

Evaluation der Wertigkeit einer semiquantitativen histomorphologischen
Bestimmung phagozytierten und freien Eisens in Prätransplantations –
Knochenmarksbiopsien für den Erfolg einer allogenen hämatologischen
Stammzelltransplantation

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Marc Höppner
geb. am 11.01.1984 in Mülheim a.d. Ruhr

angefertigt im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Leipzig

Betreuerin: Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser
Leiterin der Sektion Hämatopathologie
und molekulare Hämatopathologie
Universitätsklinikum Leipzig – AÖR
Department für Diagnostik
Institut für Pathologie
Liebigstr. 24
04103 Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16.12.2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Der Formenkreis der myelodysplastischen Syndrome und die akuten myeloischen Leukämien.....	1
1.2.1 Der Formenkreis der myelodysplastischen Syndrome	2
1.2.2 Das Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämien	8
1.3 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation	15
1.4 Komplikationen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation.....	18
1.4.1 Die Graft-versus-Host-Krankheit.....	18
1.4.2 Eisenüberladung, Therapie und Bedeutung für die posttransplantäre Mortalität.....	20
1.4.3 Infektionen	22
1.4.4 Weitere Komplikationen	22
1.5 Metabolismus und Pathophysiologie von Eisen und Ferritin	23
1.6 Zielsetzung.....	27
2 Patienten, Material und Methoden.....	28
2.1 Patientenkollektiv	28
2.1.1 Patientenkollektiv CRP < 5 mg/l.....	28
2.1.2 Patientenkollektiv CRP > 5 mg/l.....	30
2.1.3 Therapieregime vor HSZT	31
2.2 Beckenkammbiopsien	31
2.3 Immunhistochemische Charakterisierung der Makrophagen	32
2.4 Berliner Blau Färbung	33
2.5 Etablierung der Methode	33
2.6 Auswertung und statistische Analyse	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Vorbemerkungen.....	36
3.2 Korrelation des histomorphologisch ermittelten Eisengehalts mit der Anzahl der verabreichten Erythrozytenkonzentrate vor HSZT	36
3.2.1 Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate mit den serologisch ermittelten Serum-Ferritin-Werten vor HSZT	36
3.2.2 Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate und dem histomorphologisch ermittelten Gehalt intrazellulär gespeicherten Eisens in Knochenmarksbiopsien vor HSZT	37

3.2.3	Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate mit der interstitiellen Eisenablagerung im Knochenmark vor HSZT	39
3.2.4	Korrelation der Anzahl der Erythrozytenkonzentrate mit dem Anteil der eisenbeladenen CD68 ⁺ -Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68 ⁺ -Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	41
3.2.5	Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	42
3.3	Korrelationen des histomorphologisch ermittelten Eisengehalts mit den serologisch ermittelten Serum-Ferritin-Werten	44
3.3.1	Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien vor HSZT	44
3.3.2	Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit der interstitiellen Eisenablagerung im Knochenmark vor HSZT	46
3.3.3	Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit dem Anteil der eisenbeladenen CD68 ⁺ -Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68 ⁺ -Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	48
3.3.4	Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	50
3.4	Sinnhaftigkeit der histomorphologischen Eisenbestimmung bei den Patienten mit CRP-Werten > 5 mg/l	51
3.5	Korrelationen mit HFE-Mutationen	52
3.6	Die akute und chronische Graft-versus-Host Reaktion, die rückfallfreie Mortalität und die Überlebenszeit.....	59
4	Diskussion.....	65
4.1	Einleitung	65
4.2	Analyse der Wertigkeit histologischer Verfahren der Körpereisenbestimmung durch Korrelation mit der Menge der exogenen Eisenzufuhr (Anzahl der Erythrozytenkonzentrate)	67
4.3	Analyse der Wertigkeit histologischer Verfahren der Körpereisenbestimmung durch Korrelation mit den Serum-Ferritin- Werten	68
4.3.1	Untersuchung der Patientengruppe mit niedrigem CRP (CRP < 5 mg/l)	68
4.3.2	Untersuchung der Patientengruppe mit hohem CRP (CRP > 5 mg/l)	70
4.4	Abhängigkeit des Ausmaßes des gespeicherten Körpereisens mit dem HFE-Status.....	70
4.5	Wertigkeit der histologischen Körpereisenbestimmung für den Verlauf der Erkrankung nach HSZT	71
4.6	Abschließende Bemerkungen zur Validität der histologischen Eisenbestimmung...	72
5	Zusammenfassung.....	73
	Abbildungsverzeichnis.....	76
	Tabellenverzeichnis.....	78
	Literaturverzeichnis.....	81

Publikations-/Präsentationsverzeichnis.....	87
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	87
Danksagung	89
Lebenslauf.....	90

Abkürzungsverzeichnis

AML.....	Akute myeloische Leukämie
ATG.....	Antithymozytenglobulin
BSG.....	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
C/EBP α	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CML.....	Chronische myeloische Leukämie
CMML.....	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CMV.....	Cytomegalievirus
CSA.....	Cyclosporin A
DNMT.....	DNA-Methyltransferase
EBMT.....	European Group for Blood and Marrow Transplantation
FAB.....	French American British
G-CSF.....	Granulocyte colony stimulating factor
GEKID.....	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GvHD.....	Graft-versus-Host-Disease
GvL.....	Graft-versus-Leukemia
GvT.....	Graft-versus-Tumor
HAMP.....	Hepcidin Antimicrobial Peptide
HDAC.....	Histondeacetylase
HSZT.....	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IPSS.....	International Prognostic Scoring System
LDH.....	Laktatdehydrogenase
LPE.....	Labiles Plasma Eisen
MDR.....	Multi Drug Resistance
MDS.....	Myelodysplastisches Syndrom
MHC.....	Major Histocompatibility Complex
NK-Zellen.....	Natürliche Killerzellen
NTGE.....	Nicht-Transferrin-gebundenes Eisen
SEER.....	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SF.....	Serum-Ferritin
WPSS.....	WHO adapted Prognostic Scoring System

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark und dem Blut hat sich in den letzten Jahrzehnten von einer experimentellen Therapie zu einer anerkannten, potenziell kurativen Behandlung lebensbedrohlicher hämatologischer Erkrankungen, wie beispielsweise akuten myeloischen Leukämien, entwickelt (Gratwohl et al. 1998).

Patienten mit einer manifesten akuten myeloischen Leukämie, haben ohne Transplantation eine Überlebenschance von meist nur wenigen Monaten. Eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) dieser Patienten gestaltet sich in der Regel schwierig und ist mit komplexen Problemen verbunden. Dies resultiert aus dem Umstand, dass die Patienten oft älter, multimorbide und in einem schlechten Allgemeinzustand sind. Meist haben diese Patienten in den zurückliegenden Monaten zahlreiche Erythrozytentransfusionen erhalten, welche zu einer toxischen Eisenüberladung führen und mit beträchtlichen konsekutiven Komplikationen behaftet sein können (Nowak, 2006).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass diese Eisenüberladung vor einer Transplantation einen signifikanten Einfluss auf das ereignisfreie Überleben nach einer Transplantation hat. Dabei scheint die serologische Quantifizierung des Ferritins am besten geeignet zu sein, die tatsächliche Eisenüberladung abzuschätzen. Als Akute-Phase-Protein kann der serologische Ferritin-Wert jedoch nur gewertet werden, wenn keine Entzündungskonstellation besteht. Dies kann mit Bestimmung des CRP-Werts gut nachvollzogen werden. In den Fällen mit erhöhtem CRP-Wert wäre es hilfreich, alternative Methoden verfügbar zu haben, welche den Eisengehalt präzise beschreiben können (Petrides 2007).

1.2 Der Formenkreis der myelodysplastischen Syndrome und die akuten myeloischen Leukämien

Akute myeloische Leukämien (AML) sowie die Vorläufererkrankungen des myelodysplastischen Syndroms (MDS) bezeichnen maligne hämatopoetische Stammzellerkrankungen, wobei MDS ein unterschiedliches Risiko der Progression in eine AML aufweisen. Sie stellen primär eine Erkrankung überwiegend des höheren Lebensalters dar. Oft haben die für eine allogene HSZT vorgesehenen Patienten ohne Transplantation nur noch eine geringe Überlebenschance von mehreren Monaten (Haase 2002).

1.2.1 Der Formenkreis der myelodysplastischen Syndrome

Unter der Bezeichnung MDS wird eine Gruppe von Erkrankungen des Knochenmarkes zusammengefasst, welche durch einen Stammzelldefekt mit nachfolgenden Reifungsstörungen der Hämatopoese bei peripherer Zytopenie gekennzeichnet ist. Der Blutbildungsprozess ist nachhaltig gestört und es besteht grundsätzlich das Risiko des Übergangs in eine AML. MDS treten meist nach dem sechzigsten Lebensjahr auf und verlaufen je nach Progressionsrisiko unterschiedlich schwer (Haase 2002).

In allen MDS-Untergruppen, mit Ausnahme des 5qminus-Syndroms, ist ein leichtes Überwiegen des männlichen Geschlechts nachweisbar. Nach den Daten des Düsseldorfer Knochenmarkregisters beträgt die Inzidenz in der Gesamtbevölkerung 4 - 5 / 100.000 / Jahr. Aufgrund der charakteristischen Altersbindung nimmt die Inzidenz mit fortschreitendem Lebensalter stark zu und beträgt über 20 / 100.000 bei Bevölkerungsgruppen jenseits des 70. Lebensjahrs. Diese Daten werden durch flächendeckende Populationsstudien wie z. B. der SEER-Studie in den USA bestätigt (Aul et al. 2010). In über 90 Prozent der Fälle lässt sich keine auslösende Ursache nachweisen (primäre MDS). Weniger als 10 Prozent der Fälle sind durch exogene Noxen wie vorangegangene Zytostatikatherapie, Radiatio, Benzol und andere Lösungsmittel bedingt (sekundäre bzw. therapieassoziierte MDS). Therapieassoziierte MDS (t-MDS) gehen in über 90 % der Fälle mit chromosomalen Aberrationen einher. Für die Entwicklung einer klonalen Hämatopoese sind wahrscheinlich mehrere Mutationen erforderlich. Ein zentraler Pathomechanismus in den Frühstadien eines MDS ist die gesteigerte Apoptoserate der Knochenmarkzellen, die durch immunologische Faktoren ausgelöst wird. Postuliert werden autoreaktive T-Zellklone im MDS-Knochenmark, die über einen noch unbekanntem Mechanismus aktiviert werden und durch Freisetzung von TNF- α und anderen proinflammatorischen Zytokinen eine vermehrte Apoptose hämatopoetischer Progenitorzellen auslösen (Aul et al. 1997). Ein einheitlicher genetischer Defekt konnte als Ursache der MDS-Entstehung noch nicht identifiziert werden. Man geht davon aus, dass die Kumulation verschiedener genetischer Läsionen für die zunehmende Knochenmarkschädigung und finale Progression des MDS in eine AML verantwortlich ist (Aul et al. 2010).

Zur Abschätzung des Progressionsrisikos wurden in den letzten Jahren mehrere Prognose-Scores etabliert, welche sich insbesondere auf die internationalen Prognose-Scores für MDS und auf die WHO-adaptierten Prognose-Scores für MDS stützen. Die grundsätzliche Abfolge der Prognoseabschätzungssysteme verläuft nach einem analogen Muster: Gewisse Einzelfaktoren werden gewichtet und kombiniert, woraus die visierte Lebensdauer des Patienten geschätzt wird, wenn keine Behandlung eintritt. Diese Einzelfaktoren können sehr vielfältig sein. Exemplarisch können hier das Alter des Patienten, die Anzahl der

konsumierten Zigaretten je Tag oder aber die täglich zugeführte Menge an Alkohol herangezogen werden. Bei einer MDS-Erkrankung können verschiedene Einzelfaktoren in die Prognose-Scores integriert werden, um die mediane Lebenszeit ohne Behandlung des Patienten zu ermitteln (Greenberg et al. 1997).

Der am häufigsten genutzte Prognose-Score für MDS ist der Score des International Prognostic Scoring System (IPSS), der sich auf die French American British (FAB) Klassifikation von 1982 stützt und 2012 novelliert wurde (Greenberg et al. 1997; Greenberg et al. 2012). Bei dem ursprünglichen Scoring System wurden drei Determinanten miteinander verknüpft: Ausprägung des Blutzellmangels respektive Zytopenien, Summe der Veränderungen des Erbgutes (zytogenetische Veränderungen) der für die Blutbildung verantwortlichen Zellen, sowie der Anteil myeloischer Blasten in Knochenmark und Blut (Aul et al. 2010). Die revidierte Fassung verfeinert den Score um folgende Attribute: Die Neugruppierung von chromosomalen Aberrationen in fünf statt drei Risikokategorien. Neudefinition der Risikogruppen in Abhängigkeit vom medullären Blastenanteil (≤ 2 , $2 < 5$, $5 - 10$, $> 10 - 30$ %). Berücksichtigung des Grades der Zytopenien. Die Inklusion weiterer Prognoseparameter wie Serum-Ferritin, Lactatdehydrogenase, $\beta 2$ -Mikroglobulin. Des Weiteren wurden die prognostischen Risikogruppen von vier auf fünf Kategorien in Bezug auf die mediane Überlebenszeit angehoben (Greenberg et al. 2012).

Punktzahl	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Zytogenetik	Sehr günstig	-	Günstig	-	Intermediär	ungünstig	Sehr ungünstig
KM-Blasten	< 2 %	-	3 - 4 %	-	5 - 9 %	> 10 %	-
Hämoglobin g/dl	> 10	-	8 - < 10	< 8	-	-	-
Thrombozyten/ μ l	> 100	50 - < 100	< 50	-	-	-	-
Granulozyten/ μ l	> 800	< 800	-	-	-	-	-

Tab. 1.1: Internationaler Prognose-Score revidiert (IPSS-R) zur Risikostratifikation bei MDS (Germing et al. 2013)

Zytogenetische Risikogruppen	
Sehr günstig	Del(11q), -Y
Günstig	Normal, del(20q), del(5q), einzeln und doppelt, del(12p)
Intermediär	+8, del(7q), i(17q), +19, +21, jede andere einzelne und doppelte Anomalie, unabhängige Klone
Ungünstig	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), 2 Anomalien inklusive -7/del(7q), komplex mit 3 Anomalien
Sehr ungünstig	Komplex mit >3 Anomalien

Tab. 1.2: Zytogenetische Risikogruppen (Germing et al. 2013)

Risikogruppe	Score	Mediane Überlebenszeit (Monate)	AML 25% ¹⁾ (Monate)
Sehr niedriges Risiko	≤ 1,5	8,8	Nicht erreicht
Niedriges Risiko	> 1,5 - 3	5,3	10,8
Intermediäres Risiko II	> 3 - 4,5	3,0	3,2
Hohes Risiko	> 4,5 - 6	1,6	1,4
Sehr hohes Risiko	> 6	0,8	0,73

Tab. 1.3: Internationaler Prognose-Score (IPSS) zur Risikostratifikation bei MDS

1) Zeit bis sich bei 25% der Patienten eine Leukämie entwickelt hat (Germing et al. 2013)

Ein weiterer Score, der so genannte WHO-adaptierte Prognose-Score für MDS (WPSS) analysiert die potenzielle Lebenserwartung in ähnlicher Form. Erforderlich wurde dieser zweite Score durch die Revision der FAB-Klassifikation, die unter bestimmten Umständen bei MDS-Patienten einen Blastengehalt von > 20 % tolerierte (Vardiman et al. 2009).

Die Variablen des WPSS beinhalten wie der IPSS die zytogenetischen Aberrationen. Des Weiteren bezieht er den Transfusionsbedarf und die WHO-Subtypen mit ein und verteilt diese auf fünf anstatt vier Risikogruppen (Malcovati et al. 2007).

Punktzahl	0	1	2	3
WHO - Typ	RCUD/RARS/5q	RCMD	RAEB I	RAEB II
Transfusionsbedarf ²⁾	Nein	Ja	-	-
Zytogenetische Risikogruppe ¹⁾	Niedrig	Mittel	Hoch	-

Tab. 1.4: WHO-basiertes Prognostic-Scoring-System (WPSS) zur Risikostratifizierung bei MDS (Aul et al. 2010)

1) Niedriges Risiko = normaler Karyotyp, 5q-, 20q-, -Y

Mittleres Risiko = alle anderen Anomalien

Hohes Risiko = Komplexe Karyotypveränderungen (≥ 3 Anomalien), Chromosom 7-Defekte

2) Transfusionsbedarf bei Erstdiagnose

Risikogruppe	Score	Mediane Überlebenszeit (Monate)
Sehr niedriges Risiko	0	141
Niedriges Risiko	1	66
Intermediäres Risiko	2	48
Hohes Risiko	3 - 4	26
Sehr hohes Risiko	5 - 6	9

Tab. 1.5: WHO-basiertes Prognostic-Scoring-System (WPSS) zur Risikostratifizierung bei MDS (Aul et al. 2010)

Mit Ausnahme der allogenen HSZT ist bis heute keine kurative Behandlung der MDS bekannt. Bei den meisten Patienten beschränkt sich die Therapie daher auf palliative Maßnahmen, die auf eine Erhaltung bzw. Verbesserung der Lebensqualität abzielen. Supportive Therapiemaßnahmen sind als Standard in allen Krankheitsstadien anzusehen (Aul et al. 2010).

Für die MDS-Erkrankung lassen sich verschiedene therapeutische Optionen auf der Grundlage der vorgenommenen Prognose-Scores identifizieren. Sie werden in zwei Therapieregime eingeteilt: Niedrig-Risiko-MDS (sehr niedrig, niedrig, intermediär (1)) und Hoch-Risiko-MDS (intermediär (2), hoch, sehr hoch). Insofern ein Niedrig-Risiko-MDS diagnostiziert wird, kann die so genannte supportive Therapie angewendet werden. Hierbei handelt es sich um eine unterstützende Behandlung, welche die Komplikationen und Nebenwirkungen der Krankheitstherapie präventiv behandelt und bei der Vermeidung und Lösung sozialer Probleme unterstützt. Es steht der Erhalt bzw. die Wiederherstellung der Lebensqualität im Vordergrund. Eine Transplantation wird meist erst im Progress durchgeführt (McClune et al. 2010). Bei der MDS-Erkrankung umfasst die medikamentöse supportive Therapie die Gabe von Erythrozyten oder Thrombozyten, insofern diese Blutwerte erniedrig sind. Bei klinischem Anzeichen einer Infektion werden Antibiotika verabreicht. Granulozyten-Koloniestimulierende Faktoren (G-CSF) können in Verbindung mit Erythrozytenkonzentraten Leuko-, Neutro-, Granulozytopenien vorbeugen und die Rate an Erythrozytentransfusionen, abhängig vom Subtyp, erheblich verringern (Aul et al. 2010; Greenberg 2010; Tefferi & Vardiman 2009).

Als weitere Maßnahme bei Niedrig-Risiko-MDS-Patienten sei die Immunsuppression zu nennen. Diese hat an Bedeutung gewonnen, seitdem bekannt ist, dass T-Lymphozyten durch Freisetzung proapoptotischer Zytokine, insbesondere in frühen MDS-Stadien, an der Entwicklung der hämatopoetischen Insuffizienz beteiligt sind. Eine Therapie mit Antithymozytenglobulin (ATG) und/oder Cyclosporin A (CSA) kann bei Niedrig-Risiko-MDS in ca. 30% der Fälle sowohl zur Transfusionsfreiheit als auch zum Thrombozytenanstieg führen. Prädiktive Parameter für eine erfolgreiche ATG-Therapie sind z.B. jüngeres Patientenalter, kürzere Krankheitsdauer sowie geringer oder kein Transfusionsbedarf. Die Dauer des Ansprechens liegt hierbei bei ca. 10 - 12 Monaten (Nimer 2008).

Ein weiterer Wirkstoff ist Lenalidomid, eine immunmodulatorische Substanz. Dieses Medikament ist aus der Behandlung von Patienten mit multiplen Myelomen bereits bekannt. Seine Wirkung beruht auf verschiedenen Mechanismen. So hemmt es die Proliferation gewisser hämatopoetischer Tumorzellen und die Produktion entzündungsfördernder respektive proinflammatorischer Zytokine (insbesondere TNF- α und Interleukin-6 sowie Interleukin-12). Ferner beruht die positive Wirkung auf Förderung der Antiangiogenese, Stimulation von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), wodurch in Folge eine Verbesserung der durch diese Zellen vermittelten Immunität gegen Tumorzellen eintritt. So kann eine Normalisierung des Blutbildes, insbesondere der Erythropoese erreicht werden (Weber et al. 2007; Dimopoulos et al. 2007).

Die immunmodulatorische Therapie kommt besonders bei Niedrig-Risiko-MDS-Patienten mit del(5q)-Anomalie zum Einsatz und führt regelhaft zu langfristiger Transfusionsfreiheit. Die Ansprechdauer liegt hier bei ca. zwei Jahren (Mohamedali & Mufti 2009).

Auch bei Niedrig-Risiko-MDS-Patienten, die keine 5q-minus-Anomalie aufweisen, ist Lenalidomid wirksam, allerdings sind Ansprechraten, Hämoglobinanstieg und Ansprechdauer deutlich kürzer. Hauptnebenwirkung von Lenalidomid sind ausgeprägte Neutro- und Thrombozytopenien, die eine Dosisreduktion oder evtl. einen Therapieabbruch erfordern.

Erythrozytentransfusionen sind, wie oben beschrieben, ein wichtiger Bestandteil der supportiven Therapie. Durch die Bluttransfusionen kommt es über das Hämoglobin zu einer Eisenüberladung, welche im Durchschnitt 200 bis 250 Milligramm pro verabreichtem Konzentrat beträgt. Die Eisenüberladung resultiert in einer pathologischen intrazytoplasmatischen und interstitiellen Eisenablagerung in allen Organen mit konsekutiver Gewebeschädigung und Störung der Organfunktionen (Greenberg 2010). Da ein Mensch täglich nur ein Milligramm Eisen verbraucht und auch wieder ausscheidet, muss das überschüssig aufgenommene Eisen durch Eisenchelatoren aus dem Körper eliminiert werden (Ehninger 2008). Daher sollte bei Niedrig-Risiko-Patienten, die mindestens 25 Erythrozytenkonzentrate erhalten haben und deren Serum-Ferritin bei über 1000 ng/ml liegt, eine Behandlung mit einem Chelatbildner erwogen werden. Eine Eisenchelationstherapie führt bei etwa 15 - 20 % der Patienten zur Verbesserung der Blutzellzahlen (Gattermann et al. 2012). Der Überlebensvorteil wurde in retrospektiven Analysen zwar festgestellt, aber noch nicht durch prospektive, randomisierte Studien belegt (Germing et al. 2013).

Sofern bei Patienten ein Hoch-Risiko-MDS diagnostiziert wird, weisen diese in unbehandeltem Zustand ein hohes Risiko einer Transformation in eine sekundäre AML auf; die mediane Überlebenszeit beträgt in dieser Konstellation nur zwölf Monate (Greenberg et al. 1997). Neben der supportiven Therapie muss daher für diese Patienten in Abhängigkeit ihrer individuellen Situation eine gesonderte Behandlung in Erwägung gezogen werden. Die Behandlungsoptionen umfassen hier zunächst die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation. Für die Patienten, die sich für die HSZT nicht qualifizieren, sollte die epigenetische Therapie, eine intensive Chemotherapie, sowie nicht intensive Chemotherapie durch niedrig dosiertes Cytarabin oder niedrig dosiertes Melphalan in Betracht gezogen werden.

Die epigenetische Prägung einer Zelle bezeichnet die Kodierung des Phänotyps durch DNA-Methylierung oder Modifikation der Histone. Es handelt sich hier um einen komplex regulierten Schlüsselmechanismus während der normalen Zellteilung und Differenzierung. Bei MDS-Patienten führen aberrante DNA-Methylierungsmuster und Histonmodifikationen zur Inaktivierung („silencing“) kritischer Genabschnitte, die für die DNA-Reparatur,

Differenzierungsinduktion, Apoptose und Zellzykluskontrolle erforderlich sind. Diese Veränderungen können z.B. durch DNA-Methyltransferase- (DNMT) und Histondeacetylase- (HDAC) Inhibitoren rückgängig gemacht werden (Aul et al. 2010).

Am besten untersucht ist das Pyrimidinanalogon Azacytidin (Vidaza), welches anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut wird und durch Hemmung der DNMT die Hypermethylierung von Promotorgenen rückgängig macht (Gurion et al. 2010).

In der AZA-001-Studie konnte ein signifikanter Überlebensvorteil für Azacytidin gegenüber den konventionellen Therapieoptionen (supportive Therapie, niedrig dosiertes Cytosinarabinosid und Induktionstherapie) festgestellt werden (24 vs. 15 Monate) und der Übergang von einem MDS in eine AML signifikant verlängert werden (18 vs. 12 Monate). Vidaza führte bei 29 % der Patienten zu einer kompletten oder partiellen Remission und bei etwa der Hälfte der Patienten zu einem Anstieg der Blutzellwerte und zu Transfusionsfreiheit (Fenaux 2009).

Als Nebenwirkung von Azacytidin werden Myelosuppression, lokale Hautirritationen und gastrointestinale Beschwerden angegeben.

Azacytidin ist seit 2009 zur Behandlung von erwachsenen Patienten mit folgenden Erkrankungen zugelassen, insbesondere wenn für eine allogene HSZT Kontraindikationen vorliegen:

- MDS mit einem intermediären Risiko (INT-II) oder einem hohen Risiko nach IPSS
- chronische myelomonozytäre Leukämie mit 10 bis 29 Prozent Knochenmarkblasten (CMML-2) ohne myeloproliferate Störung
- AML mit 20 bis 30 Prozent Blasten und einer Mehrlinien-Dysplasie gemäß Klassifikation der WHO (Maurillo et al. 2013)

Für jüngere Patienten (< 70 Jahre) in gutem Allgemeinzustand und ohne Begleiterkrankung wird eine intensiviertere Polychemotherapie vorgesehen, die auf ähnliche Induktionsprotokolle wie bei der AML zurückgreift. Als Kombinationspartner kommen Anthrazykline, Anthrachinone, Standard- und Hochdosis-Cytosinarabinosid, Etoposid und der Topoisomerase-I-Hemmer (Topotecan) in Betracht. Hierbei werden ähnlich gute Raten an kompletter Remission erzielt wie bei der AML (50 - 70 %). Die Remissionsdauer liegt hier jedoch bei weniger als zwölf Monaten. Als ungünstige Parameter für ein Ansprechen sind die Transformation in eine AML, t-MDS, männliches Geschlecht, hohe Serum-LDH-Spiegel und der Nachweis von Chromosom-7-Anomalien und komplexen Aberrationen, identifiziert worden. Durch Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie lassen sich bei einem Teil der MDS-Patienten lang anhaltende Vollremissionen erreichen (Estey et al. 1997).

