knochenmarkschädigung bei klassischer Konditionierung. Lediglich bei den CD4⁺-Zellen fanden sich Vorteile im Anstieg bei der myeloablativen Konditionierung. Das erscheint zunächst verwunderlich, jedoch erhielten 29 von 33 Patienten bei der reduzierten Konditionierung Antithymozytenglobulin, das hier für eine Hemmung von T-Helferzellen durch längerfristige Zirkulation im peripheren Blut verantwortlich sein könnte. Der prätransplantäre Einsatz von ATG erfolgte vor allem zur Bekräftigung der Immunsuppression und Sicherung des Engraftments, um das Auftreten einer

Transplantatabstoßung und einer GVHD zu vermeiden. Es bewirkt, dass nicht nur die T-Zellen des Empfängers gebunden werden, sondern auch die des Spenders, so dass eine ungewollte „in-vivo T-Zell-depletion“ des Transplantates (Bornhäuser et al. 2000) und so auch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen auftritt. Jakubowski et al. (2007) verwendeten in Kenntnis dessen, ein zytoreduktives Konditionierungsregime bestehend aus TBI, Fludarabin und Thiotepa ohne ATG und konnten ein stabiles Engraftment mit geringer GVHD-Inzidenz nach allogener Stammzelltransplantation nachweisen. Der Einsatz von Antithymozytenglobulin wird daher in klinischen Studien weiter diskutiert.

Patienten, die in dieser Studie reduziert konditioniert wurden, waren meist durch Komorbiditäten und höheres Alter gezeichnet. Vergleichbar sind unsere Ergebnisse mit denen von Saito und Kollegen aus dem Jahre 2003: Es wurden klassisch konditionierte Patienten (Bu/Cy) mit reduziert konditionierten Patienten (Cladiribin, Busulfan, ATG) hinsichtlich der Immunrekonstitution verglichen. Ein verlangsamtes Wachstum von CD4⁺-Zellen, aber ein verbessertes Wachstum von CD19⁺-Zellen bei reduzierter Konditionierung entsprechend unseren Studienergebnissen wurden beobachtet.

Abbildung 15 stellt den Anteil an reduzierter Konditionierung je nach Lebensalter dar.

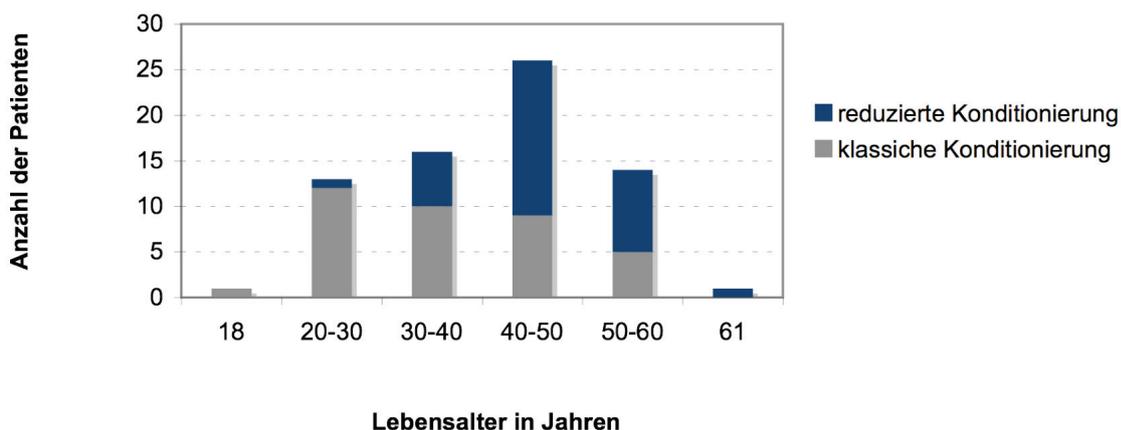


Abbildung 15: Konditionierung in den einzelnen Lebensabschnitten

Auch Moreki et al. (2001) beschrieben eine verbesserte Immunrekonstitution nach reduzierter Vorbehandlung (Flu/Bu/ATG). Die schnellere Rekonstitution von CD19⁺-Zellen bei reduzierter Vorbehandlung lässt sich laut Behringer et al. (1999) auch durch den verminderten Einsatz von MTX bei der GVHD – Prophylaxe erklären. Die

regelmäßige und schnelle Immunrekonstitution nach Transplantation ist für den Patienten essenziell. Laut unserer Studienlage konnte nachgewiesen werden, dass die Konditionierung mit reduzierten Protokollen für den Patienten von Vorteil ist, daher ist die Überlegung nur folgerichtig das Indikationsfeld für die reduzierte Konditionierung auch auf jüngere und „gesündere“ Patienten zu erweitern, um so die Lebensqualität für den Patienten zu verbessern und die therapieassoziierte Mortalität zu senken. In einer vergleichbaren Studie von Mohty et al. 2003 überstieg die TRM nach reduzierter Konditionierung mit Bu, Flu und ATG 18% nicht und blieb so weit unter der TRM von 30-40% nach klassischer Konditionierung. Auch in der Studie von Diaconescu und Kollegen (2004) wurden vermindert gastrointestinale, hepatische, pulmonale, renale und metabolische Schäden nach reduzierter Konditionierung gefunden. Zudem ist klinisch schon anhand des Auftretens von Rezidiven fassbar, dass myeloablative Konditionierungsprotokolle den malignen Zellklon niemals mit 100%iger Sicherheit auszulöschen vermögen. Bei myeloablativer Vorbehandlung wird die Empfängerhämatoopoese effektiv und schnell ausgelöscht. Konditioniert man jedoch dosisreduziert, werden insbesondere T-Zellen nicht sofort eliminiert. Es braucht drei bis sechs Monate bis die Empfängerzellen endgültig verschwinden und durch Spenderzellen ersetzt werden. Zudem werden durch eine verminderte Konditionierung weniger Schleimhautschäden verursacht. Das führte Junghans und Kollegen (2002) zu der Hypothese und der Bestätigung in einer Studie, dass die fortbestehende Präsenz von Empfängerzellen in der Frühphase nach Transplantation einen gewissen Schutz gegen Infektionen bieten könnten und geringere Infektionsraten zu verzeichnen sind. Diese Beobachtung konnte bei dem vorliegenden Patientengut zumindest für die CMV-Infektion nicht bestätigt werden. In der klassisch konditionierten Patientengruppe entwickelten 24% eine symptomatische CMV-Infektion, während in der reduziert konditionierten Gruppe 37% der Patienten eine solche ausbildeten. Bemerkenswert muss allerdings, dass in der dosisreduziert konditionierten Gruppe nur 30% der Empfänger-/Spenderpaare beidseits seronegativ für CMV im Vorfeld waren, bei den klassisch Konditionierten aber 50%. Da die Seronegativität der ausschlaggebende Faktor für die Prävention einer CMV-Infektion ist, kann die Hypothese von Junghans nicht verworfen werden, zumal in dieser Studie auch nur die CMV-Infektion herausgestellt wurde. Ein anderer Faktor mag der Einsatz von ATG im Konditionierungsregime der reduzierten Gruppe sein (29/33), da bereits mehrere Studien das erhöhte Auftreten von Infektionen unter