Die allogene HSZT ist gegenwärtig die einzige verfügbare, potenziell kurative Therapieoption für das MDS und die AML (Ehninger, 2008). Insbesondere für Patienten, welche das fünfundsechzigste Lebensjahr noch nicht überschritten haben und über eine Hochrisikokonstellation verfügen, nimmt diese Therapie einen primären Stellenwert ein (Tefferi & Vardiman 2009). Durch die Verbesserung supportiver Maßnahmen konnte die Indikation auf Patienten über das siebzigste Lebensjahr erweitert werden. Jeder geeignete MDS-Patient sollte daher bei Diagnosestellung in einem Transplantationszentrum zur individuellen Behandlung vorgestellt werden. (Ehninger, 2008).

1.2.2 Das Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämien

Die AML macht etwa 80% der akuten Leukämien des Erwachsenen und ungefähr 15 - 20 % der akuten Leukämien im Kindesalter aus. In Deutschland existiert seit 1980 zwar ein Kinderkrebsregister, in dem 95 % aller Krebsfälle bei Kindern bis 15 Jahren registriert werden (Kaatsch 2004), im Gegensatz zu den meisten angloamerikanischen und einigen skandinavischen Ländern gibt es aber erst seit 2010 ein flächendeckendes zentrales Register zur Erfassung von Leukämiefällen bei Erwachsenen. Der von der GEKID ("Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.") und dem Robert-Koch-Institut herausgegebene Bericht zu Krebs in Deutschland bezieht sich nur auf lokale Krebsregister (Haberland et al. 2006; Schaich 2008).

Um diesbezüglich Abhilfe zu schaffen, werden anhand der Häufigkeitsdaten des größten amerikanischen Krebsregisters (SEER) und der deutschen Bevölkerungsdaten Schätzzahlen für Deutschland erhoben. Natürlich ergeben sich bezüglich der Vergleichbarkeit mit den amerikanischen Zahlen limitierende Faktoren wie z.B. die unterschiedlichen Klima- und Umweltbedingungen.

Bei Berücksichtigung dieser Umstände liegt die Anzahl der geschätzten Neuerkrankungen für AML des Erwachsenen in Deutschland bei jährlich 4,3 / 100.000 für Männer und 2,9 / 100.000 für Frauen. Insgesamt erkranken etwa 3600 Menschen in Deutschland pro Jahr (Haberland et al. 2006). Die altersstandardisierte Inzidenz der kindlichen AML beläuft sich in Deutschland jährlich auf 0,7 pro 100.000. Das Verhältnis von Jungen und Mädchen ist nahezu gleich (Jungen vs. Mädchen 1,1: 1,0) (Kaatsch 2004).

Von dem amerikanischen Krebsregister ausgehend ergibt sich, dass die AML eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist. Bis zu einem Alter von 39 Jahren verändert sich die Inzidenz kaum und schwankt zwischen Werten von 0,4 in der Gruppe der 5- bis 9-Jährigen und 1,4 bei den 35- bis 39-Jährigen. Mit zunehmendem Alter steigt dann die Inzidenz der AML deutlich an und beträgt 7,3 bei den 60- bis 64-Jährigen, 15,3 bei den 70- bis 74-Jährigen und 23,1 bei den 80- bis 84-Jährigen. Damit ergibt sich ein medianes Alter von 67 Jahren bei Diagnosestellung. Schwarze Menschen erkranken hierbei im Median

10 Jahre früher als Menschen weißer Hautfarbe. Die Inzidenz in Europa entspricht den amerikanischen Werten für Menschen mit weißer Hautfarbe (Visser et al. 2012).

Die Mortalität der AML beträgt nach den Daten der SEER 2,7 / 100.000. Sie ist bei Männern höher als bei Frauen (3,5 vs. 2,2). Die Mortalität der AML zeigt naturgemäß ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit vom Alter und steigt von Werten um 1 / 100.000 bei unter 45-Jährigen auf bis zu 67 / 100.000 bei über 75-Jährigen an (Haberland et al. 2006).

Die Risikofaktoren für eine AML bestehen aus genetischen und aus extrinsischen Faktoren. Eine Exposition gegenüber hohen Dosen ionisierender Strahlung, eine langjährige chronische Benzolbelastung oder eine Zytostatikatherapie z.B. mit Alkylantien und Topoisomerase-II-Hemmer, können nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren zu Entwicklung einer AML führen. Ferner tritt eine AML gehäuft bei einigen genetischen Erkrankungen auf, wie z.B. der Trisomie 21 oder bei einer Keimbahnmutation im C/EBP α -Gen. Der Tabakkonsum nimmt ebenfalls einen hohen Stellenwert ein.

In den meisten Fällen kann die Ursache für die Entstehung der Erkrankung jedoch nicht benannt werden (Löwenberg et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

AML können sowohl de novo als auch als Progression einer präexistenten hämatopoetischen Neoplasie entstehen. Die Blastenproliferation bei Reifungsarrest führt zu einer hämatopoetischen Insuffizienz und zu einer peripheren Blastenüberschwemmung mit einer gesteigerten Koagulabilität des Blutes. Die Symptome einer AML lassen sich vorwiegend auf eine Knochenmarkinsuffizienz zurückführen. Die Symptome dieser Insuffizienz umfassen insbesondere Zeichen der Blutgerinnungsstörung mit Petechien, Hämatomen, Schleimhaut- oder Zahnfleischblutungen, Infektionen wie Pneumonie, Tonsillitis, Mundsoor, allgemeine Schwäche, Krankheitsgefühl, Blässe oder Nachtschweiß (Löwenberg et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

In den meisten Fällen besteht bei Diagnosestellung eine Leukozytose, manchmal aber auch normale oder sogar erniedrigte Leukozytenzahlen. Im Differentialblutbild lassen sich im Verlauf meist Blasten erkennen. Hinzu kommen oft eine Anämie und Thrombopenie, erhöhte LDH und Harnsäurewerte sowie Gerinnungsstörungen. Unbehandelt schreitet die Erkrankung schnell voran und führt nach kurzer Zeit meist aufgrund von Infektionen oder Blutungen zum Tode (Löwenberg et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

Vor Beginn der Behandlung müssen Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren berücksichtigt werden. Eine Sonderrolle nimmt hier die AML M3 (Akute Promyelozyten-Leukämie) ein. Während die Prognosefaktoren mittels Prognose-Scores (spontaner Verlauf) ermittelt werden, können durch die Hinzuziehung von prädiktiven Faktoren der Behandlungserfolg und der Einfluss der Pathophysiologie ziemlich genau prognostiziert werden. Bei beiden Faktoren nehmen die Komorbidität, soziale Faktoren und das Alter des

Patienten einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Prognose ein (Germing et al. 2012; Fiegl & Hiddemann 2012). Zytogenetische Abberationen, die erstmals in der Klassifikation der WHO von 2008 prognostisch Erwähnung fanden, nehmen ferner einen immer wichtigeren Stellenwert ein, um die Therapieoptionen individuell an den Patienten anzupassen und somit eine risikoadaptierte Therapie durchzuführen (Döhner et al. 2010).

Parameter	Stratum
Körpertemperatur (°C)	≤ 38, > 38
Hämoglobin (g/dl)	≤ 10,3, > 10,3
Thrombozyten (K/μl)	≤ 28, > 28 - ≤ 53, > 53 - ≤ 104, > 104
Fibrinogen (mg/dl)	≤ 150, > 150
Alter bei Diagnose (Jahre)	60 - 64, > 64 - 67, > 67 - 72, > 72
Art der Leukämie	de novo, sekundär

Tab. 1.6: Parameter zur Risikoabschätzung gemäß des AMLCG-SAL-Risiko-Scores ((Fiegl & Hiddemann 2012)
 AMLCG = Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group; SAL = Studienallianz Leukämie

Derzeit konkurrieren noch zwei Klassifikationssysteme. Die ältere FAB-Klassifikation (French-American-British-Group) unterscheidet dabei ausschließlich nach morphologischen Kriterien.

AML-Subtypen	
M0	MPO konventionell zytochemisch negativ, immunologisch und ultrastrukturell positiv; CD13-positiv
M1	unreife Myeloblasten-Leukämie
M2	Myeloblasten-Leukämie mit Ausreifung (+ spez. Form M2 Baso)
M3	Promyelozyten-Leukämie (APL), t(15;17)*
M3v	mikrogranuläre M3, zytogenetisch und molekular-genetisch ebenfalls t(15;17)*
M4	akute myelomonozytäre Leukämie
M4Eo	AMMoL + > 5% abnorme Eosinophile
M5a	unreife Monoblasten-Leukämie
M5b	Monoblasten-Leukämie mit Ausreifung
M6	akute Erythroleukämie
M7	Megakaryoblasten-Leukämie
Sonderformen:	
	* inzwischen weitere zytogenet. (z. B. t(11;17)) Formen biphänotypische u. bilineäre Leukämie AML mit Myelodysplasie AML aus MDS; akute Myelofibrose hypoplastische AML smouldering leukemia

Tab. 1.7: Morphologische Einordnung basierend auf der FAB-Klassifikation (Vardiman et al. 2009)

Die WHO-Klassifikation bezieht sich nicht nur auf die morphologischen Kriterien, sondern schließt auch die Zytogenetik und die molekulare Genetik mit ein.

Kategorien	
<p>AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien</p> <ul style="list-style-type: none"> – mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) – mit inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16) (p13.1;q22), (CBFβ/MYH11) – akute Promyelozyten-Leukämie: mit t(15;17) (q22;q12), (PML/RARA) und Varianten 	<p>Unabhängig von der Blastenzahl im Blut oder KM</p>
<ul style="list-style-type: none"> – AML mit t(9;11)(p22;q23), MLLT3-MLL oder anderen 11q23 (MLL) Abnormalitäten – AML mit t(6;9)(p23;q34), DEK-NUP214 – AML mit inv(3)(q21;q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2), RPN1-EV11 – AML (megakaryoblastic) mit t(1;22)(p13;q13), RBM15-MKL1 	<p>Alle weiteren folgenden AML-Subtypen: ≥20% Blasten im BB oder KM</p>
<p><i>Provisorische Entitäten:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> – AML mit mutiertem NPM1 – AML mit mutiertem CEBPA <p>AML mit myelodysplasieverwandten Veränderungen</p> <p>AML, therapiebedingt</p> <p>AML ohne weitere Kategorie</p> <ul style="list-style-type: none"> – mit minimaler Differenzierung – ohne Ausreifung – mit Ausreifung – akute myelomonozytäre Leukämie – akute monoblastische und monozytäre Leukämie – akute Erythroleukämie – akute erythroide Leukämie – erythroid/myeloisch – akute Megakaryoblasten-Leukämie – akute Basophilen-Leukämie – akute Panmyelosis mit Myelofibrose <p>Myeloisches Sarkom</p> <p>Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom</p> <ul style="list-style-type: none"> – transient abnormale Myelopoese – myeloische Leukämie assoziiert mit Down-Syndrom <p>Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien</p> <p>Akute myeloische Leukämien mit Mehrliniendysplasie</p>	

Tab. 1.8: WHO-Klassifikation, aktualisiert 2008 (Vardiman et al. 2009)

Hiernach findet dann eine Einteilung in eine Prognosegruppe statt, wonach die Behandlung adaptiert wird und auch die Überlebenszeit abgeschätzt werden kann.

Risikogruppe	Merkmale
Günstig	t(8,21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) oder t(16,16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutiertes <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) Mutiertes <i>CEBPA</i> (normaler Karyotyp)
Intermediär I ^a	Mutiertes <i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) Wildtyp- <i>NPM1</i> mit <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp) Wildtyp- <i>NPM1</i> ohne <i>FLT3-ITD</i> (normaler Karyotyp)
Intermediär II ^a	t(9,11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i> Zytogenetische Abnormitäten, die weder als günstig noch ungünstig klassifiziert werden können ^b
Ungünstig	inv(3)(q21q26.2) oder t(3,3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6,9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearrangiert -5 oder del(5q); -7; abnl(17p); komplexer Karyotyp ^c

^aInklusive aller akuten myeloischen Leukämien mit normalem Karyotyp; ausgenommen sind Formen, die in die günstige Subgruppe eingeschlossen werden. Die meisten dieser Fälle sind mit einer eher schlechten Prognose vergesellschaftet, sie sollten aber aufgrund möglicher Unterschiede im Behandlungsergebnis als eigenständige Gruppe verzeichnet werden.^bFür die meisten dieser Abnormitäten wurden keine ausreichenden Fallzahlen untersucht, um sichere Aussagen hinsichtlich der prognostischen Signifikanz zu treffen.^c≥3 chromosomale Abnormitäten ohne t(15,17), t(8,21), inv(16) oder t(16,16), t(9,11), t(v;11)(v;q23), t(6,9), inv(3) oder t(3,3).

Tab. 1.9: Empfehlungen des European LeukemiaNet zur standardisierten Einteilung der akuten myeloischen Leukämien in zytogenetische und molekulare Risikogruppen (ohne akute Promyelozytenleukämie); validiert bis zu einem Alter von 60 Jahren

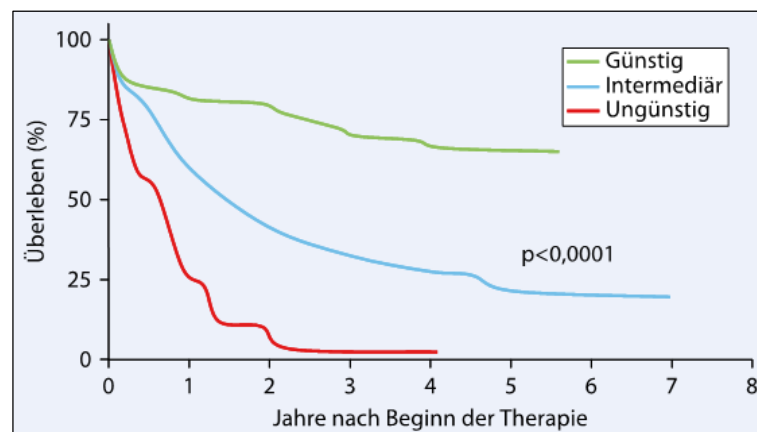


Abb. 1.1: Überleben von Patienten mit AML in Relation zum Karyotyp (Adaptiert nach (Haferlach et al. 2003))

Die konventionelle AML-Therapie unterscheidet terminologisch folgende Phasen: Erstens die Induktionstherapie und zweitens die Konsolidierungs- bzw. Postremissionstherapie. Die Induktion dient der deutlichen Reduktion der Tumorlast um mindestens drei Zehnerpotenzen und damit dem Erreichen einer Kompletten Remission. Eine komplette Remission definiert sich durch den Nachweis der Regeneration des peripheren Blutbildes (> 1000 Neutrophile/ μ l

und ≥ 100.000 Thrombozyten/ μl), durch das Vorliegen von $< 5\%$ Blasten ohne Auer-Stäbchen im Knochenmark und durch den fehlenden Nachweis von Blasten im peripheren Blut bzw. durch fehlenden Nachweis extramedullärer Leukämiemanifestationen (Cheson et al. 2003).

Die Behandlung besteht aus mehrtägigen Chemotherapiesequenzen, welche zyklisch wiederholt werden. Während der Chemotherapie nehmen die Medikamente Cytarabin und seine Analoga sowie die Anthracycline Daunorubicin und Idarubicin einen hohen Stellenwert ein. Gegebenenfalls kann die Therapie durch weitere Chemotherapeutika wie Mitoxantron zur individuellen Anpassung ergänzt werden. Wird eine vollständige Remission erreicht, schließt sich die Postremissionstherapie an (Löwenberg et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

Ziel der Postremissionstherapie ist es, ein Rezidiv der AML dauerhaft zu verhindern. Optionen für die Postremissionstherapie stellen die Chemotherapie sowie die allogene und die autologe HSZT dar. Die konsolidierende Chemotherapie besteht meist aus 2 - 3 repetitiven, intensiven Therapiezyklen, mit denen bei möglichst niedriger Toxizität ein maximaler Effekt erzielt werden soll. Das Prinzip hierbei ist eine Minimierung der residuellen Tumorlast. Dies kann durch die Hinzunahme neuer Substanzen oder durch eine Steigerung der Dosis von bereits im Rahmen der Induktionstherapie verwendeten Substanzen erfolgen. Das wichtigste Medikament hierbei ist, wie auch bei der Induktionstherapie, Cytarabin (O'Donnell et al. 2011; M Schaich 2008). Ob sich eine autologe oder allogene HSZT anschließt, hängt von dem adaptierten Risikoprotokoll ab, welches je nach Risikoeinstufung des Patienten bzw. des Ansprechens auf die bisherige Therapie ausgewählt wird.

Als Begleittherapie (supportive Therapie) nimmt der Ersatz von Blutbestandteilen (Erythrozyten und Thrombozyten), Wachstumsfaktoren für Granulozyten, die Bekämpfung von Infektionen mittels Antibiotika und die Tumorlyseprophylaxe einen wesentlichen Stellenwert ein (Löwenberg et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

Gegebenenfalls kann sich eine Erhaltungstherapie anschließen. Diese wird jedoch nur im Rahmen von Studien durchgeführt, da eine Erhaltungstherapie gegenüber einer intensiven Postremissionstherapie bislang keinen Überlebensvorteil erbrachte (Miyawaki et al. 2005). Ausnahmen hiervon sind die akute Promyelozytenleukämie oder ältere Patienten (> 60 Jahren), denen eine intensive Konsolidierungstherapie nicht zugemutet werden kann.

Abgesehen von spezifischen zyto- und molekulargenetischen Merkmalen werden die Patienten zur weiteren Risikoeinschätzung in die beiden prognostisch relevanten Altersgruppen unter und über 60 Jahre eingeteilt. Für Patienten über 60 Jahren sind die standardisierten intensiven Induktions- und Konsolidierungsstrategien meist nicht umsetzbar. Die AML des älteren Menschen, d.h. ab einem Alter über 60 Jahren, weist im Vergleich zur Erkrankung des jüngeren Menschen Besonderheiten auf. Es finden sich häufiger numerische

und Hochrisikoaberrationen. Balancierte Translokationen und Niedrigrisikoaberrationen treten hingegen seltener auf. Weiterhin findet sich häufig eine Überexpression des Resistenzgens MDR1 (Appelbaum et al. 2006; M Schaich 2008). Dies führt zu einem vermehrten Therapieversagen und zu einer hohen Rezidivrate. Zusätzlich liegen oft Komorbiditäten vor und die therapieassoziierte Mortalität ist höher. Eine intensive Therapie kann also oft nicht oder nur unvollständig durchgeführt werden, was die Prognose der älteren Patienten weiter verschlechtert (Appelbaum et al. 2006).

Grundsätzlich lässt sich bei Patienten, welche das sechzigste Lebensjahr bereits überschritten haben, eine deutlich schlechtere Überlebensrate als bei Jüngeren prognostizieren. Die Rate kompletter Remissionen liegt in dieser Altersgruppe zwischen dreißig und sechzig Prozent. Als Ursache lassen sich das vermehrte Auftreten prognostisch ungünstiger Faktoren wie beispielsweise ungünstige Zytogenetik oder Sekundärleukämien nach einem vorangegangenen MDS identifizieren. Auf der Grundlage dieser Therapie erreichen etwa fünfzehn bis fünfundzwanzig Prozent der Patienten Langzeitremissionen (Löwenberg et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

Patienten mit einer AML im Rezidiv oder in einer späteren als der zweiten Remission haben ohne hämatopoetische HSZT eine Überlebenschance von nur mehreren Wochen bis wenigen Monaten (Löwenberg et al. 1999; Vardiman et al. 2002).

Als einzige potenziell kurative Therapieoption, gilt die HSZT, die eine Heilungsrate von 50 - 60 % erzielt. Die Rezidivrate beträgt bei Patienten in der ersten kompletten Remission, die einen HLA-identischen Spender hatten unter 20 %. Eine essenzielle Voraussetzung für den Erfolg der Behandlung ist ein guter klinischer Zustand zum Zeitpunkt der Transplantation (Löwenberg et al. 1999).

1.3 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation

Unter einer HSZT versteht sich die Übertragung von Blutstammzellen von einem Spender auf einen Empfänger. Sind Spender und Empfänger dieselbe Person, spricht man von autologer HSZT, sind sie verschiedene Individuen, liegt eine allogene HSZT vor. Bei der HSZT regeneriert sich die Hämatopoese des Patienten aus Zellen des Transplantates. Das Immunsystem baut sich partiell oder vollständig aus dem Transplantat wieder auf. Als Quelle dienen hämatologische Stammzellen aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut und aus Nabelschnurblut. Die Transplantation von Knochenmark ist die klassische Methode. Im Knochenmark entsprechen ca. 0,1 % der mononukleären Zellen hämatopoetischen Stammzellen. Für eine ausreichende Regeneration der Hämatopoese sind für den Empfänger ca. $2 - 3 \times 10^8$ / kg KG kernhaltige Zellen notwendig (entsprechend einem Gesamtvolumen von ca. 1000 ml Knochenmarkblut), die während einer

Knochenmarkentnahme aus multiplen Beckenkammpunktionen in Intubationsnarkose gewonnen werden. Mitte der 1990er Jahre löste die Stammzellapherese die Knochenmarkentnahme als Stammzellquelle in vielen Bereichen ab (Baldomero et al. 2011). Dies gelang durch Mobilisation der hämatopoetischen Stammzellen mittels spezifischer Wachstumsfaktoren wie G-CSF, so dass der Anteil CD34⁺-Zellen im peripheren Blut bis auf das Hundertfache gesteigert werden konnte. Nach 4 - 5 Tagen subkutaner Injektion von G-CSF können die aus dem Knochenmark gelösten Stammzellen über eine Apherese gewonnen und dem Empfänger transplantiert werden. Das Engraftment erfolgt dabei, im Vergleich zur Transplantation von Knochenmark, circa 5 Tage früher (Nelson et al. 2000). Allerdings ist die Rate an chronischen GvHD nach Transplantation von Blutstammzellen höher, was durch die höhere Anzahl an T-Zellen im Transplantat zu erklären ist. Damit ist der Graft versus Leukämie-Effekt (GvL) aber ebenfalls höher. Für Patienten mit seltener HLA-Konstellation, für die weder ein passender Geschwisterspender noch Fremdspender zur Verfügung steht, kann auch Nabelschnurblut als Stammzellquelle dienen. Bei einer Nabelschnurbluttransplantation erfolgt jedoch erst spät ein Engraftment. Es wird zudem häufiger ein Transplantatversagen beobachtet. Heutzutage sind periphere Stammzellen die Methode der Wahl bei autologen HSZT und werden auch bevorzugt für die allogene HSZT eingesetzt (Baldomero et al. 2011).

Die Entscheidung, ob eine autologe oder eine allogene HSZT durchgeführt werden soll, beruht auf verschiedenen Überlegungen. Ziel der autologen HSZT ist die Heilung hämatologischer Erkrankungen durch Retransfusion des eigenen Stammzellmaterials, welches vor Gabe extrem hoher Dosen von Chemotherapeutika entnommen wurde. Ohne die Retransfusion würde dies zu einer monate- bis jahrelangen Knochenmarksaplasie führen und den Tod des Patienten bedeuten (Gale et al. 1985; Gluckman et al. 1989; Richman et al. 1976). Ziel der allogenen HSZT ist die Heilung durch Ausnutzung des Graft versus Tumor Effekts bei der Transplantation fremder Stammzellen.

Voraussetzung dieser Vorgehensweise besteht generell darin, durch eine hohe Gabe von Chemotherapeutika die Tumorzellen zu beseitigen um die Heilungschancen zu verbessern. Dieses Verfahren setzt jedoch voraus, dass zum Zeitpunkt der Diagnose genügend gesundes Knochenmark zur Entnahme verfügbar ist und von den neoplastischen Zellen separiert werden kann. Eine besondere Bedeutung nimmt die autologe HSZT bei lymphoproliferativen Erkrankungen oder bei Fehlen eines geeigneten Spenders ein (Gale et al. 1985; Gluckman et al. 1989; Richman et al. 1976).

Bei der allogenen HSZT steht am Anfang die Auswahl geeigneter Spender. Als primäre Spender werden zunächst HLA-kompatible Geschwister angesprochen. Falls dies nicht möglich ist, findet sich in circa der Hälfte der Fälle ein HLA-kompatibler, nicht verwandter

Spender. Transplantate von HLA-angepassten Fremdspendern gelten heute denen von HLA-identischen Geschwisterspendern als gleichwertig. Aktuelle Daten zeigen sogar, dass für ältere Patienten (> 50 Jahren), jüngere Fremdspender (< 30 Jahren) bessere Ergebnisse liefern als gleichaltrige Geschwisterspender (Kröger et al. 2013). Eine Blutgruppeninkompatibilität sollte vermieden werden, ist jedoch kein Ausschlusskriterium. Allerdings müssten in solch einem Fall die Erythrozyten beziehungsweise das Plasma aus dem Spenderpräparat entfernt werden um eine Unverträglichkeitsreaktion zu vermeiden. Bei haploidentischen HSZT sind Empfänger und Spender nur in einem Haplotyp identisch. Diese Konstellation ist nur in Ausnahmefällen akzeptabel. Durch die Entfernung der T-Zellen aus dem Transplantat und durch die Transfusion einer hohen Zahl an Stammzellen kann jedoch die fehlende Kompatibilität mäßig kompensiert werden (Gale et al. 1985; Gluckman et al. 1989; Richman et al. 1976).

Die im AML-Kapitel erwähnte Konditionierungstherapie dient der Suppression des körpereigenen Immunsystems, der weitgehenden Eradikation der Tumorzellen als auch der hämatologischen Knochenmarkzellen. Die Transplantation der hämatologischen Stammzellen sollte innerhalb von 48 bis 72 Stunden nach der Gewinnung erfolgen. Die Transfusion wird in der Regel gut vertragen und verläuft fast immer ohne Nebenwirkungen. (Gale et al. 1985; Gluckman et al. 1989; Richman et al. 1976). In der folgenden zwei- bis vierwöchigen hämatopoetischen Regenerationsphase ist zur Abwehr von Infekten eine intensive supportive Prophylaxe angezeigt. Diese umfasst die Isolation in einem Schleusenzimmer, sowie die später besprochene medikamentöse Prophylaxe gegen virale, bakterielle und fungale Erreger (Paulin et al. 1987).