ATG-Einsatz beschrieben haben (Bacigalupo 2005, Saito et al. 2003, Thomson et al. 2000). Ursächlich hierfür ist die durch ATG verursachte „in-vivo“-T-Zelldepletion. Hinsichtlich der GVHD entwickelten 36% der dosisreduziert konditionierten Fälle eine schwere GVHD, 45% der myeloablativ Konditionierten auf der anderen Seite. Sorror und Kollegen (2004) konnten in einer Studie das verminderte Auftreten schwerer GVHD-Fälle nach reduzierter Konditionierung beobachten. Die Verwendung von ATG im reduzierten Protokoll scheint sich hinsichtlich der GVHD-Entwicklung in unserer Studie vorteilhaft auszuwirken und kommt in Europa prophylaktisch bei hohem GVHD-Risiko zum Beispiel bei unverwandter Spende und RIC-Transplantationen erfolgreich zum Einsatz. Dies konnte in mehreren klinischen Studien belegt werden (Basara et al. 2004, Kroger et al. 2002, Holler et al. 1998). Die Verwendung von ATG zusätzlich zu Busulfan und Fludarabin wurde von Slavin et al. (1998) erstmals postuliert und diente der Intensivierung der Immunsuppression. Die lange Halbwertszeit, zahlreiche Nebenwirkungen und vor allem die T-Zelldepletion posttransplantationem mit resultierender Infektanfälligkeit führen jedoch auch zu Studien, die vergleichbare Ergebnisse ohne ATG-Verwendung zeigen (Bornhäuser et al. 2000). Es fehlen jedoch noch Langzeitergebnisse. Zusätzlich ist zu bedenken, dass besonders durch Radio- und Chemotherapie bei klassischer Konditionierung, die APC (antigenpräsentierende Zellen) -Aktivität durch freigesetzte Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α) erhöht ist und damit die GVHD fördern kann. Die verbesserte CD56⁺-Zellrekonstitution bei reduzierter Konditionierung bedarf gesondertem Interesse. Sie scheinen Anteil am Graft-versus-Tumor-Effekt zu haben, ohne sich an der GVHD zu beteiligen. Auf diesen GVL-Effekt wird ja bei der reduzierten Konditionierung Wert gelegt. Möglicherweise bietet der adoptive Transfer von CD56⁺-Zellen in Zukunft Möglichkeiten, den GVL-Effekt zu forcieren. Auch eine erhöhte antivirale Aktivität durch CD56⁺-Zellen wird durch dosisreduzierte Konditionierung gewährleistet.

Das Auftreten einer **Graft-versus-Host Disease** kann eine allogene Stammzelltransplantation in hohem Maße verkomplizieren. Zur Beurteilung des Einflusses der GVHD auf die Immunrekonstitution wurde das Patientengut in zwei Gruppen aufgeteilt: Die erste Gruppe umfasst Patienten, die nach Transplantation keine (19/71) oder nur eine leichte GVHD (23/71) vom Grad 1 ausbildeten ($n_{\text{ges}}=42$). Der Vergleichsgruppe ($n_{\text{ges}}=29$) wurden Patienten mit schwerer GVHD der Grade 2 ($n=24$), 3 ($n=4$) und 4 ($n=1$) zugeordnet. Annähernd 40% aller Patienten bildeten also eine schwere GVHD aus. Diese Inzidenz deckt sich mit einer Studie von Mohty et al.

2003 (37%). Bei der Betrachtung der T-Lymphozyten konnten keine signifikanten Unterschiede in den Vergleichsgruppen gezogen werden. Jedoch findet sich bei der CD8⁺-Zellentwicklung eine Wachstumsrate von 343,4% vom +60. auf den +150.Tag, sofern eine schwere GVHD vorliegt. Um 163,3% wachsen CD8⁺-Zellen im Gegensatz dazu bei leichter GVHD bzw. fehlendem GVHD-Auftreten. Das spricht für eine starke Mitreaktion der CD8⁺-Zellen bei GVHD-Entwicklung. CD8⁺- Zellen steigen am +60.Tag und schwerer GVHD unter dem Gesamtmedian ein, holen dann aber bis zum +90. Tag wieder überdeutlich im Wachstum auf. Die enge Korrelation zwischen CD8⁺-Zellexpansion und dem Auftreten einer akuten GVHD wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Garin et al. 1995, Aotsuka et al. 1991, Leino et al. 1991) und verweist auf ihre Rolle bei der Pathogenese einer akuten GVHD. CD4⁺-Zellen bleiben erstaunlicherweise vom GVHD-Grad unbeeindruckt und zeigen in beiden Zellgruppen ein annähernd vergleichbares Zellwachstum. Es ergibt sich nach unseren Daten ein signifikanter Unterschied in der Zellentwicklung bei leichter und schwerer GVHD. Besonders die CD19⁺-Zellen profitieren am +60. Tag signifikant vom Nichtauftreten einer GVHD. Die Zellzahlen liegen zu jedem Zeitpunkt deutlich über dem Median des Gesamtdurchschnittes. Beim Auftreten einer schweren GVHD liegen die CD19⁺-Zellen über der Zeit unter dem Gesamtmedian. Diese Beobachtung wurde unter anderem auch von Saito et al. (2003) sowie Petersen et al. (2003) gemacht. Es bleibt festzuhalten, dass eine schwere GVHD eine Stimulierung von CD8⁺-Zellen des Transplantates bewirkt, wohingegen B-Zellen stark beeinträchtigt und supprimiert werden. Die CD56⁺-Zellen leiden in unserer Studie unter dem Einfluss einer schweren GVHD besonders am +60. Tag erreichen jedoch Normwerte wie in der Vergleichsgruppe. Dass CD56⁺-Zellen unter der Entwicklung einer GVHD leiden oder durch ihr vermindertes Wachstum eine GVHD begünstigen, konnte bereits in den Studien von Champlin et al. (1990) und Garin et al. (1995) belegt werden. Möglicherweise kann die absolute CD56⁺-Anzahl bzw. Subgruppenanalyse der CD56⁺/CD16⁺-Zellpopulation Hinweise zur Diagnose einer akuten GVHD liefern. Eine GVHD der Grade 2 bis 4 stellt einen Risikofaktor für die regelhafte Immunrekonstitution und somit auch das Überleben des Patienten dar. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass der Einsatz von ATG zur Verminderung der GVHD hauptsächlich CD4⁺-Zellen supprimiert, die GVHD-Haupteffektorzellen laut unserer Studie jedoch CD8⁺-Zellen sind, die unter ATG-Einsatz relativ unbeeindruckt wachsen. Das Alter von Empfänger und Spender, die HLA-

Kompatibilität, der CMV-Status, die Grunderkrankung, das Transplantationsregime, die GVHD-Prophylaxe und der Zeitpunkt der Transplantation (EMBT handbook 1998, Bacigalupo 2005, Hägglund et al. 1995, Przepiorka et al. 1999) werden in der Literatur als Risikofaktoren für das Auftreten einer GVHD beschrieben. Männliche Empfänger, die Transplantate von weiblichen Spendern erhalten (siehe 5.10), zeigen häufiger eine akute GVHD, wobei vorausgegangene Schwangerschaften und Bluttransfusionen einer HLA-identischen Spenderin das Risiko noch weiter erhöhen (KMT Schaefer S.81). Ein weiterer Hinweis dafür, dass nicht nur der HLA-Komplex, sondern auch weitere nicht-MHC-kodierte Antigene bei Entwicklung einer GVHD beteiligt sein müssen. Risikofaktoren für das Auftreten einer akuten GVHD waren in unserer Studie die HLA-Inkompatibilität, klassische Konditionierung, symptomatische CMV-Infektion, ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium (45% schwere GVHD vs. 18% in der Remissionsgruppe), die AL (48% schwere GVHD vs. 39% in der CML-Gruppe) und eine GVHD-Prophylaxe mit CSA (70% schwere GVHD) oder CSA plus MMF (60% schwere GVHD). Als vorteilhaft erwies sich eine GVHD-Prophylaxe mit CSA und MTX, da nur 30% der Patienten schwere GVHD-Formen entwickelten. Höhere GVHD-Raten bei AL-Patienten und CSA plus MMF-Prophylaxe dürften erneut auf den verstärkten Einsatz einer reduzierten Konditionierung zurückzuführen sein.

Infektionen posttransplantationem gehören wie die GVHD zu den Hauptkomplikationen einer Stammzelltransplantation und verursachen einen Hauptteil der Mortalität und Morbidität (Hakki et al. 2003). Deshalb wurde die **CMV-Infektion** in dieser Studie aus dem Kreis der posttransplantären Infektionen heraus gesondert betrachtet. In unserer Studie wird die Zellreihenentwicklung vom Auftreten einer Zytomegalievirusinfektion nach Transplantation beeinflusst. 30 % (n=21) der Patienten entwickelten eine symptomatische CMV-Infektion, definiert klinisch und/oder serologisch über das pp65-Antigen. Interessanterweise kam es insbesondere bei den CD8⁺-Zellen, besonders am +150. Tag, zu einem signifikanten Wachstumssprung bei einer Wachstumsrate von 272,1% (versus 120,6% in Vergleichsgruppe ohne CMV). 713 CD8⁺-Zellen/µl Blut bei CMV-Infektion stehen hier 263 Zellen/µl bei Gesunden gegenüber. Dieses Phänomen spiegelt sich auch in der CD4/CD8-Ratio wider, die zu allen Stichpunkten signifikant niedriger in der CMV-Gruppe ist. Auch die CD3⁺-Zellen sind daher am +150.Tag signifikant höher messbar bei einer symptomatischen CMV-Infektion: Bei einer Wachstumsrate von 254,5%

stehen 850 CD3⁺-Zellen/μl in der CMV-Gruppe 600,5 Zellen/μl in der CMV-freien Gruppe entgegen. Unerwartet kommt es aber bei den CD4⁺-Zellen mit einer Signifikanz am +60. Tag zu einem Entwicklungsrückstand unter CMV-Infektion. Dieser wird jedoch zum +150.Tag hin aufgeholt. Heining et al. (2007) konnten bei einer Studie an 148 Patienten eine erhöhte Anzahl an CD8⁺-Zellen und eine Verminderung von CD4⁺-Zellen bei CMV-Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation nachweisen. Auch eine leichte Verschlechterung der CD56⁺-Zellentwicklung unter CMV-Infektion lässt sich in unserer Studie tendenziell ablesen, jedoch werden Normwerte erreicht. Anders verhält es sich bei der CD19⁺-Zellentwicklung: CD19⁺-Zellen zeigen einen signifikanten Entwicklungsrückstand bei CMV-Patienten am +60.Tag. Der Entwicklungsrückstand hält sich bis zum +90. Tag. Bis zum +150. Tag jedoch kommt es zu einer Erholung des CD19⁺-Zellwachstums bei einer Wachstumsrate von 366%. CD19⁺-Zellwerte ohne CMV stagnieren über die Beobachtungszeit um den Median. Erst einmal ist zu bemerken, dass die Haupteffektorzellen im Kampf gegen das CMV-Virus nach unserer Studie vermutlich CD8⁺-Zellen sind. Aufgrund ihres Wachstumsschubes zum +150. Tag hin scheinen die Zellen immunkompetent und reagibel bei Erscheinen einer viralen Infektion zu sein. Dieser Wachstumsschub überdauert die eigentliche Zeit der Anfälligkeit gegenüber einer CMV-Infektion und führt darüber hinaus noch zu seiner Potenzierung am +150.Tag. Vorangehende Tierversuche von Reddehase et al. (1986, 1987) konnten bereits CD8-positive zytotoxische T-Zellen als Modulatoren der Virenreplikation ausmachen. Da das Risiko, eine symptomatische CMV-Infektion nach Transplantation zu erleiden, besonders vom Tag +50 bis +100 nach Transplantation sehr groß ist, ist das reduzierte Wachstum von CD4⁺- und CD19⁺-Zellen an den Stichtagen +60 und +90 nicht verwunderlich. Anders formuliert könnten aber auch die durch andere Co-Faktoren verursachte Erniedrigung von CD4⁺-, CD56⁺- und CD19⁺-Zellen zur CMV-Infektion prädispositioniert haben. Klinisch findet sich ja beispielsweise bei HIV-Patienten eine Reaktivierung von CMV bei einer signifikanten Erniedrigung von CD4⁺-Lymphozyten. Die signifikante Depression der CD4⁺-Funktion zwei Monate nach Transplantation bei Auftreten einer CMV-Infektion wurde auch in einer Studie von Li und Kollegen (1994) beschrieben. Aufgrund der Wachstumshemmung aller Zellreihen, abgesehen von den CD8⁺-Zellen, stellt die CMV-Infektion somit einen Risikofaktor für das Gelingen der Transplantation dar. Besonders betroffen ist dabei die Frühphase nach