Bei der allogenen Stammzelltransplantation führt die Übertragung von Knochenmark eines gesunden, immungenetisch fremden Spenders, zu einem hämatologischen Chimärismus, was impliziert, dass sich die Stammzellen eines Spenders in den Markräumen des Empfängers ansiedeln und Blut der Blutgruppe des Spenders produzieren. Mit der Übertragung von Spender-Lymphozyten wird zusätzlich die zelluläre Immunität des Spenders auf den Empfänger übertragen. Donor-Lymphozyten Transfusionen stellen mittlerweile eine effektive Behandlungsmöglichkeit bei Patienten mit einem Frührezidiv nach HSZT dar (Buchholz & Ganser 2009; Gale et al. 1985; Gluckman et al. 1989; Richman et al. 1976). Die Spenderimmunität wird hier für die Eradikation residueller Tumorzellen nutzbar gemacht. Dieser sog. Graft-versus-Tumor/Leukämie-Effekt (GvT/GvL)-Effekt (Gale & Horowitz 1990) genannter Faktor beeinflusst die allogene HSZT signifikant. Es handelt sich hierbei um eine zellvermittelte Immunreaktion durch CD4⁺-, CD8⁺- und NK-Zellen. Ein unerwünschter Effekt der übertragenen Spenderimmunität besteht jedoch insbesondere in autoimmunen Reaktionen gegen den Empfängerorganismus (Graft-versus-Host-Erkrankung). Die hieraus resultierenden, teilweise schwersten Autoimmunerkrankungen

lassen sich als eine der wichtigsten Posttransplantations- Todesursachen ansehen. Daher besteht das Ziel der allogenen HSZT darin, einen dauerhaften hämatologischen Chimärismus ohne Anzeichen einer GvHD herbeizuführen (Gale et al. 1985; Gluckman et al. 1989; Richman et al. 1976).

Die allogene HSZT nimmt einen bedeutenden und festen Platz in der Therapie von akuten Leukämien und dem Hochrisiko-MDS ein (Gale et al. 1985; Gluckman et al. 1989; Richman et al. 1976). Die AML ist heutzutage sogar die häufigste Indikation für eine allogene HSZT (Baldomero et al. 2011).

1.4 Komplikationen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Die vollständige hämatologische Regeneration des Patienten nach allogener HSZT kann ein bis zwei Jahre in Anspruch nehmen. Als Komplikationen der allogenen HSZT treten die akute/aktive und die chronische/schleichende GvHD auf. Zusätzlich können infektiöse Komplikationen durch Bakterien, Viren und Pilze sowie ein Transplantationsversagen oder Zweitmalignome lebenslimitierend sein (Atkinson 1990).

Nach einer allogenen HSZT ist ein gewisser Zeithorizont notwendig, bis das neue Knochenmark so funktionstüchtig ist, dass es alle Blutzellen in angemessener Zahl produzieren kann. Kritisch ist hier insbesondere die Produktion von Leukozyten. In der Zeit der noch ineffektiven Hämatopoese steigt das Infektionsrisiko daher an. Eine Eisenüberladung kann diese Infektionsgefahr weiter erhöhen. Generell ist ein erhöhtes Serum-Ferritin assoziiert mit einer verkürzten krankheitsfreien Zeit sowie einer erhöhten Mortalität (Kataoka et al. 2009; Armand et al. 2007).

1.4.1 Die Graft-versus-Host-Krankheit

Das Risiko einer GvHD bei der allogenen HSZT ist insbesondere auf die immunologische Inkompatibilität von Spender und Empfänger zurückzuführen, die trotz Abgleich der humanen Leukozytenantigene (HLA-Matching) auftreten kann. Dabei setzen sich die T-Lymphozyten des Spenders mit den Organgeweben des Empfängers immunologisch auseinander. Außerdem gibt es weitere Spender-Empfänger-Faktoren, die das Auftreten einer GvHD begünstigen. So steigt das Risiko eine GvHD zu erleiden mit zunehmendem Alter an. Die Kombination von männlichem Empfänger und weiblichem Spender erhöht ebenso das GvHD Risiko. Auch ergibt sich bei Transfusion peripher gewonnener Stammzellen ein höheres Risiko einer chronischen GvHD. Schließlich hat das Keimmilieu des Empfängers Einfluss auf das Auftreten einer GvHD. Besonders keimbesiedelten Stellen, wie der Nasopharynxbereich, der Haut oder des Gastrointestinaltraktes, wird besondere Aufmerksamkeit zu teil. Es wird daher seitens des Gastrointestinaltrakts eine prophylaktische

Darmdekontamination z.B. mit Metronidazol diskutiert (Beelen et al. 1999). Ohne prophylaktische Maßnahmen gegen die GvHD würde sich bei fast allen allogenen HSZT eine lebensbedrohliche GvHD entwickeln.

Grundsätzlich lässt sich die akute (aktive) von der chronischen (schleichenden) GvHD unterscheiden. Nach der von Glucksberg 1974 festgelegten Einteilung unterscheidet man die akute Form, welche in der Regel innerhalb der ersten einhundert Tage nach der Transplantation auftritt und eine chronische Form, welche sich meist schleichend aus der akuten Krankheit entwickelt (Holler et al. 1995; Cutler et al. 2001). In den vergangenen Jahren wurde jedoch die Einteilung der GvHD revidiert und mittlerweile nach den Kriterien der National Institutes of Health (NIH) nach ihrer Verlaufsform beurteilt. Demnach gilt das Kriterium der hundert Tage nun als Unterscheidungsmerkmal zwischen den akuten GvHDs. Für die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer GvHD werden weitere Kriterien hinzugezogen, die in die Kategorien "diagnostische Symptome" (ausreichend um die Diagnose einer chron. GvHD zu sichern), "typische Symptome" (treten bei der chron., nicht bei der akuten GvHD auf, beweisen aber allein nicht das Vorliegen einer chron. GvHD), "gemeinsame Symptome" (tritt sowohl bei akuter und chron. GvHD auf) eingeteilt und für die einzelnen Organe festgelegt sind. Das sogenannte "overlap syndrome" stellt hierbei ein Mischbild dar. Nach diagnostizierter chron. GvHD existiert ein weiterer Score zur Einteilung des Schweregrades für jedes Organ von 0 bis 3. Die Risikoklassifizierung findet dreistufig in niedrig, mittel und hoch statt und wird nach der Anzahl der betroffenen Organe, der Schwere der Organmanifestation, dem Karnofski-Index und den Risikoparametern: Thrombozytopenie und/oder progressivem Beginn eingeteilt (Pavletic et al. 2006).

	Zeit bis zur Manifestation nach HSZT oder DLI	Zeichen der akuten GvHD	Zeichen der chron. GvHD
Akute GvHD			
Klassisch	≤ 100 Tage	Ja	Nein
Persistierend, Rezidivierend oder Spät auftretend	> 100 Tage	Ja	Nein
Chronische GvHD			
Klassisch	Kein Zeitlimit	Nein	Ja
Overlap Syndrom	Kein Zeitlimit	Ja	Ja

Tab. 1.10. Kategorien der akuten und chronischen GvHD nach NIH-Konsens; DLI = Donor Leukozyten Infusion (Pavletic et al. 2006)

Risikogruppe	Niedrig	Mittel	Hoch
Zahl der betroffenen Organsysteme	1 - 2	≥ 3	≥ 3
Schwere der Organmanifestation	1 (außer Lunge)	≥ 2 (oder Lunge 1)	≥ 2 (oder Lunge 2 - 3)
Risikoparameter Thrombozytopenie und/oder progressiver Beginn	keiner	einer	beide
Karnofski-Index	≥ 80%	< 80%	< 80%

Tab. 1.11: Risikoklassifizierung der chronischen GvHD nach NIH-Konsens (Pavletic et al. 2006)

Als betroffene Organe der akuten GvHD lassen sich insbesondere die Haut, der Gastrointestinaltrakt und die Leber identifizieren. Je nach Schwere der akuten GvHD reichen die Symptome von einem makulo-papulösen Exanthem, insbesondere an den lichtexponierten Stellen, leichter Diarrhö oder Cholestase bis hin zu einer generalisierten Hautrötung mit Blasenbildung, ähnlich dem Bild eines Lyell-Syndroms, schwersten, blutigen Diarrhöen mit starken Abdominalschmerzen oder einem massiven Ikterus (Buchholz & Ganser 2009; Holler et al. 1995).

Die chronische GvHD stellt eine der häufigsten Langzeitkomplikationen nach allogener HSZT dar. Sie betrifft Leber, Lunge, Haut und Schleimhäute. An der Haut manifestiert sie sich in einer fibrosierenden oder sklerodermiformen Art, teilweise auch mit Hyper- oder Hypopigmentierungen. An den Augen- und Mundschleimhäuten dominieren Sicca-Symptome (Flowers et al. 2003).

Die Therapie der GvHD umfasst in erster Linie hohe Dosen an Kortikosteroiden. Zusätzlich können auch Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Mycophenolat-Mofetil oder Methotrexat, spezifische Antagonisten des Interleukin-2-Rezeptors, TNF-Antikörper oder aber auch neuere Therapieverfahren wie zum Beispiel extrakorporale Photopherese zum Einsatz kommen (Deeg 2007; Flowers et al. 2008; Greinix et al. 1998). Durch diese therapeutische Optionen, kann das Risiko, an einer GvHD zu erkranken oder zu versterben, deutlich vermindert werden (Pavletic et al. 2006).

1.4.2 Eisenüberladung, Therapie und Bedeutung für die posttransplantäre Mortalität

Die Relation zwischen Eisenüberladung und posttransplantärer Mortalität oder Infektion, besonders in Bezug auf die GvHD, ist noch nicht vollständig verstanden. Einerseits wird durch die hohe Transfusionsrate an Erythrozyten die Bindungskapazität von Transferrin überschritten, wodurch toxisches nicht-Transferrin-gebundenes Eisen (NTGE) in größeren Mengen anfällt. Der Anteil an NTGE mit der niedrigsten Plasmamolekülbindung heißt labiles Plasma Eisen (LPE), welches sich in Zielorganen wie Herz, Leber und endokrinen Organen ablagern kann (Cabantchik et al. 2005). Intrazellulär begünstigt es die Produktion von Sauerstoffradikalen. Hydroxylradikale führen intrazellulär zu Dysfunktion und apoptotischem

Zelltod (Cabantchik et al. 2005), Cohen et al. 2001). Der Zelltod von Hepato- und Enterozyten potenziert diesen Schädigungsprozess, da von diesen Zellen exprimierte essentielle eisenregulierende Gene sowie das Hepcidin Antimicrobial Peptide (HAMP), welches für die Encodierung von Hepcidin und Ferroportin-1 zuständig ist, vermindert zur Verfügung stehen (Zaucha 2000). Denn hierbei werden Zytokine, unter anderem IL-6, freigesetzt, welche Einfluss auf die Freisetzung von Hepcidin und damit auf die Eisenhämostase nehmen (Andrews 2008; Deeg 2009; Pullarkat 2010).

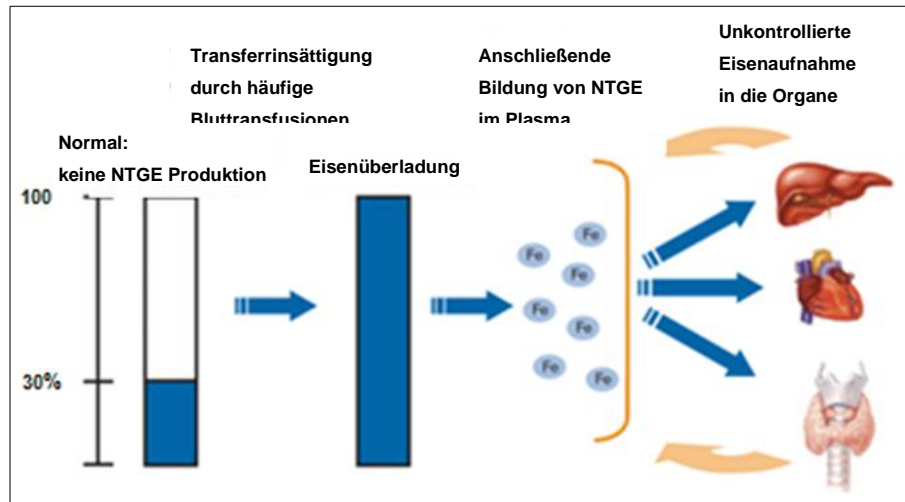


Abb. 1.2: Eisenüberladung führt zur Bildung von nicht-transferrin-gebundenem Eisen

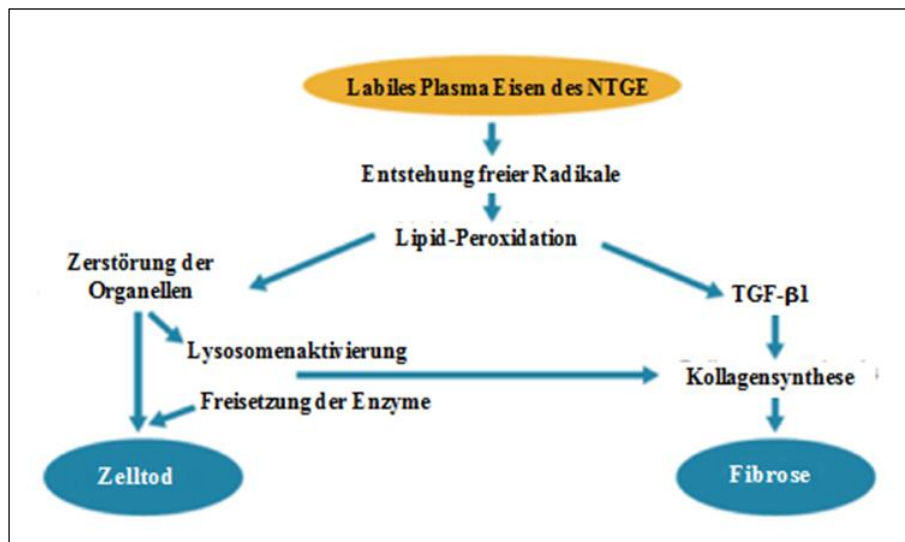


Abb. 1.3: Pathophysiologie der Eisenüberladung; NTGE = Nicht-transferrin-gebundenes Eisen; TGF-β1 = Transforming growth factor β1 (Grafiken adaptiert aus (Steinberg et al. 2009))

Präventiv sollte daher der Ferritin-Serumspiegel gemessen werden. Verschiedene Experten empfehlen die Bestimmung des Eisengehaltes mittels einer Leberbiopsie zur Feststellung des Ausmaßes der Eisenüberladung. Optional kann dieser auch durch eine

Magnetresonanztomographie gemessen werden. Im Falle einer Eisenüberladung ist die Zufuhr eisenhaltiger Medikamente kontraindiziert. Als Therapie sollte eine Eisenentleerungstherapie (Eisenchelation) mit Desferoxamin und/oder Deferipron oder dem seit 2006 zugelassenen Deferasirox (Exjade) angewendet werden. Der Vorteil von Deferasirox und Deferipron ist ihre orale Applizierbarkeit im Gegensatz zu dem parenteral, über mehrere Stunden zu verabreichenden Desferoxamin. Die Zulassung für Deferasirox in der EU bezieht sich auf die Beta-Thalassämie major ab sechs Jahren und bei Kontraindikationen für Desferoxamin auf MDS oder Sichelzellanämie (Stumpf 2007; Flaten et al. 2012).

1.4.3 Infektionen

Trotz verschiedener Vorsichtsmaßnahmen treten Infektionen nach allogener HSZT sehr häufig auf. Innerhalb der ersten dreißig Tage nach allogener HSZT - meist noch in der Phase der Neutropenie - treten insbesondere mykotische und bakterielle Infektionen auf. Viele dieser Bakterien und Pilze haben ihren Ursprung im eigenen Organismus. Der Nutzen einer prophylaktischen Darmdekontamination wird gegenwärtig jedoch noch kontrovers diskutiert, da die endogene Darmflora auch protektiven Charakter hat. Falls dennoch eine Infektionssymptomatik besteht, wird nach der Gewinnung von Proben unverzüglich mit einer breiten antibakteriellen Therapie begonnen (Ehninger 2008).

Bei Nichtansprechen der Therapie werden zusätzlich Antimykotika verabreicht. Die häufigsten Mykosen stellen Aspergillosen dar. Virale Infektionen treten meist zu einem späteren Zeitpunkt auf, insbesondere seit Einführung standardisierter prophylaktischer und protektiver Therapien (Boeckh et al. 2003; Ljungman 1998; Zaia 2002). Besonders gefürchtet sind virale Pneumonien durch CMV, welche nicht selten zum Tod des Patienten führen, sowie Varicella-Zoster-Infektionen nach dem Absetzen von Aciclovir (Tefferi 2009).

1.4.4 Weitere Komplikationen

Ein Transplantationsversagen lässt sich in der Regel in weniger als einem Prozent aller Transplantationen konstatieren und bezeichnet eine Abstoßung des Spender-Knochenmarks im Sinne einer Host-versus-Graft Reaktion. In diesem Fall zeigt das Blutbild eine persistierende und progrediente Panzytopenie. Auch eine Virusinfektion oder medikamentöse Schädigung des Knochenmarks kann zu einem Verlust des Spender-Knochenmarks führen. Auf eine ausreichende Zellzahl des Spenderknochenmarks muss daher geachtet werden. Im Rahmen der Konditionierungstherapie können frühtoxische Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Mukositis, hämorrhagische Zystitis, Kardiomyopathien oder bei allogenen HSZT eine hepatische Venenverschlusskrankheit (Sinusoidal obstructive syndrome = SOS mit Hepatomegalie, Hyperbilirubinämie und Gewichtszunahme) (Maradei et al. 2009; Kansu 2012; Carreras et al. 1998) auftreten.

Als spätere Komplikationen treten ab dem zweiten Jahr vereinzelt Zweitmalignome auf. Die Inzidenz von Zweitleukämien und MDS steigt nach zehn bis fünfzehn Jahren.

Als häufigste Todesursache nach allogener HSZT gelten Infektionen, Rezidive, eine akute oder chronische GvHD sowie Zweitmalignome (Gluckman et al. 1989).

1.5 Metabolismus und Pathophysiologie von Eisen und Ferritin

Eisen (Fe) stellt das häufigste Übergangsmetall in lebenden Organismen dar und nimmt an Redoxreaktionen durch Elektronenübergänge zwischen seiner oxidierten Fe^{3+} und reduzierten Form Fe^{2+} teil. Für die Aufnahme und den Stoffwechsel des Eisens haben sich komplexe Redox- und Transportsysteme entwickelt, durch welche Eisen immer in gebundener Form vorliegt (Petrides 2007).

Das bei einem Eisenüberschuss entstehende freie Eisen wirkt durch seine Fähigkeiten, Redoxreaktionen einzuleiten, toxisch. Speziell reagiert zweiwertiges Eisen mit H_2O unter der Bildung von Fe^{3+} und hochreaktiven, toxischen Hydroxylradikalen. Diese können Membranlipide, Proteine und Nukleinsäuren schädigen. In Proteinen wirkt Eisen als Sauerstoff- und Elektronentransporteur, wobei das Hämoglobin fast zwei Drittel des Körpereisenbestands enthält (Ganz & Nemeth 2006a).

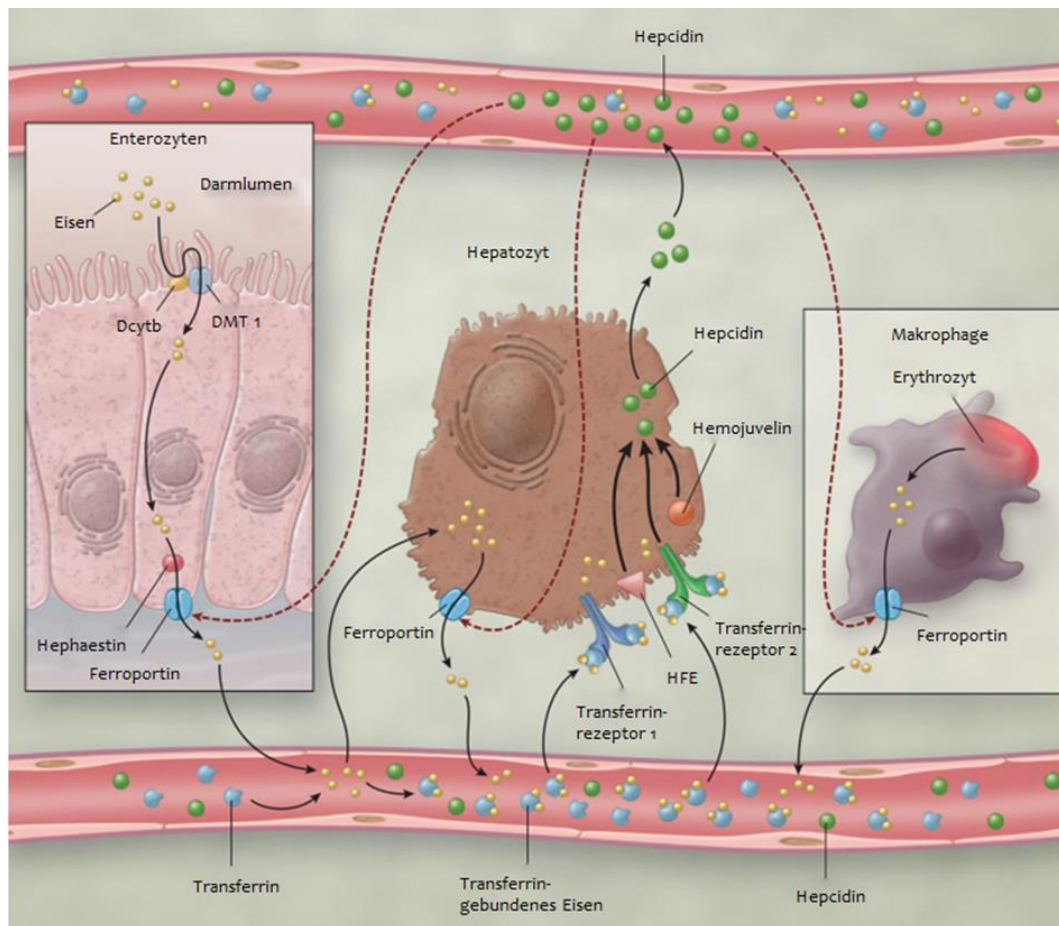


Abb. 1.4: Wechselwirkungen von Schlüsselproteinen der Eisenhämostase (Fleming 2005a)

Die Eisenabsorption findet vor allem im Duodenum statt und ist an den Bedarf angepasst. Über die Nahrung aufgenommenes Eisen wird zu 3 - 15 % absorbiert, bei Eisenmangel kann dieser Wert auf über 25 % gesteigert werden. Mit der Nahrung aufgenommenes zweiwertiges Eisen kann nach Spaltung des Proteins relativ effizient als Häm- Fe^{2+} absorbiert werden. In der Mukosazelle wird das Eisen durch eine Hämoxygenase vom Häm abgespalten und dann zu dreiwertigem Eisen oxidiert, das entweder in das Blut gelangt oder als Ferritin in der Mukosa verbleibt und bei der Zellmauserung in das Lumen zurückkehrt. Nicht-Häm-gebundenes Eisen kann nur als Fe^{2+} absorbiert werden. Nicht-Häm-gebundenes dreiwertiges Eisen muss daher zunächst von einer Ferrireduktase (Dcytb für duodenales Cytochrom B) (+Ascorbat) auf der luminalen Mukosazelloberfläche zu zweiwertigem Eisen reduziert werden. Das zweiwertige Eisen wird dann von einem elektrogenen Fe^{2+} - H^+ -Symportcarrier (DMT1 für divalenter Metalltransporter) sekundär aktiv absorbiert. Bei Eisenmangel bindet die zytosolische Aconitase (Eisen regulierendes Protein) an Ferritin-mRNA und hemmt so die mukosale Ferritin-Translation. Dadurch kann absorbiertes zweiwertiges Eisen vermehrt in das Blut gelangen. Dort wird es von Hephaestin, einem Coeruloplasmin homologen Enzym, zu dreiwertigem Eisen oxidiert, per Ferroportin aus der Zelle transportiert um dann an Apotransferrin (Transferrin mit zwei Fe^{3+} Molekülen), welches

für den Eisentransport im Plasma zuständig ist, gebunden (Silbernagl 2012; Ganz & Nemeth 2006a). Die Proteinbildung ist notwendig, weil dreiwertiges Eisen in wässrigem Medium nur eine sehr begrenzte Löslichkeit besitzt und bei physiologischem pH-Wert zur Polymerisation neigt. Jedes Transferrinmolekül bindet zwei Fe^{3+} -Moleküle. Die Transferrinkonzentration im Plasma beträgt 220 bis 370 mg / 100 ml und die Gesamtmenge 7 bis 15 g, welche zu gleichen Teilen im Plasma und Interstitialraum verteilt ist. Aus der Summe aus freiem Eisen und Transferrin errechnet sich die Eisen-Transferrin-Sättigung. Die Gesamteisenmenge im Blutplasma beträgt drei bis vier Milligramm. Bei einem Normalbereich des Transferrins von 220 bis 370 mg / 100 ml beträgt die normale Eisen-Transferrin-Sättigung des Erwachsenen etwa zwanzig bis vierzig Prozent. Eine Erhöhung des Serum-Transferrin-Wertes zeigt eine Überladung beziehungsweise eine Verminderung einen Mangel an. Etwa achtzig Prozent des an Transferrin gebundenen Eisens wird durch die Erythrozytenvorstufen im Knochenmark für die Hämoglobinsynthese verbraucht. Als Reservoir für das zirkulierende Eisen dienen die Hepatozyten, die Darmmukosa, die Erythrozyten und das Knochenmark, die Speicherung erfolgt in Form von Ferritin. Die serologische Ferritinquantifizierung eignet sich daher als guter Marker, um die Eisenspeicher des Körpers abzuschätzen. In der akuten Phase bei systemischen Infektionen oder auch bei neoplastischen Erkrankungen und chronischen Leber- und Nierenerkrankungen steigt der Ferritinspiegel jedoch ebenfalls an, sodass der Ferritinwert nur bei normalem CRP-Wert eine Aussage über den Eisengehalt eines Patienten zulässt. Ist der Ferritinspeicher voll, wird das Eisen als Hämosiderin in erster Linie in den so genannten retikuloendothelialen Zellen beziehungsweise bei starker Überladung auch interstitiell abgelagert (CAZZOLA 2005; Fleming 2005a; Ganz & Nemeth 2006a; Petrides 2007).

Die Eisenhomöostase ist abhängig von regulierenden Feedback-mechanismen, die notwendig sind, um ein Gleichgewicht zwischen benötigtem und aufgenommenem Eisen zu erhalten. Zu diesen Mechanismen gehören unter anderem die Eisenspeicher des Körpers, die erythropoetische Aktivität im Knochenmark, die Hämoglobinkonzentration im Blut, der Sauerstoffgehalt im Blut und die Präsenz oder Absenz von inflammatorischen Zytokinen (Fleming 2005b).