Transplantation, denn nach dem +90. Tag konnten alle negativ beeinflussten Zelllinien ihren Wachstumsrückstand wieder wettmachen. Widmann et al. (2008) konnten ebenfalls in einer Studie zeigen, dass eine CMV-Virämie mit einer Reduktion von CMV-spezifischen CD4⁺-Zellen einhergeht, welche sich nach Überstehen der Virämie wieder erholt. Prädiktiv kann man nach Serostatus Niedrig- (negativer Serostatus), Intermediate- (nur Spender seropositiv) und Hochrisiko (Empfänger seropositiv) voneinander trennen (Boeckh et al. 1996). Als wichtigste Voraussetzung zur CMV-Prophylaxe gilt auch nach unserer Datenlage: Spender und Empfänger sollten in ihrem Serostatus negativ sein. In unserer Studie waren 28 der 50 Patienten ohne CMV-Infektion prätransplantationem seronegativ. Unter den 21 Patienten mit symptomatischer CMV war nur bei einem seronegativen Patienten auch der Spender seronegativ. Das heißt, dass bei Seropositivität eines der Transplantationspartner mit hoher Wahrscheinlichkeit eine CMV-Infektion symptomatisch werden wird. Laut Einsele et al. (1999) tritt bei zirka 60-70% der Transplantierten eine symptomatische CMV-Infektion auf, wenn sie bereits prätransplantär seropositiv waren oder eine seropositive Spende erhielten. Andererseits betrachtet schützt Seronegativität allein nicht vor Infektion, andere Faktoren müssen eine Rolle spielen: Zu 52,3% traten in der CMV-Gruppe schwere GVHD-Formen auf, wohingegen es in der infektionsfreien Gruppe nur in 36% zu einer GVHD der Grade 2 bis 4 kam. Nach unserer Auswertung kommt es zu einer Mitreaktion der CD3⁺- und CD8⁺-Zellen unter schwerer GVHD, so dass diese Effekte hier additiv getriggert haben könnten.

6.3 Perspektiven

Für die allogene Stammzelltransplantation ist eine hochdosierte Chemotherapie in Kombination mit Bestrahlung heute ein standardisiertes Verfahren für verschiedene Krankheitsentitäten. Mit Hilfe einer dosisreduzierten Konditionierung kann heute ein zahlenmäßig bedeutendes Patientenkontingent ebenso von einer Stammzelltransplantation trotz erhöhtem Risikoprofil profitieren. Vorliegende Studie unterstreicht anhand der lymphozytären Immunrestitution die klinische Bedeutsamkeit einer dosisangepassten Konditionierung. In naher Zukunft gelingt hoffentlich durch eine zielgerichtete Manipulation von Transplantaten und einem exakten genetischen Abgleich zwischen Spender und Empfänger die GVHD-Rate zu verringern bei gleichzeitigem Erhalt des Antileukämieeffektes.

7 SCHLUSSFOLGERUNG

Zusammenfassend kann anhand der Datenauswertung geschlussfolgert werden:

- 7.1. Die lymphozytäre Immunrekonstitution verlief in allen untersuchten lymphozytären Subpopulationen regelhaft. Alle Zellreihen waren am 60.Tag nach Transplantation messbar. CD8⁺- und CD56⁺-Zellen konnten sogar Normwerte erzielen, dies unabhängig von den Rahmenbedingungen. Unter dem Therapieregime litten am meisten die CD19⁺-Zellen, gefolgt von den CD4⁺-Zellen. Beide Zellgruppen konnten am 150.Tag keine Normwerte erreichen.
- 7.2. Die infundierte Menge an CD34⁺-Stammzellen zeigte in keiner der Zelllinien einen signifikanten Unterschied in der Zellentwicklung nach Transplantation. Nur tendenziell scheinen CD4⁺-, CD8⁺- und CD19⁺-Zellen in ihrem Wachstum bei höherer Stammzellmenge bevorteilt zu sein. Die Quantität an Stammzellen allein bewirkt also keine schnellere Immunrekonstitution.
- 7.3. Mehr CD3⁺-Zellen im Transplantat wirken sich nicht negativ auf die Zellreihenentwicklung aus. Nicht signifikant, aber tendenziell verbessertes Wachstum zeigten erneut CD8⁺-und CD19⁺-Zellen. Nicht unerwartet wurden jedoch knapp 50% GVHD der Grade 2-4 bei erhöhter CD3⁺-Zellinfusion bei den Patienten beobachtet (versus 30% bei geringerer CD3⁺-Zellinfusion). Eine höhere CD3⁺-Zellinfusion stellt also einen Risikofaktor für das Auftreten einer GVHD, insbesondere höherer Grade dar.
- 7.4. Für Familientransplantate, die zudem noch komplett HLA-identisch sind, konnte eine verbesserte Immunrekonstitution aller Zellreihen (insbesondere der T-Lymphozyten) sowie ein geringeres GVHD-Auftreten gezeigt werden.
- 7.5. Laut dieser Studie zeigte das Spendergeschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Immunrekonstitution des Empfängers.
- 7.6. Patienten mit akuten Leukosen zeigten hinsichtlich der Immunrekonstitution bessere Ergebnisse nach Transplantation als bei CML-Patienten. CD19⁺-Zellen und CD56⁺-Zellen zeigen dabei einen signifikant besseren Anstieg, bei den CD4⁺-und CD8⁺-Zellen gibt es hierfür Tendenzen.
- 7.7. Ein signifikant schlechteres Zellwachstum ließ sich in fortgeschrittenen Krankheitsstadien nach Transplantation nicht ausmachen. Sogar zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CD3⁺-, CD8⁺-, und CD19⁺-Zellreihen zwischen

den Messpunkten in der Fortgeschrittenengruppe, dies war in der Remissionsgruppe nicht nachweisbar.