Ein weiterer wichtiger Regulator des Eisenstoffwechsels ist das Heparin. Es bindet in Dünndarmmukosazellen und Makrophagen an Ferroportin; ein Protein, welches zum Export des Eisens aus der Zelle benötigt wird und diese blockiert, so dass das Eisen nicht in den Körperkreislauf gelangen und an Ferritin binden kann. Durch Heparin wird die Eisenaufnahme über den Darm, über die Plazenta und die Freisetzung von Eisen aus dem retikuloendothelialen System (RES) gebremst. Die Dünndarmmukosazellen können so erst am Ende ihrer individuellen Lebensdauer, bevor sie in den Darm abgestoßen werden, ihr aufgenommenes Eisen über das Ferroportin wieder exportieren (Vaulont et al. 2005).

Die Hpcidinexpression kann geschädigt und z.B. bei Patienten, die an einer hereditären Hämochromatose leiden, unangemessen niedrig sein (Fleming 2005a).

Die hereditäre Hämochromatose ist die häufigste genetisch bedingte Erkrankung des Eisenstoffwechsels. Sie wird autosomal rezessiv vererbt mit unvollständiger Penetranz und zeigt eine klinische Ausprägung in aller Regel nur bei Homozygotie. In der unmittelbaren Nachbarschaft des menschlichen MHC-Lokus liegt das HFE-Gen, welches in achtzig Prozent der Fälle der hereditären Hämochromatose Typ 1 eine Variante aufweist, wodurch in der Position 282 Cystein durch Tyrosin ersetzt wird (HFE-C282Y). Die Allelfrequenz für diese Punktmutation liegt in der Normalbevölkerung bei etwa zehn Prozent. Die genaue Funktion des HFE-Gens ist noch nicht geklärt. Die genannte Keimbahnmutation ist mit einer zwei- bis vierfach erhöhten Eisenresorption im Dünndarm assoziiert (CAZZOLA 2005; Fleming 2005a; Ganz & Nemeth 2006a; Petrides 2007; Guyatt et al. 1990).

Die anderen, weniger häufigen Typen weisen Mutationen in Genen auf, die für Hämajuvenil, Transferrinrezeptor 2 oder Ferroportin enkodieren und somit die Eisenbalance zu Lasten der Aufnahme beeinflussen (Fleming 2005a).

Unbehandelt führt die Mutation im HFE-Gen zu einer dauerhaft vermehrten Eisenresorption mit konsekutiver schwerer chronischer Toxizität und Organdysfunktion, welche insbesondere in der Leber zu verzeichnen ist. Hier drohen eine Leberzirrhose respektive die Entwicklung von Lebertumoren. Eine Störung der endokrinen Pankreasfunktion resultiert häufig in einem Diabetes mellitus. Zusammen mit der charakteristischen Eisenablagerung in der Haut wurde hier der Begriff des "Bronze-Diabetes" geprägt (Fleming 2005a; Petrides 2007). Je höher der Ferritinspiegel ansteigt, umso eher muss mit Organschäden gerechnet werden.

Es muss berücksichtigt werden, dass bei einem großen Teil der Hämochromatose-Patienten, welche heterozygot für den Polymorphismus (SNP) C282Y sind, eine kombinierte Heterozygotie mit einer weiteren Variante im HFE-Gen relativ häufig vorkommt, wobei es sich in den meisten Fällen um den Austausch H63D oder seltener um S65C handelt. Kombinierte Heterozygotien sind in der Regel mit einer milden Form der Hämochromatose assoziiert. Individuen mit H63D oder S65C in homozygoter oder kombiniert heterozygoter Form zeigen zwar durchschnittlich leicht erhöhte Serum-Ferritin-Konzentrationen, weisen jedoch nach bisherigem Kenntnisstand nur ein geringfügig erhöhtes Risiko auf, an einer Hämochromatose zu erkranken (Swinkels et al. 2006). Insgesamt ist also bei der genetischen Untersuchung auch mit komplexeren Veränderungen zu rechnen, so dass im Idealfall das gesamte Gen sequenziert werden sollte (Adams 2006).

Die Therapie der Hämochromatose besteht in der Regel aus eisenarmer Diät und regelmäßigen Aderlässen, wobei das Intervall zwischen zwei Aderlässen individuell sehr unterschiedlich sein kann und empirisch für jeden Patienten ermittelt werden muss. Als

Verlaufparameter dienen die Ferritin- und Hämoglobinwerte (CAZZOLA 2005; Fleming 2005a; Ganz & Nemeth 2006a; Petrides 2007; Guyatt et al. 1990).

1.6 Zielsetzung

Die allogene HSZT nach myeloablativer oder myeloreduktiver Therapie ist als potenziell kurative Therapieoption einer AML oder eines Hochrisiko-MDS anzusehen. Die wichtigsten therapieassoziierten Todesursachen umfassen das Rezidiv, infektiöse Komplikationen und die GvHD. Bis zum heutigen Tage ist es schwierig, die individuelle Prognose eines Patienten und den möglichen Verlauf bzw. das Risiko einer allogenen HSZT genau abzuschätzen.

Eine Eisenüberladung kann als negativer Prognosefaktor eingeordnet werden, weshalb eine präzise Bestimmung des Körpereisens sehr wichtig ist. Dies gelingt mit der Ferritinbestimmung jedoch nur in jenen Fällen gut, in denen keine Entzündungskonstellationen bestehen, bei welcher Ferritin als Akute-Phase-Protein aus anderen Gründen erhöht ist. In diesen Situationen wird von einigen Autoren die Gewinnung einer Leberbiopsie empfohlen, wobei es sich immer um eine invasive diagnostische Maßnahme mit entsprechenden Risiken handelt.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb herausgearbeitet werden, inwieweit die Eisenbestimmung auch in der diagnostischen Knochenmarkbiopsie vor Transplantation, die standardmäßig gewonnen wird, helfen kann, die individuelle Eisenlast festzulegen. Hierzu wurde ein Grading von G0 - G5 für intrazelluläres und g0 - g3 für interstitielles Eisen neu generiert, um die Eisenablagerungen semiquantitativ darzustellen. Ferner wird das Verhältnis von eisenspeichernden Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68⁺-Makrophagen und von CD68⁺-Makrophagen in Bezug auf alle hämatopoetischen Zellen berechnet werden.

Die gewonnenen Daten wurden dann mit den Werten für Serum-Ferritin, dem HFE-Genotyp, der Menge an vorangegangenen Bluttransfusionen sowie mit dem weiteren Verlauf des Patienten, insbesondere bzgl. des Auftretens der Komplikationen akute und chronische GvHD, Infektion/Sepsis, Rezidiv und Mortalität, korreliert, um so die Wertigkeit der histomorphologischen Eisenbestimmung für die Prognose des Verlaufs der Erkrankung abzuschätzen.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Diese Arbeit umfasst ausschließlich Patienten, die im Rahmen einer Studie geführt wurden und ihre Erlaubnis für die Auswertung der erhobenen Befunde in anonymisierter Form erteilten.

Sämtliche Knochenmarkbiopsien wurden mit einem Median von 24 Tagen vor der allogenen HSZT aus diagnostischen Gründen (zur Festsetzung des Blastengehalts) gewonnen und nach entsprechender Prozessierung im Blockarchiv des Instituts für Pathologie gelagert. Die für die Studie erforderlichen Spezialuntersuchungen (Berliner Blau Reaktion, Immunhistochemie für CD68⁺-Zellen) wurden an diesem eingeblocktem Gewebe im Rahmen dieser Promotion zusätzlich angefertigt.

Des Weiteren durften die Knochenmarkbiopsien nicht länger als 3 Monate vor der HSZT entnommen worden sein, da die Anzahl der verabreichten Erythrozytenkonzentrate darüber hinaus nicht mit Sicherheit angegeben werden konnte.

Die Eisenspeicherung im Knochenmark wurde anhand der in 2.5 beschriebenen Graduierung für jeden Patienten festgelegt und mit dem HFE-Genotyp und der Anzahl der Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten vor Transplantation sowie mit den individuellen Werten des Serum-Ferritins (SF) korreliert. Die Angabe der Ferritinwerte erfolgte dabei nicht absolut, sondern gruppiert (0 - 400 etc.).

Das Patientenkollektiv wurde nach dem CRP-Gehalt in zwei Gruppen (CRP < 5 mg/l und CRP > 5 mg/l) eingeteilt. Die Einteilung erfolgte um einen direkten Vergleich zwischen Serum-Ferritin und der zu etablierenden Methode zu erreichen. Denn, wie bereits erwähnt, ist Serum-Ferritin nur bei einem CRP-Wert unter 5 mg/l aussagekräftig, da es aufgrund seiner Eigenschaft als Akut-Phase-Protein, bei Entzündungen generell erhöht sein kann (Mahindra et al. 2009; Platzbecker et al. 2008; Armand et al. 2007)

2.1.1 Patientenkollektiv CRP < 5 mg/l

Die Gruppe mit einem CRP-Wert < 5 mg/l bestand aus 90 Patienten (48 Männer und 42 Frauen im Durchschnittsalter von 57 Jahren). Die Patienten wurden je nach intrazellulärem Eisengehalt in eine von sechs Gruppen eingeteilt. Den Gruppen G0 - G5 wurden insgesamt 5, 3, 13, 26, 24 und 19 Patienten zugeordnet. Kumuliert ergab dies für die Gruppen G0 + G1, G2 + G3 und G4 + G5 jeweils 8, 39 und 43 Patienten. Die interstitielle Eisenablagerung in den Gruppen g0 - g3 ergab 41, 17, 15 und 17 sowie in den Gruppen g0 + g1 und g2 + g3 jeweils 58 und 32. Der Eisengehalt bei CD68⁺-Makrophagen lag bei 0 - 100 Prozent mit

einem Median von 72 Prozent und der gesamte Makrophagengehalt bei 4 - 45 Prozent mit einem Median bei 15 Prozent.

Aus dieser Patientengruppe gehörten 58 Patienten der so genannten „reduced-intensity conditioning“ hämatopoetischen Zelltransplantation (RIC-HSZT)-Gruppe und 32 Patienten der so genannten „myeloablativen conditioning“ hämatopoetischen Stammzelltransplantation (MAC-HSZT)-Gruppe an. Beide Gruppen unterschieden sich insbesondere bzgl. des Lebensalters. Während der Altersmedian in der RIC-HSZT-Gruppe 62 Jahre betrug, lag er in der MAC-HSZT-Gruppe bei 43 Jahren. Bei 68 Patienten war die Diagnose einer AML gestellt worden, bei 19 Patienten die Diagnose eines Hochrisiko MDS. Drei weitere Patienten litten an anderweitigen Erkrankungen. In der RIC-HSZT-Gruppe wurde bei 14 Patienten die Diagnose eines MDS gestellt.

Der mediane Wert des SF betrug 2009 ng/ml (Messbereich: 36 – 16900 ng/ml). 25% der Patienten wiesen ein SF von > 3000 ng/ml auf. Der Median der vor der Transplantation verabreichten Erythrozytenkonzentrate lag bei 26 (Messbereich: 0 - 115).

Parameter	Alle Patienten n = 90	RIC - HSZT n = 58	MAC - HSZT n = 32
Alter (Median, Bereich)	57 (18 - 74)	62 (21-74)	43 (18-64)
Geschlecht (m/w)	48 / 42	34 / 24	14 / 18
Erkrankung			
Akute Myeloische Leukämie	68	44 (76%)	24 (75%)
Myelodysplastische Syndrom	19	14	5
Andere	3	-	3
Spender			
Geschwister	17	8 (14%)	9 (28%)
Nicht verwandt	73	50 (86%)	23 (72%)
HLA identisch (Ja / Nein)	68 / 22	45 / 13	23 / 9
Geschlechtswechsel (Ja / Nein)	42 / 48	27 / 31	15 / 17
CMV			
Empfänger(Pos./Neg.)	72 / 17	49 / 8	23 / 9
Spender (Pos./Neg.)	35 / 54	24 / 33	11 / 21
Mismatch (Ja / Nein)	46 / 43	32 / 25	14 / 18
Gesamtzahl früherer Erythrozytenkonzentrate (Median, Bereich)	26 (0 – 115)	26 (0-115)	24 (0-95)
Ferritin vor der HSZT (Median, Bereich) (n = 74)	2009 (36-16900)	2166 (36-6900)	1745 (86-11500)
Ferritin vor HSZT (ng/ml)			
< 400	2	1	1
400 - 800	11	8	3
> 800 - 1600	16	9	7
> 1600	45	32	13
< / > median (Ferritin _{med} = 2009) - 3. quartile vs. 4. quartile (< / > 3111)	37 / 37 56 / 18	22 / 28 36 / 14	15 / 9 20 / 4
HFE vor HSZT			
wt	33	23	10
hetH63D	15	11	4
hetC282Y	7	6	1
hetS65C	2	-	2
homoH63D	3	3	-

Parameter	Alle Patienten n = 90	RIC - HSZT n = 58	MAC - HSZT n = 32
Intrazellulärer Eisengehalt G0 – G5			
G0	5	2	3
G1	3	2	1
G2	13	10	3
G3	26	16	10
G4	24	16	8
G5	19	12	7
G0 + G1	8	4	4
G2 + G3	39	26	13
G4 + G5	43	28	15
Interstitielle Eisenablagerung g0 - g3			
g0	41	23	18
g1	17	14	3
g2	15	11	4
g3	17	10	7
g0 + g1	58	37	21
g2 + g3	32	21	11
Eisenbeladene CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen	72 (0 - 100)	75 (0-100)	72 (0-100)
Makrophagengehalt gesamt (%)	15 (4 - 45)	15 (4 - 45)	15 (4 - 40)

Tab. 2.1: Klinische Parameter und Laborwerte des Patientenkollektivs CRP < 5mg/l

2.1.2 Patientenkollektiv CRP > 5 mg/l

In der folgenden Tabelle sind die Patienten mit einem CRP-Gehalt größer als 5 mg/l aufgelistet. Der durchschnittliche CRP-Gehalt betrug 18,6 mg/l bei einer Spanne von 5,7 mg/l - 56,9 mg/l. Die Patientenanzahl betrug 33 Personen (20 männlich und 13 weiblich), bei denen das Durchschnittsalter bei 56 Jahren lag. Der intrazelluläre Eisengehalt zeigte sich als heterogen verteilt, mit Betonung auf den drei höchsten Gradingstufen. Es zeigte sich eine Mortalität von 100 %.

Parameter	Alle Patienten n = 33
Alter (Median, Bereich)	56 (29 - 73)
Geschlecht (m/w)	20 / 13
CRP	18,6 (5,7 - 56,9)
Intrazelluläre Eisengehalt G0 - G5	
G0	2
G1	1
G2	6
G3	8
G4	8
G5	8
Interstitielle Eisenablagerung g0 - g3	
g0	17
g1	4
g2	3
g3	9
Eisenbeladene CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen	62 (0 - 100)
Makrophagengehalt gesamt (%)	20 (5 - 45)
Verstorben	33
Todesursache	
Rezidiv	10
Infektion	8
GvHD	6
Sonstige	9

Tab. 2.2: Klinische Parameter und Laborwerte des Patientenkollektivs mit CRP > 5 mg/l

2.1.3 Therapieregime vor HSZT

Die Vorbehandlung bestand aus 12 Gray TBI/Cyclophosphamide 120 mg/kg in 32 Fällen und einer reduzierten intensiven Behandlung mit Fludarabin 30 mg/m²/Tag über drei Tage und 2 Gray TBI in 58 Fälle. Ein veränderter HFE-Genotyp wurde in 27 Patienten vor der HSZT (heterozygot (het) für H63D, n = 15, het C282Y, n = 7, het S65C, n = 2, und homozygot für H63D, n = 3) gefunden.

Periphere Blutentnahmen wurden sieben Tage vor der allogenen HSZT durchgeführt.

Als Kriterien für den Erfolg der Transplantation wurden die Überlebenszeit, die rückfallfreie Mortalität und die akute und chronische GvHD nach einer allogenen HSZT bestimmt. Nach einem Median von 24 Monaten traten eine akute und/oder chronische GvHD (bei CRP < 5 mg/l) in jeweils 70 % und 53 % der Patienten auf. Es überlebten 58 % der untersuchten Personen; die rückfallfreie Mortalität betrug 22 %.

2.2 Beckenkammbiopsien

Für die Etablierung der Methode standen Routinepräparate des Zentrums für Pathologie der Universität zu Leipzig zur Verfügung. Die Biopsien wurden den Patienten aus diagnostischen Gründen entnommen. Sie wurden nach der Technik nach Jamshidi und Swaim aus der Crista iliaca posterior entnommen (Jamshidi & Swaim 1971). Die Präparate wurden nach Standard Formalin fixiert, dekalzifiziert und in Paraffin eingebettet.

2.3 Immunhistochemische Charakterisierung der Makrophagen

Zwei μm dicke Schnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms von den eingeblockten Knochenmarkbiopsien angefertigt. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte mit Xylol (2 x 5 Minuten), die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100 %, 90 %, 70 % Ethanol) bis hin zu Aqua dest. für jeweils 2 Minuten. Die nun folgende Proteindemaskierung erfolgte durch Hitzedenaturierung mit Hilfe einer Mikrowellenbehandlung (Methode nach Pileri et al).

Im ersten Schritt äquilibrierten die Schnitte in einer Küvette in Citratpuffer, pH 6, um dann fraktioniert in vier Zyklen für insgesamt 15 Minuten bei 700 Watt in der Mikrowelle zu inkubieren. Nach Abkühlung der Präparate folgte der eigentliche Färbevorgang nach der Standard-APAAP-Methode (siehe auch Abbildung).

Die Schnitte wurden in TBS (tris buffered saline) gespült. Dann wurden 60 μl des monoklonalen Maus-Antikörpers PGM1 (CD68, (DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland)) in einer Verdünnung von 1 : 50 in einem hintergrundreduzierenden Antikörperverdünnungsmedium (DAKO) auf jedes Präparat aufgetragen und bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erneut in TBS-Puffer gespült, bevor jetzt unter Verwendung des Brückenantigens Anti-Maus-IgG E413 in einer Verdünnung von 1 : 200 wiederum 60 μl pro Präparat aufgetragen wurden und die Schnitte so zur weiteren Inkubation für 35 Minuten bei 37°C in den Wärmeschrank gelegt wurden. Hiernach wurde wieder in TBS-Puffer gespült und dann 60 μl pro Präparat des Strept-AB-Komplexes (DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgetragen. Dieser setzt sich aus 98 μl TBS-Puffer, 1 μl Streptavidin und 1 μl biotinierter alkalischer Phosphatase zusammen. Wieder wurde für 35 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Es folgte eine erneute Spülung in TBS-Puffer, um eine Absättigung des Brückenantikörpers mit dem Primärantikörper zu verhindern und die Anfärbung unspezifischer Bindungen zu verringern. Nun wurde AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) für 10 Minuten auf jedes Präparat gegeben. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Präparate terminal in TBS gespült.

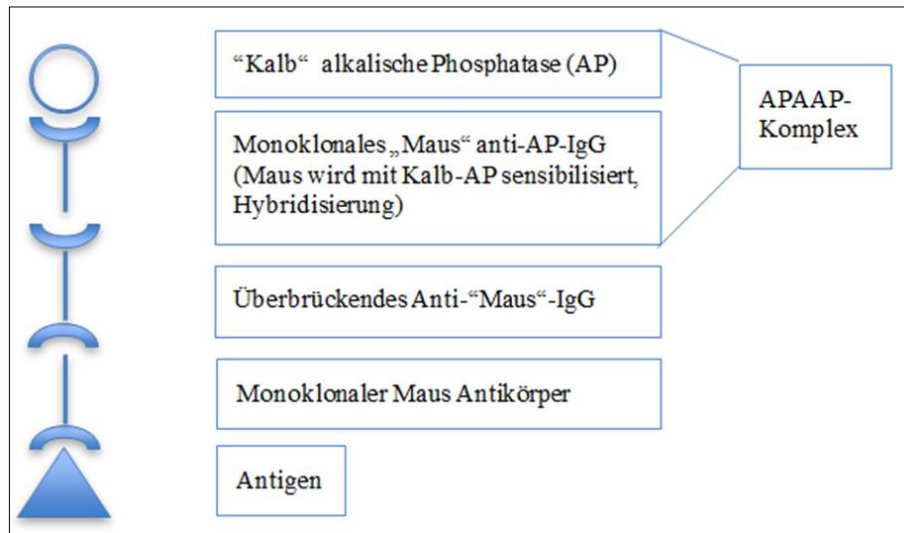


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der APAAP-Methode (Cordell et al. 1984)

2.4 Berliner Blau Färbung

Berliner Blau ist ein lichtechtes, tiefblaues, anorganisches Pigment und wird aus einer Lösung von Eisen(III)-Salz und gelbem Blutlaugensalz hergestellt. Die Reaktion zum Berliner Blau ist eine sehr empfindliche Methode für den Eisennachweis. In der analytischen Chemie ist das Verfahren zum Nachweis von Eisen (oder von Cyaniden) daher eine verbreitete Methode. Auf Grund der hohen Empfindlichkeit und wegen der hohen Farbstärke ist dieses auch für den Nachweis intra- und extrazellulär gebundenen Eisens geeignet.

Der entparaffinierte Gewebeschnitt wird in eine Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat (1 - 2 %) und Salzsäure (1 - 2 %) im Verhältnis 1 : 2 getaucht. Das Eisen im Schnitt wird durch die Salzsäure ionisiert. Es hat nun eine hohe Affinität zum Ferrocyanid und verdrängt das Kalium. Es bildet sich Ferriferocyanid, ein schwerlösliches Salz. Anschließend wird mit Aqua destillata gespült und mit Kernechtrot gegengefärbt.

Im Präparat stellen sich die Kerne rot, die Eisenablagerungen (z.B. Hämosiderin) blau dar.

2.5 Etablierung der Methode

Die Beurteilung des Eisengehaltes der Beckenkammbiopsien erfolgte durch mikroskopische, semiquantitative Bewertung. Zur Betrachtung wurde ein Axioplan 2 Mikroskop mit einer Axiocam HRC (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) eingesetzt. Die Einteilung erfolgte in modifizierter Form in Anlehnung an die Methode von Takkunen (Takkunen 1976) wie in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Einteilung in intrazellulär und interstitiell wurde deshalb gewählt, weil beide Ablagerungsformen unabhängig voneinander auftraten. Um die Eisenbestimmung im Knochenmark möglichst zu standardisieren, wurden zunächst die mit

Eisenfärbung eingefärbten Präparate mit einem Objektiv der 50fachen Vergrößerung mikroskopiert, um eine Übersicht zu gewinnen. Hierbei wurde die Qualität der Stanze grob beurteilt und der Fettzellgehalt abgeschätzt. Danach wurde bei 200facher Vergrößerung der absolute Eisengehalt semiquantitativ bestimmt. Es wurden nur die Knochenmarkstanzen einbezogen, bei denen mindestens sieben Sichtfelder ausgewertet werden konnten, um eine ausreichende Qualität der Stanze zu gewährleisten. Um den interstitiellen Anteil zu bestimmen wurden markante Punkte aus dem Berliner Blau gefärbten-Präparat gewählt und diese mit der gleichen Position in dem CD68⁺-Präparat verglichen. Die Bestimmung, ob sich das Eisen innerhalb der Makrophagen oder interstitiell befand, wurde ebenfalls in einer 200fachen Vergrößerung durchgeführt und per 400facher Vergrößerung kontrolliert. Im Anschluss wurde in 100facher Vergrößerung der absolute Gehalt an CD68⁺-Zellen im Präparat bestimmt und der Quotient zwischen Eisengehalt und CD68⁺-Zellen gebildet.

Grad		Beschreibung	Anteil in %
Intrazellulär	0	kein Eisen vorhanden	0
	1	Kaum	1 - 20
	2	Wenig	21 - 40
	3	Mäßig	41 - 60
	4	Viel	61 - 80
	5	Massiv	> 80
Interstitiell	0	kein Eisen vorhanden	0
	1	Gering	1 - 30
	2	Mäßig	31 - 60
	3	Viel	> 60

Tab. 2.3: Einteilung des Eisengehaltes bei Knochenmarksbiopsien

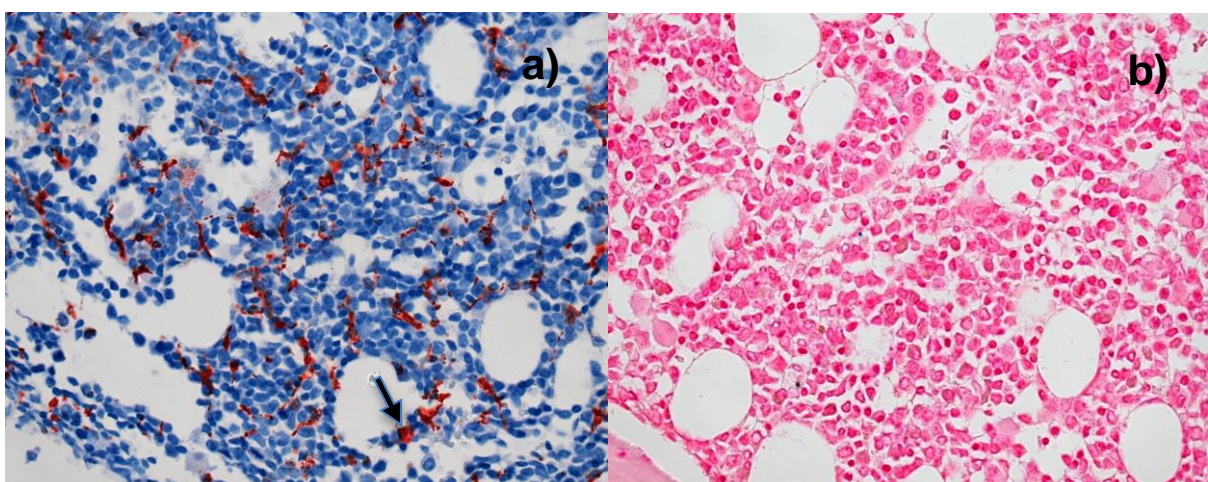


Abb. 2.2: Abb. 2.2 a) und b) zeigen ein G0 g0 Präparat in 400facher Vergrößerung in der Berliner Blau (rechts) und der CD68⁺-Färbung (links). Die rot gefärbten CD68⁺-Makrophagen sind mit einem Pfeil markiert. Kein Nachweis von Eisenpigment im Präparat.

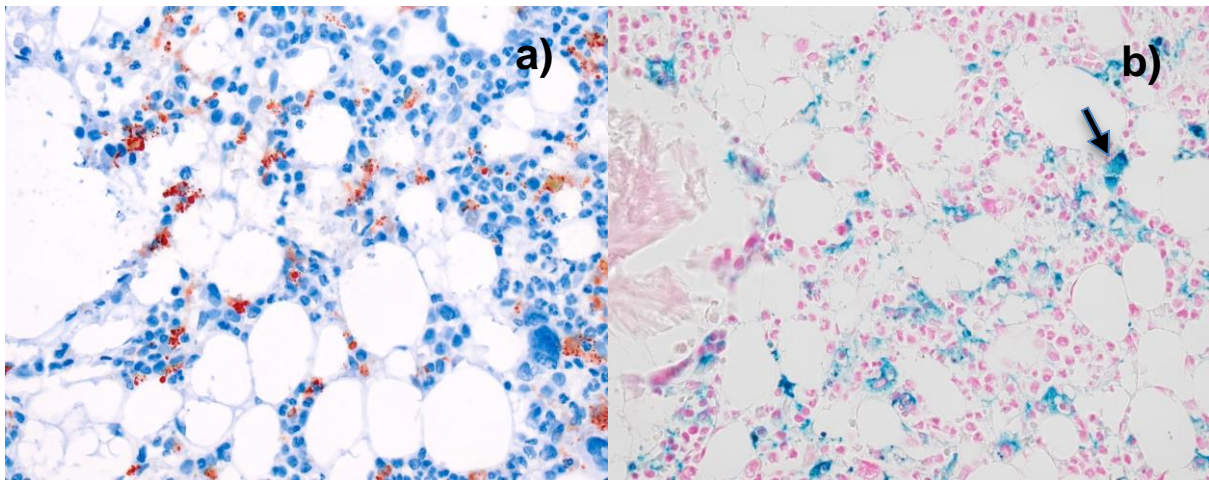


Abb. 2.3: Abb. 2.3 a) und b) zeigen ein G3 g2 Präparat in 400facher Vergrößerung in der Berliner Blau (rechts) und der CD68⁺-Färbung (links). Das blau gefärbte Eisenpigment ist mit einem Pfeil markiert.

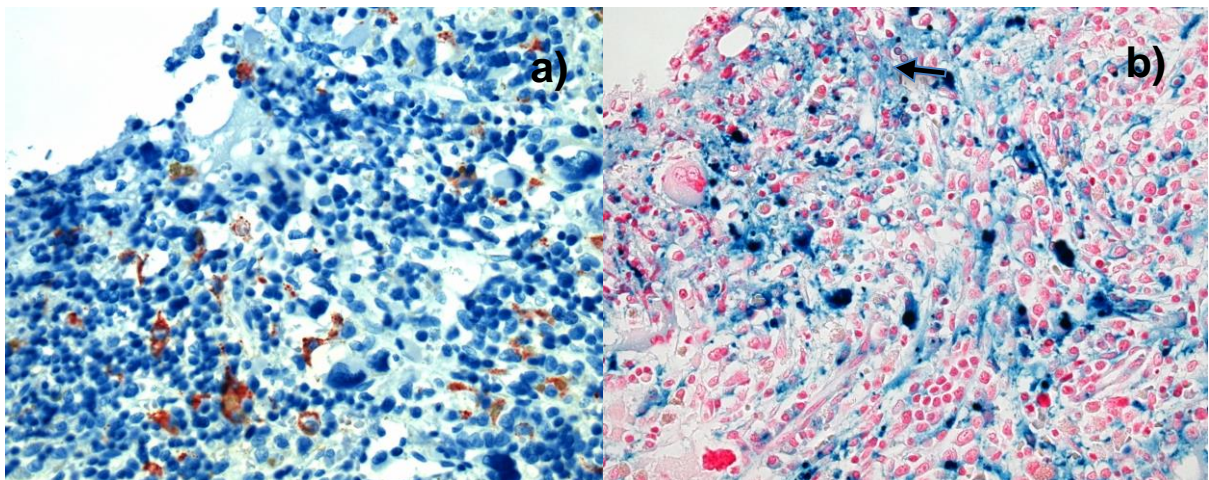


Abb. 2.4: Abb. 2.4 a) und b) zeigen ein G5 g3 gegradetes Präparat in 400facher Vergrößerung in der Berliner Blau (rechts) und der CD68⁺-Färbung (links). Der Pfeil weist auf das viele interstitiell abgelagerte Eisen.

2.6 Auswertung und statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Win 10.0 Software (SPSS, Chicago, IL, USA).

Da es in der vorliegenden Erhebung keine Kontrollgruppe gab, wurde überwiegend deskriptive Statistik mit der Bestimmung von Häufigkeiten, Mittelwerten, Standardabweichungen und Medianen berechnet.

Um Zusammenhänge zwischen den Variablen auf Nominal- und Ordinalskalenniveau zu überprüfen wurden Kreuztabellen erstellt. Mittels des Chi-Quadrat-Tests wurde geprüft, ob die Ergebnisse signifikant auf einem Signifikanzniveau von 5 % sind. Zur graphischen Darstellung von Verteilungen wurden neben Balkendiagrammen auch Streudiagramme verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbemerkungen

In der vorliegenden Untersuchung wurde herausgearbeitet, in wieweit die Eisenbestimmung in der diagnostischen Knochenmarkbiopsie vor Transplantation helfen kann, die individuelle Eisenlast festzulegen. Hierzu wurde, gemäß der in Abschnitt 2.5 beschriebenen Methode, ein neu generiertes Grading von G0 - G5 für intrazellulär gespeichertes Eisen und g0 - g3 für interstitiell abgelagertes Eisen verwendet, um die Eisenablagerungen semiquantitativ darzustellen. Ferner wurde das Verhältnis von eisenspeichernden Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68⁺-Makrophagen und von CD68⁺-Makrophagen in Bezug auf alle hämatopoetischen Zellen berechnet.

Die gewonnenen Daten wurden zunächst mit der Menge an vorangegangenen Bluttransfusionen und mit den Werten für Serum-Ferritin (SF) und anschließend mit dem HFE-Genotyp sowie mit dem weiteren Verlauf des Patienten insbesondere bzgl. des Auftretens einer akuten oder chronischen GvHD, infektiöser Komplikationen, dem Auftreten von Rezidiven und der rückfallfreien Mortalität korreliert.

3.2 Korrelation des histomorphologisch ermittelten Eisengehalts mit der Anzahl der verabreichten Erythrozytenkonzentrate vor HSZT

Um grundsätzlich die Wertigkeit der histologischen Abschätzung der Eisenüberladung im Knochenmark zu überprüfen wurden die Parameter Serum-Ferritin-Wert, intrazellulärer Eisengehalt, interstitielle Eisenablagerung, Anteil der eisenbeladenen CD68⁺-Makrophagen im Verhältnis zu den CD68⁺-Makrophagen (eisenbeladene CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen) sowie der CD68⁺-Makrophagengehalt bezogen auf alle hämatopoetischen Zellen mit der Anzahl der verabreichten Erythrozytenkonzentrate (EK) korreliert. Dabei wurden zunächst nur diejenigen Patienten betrachtet, deren CRP-Wert < 5 mg/l betrug.

3.2.1 Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate mit den serologisch ermittelten Serum-Ferritin-Werten vor HSZT

Die Korrelation zwischen der Anzahl der verabreichten EKs und der serologisch ermittelten SF-Werte vor der HSZT sind in der Abbildung 3.1 und der Tabelle 3.1 dargestellt.

Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,57. Die Signifikanz $p = < 0,001$ zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl verabreichter EKs und den SF-Werten.

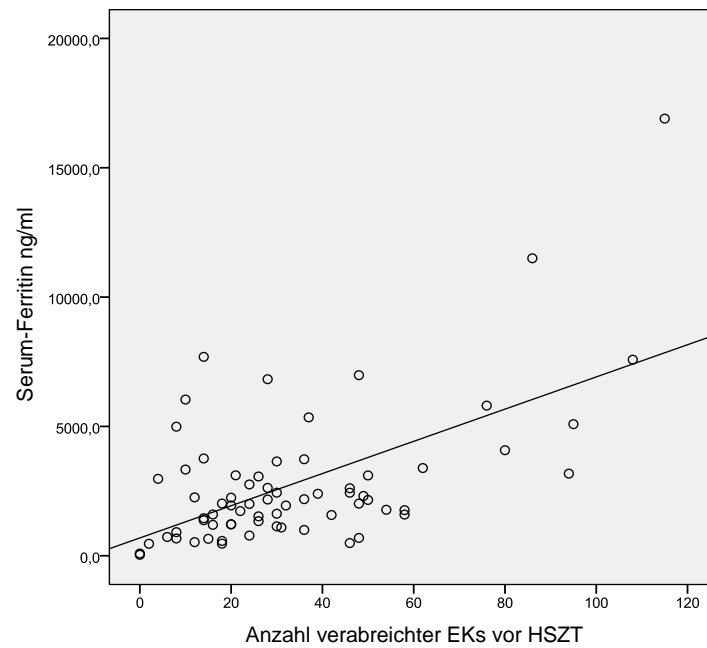


Abb. 3.1: Korrelation der SF-Werte mit der verabreichten Anzahl an EKs

		Serum-Ferritin-Werte	Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT
Serum-Ferritin-Werte	Korrelation nach Pearson	1	0,586
	Signifikanz (2-seitig)		< 0,001
	N	74	85
Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Korrelation nach Pearson	0,586	1
	Signifikanz (2-seitig)	< 0,001	
	N	69	85

Tab. 3.1: Korrelation der verabreichten EKs mit den serologisch ermittelten SF-Werten vor HSZT

3.2.2 Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate und dem histomorphologisch ermittelten Gehalt intrazellulär gespeicherten Eisens in Knochenmarksbiopsien vor HSZT

Die Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem intrazellulär gespeicherten Eisen im Knochenmark, gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor der HSZT, sind in der Abbildung 3.2 und den Tabellen 3.2, 3.3 und 3.4 dargestellt.

Der Korrelationskoeffizient r war mit 0,38 gering. Die Signifikanz $p = 0,005$ zeigte jedoch eine Korrelation zwischen hoher Anzahl verabreichter EKs und einer hohen, vermehrten intrazellulären Eisenspeicherung in den Knochenmarksbiopsien an (Tabelle 3.4).

	Eisengehalt Intrazellulär	Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Anzahl der EKs vor HSZT	G0 (0 %)	4	80,0	1	20,0	5	100,0
	G1 (1 - 20 %)	3	100,0	0	0,0	3	100,0
	G2 (21 - 40 %)	13	100,0	0	0,0	13	100,0
	G3 (41 - 60 %)	23	88,5	3	11,5	26	100,0
	G4 (61 - 80 %)	24	100,0	0	0,0	24	100,0
	G5 (> 80 %)	18	94,7	1	5,3	19	100,0

Tab. 3.2: Korrelation zwischen verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

Eisengehalt intrazellulär		Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT
G0 (0 %)	Median Minimum Maximum	18 0 36
G1 (1 - 20 %)	Median Minimum Maximum	8 0 8
G2 (21 - 40 %)	Median Minimum Maximum	26 2 94
G3 (41 - 60 %)	Median Minimum Maximum	24 2 86
G4 (61 - 80 %)	Median Minimum Maximum	29 2 108
G5 (> 80 %)	Median Minimum Maximum	29 12 115

Tab. 3.3: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien, gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

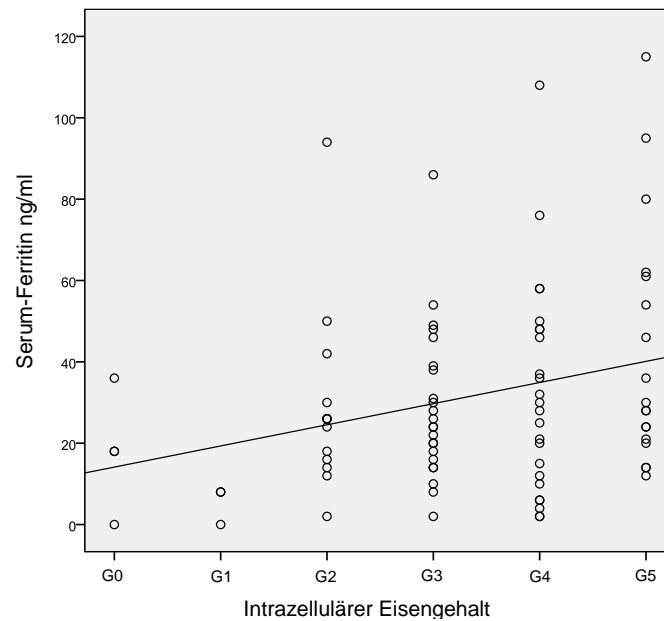


Abb. 3.2: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

		Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Eisengehalt intrazellulär
Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Korrelation nach Pearson	1	0,380
	Signifikanz (2-seitig)		0,005
	N	85	85
Eisengehalt intrazellulär	Korrelation nach Pearson	0,380	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,005	
	N	85	90

Tab. 3.4: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

3.2.3 Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate mit der interstitiellen Eisenablagerung im Knochenmark vor HSZT

Die Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem Ausmaß der semiquantitativ ermittelten interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien, gemäß der in Abschnitt 2.5 beschriebenen Methode vor HSZT sind in Abbildung 3.3 und den Tabellen 3.5, 3.6 und 3.7 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r war mit 0,19 gering. Die Signifikanz $p = 0,09$ zeigte keine Korrelation zwischen der Anzahl verabreichter EKs und den semiquantitativ ermittelten Werten der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien an (Tabelle 3.7).

		Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Interstitielle Eisenablagerung						
	g0 (0 %)	37	90,2	4	9,8	41	100,0
	g1 (1 - 30 %)	17	100,0	0	0,0	17	100,0
	g2 (31 - 60 %)	15	100,0	0	0,0	15	100,0
	g3 (> 60 %)	16	94,1	1	5,9	17	100,0

Tab. 3.5: Korrelation zwischen verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

Interstitielle Eisenablagerung	Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT
g0 (0 %)	
Median	22
Minimum	0
Maximum	94
g1 (1 - 30 %)	
Median	32
Minimum	2
Maximum	80
g2 (31 - 60 %)	
Median	49
Minimum	10
Maximum	108
g3 (> 60 %)	
Median	20,5
Minimum	4
Maximum	115

Tab. 3.6: Darstellung der Anzahl der verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT.

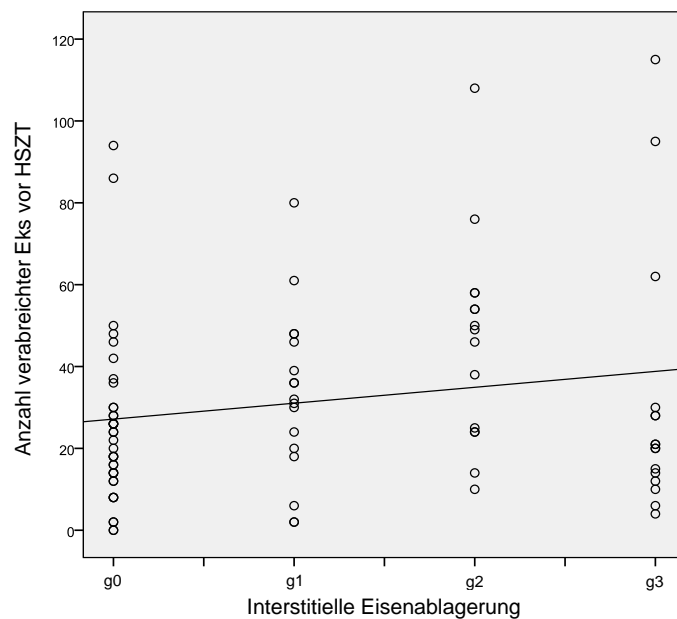


Abb. 3.3: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

		Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Interstitielle Eisenablagerung
Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Korrelation nach Pearson	1	0,185
	Signifikanz (2-seitig)		0,09
	N	85	85

Tab. 3.7: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

3.2.4 Korrelation der Anzahl der Erythrozytenkonzentrate mit dem Anteil der eisenbeladenen CD68⁺-Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68⁺-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

Die Häufigkeiten der verabreichten EKs und die Korrelation mit dem Anteil der eisenbeladenen CD68⁺-Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68⁺-Makrophagen vor HSZT sind in den Abbildungen 3.4 - 3.5 und der Tabelle 3.8 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r war mit 0,24 gering. Die Signifikanz $p = 0,025$ zeigte keine Korrelation.

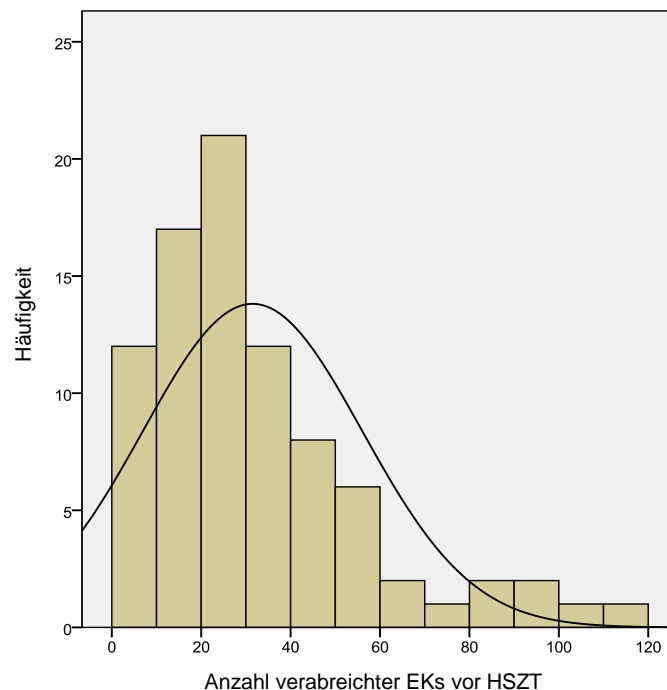


Abb. 3.4: Darstellung der Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT

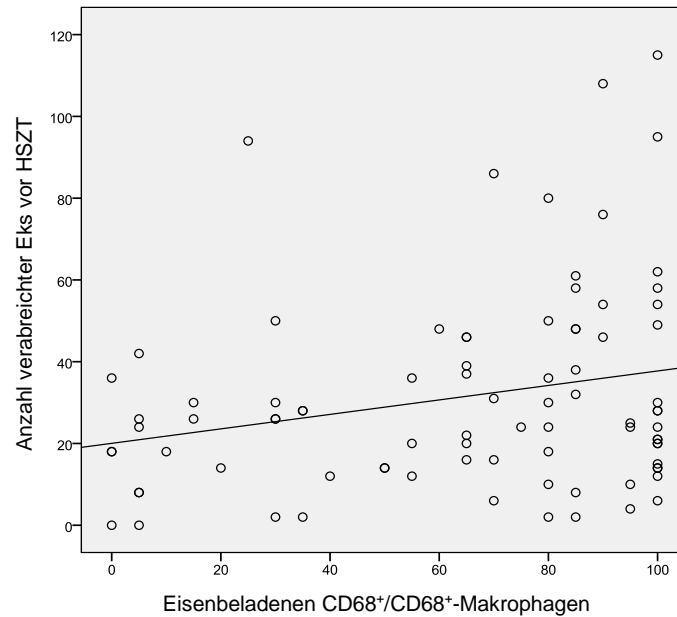


Abb. 3.5: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

		Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Eisenbeladene CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen
Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Korrelation nach Pearson	1	0,242
	Signifikanz (2-seitig)		0,025
	N	85	85

Tab. 3.8: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

3.2.5 Korrelation der verabreichten Erythrozytenkonzentrate mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoese fläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

Die Korrelation des Makrophagengehalts an der Hämatopoese fläche in den Knochenmarkbiopsien mit der verabreichten Anzahl der EKs vor HSZT ist in der Abbildung 3.6, sowie in der Tabelle 3.9 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r fiel mit 0,09 gering aus. Die Signifikanz $p = 0,4$ zeigte keine Korrelation zwischen der Anzahl der verabreichten EKs und dem gesamten Makrophagengehalt.

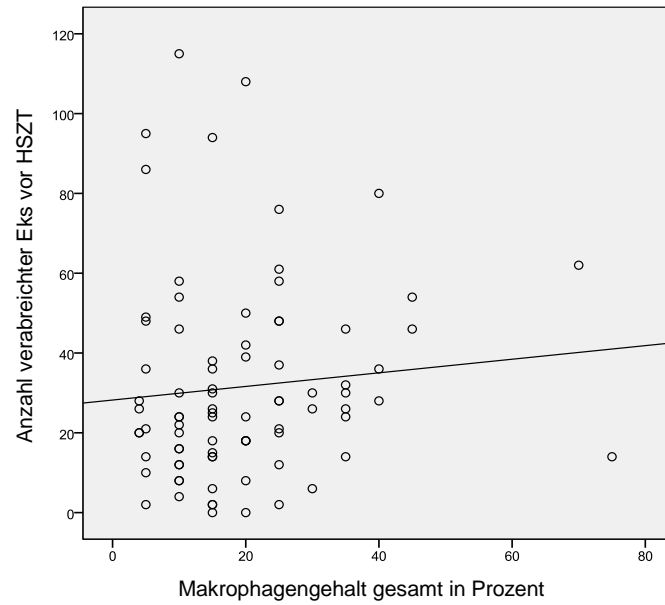


Abb. 3.6: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoesefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

		Anzahl der verabreichten EKs vor Tx	Makrophagengehalt gesamt in Prozent
Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	Korrelation nach Pearson	1	0,093
	Signifikanz (2-seitig)		0,401
	N	85	83

Tab. 3.9: Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoesefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

3.3 Korrelationen des histomorphologisch ermittelten Eisengehalts mit den serologisch ermittelten Serum-Ferritin-Werten

Als weiterer Test für die Überprüfung der Wertigkeit der histomorphologischen Eisenbestimmung im Knochenmark wurde die Korrelation der so ermittelten Ergebnisse mit dem etablierten Marker Ferritin durchgeführt, wobei ausschließlich die Patienten ausgewählt wurden, deren CRP-Wert < 5 mg/l betrug. Speziell wurden die Ergebnisse der Korrelationen der SF-Werte mit den Parametern intrazellulärer Eisengehalt, interstitielle Eisenablagerung, Anteil der eisenbeladenen CD68⁺-Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68⁺-Makrophagen (eisenbeladene CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen) sowie dem Gesamt-Makrophagengehalt bezogen auf alle hämatopoetischen Zellen dokumentiert.

3.3.1 Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien vor HSZT

Die Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulär gespeicherten Eisen im Knochenmark, gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor der HSZT, sind in der Abbildung 3.7 und den Tabellen 3.10 - 3.13 dargestellt.

		Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
Serum-Ferritin-Werte	Eisengehalt Intrazellulär	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
	G0 + G1 (0 - 20 %)	8	100	0	0	8	100
	G2 + G3 (21 - 60 %)	31	79,5	8	20,5	39	100
	G4 + G5 (61 - 100 %)	35	81,4	8	18,6	43	100

Tab. 3.10: Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT. Die Fälle, bei denen keine SF-Werte vorlagen, sind als "fehlend" gekennzeichnet

Eisengehalt Intrazellulär	Serum-Ferritin-Werte
G0 + G1 (0 - 20 %) Median Minimum Maximum	620,5 36 997
G2 + G3 (21 - 60 %) Median Minimum Maximum	1727,5 463 11500
G4 + G5 (61 - 100 %) Median Minimum Maximum	2756 490,8 16900

Tab. 3.11: Darstellung der SF-Werte und des intrazellulären Eisengehalts in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

Der Korrelationskoeffizient r war mit 0,32 gering. Die Signifikanz $p = 0,005$ zeigte eine Korrelation zwischen der Höhe der SF-Werte und den semiquantitativ ermittelten Werten der intrazellulären Eisenspeicherung in den Knochenmarkbiopsien an (Tabelle 3.12). Der Vergleich der ersten bis dritten Quartile versus des vierten Quartils ergab keine Signifikanz (Tabelle 3.13).

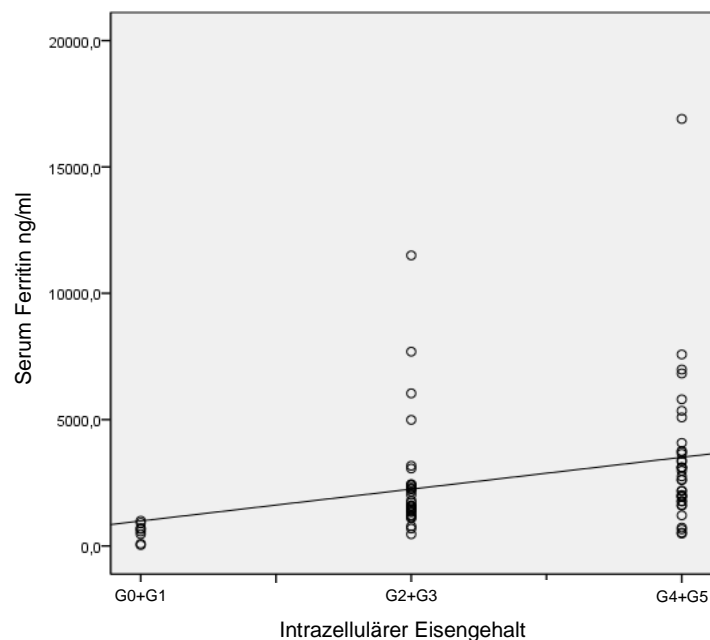


Abb. 3.7: Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

		Serum-Ferritin-Werte	Eisengehalt intrazellulär
Serum-Ferritin-Werte	Korrelation nach Pearson	1	0,321
	Signifikanz (2-seitig)		0,005
	N	74	74
Eisengehalt intrazellulär	Korrelation nach Pearson	0,321	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,005	
	N	74	90

Tab. 3.12: Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	6,827	0,033
Likelihood-Quotient	8,537	0,014
Zusammenhang linear-mit-linear	6,689	0,010
Anzahl der gültigen Fälle	74	

Tab. 3.13: Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT; 1.-3. Quartil vs. 4. Quartil

3.3.2 Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit der interstitiellen Eisenablagerung im Knochenmark vor HSZT

Die Korrelation der SF-Werte mit dem Ausmaß der semiquantitativ ermittelten, interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT, gemäß der in Abschnitt 2.5 beschriebenen Methode, sind in Abbildung 3.8 und den Tabellen 3.14 - 3.17 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r war mit 0,31 gering. Die Signifikanz $p=0,007$ zeigte dennoch eine Korrelation zwischen hohen SF-Werten und höhergradiger interstitieller Eisenablagerung an. Der Vergleich der ersten bis dritten Quartile versus des vierten Quartils ergab keine Signifikanz.

		Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
Serum-Ferritin-Werte	Interstitielle Eisenablagerung	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
		g0 + g1 (0 - 30 %)	49	84,5	9	15,5	58
	g2 + g3 (31 - 100 %)	25	78,1	7	21,9	32	100

Tab. 3.14: Korrelation der SF-Werte mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien vor HSZT gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5. Die Fälle, bei denen keine SF-Werte vorlagen, sind als "fehlend" gekennzeichnet

Interstitielle Eisenablagerung	Serum-Ferritin-Werte
g0 + g1 (0 - 30 %) Median Minimum Maximum	1593 36 11500
g2 + g3 (31 - 100 %) Median Minimum Maximum	3103 654,7 16900

Tab. 3.15: Darstellung der SF-Werte und der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

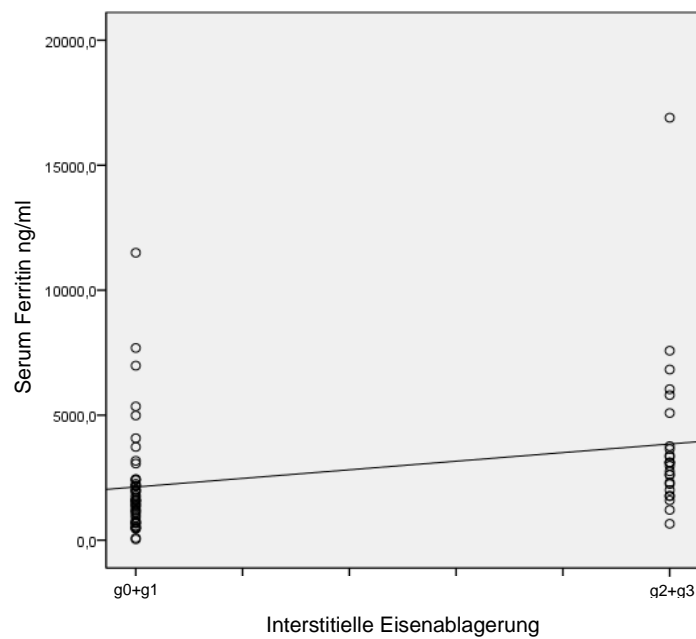


Abb. 3.8: Korrelation der SF-Werte mit dem Ausmaß der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

		Serum-Ferritin-Werte	Interstitielle Eisenablagerung
Serum-Ferritin-Werte	Korrelation nach Pearson	1	0,310
	Signifikanz (2-seitig)		0,007
	N	74	74

Tab. 3.16: Korrelation der SF-Werte mit dem Ausmaß der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,040 ^a	0,025	
Likelihood-Quotient	4,844	0,028	
Exakter Test nach Fisher			0,043
Anzahl der gültigen Fälle	74		

Tab. 3.17: Korrelation der SF-Werte mit dem Ausmaß der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT; 1. - 3. Quartil vs. 4. Quartil

3.3.3 Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit dem Anteil der eisenbeladenen CD68⁺-Makrophagen im Verhältnis zu allen CD68⁺-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

Die SF-Werte und der Anteil der eisenbeladenen Makrophagen an allen CD68⁺-Makrophagen (eisenbeladene CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen) im Knochenmark vor der HSZT und deren Korrelation sind in den Abbildungen 3.9 - 3.11 und der Tabelle 3.18 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r war mit 0,33 gering. Die Signifikanz $p = 0,004$ zeigte jedoch eine Korrelation zwischen hohen SF-Werten und den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen an.

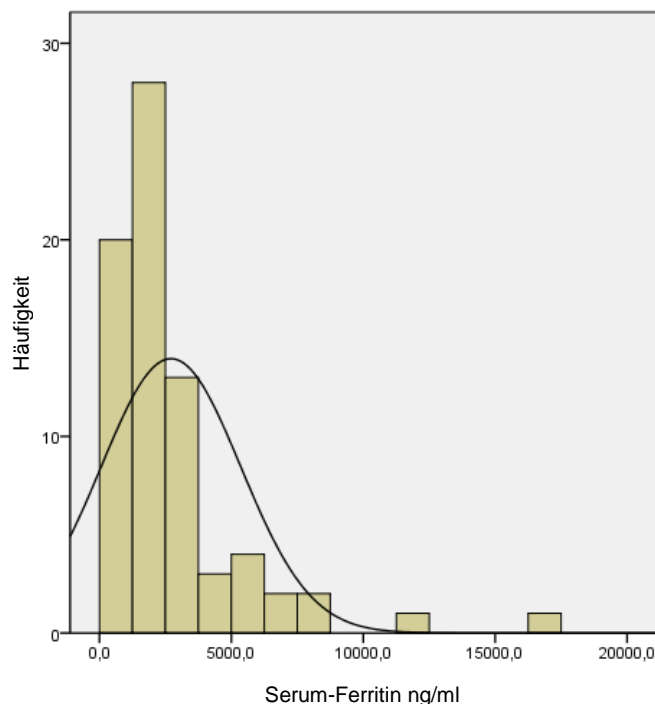


Abb. 3.9: Darstellung der SF-Werte vor HSZT

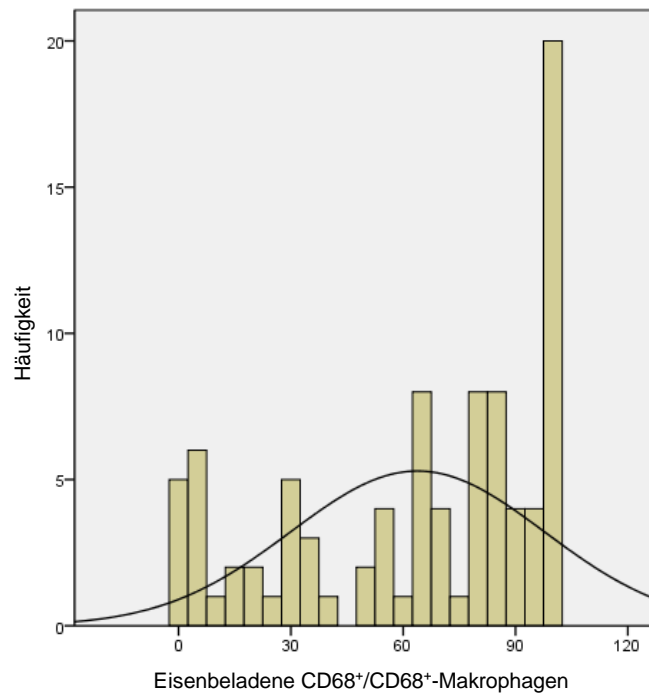


Abb. 3.10: Darstellung der eisenbeladenen CD68+/CD68+-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

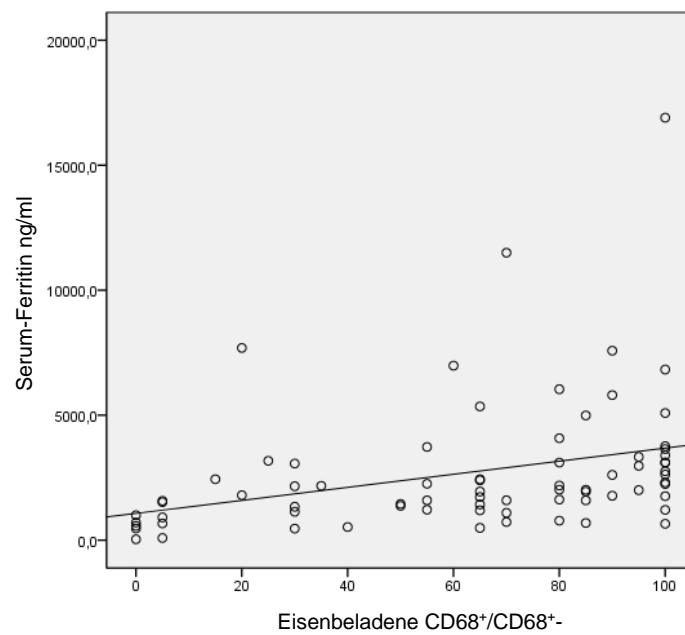


Abb. 3.11: Korrelation der SF-Werte mit den eisenbeladenen CD68+/CD68+-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

		Serum-Ferritin- Werte	Eisenbeladene CD68+/ CD68+-Makrophagen
Serum-Ferritin-Werte	Korrelation nach Pearson	1	0,332
	Signifikanz (2-seitig)		0,004
	N	74	74
Eisenbeladene CD68+/ CD68+-Makrophagen	Korrelation nach Pearson	0,332	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,004	
	N	74	90

Tab. 3.18: Die Korrelationen der SF-Werte mit den eisenbeladenen CD68+/CD68+-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

3.3.4 Korrelation der Serum-Ferritin-Werte mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoese­fläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

Der Anteil der Makrophagen an der Hämatopoese­fläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT und dessen Korrelation mit den SF-Werten sind in den Abbildungen 3.12 - 3.13 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient r fiel mit 0,92 gering aus. Die Signifikanz $p = 0,441$ zeigte keine Korrelation zwischen SF-Werten und dem Makrophagengehalt an der Hämatopoese­fläche.

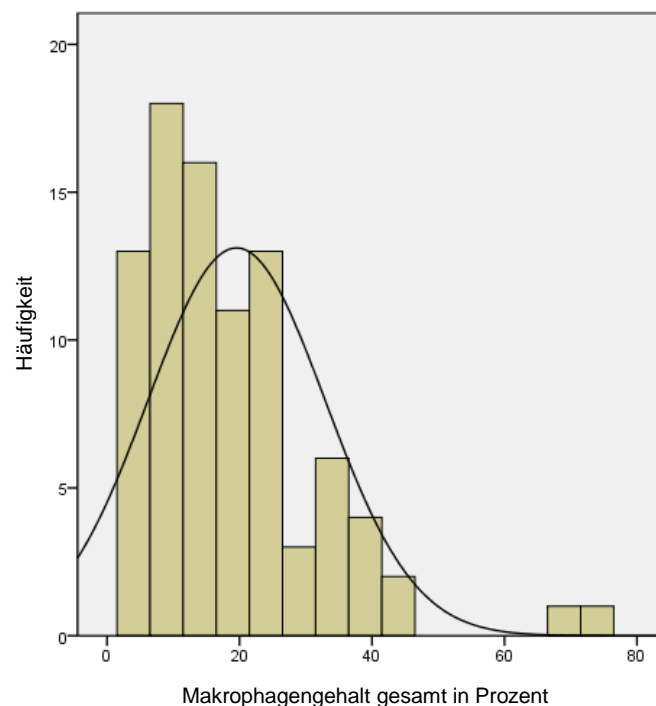


Abb 3.12: Darstellung des Makrophagengehalts an der Hämatopoese­fläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

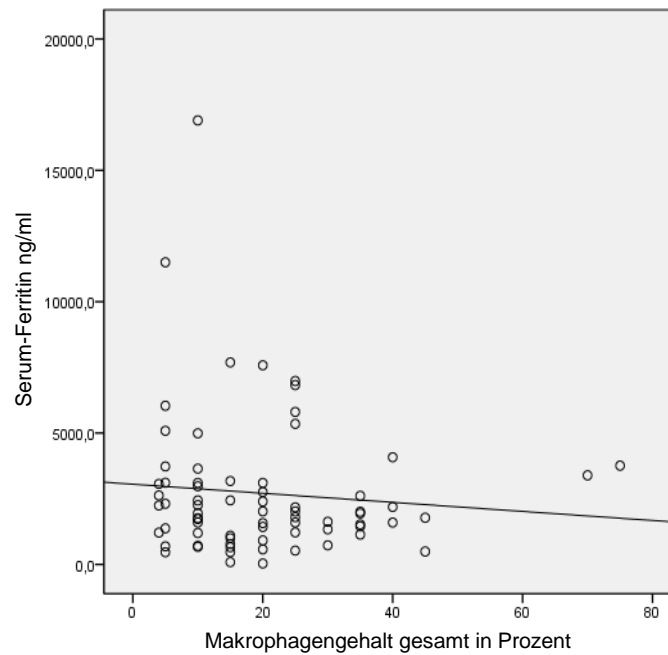


Abb. 3.13: Korrelation der SF-Werte mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

		Serum-Ferritin-Werte	Makrophagengehalt gesamt in Prozent
Serum-Ferritin-Werte	Korrelation nach Pearson	1	0,092
	Signifikanz (2-seitig)		0,441
	N	74	72
Makrophagengehalt gesamt in Prozent	Korrelation nach Pearson	0,092	1
	Signifikanz (2-seitig)	0,441	
	N	72	88

Tab. 3.19: Die Korrelationen der SF-Werte mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

3.4 Sinnhaftigkeit der histomorphologischen Eisenbestimmung bei den Patienten mit CRP-Werten > 5 mg/l

Die folgende Untersuchung diente dazu, die Wertigkeit der histologischen Bestimmung des Eisengehaltes an denjenigen Patienten zu überprüfen, bei denen der CRP-Wert > 5 mg/l betrug und bei denen somit die Messung des SF-Wertes keine Informationen bezüglich des Eisengehaltes erbrachte.

Bei der Korrelation mit den klinischen Parametern dieser Patienten zeigte sich nach der HSZT eine transplantationsassoziierte Mortalität von 100 %.

Eine Überprüfung des intramedullären Eisengehaltes auf seine Eignung als Prognoseparameter nach HSZT war daher nicht möglich.

3.5 Korrelationen mit HFE-Mutationen

Die Bedeutung von HFE Mutationen bei der Entwicklung einer Eisenüberladung im Rahmen einer Erythrozytensubstitution bei hämatologischer Systemerkrankung und HSZT ist bisher nicht abschließend geklärt.

Aus diesem Grund wurde an dem hier präsentierten Patientenkollektiv das Vorhandensein einer heterozygoten oder homozygoten HFE-Mutation überprüft.

Das Vorhandensein oder das Fehlen von HFE-Mutationen wurde mit dem intrazellulären Eisengehalt im Knochenmark sowie mit der interstitiellen Eisenablagerung, den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen, dem absoluten Makrophagengehalt und den SF-Werten vor HSZT korreliert. Die Häufigkeiten der HFE-Mutationen sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

In Abbildung 3.15 ist die Korrelation der HFE-Mutationen mit der Anzahl der eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien und in der Abbildung 3.16 die Korrelation der HFE Mutationen mit der Anzahl der Makrophagen insgesamt dargestellt. Die Abbildung 3.17 zeigt die Korrelation zwischen den HFE-Mutationen und den SF-Werten. In den Tabellen 3.20 bis 3.30 werden die dazugehörigen Korrelationen der verarbeiteten Fälle, deskriptive Statistiken und Signifikanzen abgebildet.

Bei der Korrelation von HFE-Mutationen mit dem intrazellulär gespeicherten Eisen im Knochenmark betrug die asymptotische Signifikanz 0,763. Bei der Korrelation mit der interstitiellen Eisenablagerung und dem Anteil der eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen lag sie bei 0,031 sowie 0,957 und bei Korrelation mit dem gesamten Makrophagengehalt betrug die asymptotische Signifikanz 0,006. Bezogen auf die SF-Werte betrug die asymptotische Signifikanz 0,696.

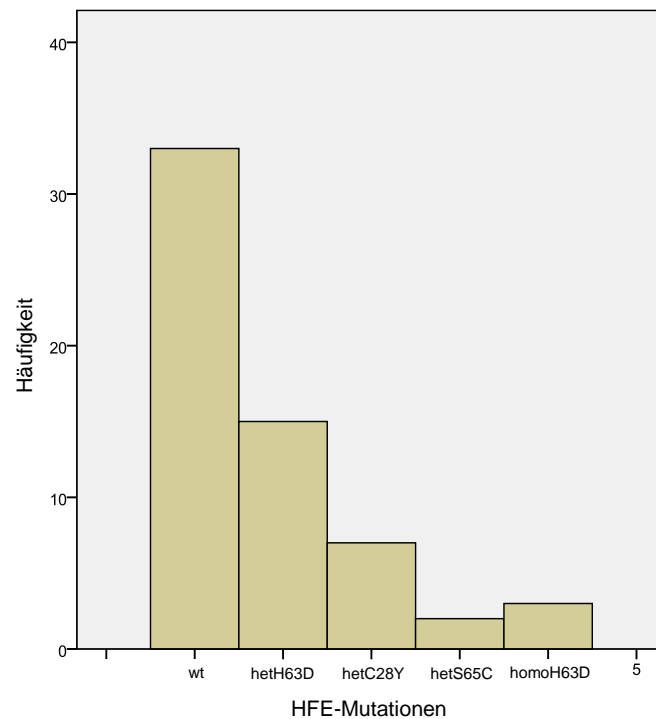


Abb. 3.14: Darstellung der HFE-Mutationen

Eisengehalt intrazellulär	HFE-Mutationen					Gesamt
	wt	hetH63D	hetC282Y	hetS65C	homoH63D	
G0 (0 %)	0	1	1	0	0	2
G1 (1 - 20 %)	1	0	0	0	0	1
G2 (21 - 40 %)	4	3	0	0	0	7
G3 (41 - 60 %)	9	3	3	1	2	18
G4 (61 - 80 %)	11	4	2	0	0	17
G5 (> 80 %)	8	4	1	1	1	15
Gesamt	33	15	7	2	3	60

Tab. 3.20: Korrelation der HFE Mutationen mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	12,633	0,893
Likelihood-Quotient	15,230	0,763
Anzahl der gültigen Fälle	60	

Tab. 3.21: Korrelation der HFE-Mutationen mit dem intrazellulären Eisengehalt in Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

Interstitielle Eisenablagerung	HFE-Mutationen_					Gesamt
	wt	hetH63D	hetC282Y	hetS65C	homoH63D	
g0 (0 %)	12	6	3	1	1	23
g1 (1 - 30 %)	9	3	3	0	0	15
g2 (31 - 60 %)	9	0	0	0	2	11
g3 (> 60 %)	3	6	1	1	0	11
Gesamt	33	15	7	2	3	60

Tab. 3.22: Korrelation der HFE-Mutationen mit der interstitiellen Eisenablagerung in Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	19,279	0,082
Likelihood-Quotient	22,601	0,031
Anzahl der gültigen Fälle	60	

Tab. 3.23: Korrelation der HFE-Mutationen mit der interstitiellen Eisenablagerung in Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT

Eisenbeladene CD68 ⁺ / CD68 ⁺ -Makrophagen	HFE- Mutationen	Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
	wt	33	100,0	0	0,0	33	100,0
	hetH63D	15	100,0	0	0,0	15	100,0
	hetC282Y	7	100,0	0	0,0	7	100,0
	hetS65C	2	100,0	0	0,0	2	100,0
	homoH63D	3	100,0	0	0,0	3	100,0

Tab. 3.24: Korrelation der HFE-Mutationen mit den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen im Knochenmark vor HSZT

HFE-Mutationen		Eisenbeladene CD68 ⁺ / CD68 ⁺ -Makrophagen
wt	Median Minimum Maximum	80 5 100
hetH63D	Standardabweichung Minimum Maximum	30 0 100
hetC282Y	Median Minimum Maximum	85 0 100
hetS65C	Median Minimum Maximum	82,5 65 100
homoH63D	Median Minimum Maximum	85 30 95

Tab. 3.25: Korrelation der HFE-Mutationen mit den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen im Knochenmark vor HSZT

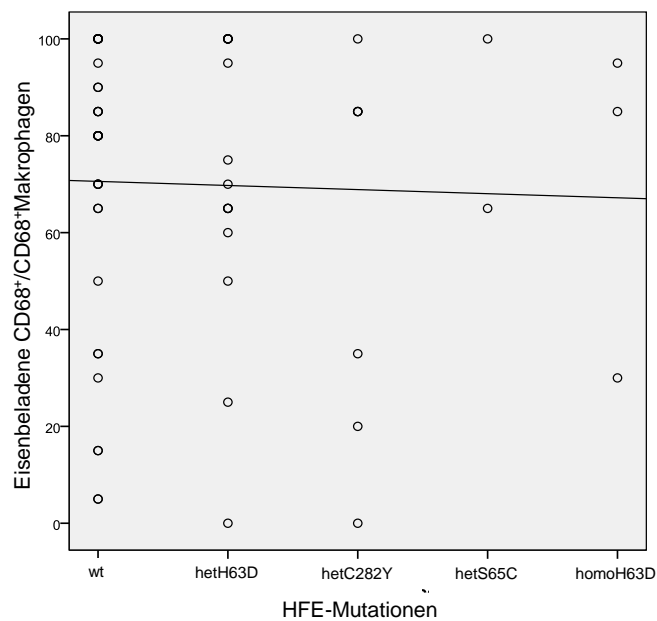


Abb. 3.15: Korrelation der HFE-Mutationen mit den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen im Knochenmark vor HSZT

Kruskal-Wallis-Test (wt + hetH63D)	Eisenbeladenen CD68+/ CD68+-Makrophagen
Chi-Quadrat	0,654
Asymptotische Signifikanz	0,957

Tab. 3.26: Korrelation der HFE-Mutationen wt und hetH63D mit den eisenbeladenen CD68+/CD68+-Makrophagen im Knochenmark vor HSZT

		Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
Makrophagengehalt gesamt in Prozent	HFE Mutationen	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
	wt	31	93,9	2	6,1	33	100,0
	hetH63D	14	93,3	1	6,7	15	100,0
	hetC282Y	7	100,0	0	0,0	7	100,0
	hetS65C	2	100,0	0	0,0	2	100,0
	homoH63D	3	100,0	0	0,0	3	100,0

Tab. 3.27: Korrelation der HFE Mutationen mit dem gesamten Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche im Knochenmark vor HSZT

HFE Mutationen	Makrophagengehalt gesamt in Prozent
wt	Median Minimum Maximum
	20 5 45
hetH63D	Median Minimum Maximum
	10 4 25
hetC282Y	Median Minimum Maximum
	15 5 25
hetS65C	Median Minimum Maximum
	17 10 25
homoH63D	Median Minimum Maximum
	30 15 35

Tab. 3.28: Korrelation der HFE Mutationen mit dem gesamten Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche im Knochenmark vor der HSZT

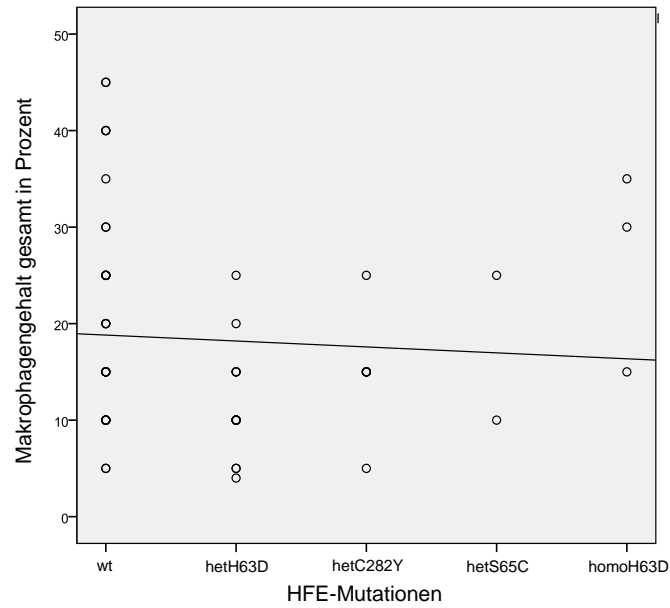


Abb. 3.16: Korrelation der HFE Mutationen mit dem gesamten Makrophagengehalts an der Hämatopoesefläche im Knochenmark vor HSZT

wt + hetH63D	Makrophagengehalt gesamt in Prozent
Mann-Whitney-U	108
Wilcoxon-W	213
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,006

Tab. 3.29: Korrelation der HFE Mutationen wt + hetH63D mit dem gesamten Makrophagengehalt an der Hämatopoesefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT

		Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
Serum-Ferritin-Werte	HFE Mutationen	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
		wt	25	75,8	8	24,2	33
	hetH63D	13	86,7	2	13,3	15	100,0
	hetC282Y	4	57,1	3	42,9	7	100,0
	hetS65C	1	50,0	1	50,0	2	100,0
	homoH63D	2	66,7	1	33,3	3	100,0

Tab. 3.30: Korrelation der Fälle mit HFE-Mutationen mit den SF-Werten vor HSZT. Die Fälle, bei denen keine SF-Werte vorlagen, sind als "fehlend" gekennzeichnet

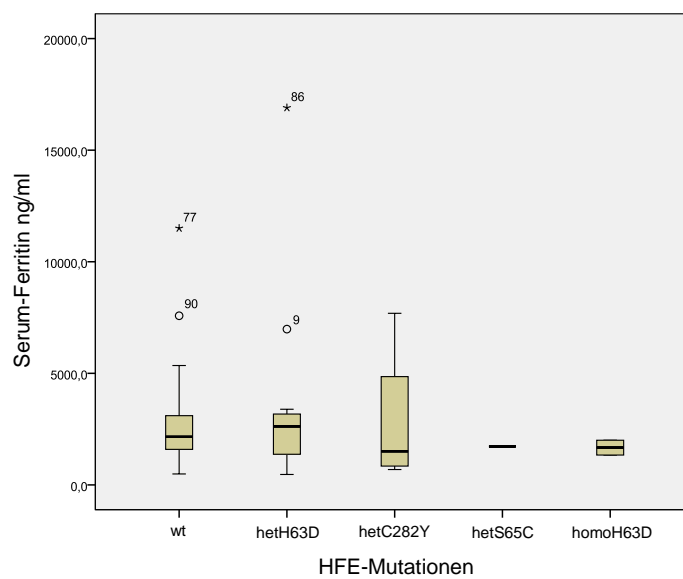


Abb. 3.17: Korrelation der HFE Mutationen mit den SF-Werten vor HSZT

Kruskal-Wallis-Test (wt + hetH63D)	Serum-Ferritin-Werte
Chi-Quadrat	0,726
Asymptotische Signifikanz	0,696

Tab. 3.31: Korrelation der HFE Mutationen mit den SF-Werten vor HSZT

3.6 Die akute und chronische Graft-versus-Host Reaktion, die rückfallfreie Mortalität und die Überlebenszeit

Eine toxische Eisenüberladung erhöht das Risiko einer GvHD und der transplantationsassoziierten rückfallfreien Mortalität insgesamt. Es wurde daher das Auftreten einer zumindest mittelschweren akuten GvHD, einer chronischen GVHD, die rückfallfreie Mortalität, sowie die Überlebenszeit nach HSZT mit den von Bedeutung erscheinenden Faktoren uni- und multivariat in der CRP < 5mg/l Gruppe korreliert (Tabelle 3.31). Die Überlebensfunktionen rückfallfreie Mortalität und Überlebenszeit sind in den Tabellen 3.41 und 3.44, sowie in den Abbildungen 3.18 und 3.19 dargestellt. Tabelle 3.32 und 3.36 zeigen eine Übersicht aller erfassten akuten und chronischen GvHD. Die Tabellen 3.33 - 3.35 und 3.37 - 3.40 zeigen eine detaillierte Verteilung nach Organen der GvHD. Nach einem Median von 24 Monaten trat bei den Patienten eine zumindest mittelschwere akute und chronische GvHD in jeweils 70 % und 53 % der Fälle auf. Es überlebten 58 % der Patienten. Die rückfallfreie Mortalität betrug 22 %. Das Ausmaß intrazellulär gespeicherten und interstitiell abgelagerten Eisens, ebenso wie die Anzahl eisenbeladener CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen korrelierte nicht mit dem Auftreten einer GvHD, dem Überleben oder der rückfallfreien Mortalität. Jedoch zeigte sich eine gute Aussagekraft hoher SF-Werte bezüglich des Überlebens ($p = 0,002$) und der rückfallfreien Mortalität ($p = 0,007$).