- 7.8. Auch bei älteren Patienten fand sich eine regelhafte Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation. Insbesondere ein verbessertes CD56⁺- und CD19⁺-Zellwachstum ließ sich messen. Höheres Alter stellt damit hinsichtlich der Immunrekonstitution keine Kontraindikation zur Transplantation dar, jedoch scheint sich eine reduzierte Konditionierung günstig auszuwirken.
- 7.9. Das Geschlecht des Empfängers hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Immunrekonstitution.
- 7.10. Eine reduzierte Konditionierung ist der klassischen Konditionierung hinsichtlich der lymphozytären Immunrekonstitution mindestens als gleichrangig anzusehen. Bei reduzierter Konditionierung konnte eine verbesserte Immunrekonstitution in der Frühphase nach Stammzelltransplantation gemessen werden. Dies betrifft insbesondere CD8⁺-, CD19⁺- und CD56⁺-Zellen, die zu verschiedenen Messzeitpunkten ein verbessertes Zellwachstum zeigen. Für CD4⁺-Zellen konnte dies nicht nachgewiesen werden.
- 7.11. 40% der Patienten entwickelten nach Transplantation eine schwere GVHD der Grade 2 bis 4. Risikofaktoren waren ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium, HLA-Inkompatibilität, akute Leukosen, Prophylaxe mit CSA allein oder in Kombination mit MMF. Die Haupteffektorzellen der GVHD sind CD8⁺-Zellen. Insbesondere CD19⁺-Zellen profitieren in ihrem Wachstum von Nichtauftreten einer GVHD, ebenso CD56⁺-Zellen. CD4⁺-Zellen werden in ihrem Anstieg durch eine GVHD nicht beeinträchtigt.
- 7.12. 30% der Transplantierten entwickelten eine symptomatische CMV-Infektion. Auch hier wird ein Wachstumssprung von CD8⁺-Zellen unter Infektion gemessen. Der symptomatischen CMV-Infektion geht wahrscheinlich eine Depression der anderen Zellreihen, insbesondere CD4⁺-Zellen voraus. CD19⁺-Zellen leiden in ihrem Wachstum unter einer symptomatischen CMV-Infektion, tendenziell auch die CD56⁺-Zellen. Für die CMV-Prophylaxe ist die Seronegativität von Spender und Empfänger am Bedeutsamsten.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aotsuka N, Asai T, Oh H et al. 1991. Lymphocyte subset reconstitution following human allogeneic bone marrow transplantation: differences between engrafted patients and graft failure patients. *Bone Marrow Transplantation*(8): 339-386.

Appelbaum FR. 1996. The use of bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of cancer. *Cancer Journal for Clinicians* 46(3): 142-146.

Apperley J, Gluckmann E, Gratwohl A, Craddock C.1998. *The EBMT Handbook – Blood and Marrow Transplantation*. 1. Aufl. Paris: Robert Arts Graphiques.

Aversa F, Tabilio A, Terenzi A et al. 1994. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical three-loci incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84: 3948-3955.

Bacigalupo A. 2000. Haematopoietic stem cell transplantation after reduced intensity conditioning regimen (RI-HSCT): report of a workshop of the EBMT. *Bone Marrow Transplantation* 25: 803-805.

Bacigalupo A. 2002. Second EBMT workshop on reduced intensity allogeneic haematopoietic stem cell transplants (RI-HSCT). *Bone Marrow Transplantation* 29: 191-195.

Bacigalupo A. 2004. Third EBMT/AMGEN workshop on reduced-intensity conditioning allogeneic haematopoietic stem cell transplants (RIC-HSCT) and panel consensus. *Bone Marrow Transplantation* 33: 691-696.

Bacigalupo A. 2005. Antithymocyte/thymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant* 35(3): 225-31.

Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Heimfeld S, Oparin D, Zellmer E, Radich JP, Grumet FC, Blume KG, Chauncey TR, Little MT. 2004. Kinetics of engraftment in patients with haematologic malignancies given allogeneic haematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 104 (8): 2254-2262.

Bartsch HH, Mertelsmann R. 1996. Knochenmark- und periphere Stammzelltransplantation. 1. Aufl. Freiburg, Basel: Karger GmbH.

Basara N, Yaman A, Kolbe K et al. 2004. Anti-thymocyte globulin in unrelated haematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 33: S.69.

Behringer D, Bertz H, Schmoor C, Berger C, Dwenger A, Finke J. 1999. Quantitative lymphocyte subset reconstitution after allogeneic haematopoietic transplantation from matched related donors with CD34⁺-selected PBSC grafts, unselected PBSC grafts or BM grafts. *Bone Marrow Transplantation* 24: 295-302.

Belka C, Budach W, Betsch A, Bamberg M. 2001. Ganzkörperbestrahlung für die Knochenmark-und Blutstammzelltransplantation. *Onkologe* 7: 1305 – 1312.

Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. 1996. Cytomegalievirus pp65-antigenaemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation. *Blood*(88): 4063 – 4071.

Bornhäuser M, Schuler U, Pörksen G, Naumann R, Geissler G, Thiede C, Schwerdtfeger R, Ehninger G, Thiede HM. 1999. Mycophenolate Mofetil and cyclosporine as graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplantation* 67(4): 499-504.