Bei Patienten mit SF-Werten > 3000 ng/ml betrug der Anteil der überlebenden Patienten und die rückfallfreie Mortalität 37 % und 49 % gegenüber 78% und 9% bei Patienten mit SF-Werten jenseits dieses Schwellenwerts ($p = 0,001$). Zudem korrelierten SF-Werte > 3000ng/ml mit dem Auftreten einer akuten GvHD ($p = 0,002$), aber nicht mit dem einer chronischen GvHD ($p = 0,97$).

Parameter	Akute GvHD		Chronische GvHD		Rückfallfreie Mortalität		Überlebenszeit	
	Uni-	multivariant	Uni-	multivariant	Uni-	multivariant	Uni-	multivariant
Alter	0,29		0,004	0,41	0,19		0,15	
Geschlecht (m/f)	0,78		0,53		0,74		0,88	
Erkrankungen (AML, MDS)	0,03	0,01	0,20		0,12		0,90	
Anzahl verabreichter EKs vor HSZT	0,90		0,98		0,07	0,30	0,16	
SF-Werte vor HSZT (ng/ml)								
Gesamt	0,08		0,54		< 0,0005	nicht inkl.	< 0,0005	nicht inkl.
< 400; 401 – 800; 801 – 1600; > 1600	0,19		0,87		0,44		0,71	
1.- 3. Quartil vs. 4. Quartil	0,002	0,002	0,97		0,002	0,007	0,001	0,002
HFE-Mutation vor HSZT	0,12		0,65		0,91		0,78	
Ferritin / verabreichte EKs vor HSZT	0,04	0,24	0,41		0,88		0,18	
Intrazelluläre Eisenspeicherung	0,93		0,39		0,02	0,17	0,50	
Interstitielle Eisenablagerung	0,51		0,75		0,03	0,33	0,79	
Eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen	0,47		0,46		0,16		0,94	
Makrophagengehalt gesamt	0,74		0,10		0,92		0,87	

Tab. 3.32: Übersicht der Korrelationen akute und chronische GvHD, rückfallfreie Mortalität und Überlebenszeit

GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Keine	26	28,9	29,2	29,2
Akute GvHD	63	70,0	70,8	100,0
Gesamt	89	98,9	100,0	
Fehlend	1	1,1		
Gesamt	90	100,0		

Tab. 3.33: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten GvHD

Grad der GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Keine	75	83,3	84,3
Grad 1	3	3,3	3,4
Grad 2	4	4,4	4,5
Grad 3	4	4,4	4,5
Grad 4	3	3,3	3,4
Gesamt	89	98,9	100,0
Gesamt	90	100,0	

Tab. 3.34: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten Darm GvHD

Grad der GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Keine	27	30,0	30,3
Grad 1	26	28,9	29,2
Grad 2	26	28,9	29,2
Grad 3	10	11,1	11,2
Gesamt	89	98,9	100,0
Gesamt	90	100,0	

Tab. 3.35: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten Haut GvHD

Grad der GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Keine	81	90,0	91,0
Grad 1	2	2,2	2,2
Grad 2	3	3,3	3,4
Grad 3	3	3,3	3,4
Gesamt	89	98,9	100,0
Gesamt	90	100,0	

Tab. 3.36: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten Leber GvHD

Chronische GvHD	cGvHD Haut	cGvHD Darm	cGvHD Leber	cGvHD weitere Organe	
Keine	44	72	67	59	41
Chronische GvHD	33	5	10	18	
Fehlend	13	13	13	13	
Gesamt	90	90	90	90	
Gesamtanzahl (der Patienten, die an einer cGvHD litten)					

Tab. 3.37: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen GvHD

GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Keine	44	48,9	57,1
Begrenzt	32	35,6	41,6
Generalisiert	1	1,1	1,3
Gesamt	77	85,6	100,0
Fehlend	13	14,4	
Gesamt	90	100,0	

Tab. 3.38: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen Haut GvHD

GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Keine	72	80,0	93,5
cGvHD	5	5,6	6,5
Gesamt	77	85,6	100,0
Gesamt	90	100,0	

Tab. 3.39: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen Darm GvHD

GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Keine	67	74,4	87,0
cGvHD	10	11,1	13,0
Gesamt	77	85,6	100,0
Gesamt	90	100,0	

Tab. 3.40: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen Leber GvHD

GvHD	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Keine	58	64,4	76,3
cGvHD	18	20,0	23,7
Gesamt	76	84,4	100,0
Gesamt	90	90	100,0

Tab. 3.41: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen GvHD weiterer Organe

Rückfallfreie Mortalität	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
SF < 3000 ng/ml	56	5	51	91,1
SF > 3000 ng/ml	18	6	12	66,7
Gesamt	74	11	63	85,1

Tab. 3.42: Tabellarische Darstellung der rückfallfreien Mortalität

Serum-Ferritin-Werte		Grenzen
SF < 3000 ng/ml	Median	1594,5
	Minimum	36,0
	Maximum	2990,0
SF > 3000 ng/ml	Median	5218,5
	Minimum	3175,5
	Maximum	16900,0

Tab. 3.43: Tabellarische Darstellung der SF-Werte und deren Gruppierung

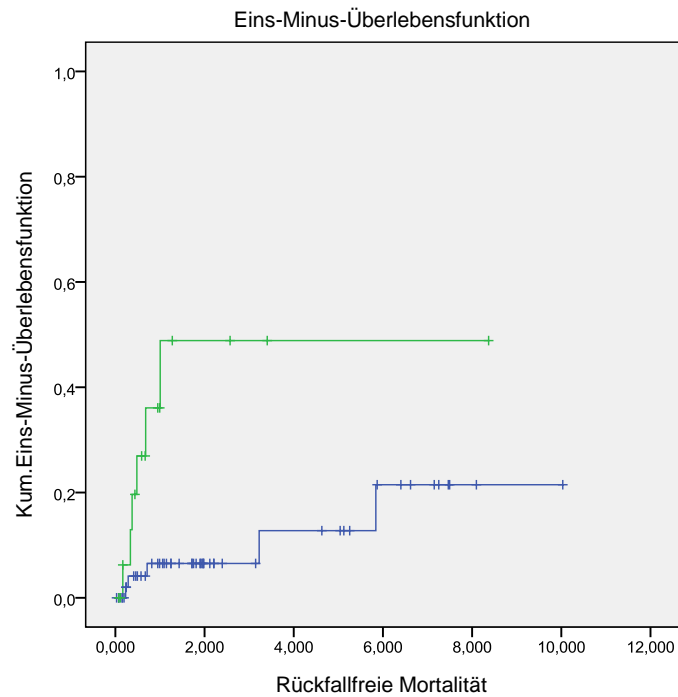


Abb. 3.18: Überlebensfunktion Rückfallfreie Mortalität, gruppiert nach SF-Werten (blau: SF < 3000 ng/ml; grün: SF > 3000 ng/ml)

Überlebenszeit	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
SF < 3000 ng/ml	56	17	39	69,6
SF > 3000 ng/ml	18	13	5	27,8
Gesamt	74	30	44	59,5

Tab. 3.44: Tabellarische Darstellung der Überlebenszeit

Gesamtüberleben	Median [Jahre]			
	Schätzer	Standardfehler	95 % - Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze
SF < 3000 ng/ml	7,523	1,479	4,624	10,423
SF > 3000 ng/ml	1,019	0,051	0,919	1,119
Gesamt	5,279	1,197	2,933	7,625

Tab. 3.45: Tabellarische Darstellung der Überlebenszeit nach SF-Werten gruppiert

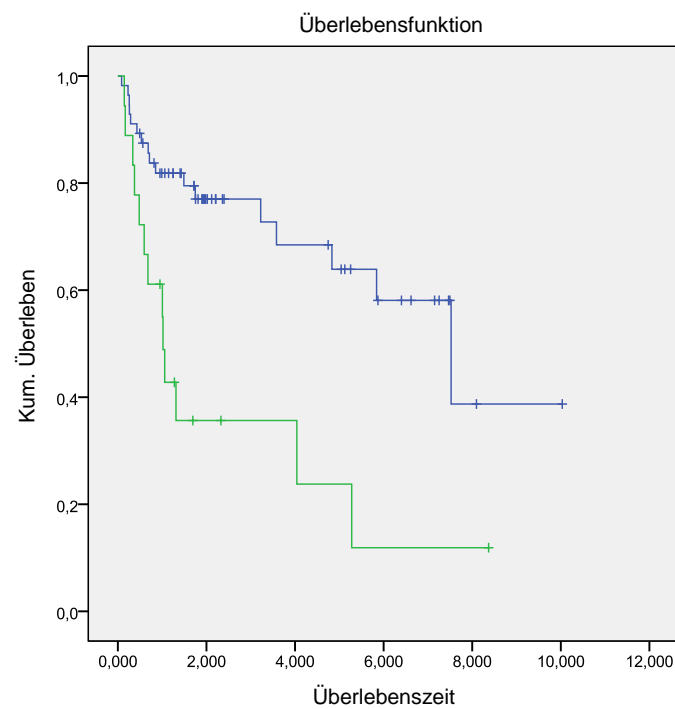


Abb. 3.19: Graphische Darstellung der Überlebenszeit, gruppiert nach SF-Werten (blau: SF < 3000 ng/ml; grün: SF > 3000 ng/ml)

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Die HSZT wird als kurative Therapieoption bei einer Vielfalt hämatologischer Erkrankungen und Erkrankungen des Immunsystems angewandt. Obwohl dieses Verfahren hinsichtlich rückfallfreier und transplantationsbedingter Mortalität erhebliche Fortschritte erzielen konnte, die sich in steigenden Überlebensraten zeigen, ist die transplantationsbedingte Mortalität immer noch die größte Hürde für eine wirkliche Verbesserung des Gesamtüberlebens insbesondere von älteren Patienten und von denjenigen Patienten, die in späten Krankheitsstadien transplantiert werden (Pullarkat 2010). Der Verlauf nach HSZT zeigt, abhängig von der Grunderkrankung, eine große Variation und ist mit einer Vielzahl an Komplikationen, wie Infektionen, GvHD, Toxizität im Rahmen der Konditionierungstherapie und dem sinusoidal obstructive syndrome (SOS) behaftet (Appelbaum 1996).

In den letzten Jahren konnte die Eisenüberladung als wichtiger Risikofaktor für den Erfolg einer HSZT identifiziert werden (Armand et al. 2007; Pullarkat et al. 2008; Mahindra et al. 2009; Kataoka et al. 2009). Als häufigste Ursache für eine toxische Eisenüberladung gilt die Transfusion multipler Erythrozytenkonzentrate als supportive therapeutische Maßnahme. Weitere Gründe einer Eisenüberladung können grundsätzlich eine erhöhte intestinale Eisenresorption durch verminderte Hcpidinproduktion infolge von HFE-Keimbahnmutationen sein, eine Minderutilisation des Eisens oder eine Freisetzung zellulären Eisens bei Knochenmarksdestruktion im Rahmen der Konditionierungstherapie.

Ein Erythrozytenkonzentrat enthält 200 - 250 mg Eisen, so dass es bei Patienten, die regelmäßig Transfusionen erhalten, zu einem Eisenexzess von bis zu 0,5 mg/kg kommen kann (Andrews 2008).

Als hilfreiche Methode zur Abschätzung des Gesamteisens im Körper des Patienten hat sich die Bestimmung des SF-Werts bewährt (Pullarkat 2010; Shander & Sazama 2010; Kanda et al. 2011). Ferritin ist ein zellulär eisenspeicherndes Protein, mit dessen Hilfe Eisen als dreiwertiges Ion in seiner nicht toxischen Form in Lösung gehalten wird. Unter normalen Bedingungen ist der Ferritin-Wert im Serum gering, bei Eisenüberladung hingegen erhöht. Daneben zeigt sich der SF-Wert von anderen Faktoren wie Inflammation, Leberschaden, Infektionen und nach einer HSZT, im Rahmen der Entwicklung einer GvHD beeinflusst und ist in diesen Fällen, dann ebenfalls erhöht. Hierdurch besteht prinzipiell die Gefahr einer Überschätzung des Körpereisens (Mahindra et al. 2009; Platzbecker et al. 2008; Armand et al. 2007).

Diese diagnostische Schwäche verlangt nach der Etablierung zusätzlicher Marker jenseits des SF-Wertes, die nicht den oben genannten Einflüssen unterliegen aber eine ebenso

präzise Aussage zum Ausmaß einer Eisenüberladung und zur Prognoseabschätzung zulässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher überprüft, ob semiquantitative, histomorphologische Eisenbestimmungen in den diagnostischen Knochenmarkbiopsien vor HSZT die Bestimmung des SF Werts ersetzen oder zumindest ergänzen könnten und so im Idealfall bei Begleiterkrankungen, die den SF-Wert modifizieren, wertvolle Zusatzinformationen liefern. Dieser Frage war bereits von anderen Arbeitsgruppen nachgegangen worden, wobei überwiegend die Methode als geeignet eingestuft wurde, so dass eine genaue Bestimmung des Gesamteisens im Körper und den Organen (mit Einschränkung des Herzens) als möglich dargestellt wurde (Strasser et al. 1998; Pullarkat 2010). Die für das SF zuvor aufgeführten Einschränkungen sind für die histologische Bestimmung des Eisens im Knochenmark bisher nicht beschrieben. Da die Knochenmarksbiopsien im Rahmen der Initialdiagnostik standardmäßig bei hämatologischen Erkrankungen gewonnen werden, ist für die so skizzierte Eisenbestimmung keine zusätzliche invasive Diagnostik notwendig.

Die im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation aufgestellte Hypothese bestand darin, dass Eisen im Knochenmark nicht nur intrazellulär in Makrophagen gespeichert wird, sondern, bei sehr ausgeprägter Eisenüberladung, sich nach Art eines Überlaufs auch interstitiell ablagert. Diese Frage wurde bislang noch nicht gezielt untersucht. Literaturberichten zufolge ist lediglich beschrieben, dass die Substitution multipler Erythrozytenkonzentrate zu einer Eisenakkumulation vordergründig in den Gewebsmakrophagen von Leber, Milz und im Knochenmark führt (Ganz & Nemeth 2006b). Zum Zwecke einer semiquantitativen Einschätzung des gespeicherten Eisengehalts wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Eisenscore in Anlehnung an den Eisenscore von Takkunen (Takkunen 1976) entwickelt, der die Ablagerung intrazellulär und interstitiell gespeicherten Eisens unterscheidet. Mit Hilfe von CD68⁺-Immunfärbungen sollte die individuelle Eisenbeladung an der Gesamtzahl der Makrophagen analysiert werden. Mit der Abschätzung der Gesamtanzahl der Makrophagen an der Hämatopoesefläche sollte ferner überprüft werden, ob der absolute und relative Makrophagengehalt sich bei Eisenüberladung verändert.

Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen eingeteilt (CRP-Gruppe < 5 mg/l und > 5 mg/l), um die Einschränkungen des SF als Akut-Phase-Protein (Kanda et al. 2011) zu berücksichtigen und mögliche Effekte der Eisenablagerung ohne und während einer Infektion zu beobachten.

4.2 Analyse der Wertigkeit histologischer Verfahren der Körpereisenbestimmung durch Korrelation mit der Menge der exogenen Eisenzufuhr (Anzahl der Erythrozytenkonzentrate)

In der hier vorliegenden Arbeit konnte der in der Literatur beschriebene Zusammenhang (Pullarkat 2010; Shander & Sazama 2010) zwischen der verabreichten Anzahl der Erythrozytenkonzentrate und der Höhe der SF-Werte reproduziert und SF somit als valider Marker bestätigt werden. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,59$ und eine Signifikanz von $p = 0,001$.

Bei der Überprüfung der Eignung histomorphologischer Parameter zur Evaluation der Eisenüberladung zeigte sich in der Korrelation mit der Anzahl der verabreichten Erythrozytenkonzentrate bzgl. des von uns eingeführten Eisengradings hinsichtlich der intrazellulären Eisenspeicherung ein Korrelationskoeffizienten von $r = 0,38$ und eine Signifikanz von $p = 0,005$ und somit eine signifikante Korrelation. Eine exogene Eisenzufuhr führt somit zu einer vermehrten Eisenablagerung in den phagozytierenden Zellen des Knochenmarks, welche mit dem neu eingeführten Eisengrading gut semiquantitativ darstellbar ist.

Bezüglich der interstitiellen Eisenablagerung zeigte sich hingegen keine Korrelation ($r = 0,19$; $p = 0,09$). Dies spricht gegen die von uns initial aufgestellte Hypothese, dass eine interstitielle Eisenablagerung Ausdruck einer sich erschöpften phagozytischen Kapazität der Makrophagen darstellen könnte, da hier eine Korrelation einer hohen Menge verabreichter Erythrozytenkonzentrate mit einer höhergradigen interstitiellen Eisenablagerung hätte gegeben sein müssen.

Auch die Korrelation von Gesamt-Makrophagengehalt an der Hämatopoesefläche sowie vom Anteil eisenbeladener CD68⁺-Makrophagen pro CD68⁺-Makrophagen insgesamt in den Knochenmarkbiopsien mit der Anzahl der verabreichten EKs ergab überraschender Weise keine signifikante Übereinstimmung. Dies lässt in erster Linie den Schluss zu, dass die absolute Anzahl sich im Knochenmark befindlicher Makrophagen weniger eine dem Bedarf entsprechende Adaption zeigt sondern vielmehr eine individuell determinierte statische Größe zu sein scheint. Diese Annahme wird durch den Befund unterstützt, dass die Anzahl der Makrophagen bei vermehrter Eisenbeladung nicht höher war als bei geringer Eisenbeladung. Möglicherweise liegt auch eine Modifikation der Makrophagendichte entsprechend der hämatologischen Grunderkrankung vor. Letztere Hypothese wird auch von anderen Arbeitsgruppen unterstützt (Kitagawa et al. 2009).

4.3 Analyse der Wertigkeit histologischer Verfahren der Körpereisenbestimmung durch Korrelation mit den Serum-Ferritin-Werten

Der Serum-Ferritin-Spiegel wird in der Literatur übereinstimmend als valider Marker zur Abschätzung der Konzentration des Körpereisens angegeben, gesetzt dem Fall, dass bei dem Patienten keine Entzündungskonstellation besteht, da eine Erhöhung dieses Wertes dann auch Folge seiner Eigenschaft als Akut-Phase-Protein sein kann (Shander & Sazama 2010). Diese Einschätzung konnten wir in unseren hier vorliegenden Untersuchungen bestätigen.

Daher wurde die Wertigkeit der histologischen Parameter zur Eisenbestimmung hinsichtlich ihrer Validität auch durch die Korrelation mit den SF-Werten überprüft. Die Normalwerte für SF sind geschlechtsspezifisch mit Werten von 12 - 300 ng/ml bei Männern und 12 - 150 ng/ml bei Frauen (Shander & Sazama 2010). Überschreiten die SF-Werte 1000 ng/ml - 3000 ng/ml - hier herrscht Uneinigkeit zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen - wird von einer Eisenüberladung gesprochen, die sich prognostisch negativ auf das posttransplantäre Überleben auswirkt (Pullarkat 2010; Mahindra et al. 2009; Kataoka et al. 2009; Platzbecker et al. 2008; Pullarkat et al. 2008). Eine Korrelation der SF-Werte mit den im Rahmen dieser Studie ausgewerteten histologischen Parametern zur Evaluation des Eisenspiegels, würde demnach die Wertigkeit letzterer Verfahren unterstreichen und so möglicherweise eine valide Aussage bei den Patienten ermöglichen, die hohe CRP-Werte aufwiesen.

4.3.1 Untersuchung der Patientengruppe mit niedrigen CRP (CRP < 5 mg/l)

In dieser Gruppe zeigte sich im direkten Vergleich der histologischen Parameter mit den SF-Werten eine signifikante Korrelation mit der (semiquantitativen) Evaluation des intrazellulär gespeicherten Eisens ($r = 0,32$; $p = 0,005$). Dabei fiel auf, dass insbesondere bei histologisch geringer Eisenspeicherung (G0 / G1) eine hochsignifikante Korrelation mit den SF-Werten bestand und in dieser Gruppe SF-Werte von $>3000\text{ng/ml}$ und damit Fälle mit pathologischer Eisenüberladung nicht vorkamen. Ebenso korrelierten die SF-Werte mit der (semiquantitativ ermittelten) Menge interstitiell abgelagerten Eisens ($r = 0,31$; $p = 0,007$), wobei diese Korrelation nicht signifikant war.

Bezüglich des Anteils der eisenbeladenen CD68⁺-Makrophagen an allen CD68⁺-Makrophagen zeigte sich der Korrelationskoeffizient mit $r = 0,33$ gering. Die Signifikanz $p = 0,004$ zeigte aber eine Korrelation zwischen steigenden SF-Werten und eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen an. Die absolute Anzahl der Makrophagen, konnte nicht mit den SF-Werten signifikant korreliert werden.

Es zeigt sich somit eine gleichartige Konstellation, wie bereits in der Korrelation mit der Anzahl der verabreichten EKs dargestellt. Wiederum ist als erstaunliches Ergebnis festzulegen, dass weder die Anzahl der Makrophagen an der Hämatopoesefläche noch der Anteil eisenspeichernder Makrophagen am gesamten Makrophagenpool im Falle einer Eisenüberladung eine lineare Dynamik erkennen lässt. Was den ersten Faktor angeht, ist festzuhalten, dass die Analyse des Makrophagengehalts an der Hämatopoesefläche deutlich machte, dass im Rahmen der zytoreduktiven Therapie vor Transplantation die Makrophagenanzahl kaum abnahm, während der Anteil des blutbildenden Markes eine wesentlich stärkere Dynamik erkennen ließ. Insofern legen die Daten nahe, dass die Hämatopoesefläche keine geeignete Bezugsgröße für die Dynamik der phagozytischen Aktivität der Makrophagen zu sein scheint. Was den zweiten Faktor angeht, ist festzuhalten, dass bei Auswertung des Gehalts eisenspeichernder Makrophagen am gesamten Makrophagenpool nur bei geringer Eisenbelastung eine Vergleichbarkeit mit den SF-Werten gegeben ist. Insofern scheint bei Betrachtung des Eisengehalts in der Berliner Blau Reaktion eine Unterscheidung zwischen stärkerer und weniger starker Eisenphagozytose semiquantitativ nicht gut möglich zu sein.

Somit zeigt sich, dass erhöhte SF-Werte in aller Regel von vermehrten intrazellulären wie auch interstitiellen Eiseneinlagerungen begleitet sind, die Korrelation bleibt insbesondere bei höheren und hohen SF-Werten mit dem von uns eingeführten Grading schwach. Jedoch ist es interessant zu beobachten, dass interstitielle Ablagerungen vermehrt bei hohen SF-Werten - wenn auch nicht signifikant - auftreten. Dies ist grundsätzlich als Unterstützung unserer Hypothese zu sehen, nach der zunächst das überschüssige Eisen intrazellulär und erst bei starker Überladung interstitiell abgelagert wird.

Diese Beobachtung ist für zukünftige Arbeiten interessant, denn es ist durchaus denkbar, dass interstitiell abgelagertes Eisen schwerer wieder zu mobilisieren und damit toxischer ist als das intrazellulär gespeicherte Eisen. Das Phänomen des interstitiell abgelagerten Eisens müsste daher einer genaueren Beobachtung unterzogen werden, denn klinisch wird in der Literatur berichtet, dass eine starke Eisenüberladung nach HSZT auch mit Hilfe von Chelatoren in einer signifikanten Anzahl der Fälle nur eingeschränkt therapierbar ist und die Langzeiteffekte einer Eisenüberladung noch nicht eindeutig geklärt sind (Eisfeld et al. 2012; Pullarkat 2010).

Die schwache Korrelation des im Rahmen dieser Arbeit generierten Eisengradings mit dem SF könnte auch durch die Bindungskapazität des Ferritins erklärbar sein. Ferritin bindet nicht nur Eisen, sondern besitzt auch Bindungsstellen für Aluminium, Zink, Mangan, Blei und Cadmium, wobei die drei erstgenannten Elemente den Großteil ausmachen. In einer von De Sole veröffentlichten Arbeit wird gezeigt, dass das Verhältnis der von Ferritin gebundenen

Elemente von der Krankheit und dem Zustand (z.B. Sepsis) sowie der Notwendigkeit von Hämodialysen abhängig sind. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Aluminium und Eisen fast äquimolar gebunden war (Spada et al. 2009). In der hier vorliegenden Studie wurde mit der Berliner Blau Färbung lediglich die Eisenbelastung in den Knochenmarksstanzen untersucht, während die Ablagerung möglicherweise zusätzlich eingelagerten Aluminiums oder anderer toxischer Metalle nicht visualisiert wurden. Die Korrelation der SF-Werte mit den so ermittelten Werten könnte also auch deshalb schwach sein, weil die SF-Werte nicht nur den Eisenspeicher des Körpers repräsentieren, sondern als Speicher toxischer Substanzen ein unabhängiger, prognostischer Marker darstellen (Pullarkat 2010; Kanda et al. 2011),

4.3.2 Untersuchung der Patientengruppe mit hohem CRP (CRP > 5 mg/l)

Die Notwendigkeit einer Eisenbestimmung jenseits des etablierten SF-Wertes wird in der Patientengruppe mit CRP-Werten > 5 mg/l deutlich, da hier der SF Wert als Parameter versagt und unabhängig von der Eisenbelastung hohe Werte bietet. In unserer Patientengruppe (n = 33) konnten wir aber feststellen, dass keiner der Patienten die Transplantation überlebte. Wir verzichteten daher an diesem relativ kleinen Patientenkollektiv auf eine systematische histologische Auswertung der Knochenmarkbiopsien.

4.4 Abhängigkeit des Ausmaßes des gespeicherten Körpereisens mit dem HFE-Status

Die genaue Funktion des HFE-Gens ist noch nicht geklärt. Jedoch ist die hereditäre Hämochromatose, neben anderen eisenregulierenden Proteinen wie TfR2, HJV und HAMP mit einer homozygoten Mutation des HFE-Gens stark assoziiert (Alexander & Kowdley 2009). Einhergehend mit einer Keimbahnmutation des HFE-Gens wird eine erniedrigte Hepcidinsynthese in der Leber beschrieben, mit der Folge einer vermehrten Eisenrückresorption und Eisenspeicherung. Somit kann die HFE-Gen-Mutation als zentraler, pathogenetischer Faktor der hereditären Hämochromatose postuliert werden (Gehrke et al. 2003).

Da eine Mutation im HFE-Gen beträchtlichen Einfluss auf die Eisenhomöostase hat, sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, ob HFE-Mutationen mit einer vermehrten Eisenspeicherung im Knochenmark assoziiert sind, die mit dem neu eingeführten Eisenscore visualisiert werden können und ob quantitative Unterschiede der Eisenspeicherung bei der mikroskopischen Darstellung zwischen den verschiedenen Gen-Mutationen sowie dem Mutationsstatus (homo- versus heterozygot) bestehen.