Bornhäuser M, Thiede C, Schuler U, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Helwig A, Plettig R, Röllig A, Naumann R, Kroschinsky F, Neubauer A, Ehninger G. 2000. Dose-reduced conditioning for allogeneic blood stem cell transplantation: durable

engraftment without antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplantation* 26: 119-125.

Castermans E, Baron F, Willems E, Schaaf-Lafontaine N, Meuris N, Gothot A, Vanbellighen JF, Herens C, Seidel L, Geenen V, Cheynier R, Beguin Y. 2008. Evidence for neo-generation of T cells by thymus after non-myeloablative conditioning. *Haematologica* 93(2):240-7.

Champlin R, Ho W, Feig S et al. 1990. Selective depletion of CD8⁺ -T- lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* (73): 418 -423.

Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM et al. 2000. Blood stem cells compared with bone marrow as source of haematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* (95): 3702 -3709.

Chen BJ, Cui X, Sempowski DG, Domen J, Chao NJ. 2004. Haematopoietic stem cell dose correlates with the speed of immune reconstitution after stem cell transplantation. *Blood* 103(11): 4344-4352.

Childs R, Clave E, Contentin N et al. 1999. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* (94): 3234 - 3241.

Childs R et al. 2000. Nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation as immunotherapy for malignant diseases. *Cancer Journal* 6(3): 179-87.

Clift RA, Radich J, Appelbaum FR, Martin P, Deeg HJ et al. 1999. Long-term follow-up of a randomized study comparing cyclophosphamid and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamid for patients receiving allogeneic marrow transplants during chronic phase of CML. *Blood* (94): 3960 -3962.

Copelan EA, Deeg HJ. 1992. Conditioning for allogeneic marrow transplantation in patients with lymphohaematopoietic malignancies without the use of total body irradiation. *Blood* 80(7): 1648-1658.

Corradini P, Tarella C, Olivieri A et al. 2002. Reduced-intensity conditioning followed by allografting of haematopoietic cells can produce clinical and molecular remissions in patients with poor risk haematologic malignancies. *Blood* (99): 75 -82.

Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, Sorrow ML, Maris MB, Maloney DG, Sandmaier BM, Storb R. 2004. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared with myeloablative conditioning before haematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors. *Blood* 104(5): 1550-1558.

Drucker BJ, Talpaz M, Resta DJ. 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 344: 1031-1037.

Dumont-Girard F, Roux F, van Lier RA, Hale G, Helg C, Chapuis B, Starobinski M, Roosnek E. 1998. Reconstitution of the T-cell-compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 92(11): 4464-4471.

Dunbar EM, Buzzeo MP, Levine JB, Schold JD, Meier-Kriesche HU, Reddy V. 2008. The relationship between circulating natural killer cells after reduced intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation and relapse-free survival and graft-versus-host disease. *Haematologica* 93(12): 1853-8.

Einsele H, Kanz L. 1999. Allogene Stammzelltransplantation. *Der Internist* 40: 1249-1256.

Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiel MG, Runde V, Kolb HJ, Holler E, Beck R, Schwertdfeger R et al. 2001. Epidemiology and interventional treatment strategies of infectious complications after allogeneic stem cell transplantation. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 126(45): 1278-1284.

Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiehl MG, Runde V, Kolb HJ, Holler E, Beck R, Schwerdtfeger R, Schumacher U, Hebart H, Martin H, Kienast J, Ullmann AJ, Maschmeyer G, Krüger W, Niederwieser D, Link H, Schmidt CA, Oettle H, Klingebiel T. 2003. Infections complications after allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies. *Ann Haematol* 82(Suppl 2): 175-185.

Ferrara JL, Levy R, Chao NJ et al. 1999. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Translant* (6): 347-356.

Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringdén O, Stone JA, Bortin MM. 1994. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med* 120(8): 646-652.

Garin L, Rigal D, Souillet G et al. 1995. Allogeneic BMT in children: differential lymphocyte subset reconstitution according to the occurrence of acute GVHD. *Clin Immunol Immunopathol* (77): 139 -148.

Giralt S, Estey E, Albitar M et al. 1997. Engraftment of allogeneic haematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* (89): 4531 -4536.

Giralt S, Thall PF, Khouri I et al. 2001. Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with haematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* (97): 631-637.

Gratwohl A, Balermo H, Frauendorfer K, Rocha V, Apperley J, Niederwieser D. 2006. The EBMT activity survey 2006 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on the use of cord blood products. *Bone Marrow Transplantation* (2007): 1-19.

Graw RG, Lohrmann HP, Bull MI, Decter J, Herzig GP, Bull JM, Leeventhal BG, Yankee RA, Herzig RA, Krueger GRF et al. 1974. Bone marrow transplantation

following combination chemotherapy immunosuppression in patients with acute leukemia. *Transplant Proc* 6: 349.

Gunsa D. 1991. *Immunologie: Grundlagen, Klinik, Praxis*. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme Verlag.

Hägglund H, Bostrom L, Remberger M, Ljungman P, Nilsson B, Ringden O. 1995. Risk factors for acute-graft-versus-host disease in 291 consecutive HLA-identical bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 16: 747.

Hakim FT, Gress RE. 2002. Reconstitution of thymic function after stem cell transplantation in humans. *Curr Opin Hematol* (9): 490-496.

Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. 2003. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 102(8): 3060-3067.

Hassan HT, Krog C, Stockschräder M, Zelle W, Krüger W, Erttmann R, Zander AR. 1997. Factors influencing haematological recovery after allogeneic bone marrow transplantation in leukemia patients treated with methotrexate-containing GVHD-prophylaxis. *Support Care Centre* 5: 299-306.

Hauch M, Gazzola MV, Small T et al. 1990. Anti-leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* (75): 2250-2262.

Heil G, Ganser A. 2002. Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie. *Onkologe* (8): 686-692.

Heining C, Spyridonidis A, Bernhardt E, Schulte-Mönting J, Behringer D, Grüllich C, Jakob A, Bertz H, Finke J. 2007. Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients. *Bone Marrow Transplantation* 39:613-622.

Heitger A, Neu N, Kern H et al. 1997. Essential role of the thymus to reconstitute naive T-helper cells after human allogeneic BMT. *Blood* (90): 850-857.

Hertenstein B, Ganser A. 2004. Knochenmarktransplantation. *Der Internist* 45: 1261-1267.

Hoelzer D, Gökbuget N. 2002. Diagnostik und Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen. *Onkologie* (8): 672- 685.

Holler E, Ledderhose G, Knabe H. 1999. ATG serotherapy during pre-transplant conditioning in unrelated donor BMT: dose-dependent modulation of GVHD. *Bone Marrow Transplant* 21(Suppl1): 105a.

Jakubowski AA, Small TN, Young JW, Kernan NA, Castro- Malaspina H, Hsu KC, Perales MA, Collins N et al. 2007. T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood* 110(13): 4552-9.

Jiang YZ, Garret AJ, Goldman JM, Mavroudis AD.1997. Association of NK-cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic marrow transplantation. *Ann Hematol* 74: 1-6.

Junghanss C, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, McSweeney PA, Little MT, Corey L, Storb R. 2002. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 99 (6): 1978-1985.

Kasper C, Sayer HG, Höffken K. 2001. Potential adulter Stammzellen für Transplantationskonzepte. *Der Onkologe* 7: 1319-1323.

Keever CA, Klein J, Leong N et al. 1995. Effects of GVHD on the recovery of NK cell activity and LAK precursors following BMT. *Bone Marrow Transplantation* (12): 289-295.

Khouri IF, Keating M, Korbling M et al. 1998. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabin-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* (16): 2817-2824.

Kienast J, Grote A, Berdel WE. 2002. Transplantation von Knochenmark und peripheren Blutstammzellen. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie* 16 (Suppl 1): 1/91-1/94.

Kim I, Lee KH, Choi Y, Keam B, Koo NH, Yoon SS, Yoo KY, Park S, Kim BK. 2007. Allogeneic stem cell transplantation for patients with advanced hematological malignancies: comparison of fludarabine-based reduced intensity conditioning versus myeloablative conditioning. *J Korean Med Sci* 22(2):227-34.

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobson N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J et al. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86(5): 2041-50.

Kolb HJ, Sayer HG, Arnold R. 2002. Immunbiologische Grundlagen der Stammzelltransplantation. *Der Onkologe* 8(Suppl 1): 66-70.

Kröger N, Zabelina T, Krüger W, Renges H, Stute N, Kabisch H, Jaburg N, Lölliger C, Krüll A, Zander AR. 2001. Comparison of total body irradiation vs. busulfan in combination with cyclophosphamid as conditioning for unrelated stem cell transplantation in CML patients. *Bone Marrow Transplantation* 27: 349-354.

Leino L, Lilius EM, Nikoskelainen J et al. 1991. The appearance of 10 differentiation antigens on peripheral blood lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (8): 339-344.

Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddel SR. 1994. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow

transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* (83): 1971-1979.

Link H. 1997. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. *Der Onkologe* 3 (Suppl 1): 1-11.

Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA et al. 1991. T-cell-depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 78(8): 2120-30.

Martin PJ, Schoch G, Fischer L et al. 1991. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: Secondary treatment. *Blood* 77: 1821-1828.

McKinnon S, Papadopoulos EB, Carabassi MH, et al. 1995. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of CML after bone marrow transplantation. *Blood* (86): 1261-1268.

McNiece I, Shpall EJ. 1998. Ex vivo Expansion of Hematopoietic Cells: What cells are needed? BMT Program, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado.

McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA et al. 2001. Haematopoietic stem cell transplantation older patients with haematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* (97): 3390-3400.

Mohty M, Bay JO, Faucher C, Choufi B, Bilger K, Tournilhac O, Vey N, Stoppa AM, Coso D, Chabannon C, Viens P, Maraninchi D, Blaise D. 2003. Graft-versus-host disease following allogeneic transplantation from HLA-identical sibling with antithymocyte globulin-based reduced intensity preparative regimen. *Blood* (2): 470-476.

Moreki S, Gelfand Y, Nagler A, Or R, Naparstek G, Varadi G, Engelhard D, Akerstein A, Slavin S. 2001. Immune reconstitution following allogeneic stem cell

transplantation in recipients conditioned by low intensity vs. myeloablative regimen. *Bone Marrow Transplantation* 28: 243-249.

Nakamura R, Auayporn N, Smith DD, Palmer J, Sun JY, Schriber J, Pullarkat V, Parker P et al. 2008. Impact of graft cell dose on transplant outcomes following unrelated donor allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: higher CD34⁺ cell doses are associated with decreased relapse rates. *Biol Blood Marrow Transplant* 14(4): 449-57.

Ottinger HD, Müller CR, Goldmann SF, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Casper J, Ebell W, Ehinger G et al. 2001. Second german consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann Hematol* 80(12): 706-14.

Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B et al. 1996. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* (88): 2775-2779.

Pavletic ZS, Joshi SS, Pirruccello SJ, Tarantolo SR, Kollath J, Reed EC, Bierman PJ, Vose JM, Warkentin PI, Gross TG, Nasrati K, Armitage JO, Kessinger A, Bishop MR. 1998. Lymphocyte reconstitution after allogeneic blood cell transplantation for haematologic malignancies. *Bone Marrow Transplantation* 21: 33-41.

Petersen SL, Ryder LP, Björk P, Madsen HO, Heilmann C, Jacobsen N, Segelov H, Vindelov LL. 2003. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leukocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplantation* 32: 65-72.

Przepiorka D, Smith TL, Follonder J, Khouri I, Ueno NT, Mehra R, Körbling M et al. 1999. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 94(4): 1465-1470.

Reddehase MJ, Buhning HJ, Koszinowski UH. 1986. Cloned long-term cytolytic T-lymphocyte line with specificity for an immediate-early membrane antigen of murine cytomegalovirus. *J Virol* (61): 3102 -3108.

Reiffers J, Goldman JM, Armitage. 1998. *Blood Stem Cell Transplantation*. 1.Aufl. London: Martin Dunitz Ltd.

Rondelli D, Re F, Bandini G, Raspadori D, Arpinati M, Senese B, Stanzani M, Bonifazi F, Falcioni S, Chirumbolo G, Tura S. 2000. Different immune reconstitution in multiple myeloma, chronic myeloid leukemia and acute myeloid leukemia patients after allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 26: 1325-1331.

Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M. 2000. Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* (96): 2299-2303.

Rummel M. 2002. Diagnostik und Therapie der chronisch-lymphatischen Leukämie. *Onkologie* (8): 708-720.

Saito T, Kanda Y, Nakai K, Kim SW, Arima F, Kami M, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Heike Y, Mineishi S, Takaue Y. 2003. Immune reconstitution following reduced-intensity transplantation with cladribine, Busulfan and anti-thymocyte globulin: serial comparison with conventional myeloablative transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 32: 601-608.

Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R et al. 1983. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamid. *N Eng J Med* (309): 1347-1353.

Schaefer UW, Beelen DW. 1991. *Knochenmarktransplantation*. 2.Aufl. München, Basel: Karger GmbH.

Schetelig J, Bornhäuser M, Kiehl M, Schwerdtfeger R, Kröger N, Runde V, Zabelina T, Held TK, Thiede C, Fauser AA, Beelen D, Zander A, Ehninger G, Siegert W. 2004. Reduced-intensity conditioning with busulfan and fludarabine with or without antithymocyte globulin in HLA-identical sibling transplantation—a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplantation* 33: 483-490.

Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D et al. 2000. A randomised study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation comparing allogeneic transplantation of filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cells with bone marrow transplantation in 350 patients with leukemia. *Blood* 96: 481.

Shpall EJ, Champlin R, Glaspy JA. 1998. Effect of CD34⁺ peripheral blood progenitor cell dose on hematopoietic recovery. *Biol Bone Marrow Transplant* (19): 9-13.

Shenoy S, Mohanakumar T, Todd G, Westhoff W, Dunnigan K, Adkins DR, Brown RA, DiPersio JF. 1999. Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplantation* 23: 335-346.

Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R. 1998. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant haematologic diseases. *Blood* 91 (3): 756-763.

Sorrer ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu D, Flowers C, Maloney DG, Storb R. 2004. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor haematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* 104(4): 961-968.

Spitzer TR, McAfee S, Sackstein R et al. 2000. Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for

refractory haematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplantation* 6: 309-320.

Stachel D. 1999. Stammzelltransplantation. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 147: 707-715, 775-782.

Stern M, Brand R, de Witte T, Sureda A, Rocha V, Passweg J, Baldomero H, Niederwieser D, Gratwohl A. 2008. Female-versus-male alloreactivity as a model for minor histocompatibility antigens in hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Transplant* 8(10): 2149-57.

Storb R, Yu C, Sanmeier BM et al. 1999. Mixed haematopoietic chimerism after marrow grafts. Transplantation in the ambulatory care setting. *Ann NY Acad Sci* 872: 372-375.

Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon RP, Bensinger W, Flowers MED, Martin P, Storb R, Appelbaum R, Boeckh M. 2001. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 97(11): 3380-3389.

Storek J, Witherspoon RP, Storb R. 1995. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T-cell development in early life. *Bone Marrow Transplantation* (16): 413- 435.

Sykes M, Preffer F, McAfee S et al. 1999. Mixed lymphohaematopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effect are achievable in adult recipients following non-myeloablative therapy and HLA-mismatch donor bone marrow transplantation. *Lancet* (353): 1755-1759.

Storb R, Prentice RL, Buckner CD, Clift RA et al. 1983. Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anaemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. *N Eng J Med* (308): 302-307.

Subirà M, Sureda A, Ancin I, Martino R, Altés A, Brunet S Sierra J. 2003. Allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning is potentially feasible as an outpatient procedure. *Bone Marrow Transplantation* 32: 869-872.

Sykes M, Szot GL, Swenson KA, Person DA. 1997. Induction of high levels of allogeneic haematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nat Med* 3(7): 783-7.

Theml H. 1983. Taschenatlas Hämatologie. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag.

Thomas ED, Storb R. 1970. Technique for human marrow grafting. *Blood* (36) 507-517.

Thomas ED, Clift RA, Hersman J et al. 1982. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission using fractionated or single-dose irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8: 817-821.

To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. 1997. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89 (7): 2233-2258.

Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, Kotylo P, Brahmi Z, Smith FO. 2000. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 96(8): 2703-11.

Trenschel R, Ottinger HD, Elmaagacli A, Peceny R, Schaefer UW. 2001. Blutstammzelltransplantation-Stand und neue Trends. *Der Onkologe* 7: 1283-1295.

Twardzik T, Rapp UR. 2002. Somatische Stammzellen. *Bundesgesundheitsb-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 45: 75-84.

Ucida N, Tsukamoto A, He D, et al. 1998. High doses of purified stem cells cause early haematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts. *J Clin Invest* (101): 961-966.

Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Bruckner CD, Storb R. 1979. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic marrow grafts. *New England Journal of Medicine* 300(19): 1068-73.

Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N et al. 1981. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease. *N Engl J Med*(304): 1529-1531.

Widmann T, Sester U, Gärtner BC, Schubert J, Pfreundschuh M, Köhler H, Sester M. 2008. Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS ONE* 3(11): e3634.

Witherspoon RP. 1995. Immunologic reconstitution after high-dose chemo-radiotherapy and allogeneic or autologous bone marrow or peripheral blood haematopoietic stem cell transplantation. *High-dose Cancer Therapy*, pp 242-258.

Zander AR, Zibeline T, Kroger N et al. 1999. Use of a five-agent GVHD prevention regimen in recipients of unrelated donor marrow. *Bone Marrow Transplantation* 23: 889-893.

9.2 Danksagungen

Dank gebührt für die hilfreiche Unterstützung bei der Umsetzung dieser Dissertation von der Idee zur Niederschrift:

- Frau Dr. Katrin Hoffmann, Koordinatorin des Forschungszentrums Lobeda, für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Datensammlung
- dem Dokumentations- und Koordinationsbüro mit Frau Anja Markusch
- Frau Prof. Dr. med. Katharina Pachmann für die passagere Übernahme der Promotionsbetreuung
- sowie den Mitarbeitern des FACS-Labors und der Mildred-Scheel-Station für Knochenmarktransplantation, Klinik für Innere Medizin II in Jena, für die praktische Einführung

Im Besonderen ist zu nennen, mein Betreuer :

- Herr PD Dr.med.habil.H.G.Sayer für die interessante Aufgabenstellung, für die trotz räumlicher Trennung stets motivierende, geduldige und kompetente Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr.med. habil. H.G.Sayer (Betreuer) und Frau Dr. Katrin Hoffman (Statistik),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den 20.4.2009