Hierfür wurden die am häufigsten auftretenden HFE-Mutationen der Empfänger bestimmt und mit dem intrazellulären Eisengehalt, der interstitiellen Eisenablagerung, den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen, sowie dem gesamten Makrophagengehalt verglichen.

Die asymptotische Signifikanz betrug 0,763 bei intrazellulärem Eisen, 0,031 bei interstitiell abgelagerten Eisen, 0,957 verglichen mit den eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen und 0,006 in Bezug zum gesamten Makrophagengehalt. Passend hierzu ergab sich auch keine Korrelation mit den SF-Werten ($p = 0,69$). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine heterozygote HFE-Mutation des Patienten das Risiko einer toxischen Eisenüberladung im Rahmen des Transplantationsprozesses nicht erhöht. Bezogen auf die homozygoten Mutationen müssen diese Ergebnisse jedoch, aufgrund der geringen Fallzahl, kritisch betrachtet und durch größere Fallzahlen bestätigt werden.

4.5 Wertigkeit der histologischen Körpereisenbestimmung für den Verlauf der Erkrankung nach HSZT

Die Menge intrazellulär gespeicherten und interstitiell abgelagerten Eisens, korrelierten bei Anwendung, des von uns generierten Gradings, weder mit dem Auftreten einer GvHD, noch dem Überleben oder der rückfallfreien Mortalität. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der SF-Werte: erhöhte SF-Werte waren hier sowohl mit der Überlebenswahrscheinlichkeit ($p = 0.002$) als auch mit der rückfallfreien Mortalität ($p = 0.007$) signifikant korreliert. So betrug bei Patienten mit SF > 3000 ng/ml das Überleben und die rückfallfreie Mortalität 37 % und 49 % gegenüber 78 % und 9 % bei Patienten mit niedrigen SF-Werten ($p = 0.001$). Außerdem korrelierten SF-Niveaus > 3000 ng/ml mit der akuten GvHD ($p = 0.002$). Eine Korrelation mit der chronischen GvHD zeigte sich auch für die SF-Werte nicht.

Eine Korrelation von hohen SF-Werten vor der HSZT mit der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer akuten GvHD wurde schon von anderen beschrieben (Pullarkat et al. 2008; Platzbecker et al. 2008). Andere Studien konnten diese Annahme jedoch nicht bestätigen oder zeigten sogar eine umgekehrte Korrelation (Mahindra et al. 2009; Armand et al. 2007). In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass die immunsuppressiven Effekte des Eisens das Risiko für die Entwicklung einer akuten GvHD abschwächen könnten (Pullarkat 2010).

Die chronische GvHD grenzt sich pathophysiologisch durch gestörte Toleranzmechanismen (reduzierte Funktion des Thymus, Dysfunktion regulatorischer T-Zellen), bei denen autoreaktive, als auch alloreaktive T- und B-Lymphozyten eine Rolle spielen, von der akuten GvHD ab und ist eher als eine spezialisierte Autoimmunerkrankung anzusehen (Ferrara et

al. 2009). Erhöhte SF-Werte wie, auch die histologischen Parameter, scheinen keine geeigneten Marker zu sein, um das Risiko für die Entwicklung einer solchen Erkrankung vorherzusagen.

4.6 Abschließende Bemerkungen zur Validität der histologischen Eisenbestimmung

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit neu generierten Eisenscore ist es möglich, eine Eisenüberladung semiquantitativ darzustellen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang festzuhalten, dass niedrige Eisengrade (G0 / G1) klinisch-pathologisch bedeutsame SF-Werte von > 3000 ng/ml ausschließen. Da bzgl. höherer Eisengrade die Korrelation mit den SF-Werten verwischt, ist es allerdings mit diesen Parametern im Gegensatz zu den SF-Werten nicht möglich, eine signifikante Aussage über die rückfallfreie Mortalität und die Überlebenszeit zu treffen.

Obwohl somit die histologische Eisenmessung der serologischen Bestimmung des SF-Wertes unterlegen ist, sollte eine sorgfältige Bestimmung des Eisengehalts - im Idealfall unter Zuhilfenahme der von uns generierten Scores - an den Knochenmarkbiopsien, die im Rahmen der Standarddiagnostik gewonnen werden, vorgenommen werden. Nur so kann die Wertigkeit der Sublokalisierung (intrazellulär versus interstitiell) vor dem Hintergrund des weiteren Verlaufs der Patienten nach Transplantation systematisch weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Patienten extra- und intrazelluläres Eisen in Knochenmarksbiopsien vor der Transplantation bestimmt und die Ergebnisse mit dem Erfolg der jeweiligen allogenen HSZT verglichen.

Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin festzustellen, ob es neben dem etablierten Marker Serum-Ferritin (SF) noch andere Marker gibt, welche für den Erfolg der Transplantation bedeutsam sind. Die Erfolgsparameter waren das Überleben, die rückfallfreie Mortalität sowie die akute und die chronische GvHD. Außerdem wurde die Korrelation von Eisenlagern im Knochenmark mit dem Gentyt (HFE-Genotyp) untersucht.

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ist eine anerkannte Behandlung von lebensbedrohlichen hämatologischen Erkrankungen. Dennoch sind bis heute nur eingeschränkt Daten vorhanden, welche die Bedeutung der Eisen- und Ferritinablagerung im Knochenmark des Patienten vor der Transplantation in Verbindung mit dem Erfolg der Knochenmarktransplantation zeigen.

Es wurden Knochenmarkbiopsien von 123 Patienten am Institut für Pathologie des Uniklinikums Leipzig histologisch untersucht, die zuvor aus diagnostischen Gründen entnommen wurden. Die Biopsien erfolgten innerhalb der letzten drei Monate vor der Transplantation, bei einem Median von 24 Tagen. In den gewonnenen Präparaten wurde die Eisenablagerung mit der Berliner Blau Färbung und einer Makrophagenidentifizierung (CD68⁺) bestimmt. Dabei wurde ein selber generiertes Grading, in Anlehnung an das Grading von Takkunen, von G0 bis G5 für intrazellulär gespeichertem Eisen und g0 bis g3 für interstitielles Eisen verwendet, um die Eisenablagerung quantitativ per Mikroskop darzustellen. Das relative Verhältnis von eisenbeladenen CD68⁺/CD68⁺-Makrophagen und das absolute Verhältnis von CD68⁺-Makrophagen in Bezug auf alle hämatopoetischen Zellen wurde berechnet.

Alle Peripheren Blutentnahmen zur Bestimmung des SF-Werts wurden sieben Tage vor der allogenen HSZT durchgeführt.

Das Patientenkollektiv wurde in zwei Gruppen CRP < 5 mg/l und CRP > 5 mg/l eingeteilt, um die bekannten Einschränkungen des SF als Akut-Phase-Protein, zu berücksichtigen.

Die Gruppe mit einem CRP-Gehalt < 5 mg/l umfasste so 90 Personen (48 Männer und 42 Frauen, Durchschnittsalter 57 Jahre), der Gruppe > 5 mg/l wurden 33 Patienten (20 männlich und 13 weiblich, Durchschnittsalter 56 Jahre) zugeordnet. Der durchschnittliche CRP-Gehalt in dieser Gruppe betrug 18,6 mg/l, bei einer Spanne von 5,7 mg/l - 56,9mg/l.

In der Gruppe < 5 mg/l wurde ein veränderter HFE-Genotyp bei 27 Patienten gefunden. Der Median des SF betrug 2009 ng/ml, wobei 25 % der Patienten, einen SF-Gehalt von über 3000 ng/ml hatten. Der Median der vor der Transplantation verabreichten EKs lag bei 26 Konzentraten.

In dem Patientenkollektiv CRP < 5 mg/l zeigte sich eine starke Signifikanz bei den Korrelationen zwischen den SF-Werten und der verabreichten Anzahl an EKs ($r = 0,59$; $p = 0,001$), womit SF als valider Marker, zur Bestimmung des Körpereisens, bestätigt werden konnte.

Der von uns generierte Eisenscore zeigte hinsichtlich der intrazellulären Eisenspeicherung ebenfalls eine signifikante Korrelation ($r = 0,38$; $p = 0,005$) mit der Anzahl der verabreichten EKs und konnte somit eine exogene Eisenzufuhr, im phagozytierenden System, semiquantitativ gut darstellen. Bezüglich der interstitiellen Eisenablagerung zeigte sich hingegen keine Korrelation ($r = 0,19$; $p = 0,09$). Auch die Korrelation von Gesamtmakrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche sowie vom Anteil eisenbeladener CD68⁺-Makrophagen pro CD68⁺-Makrophagen insgesamt in den Knochenmarkbiopsien, mit der Anzahl der verabreichten EKs, ergab keine signifikante Übereinstimmung. Der fehlende Zusammenhang lässt sich mit der Schlussfolgerung erklären, dass der Makrophagengehalt eine individuelle, anstatt eine adaptative Größe darstellt.

Hinsichtlich weiterer Korrelationen zwischen dem Eisengrading mit den SF-Werten ergab sich, dass höhere SF-Werte mit vermehrter intrazellulärer Eisenspeicherung ($p = 0,005$; $r = 0,32$), interstitieller Eisenablagerung ($p = 0,007$; $r = 0,31$) sowie mit einer höheren Anzahl eisenbeladener CD68⁺ pro CD68⁺-Makrophagen ($p = 0,004$; $r = 0,33$) assoziiert waren.

Die Anzahl der Gesamtmakrophagen korrelierte, wie schon bei der Korrelation mit der exogenen Eisenzufuhr durch EKs, nicht mit der Höhe der SF-Werte.

Zusätzlich zeigte sich die Eisenspeicherung vom HFE-Genotyp nicht beeinflusst. Dies bedeutet, dass eine heterozygote HFE-Mutation des Patienten das Risiko einer toxischen Eisenüberladung im Rahmen des Transplantationsprozesses nicht erhöht. Bezogen auf die homozygoten Mutationen müssen diese Ergebnisse jedoch, aufgrund der geringen Fallzahl, kritisch betrachtet und durch größere Fallzahlen in weiteren Studien bestätigt werden.

Nach einem Median von 24 Monaten kamen die akute und chronische GvHD in jeweils 70 % und 53 % bei Patienten vor. Es haben 58% der Patienten überlebt; die rückfallfreie Mortalität betrug 22 %. Intrazellulär gespeichertes Eisen und interstitiell abgelagertes Eisen konnte bei niedrigen Eisengraden (G0 / G1) SF-Werte > 3000 ng/ml, und damit eine toxische Eisenüberladung ausschließen. Allerdings war eine signifikante Aussage in Korrelation mit höheren SF-Werten nicht gegeben, so dass es nicht möglich war, mit dem Eisengrading eine

signifikante Aussage über die rückfallfreie Mortalität die Überlebenszeit oder das Auftreten einer GvHD zu treffen.

Jedoch zeigten die erhöhten SF-Werte in dem Patientenkollektiv CRP < 5 mg/l eine hohe Aussagekraft bezüglich des Überlebens ($p = 0.002$) und der rückfallfreien Mortalität ($p = 0.007$). Bei Patienten mit SF > 3000 ng/ml betrug der Überlebensanteil und die rückfallfreie Mortalität 37 % und 49 % gegenüber 78 % und 9 % bei Patienten mit niedrigem SF ($p = 0.001$). Zudem korrelierte SF bei einem Niveau > 3000 ng/ml mit der akuten GvHD ($p = 0.002$). Eine Korrelation mit der chronischen GvHD fand sich nicht.

In dem Patientenkollektiv mit einem CRP-Gehalt > 5 mg/l konnte, aufgrund einer Mortalität von 100% und der Heterogenität der Items, keine statistische Aussage über Korrelationen getroffen werden.

Demzufolge bleibt SF eine preiswerte und nicht invasive Option um eine Eisenüberladung zu verifizieren und somit den Erfolg einer allogenen HSZT vorauszusagen, wenn die bekannten Einschränkungen berücksichtigt werden.

Obwohl somit die histologische Eisenmessung der serologischen Bestimmung des SF-Wertes unterlegen ist, sollte eine sorgfältige Bestimmung des Eisengehalts an den Knochenmarkbiopsien, die im Rahmen der Standarddiagnostik gewonnen wurden, vorgenommen werden. Nur so kann die Wertigkeit der intrazellulären versus der interstitiellen Eisenspeicherung, vor dem Hintergrund des weiteren Verlaufs der Patienten nach Transplantation systematisch weiter untersucht und verbessert werden.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Überleben von Patienten mit AML in Relation zum Karyotyp Adaptiert nach Haferlach 2003	13
Abb. 1.2:	Eisenüberladung führt zur Bildung von nicht-transferringebundenem Eisen	21
Abb. 1.3:	Pathophysiologie der Eisenüberladung NTGE = Nicht-transferringebundenes Eisen; TGF- β 1 = Transforming growth factor β 1 Grafik adaptiert aus (Steinberg et al. 2009)	21
Abb. 1.4:	Wechselwirkungen von Schlüsselproteinen der Eisenhämostasie (Fleming 2005)	24
Abb. 2.1:	Schematische Darstellung der APAAP-Methode (Cordell et al. 1984)	33
Abb. 2.2:	Abb. 2.2 a) und b) zeigen ein G0 g0 Präparat in 400facher Vergrößerung in der Berliner Blau (rechts) und der CD68 ⁺ -Färbung (links). Die rot gefärbten CD68 ⁺ -Makrophagen sind mit einem Pfeil markiert. Kein Nachweis von Eisenpigment im Präparat.....	34
Abb. 2.3:	Abb. 2.3 a) und b) zeigen ein G3 g2 Präparat in 400facher Vergrößerung in der Berliner Blau (rechts) und der CD68 ⁺ -Färbung (links). Das blau gefärbte Eisenpigment ist mit einem Pfeil markiert.	35
Abb. 2.4:	Abb. 2.4 a) und b) zeigen ein G5 g3 gegradetes Präparat in 400facher Vergrößerung in der Berliner Blau (rechts) und der CD68 ⁺ -Färbung (links). Der Pfeil weist auf das viele interstitiell abgelagerte Eisen.	35
Abb. 3.1:	Korrelation der SF-Werte mit der verabreichten Anzahl an EKs.....	37
Abb. 3.2:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT.....	39
Abb. 3.3:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT.....	41
Abb. 3.4:	Darstellung der Anzahl der verabreichten EKs vor HSZT	41
Abb. 3.5:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT.	42
Abb. 3.6:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoeseffläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	43
Abb. 3.7:	Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	45
Abb. 3.8:	Korrelation der SF-Werte mit dem Ausmaß der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	47
Abb. 3.9:	Darstellung der SF-Werte vor HSZT	48
Abb. 3.10:	Darstellung der eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	49
Abb. 3.11:	Korrelation der SF-Werte mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	49
Abb. 3.12:	Darstellung des Makrophagengehalts an der Hämatopoeseffläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	50

Abb. 3.13: Korrelation der SF-Werte mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoesefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	51
Abb. 3.14: Darstellung der HFE-Mutationen.....	53
Abb. 3.15: Korrelation der HFE-Mutationen mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen im Knochenmark vor HSZT	55
Abb. 3.16: Korrelation der HFE Mutationen mit dem gesamten Makrophagengehalts an der Hämatopoesefläche im Knochenmark vor HSZT	57
Abb. 3.17: Korrelation der HFE Mutationen mit den SF-Werten vor HSZT	58
Abb. 3.18: Überlebensfunktion Rückfallfreie Mortalität (NRM), gruppiert nach SF-Werten (blau: SF < 3000 ng/ml; grün: SF > 3000 ng/ml).	63
Abb. 3.19: Graphische Darstellung der Überlebenszeit (OS), gruppiert nach SF-Werten (blau: SF < 3000 ng/ml; grün: SF > 3000 ng/ml)	64

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Internationaler Prognose-Score revidiert (IPSS-R) zur Risikostratifikation bei MDS	3
Tab. 1.2:	Internationaler Prognose-Score revidiert (IPSS-R) zur Risikostratifizierung bei MDS	3
Tab. 1.3:	Internationaler Prognose-Score revidiert (IPSS-R) zur Risikostratifikation bei MDS	4
Tab. 1.4:	WHO-basiertes Prognostic-Scoring-System (WPSS) zur Risikostratifizierung bei MDS.....	4
Tab. 1.5:	WHO-basiertes Prognostic-Scoring-System (WPSS) zur Risikostratifizierung bei MDS.....	4
Tab. 1.6:	Parameter zur Risikoabschätzung gemäß des AMLCG-SAL-Risiko-Scores	10
Tab. 1.7:	Morphologische Einordnung basierend auf der FAB-Klassifikation	11
Tab. 1.8:	WHO-Klassifikation, aktualisiert 2008 (Vardiman 2009).....	12
Tab. 1.9:	Empfehlungen des European LeukemiaNet zur standardisierten Einteilung der akuten myeloischen Leukämien in zytogenetische und molekulare Risikogruppen (ohne akute Promyelozytenleukämie); validiert bis zu einem Alter von 60 Jahren.....	13
Tab. 1.10:	Kategorien der akuten und chronischen GvHD nach NIH-Konsens	30
Tab. 1.11:	Risikoklassifizierung der chronischen GvHD nach NIH-Konsens	30
Tab. 2.1:	Klinische Parameter und Laborwerte des Patientenkollektivs CRP < 5 mg/l	30
Tab. 2.2:	Klinische Parameter und Laborwerte des Patientenkollektivs mit CRP > 5 mg/l.	31
Tab. 2.3:	Einteilung des Eisengehaltes bei Knochenmarksbiopsien.....	34
Tab. 3.1:	Korrelation der verabreichten EKs mit den serologisch ermittelten SF-Werten vor HSZT	37
Tab. 3.2:	Korrelation zwischen verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	38
Tab. 3.3:	Darstellung der Anzahl der verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT.....	38
Tab. 3.4:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT.....	39
Tab. 3.5:	Korrelation zwischen verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	40
Tab. 3.6:	Darstellung der Anzahl der verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT.....	40
Tab. 3.7:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT.....	41

Tab. 3.8:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	42
Tab. 3.9:	Korrelation der Anzahl der verabreichten EKs mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoese­fläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	43
Tab. 3.10:	Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	44
Tab. 3.11:	Darstellung der SF-Werte und des intrazellulären Eisengehalts in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	45
Tab. 3.12:	Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	46
Tab. 3.13:	Korrelation der SF-Werte mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT; 1. - 3. Quartil vs. 4. Quartil	46
Tab. 3.14:	Korrelation der SF-Werte mit der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien vor HSZT gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5. Die Fälle, bei denen keine SF-Werte vorlagen, sind als "fehlend" gekennzeichnet	46
Tab. 3.15:	Darstellung der SF-Werte und der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	47
Tab. 3.16:	Korrelation der SF-Werte mit dem Ausmaß der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	47
Tab. 3.17:	Korrelation der SF-Werte mit dem Ausmaß der interstitiellen Eisenablagerung in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT; 1. - 3. Quartil vs. 4. Quartil	48
Tab. 3.18:	Die Korrelationen der SF-Werte mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	50
Tab. 3.19:	Die Korrelationen der SF-Werte mit dem Makrophagengehalt an der Hämatopoese­fläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	51
Tab. 3.20:	Korrelation der HFE Mutationen mit dem intrazellulären Eisengehalt in den Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	53
Tab. 3.21:	Korrelation der HFE-Mutationen mit dem intrazellulären Eisengehalt in Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	53
Tab. 3.22:	Korrelation der HFE-Mutationen mit der interstitiellen Eisenablagerung in Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	54
Tab. 3.23:	Korrelation der HFE-Mutationen mit der interstitiellen Eisenablagerung in Knochenmarksbiopsien gemäß dem Grading nach Abschnitt 2.5 vor HSZT	54
Tab. 3.24:	Korrelation der HFE-Mutationen mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen im Knochenmark vor HSZT	54
Tab. 3.25:	Korrelation der HFE-Mutationen mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen im Knochenmark vor HSZT	55
Tab. 3.26:	Korrelation der HFE-Mutationen wt und hetH63D mit den eisenbeladenen CD68 ⁺ /CD68 ⁺ -Makrophagen im Knochenmark vor HSZT	56
Tab. 3.27:	Korrelation der HFE Mutationen mit dem gesamten Makrophagengehalt an der Hämatopoese­fläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	57

Tab. 3.28: Korrelation der HFE Mutationen mit dem gesamten Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	57
Tab. 3.29: Korrelation der HFE Mutationen wt + hetH63D mit dem gesamten Makrophagengehalt an der Hämatopoeseefläche in den Knochenmarkbiopsien vor HSZT	57
Tab. 3.30: Korrelation der Fälle mit HFE-Mutationen mit den SF-Werten vor HSZT	57
Tab. 3.31: Korrelation der HFE Mutationen mit den SF-Werten vor HSZT	58
Tab. 3.32: Übersicht der Korrelationen akute und chronische GvHD, rückfallfreie Mortalität und Überlebenszeit	60
Tab. 3.33: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten GvHD	60
Tab. 3.34: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten Darm GvHD	60
Tab. 3.35: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten Haut GvHD	61
Tab. 3.36: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer akuten Leber GvHD	61
Tab. 3.37: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen GvHD	61
Tab. 3.38: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen Haut GvHD	61
Tab. 3.39: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen Darm GvHD	62
Tab. 3.40: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen Leber GvHD.....	62
Tab. 3.41: Übersicht über die Anzahl aller Patienten mit Auftreten einer chronischen GvHD weiterer Organe	62
Tab. 3.42: Tabellarische Darstellung der rückfallfreien Mortalität.....	63
Tab. 3.43: Tabellarische Darstellung der SF-Werte und deren Gruppierung.....	63
Tab. 3.44: Tabellarische Darstellung der verarbeiteten Fälle und Gruppierung nach SF-Werten.....	64
Tab. 3.45: Tabellarische Darstellung der Überlebenszeit nach SF-Werten gruppiert	64

Literaturverzeichnis

- Adams, P.C., 2006. Review article: the modern diagnosis and management of haemochromatosis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(12), pp.1681–1691.
- Alexander, J. & Kowdley, K.V., 2009. HFE-associated hereditary hemochromatosis. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 11(5), pp.307–313.
- Andrews, N.C., 2008. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 112(2), pp.219–230.
- Appelbaum, F.R., 1996. The use of bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 46(3), pp.142–164.
- Appelbaum, F.R.F. et al., 2006. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(9), pp.3481–3485.
- Armand, P. et al., 2007. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood*, 109(10), pp.4586–4588.
- Atkinson, K.K., 1990. Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 5(4), pp.209–226.
- Aul, C., Giagounidis, A. & Germing, U., 2010. Myelodysplastische Syndrome. *Der Internist*, 51(2), pp.169–184.
- Aul, C.C., Bowen, D.T.D. & Yoshida, Y.Y., 1997. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 83(1), pp.71–86.
- Baldomero, H. et al., 2011. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone marrow transplantation*, 46(4), pp.485–501.
- Beelen, D.W.D. et al., 1999. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood*, 93(10), pp.3267–3275.
- Boeckh, M.M. et al., 2003. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood*, 101(2), pp.407–414.
- Buchholz, S. & Ganser, A., 2009. Hämatopoetische Stammzelltransplantation. *Der Internist*, 50(5), pp.572–580.
- Cabantchik, Z.I.Z. et al., 2005. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best practice & research. Clinical haematology*, 18(2), pp.277–287.
- Carreras, E.E. et al., 1998. Incidence and outcome of hepatic veno-occlusive disease after blood or marrow transplantation: a prospective cohort study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. European Group for Blood and Marrow Transplantation Chronic Leukemia Working Party. *Blood*, 92(10), pp.3599–3604.

- CAZZOLA, M., 2005. Role of ferritin and ferroportin genes in unexplained hyperferritinaemia. *Best practice & research. Clinical haematology*, 18(2), pp.251–263.
- Cheson, B.D. et al., 2003. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 21(24), pp.4642–4649.
- Cordell, J.L. et al., 1984. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 32(2), pp.219–229.
- Cutler, C.C. et al., 2001. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 19(16), pp.3685–3691.
- Deeg, H.J., 2009. GLAL_A_414638 1566..1572 . pp.1–8.
- Deeg, H.J.H., 2007. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*, 109(10), pp.4119–4126.
- Dimopoulos, M. et al., 2007. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 357(21), pp.2123–2132.
- Döhner, H. et al., 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), pp.453–474.
- Eisfeld, A.-K. et al., 2012. Kinetics of iron removal by phlebotomy in patients with iron overload after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *American journal of blood research*, 2(4), pp.243–253.
- Estey, E.E. et al., 1997. Effect of diagnosis (refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation, or acute myeloid leukemia [AML]) on outcome of AML-type chemotherapy. *Blood*, 90(8), pp.2969–2977.
- Ferrara, J.L. et al., 2009. Graft-versus-host disease. *The Lancet*, 373(9674), pp.1550–1561.
- Fiegl, M. & Hiddemann, W., 2012. Risikoadaptierte Therapie der akuten myeloischen Leukämie. *Der Internist*, 53(4), pp.392–399.
- Flaten, T.P.T. et al., 2012. Iron mobilization using chelation and phlebotomy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3), pp.127–130.
- Fleming, R.E., 2005a. Orchestration of Iron Homeostasis — NEJM. *New England Journal of Medicine*.
- Fleming, R.E., 2005b. Orchestration of Iron Homeostasis. pp.1–4.
- Flowers, M.E.D. et al., 2008. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 112(7), pp.2667–2674.
- Flowers, M.E.D., Lee, S. & Vogelsang, G., 2003. Re: chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 9(8), p.540.
- Gale, R.P. & Horowitz, M.M., 1990. Graft-versus-leukemia in bone marrow transplantation.

- The Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone marrow transplantation*, 6 Suppl 1, pp.94–97.
- Gale, R.P., Touraine, J.L. & Lucarelli, G., 1985. *Fetal liver transplantation*,
- Ganz, T.T. & Nemeth, E.E., 2006a. Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(2), pp.G199–G203.
- Ganz, T.T. & Nemeth, E.E., 2006b. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), pp.10–10.
- Gattermann, N. et al., 2012. Hematologic responses to deferasirox therapy in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 97(9), pp.1364–1371.
- Gehrke, S.G.S. et al., 2003. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. *Blood*, 102(1), pp.371–376.
- Germing, U. et al., 2013. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Deutsches Ärzteblatt international*, 110(46), pp.783–790.
- Germing, U. et al., 2012. Survival, prognostic factors and rates of leukemic transformation in 381 untreated patients with MDS and del(5q): a multicenter study. *Leukemia*, 26(6), pp.1286–1292.
- Gluckman, E.E. et al., 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine*, 321(17), pp.1174–1178.
- Gratwohl, A. et al., 1998. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1996. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone marrow transplantation*, 22(3), pp.227–240.
- Greenberg, P. et al., 1997. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes.
- Greenberg, P.L., 2010. Current therapeutic approaches for patients with myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*, 150(2), pp.131–143.
- Greenberg, P.L.P. et al., 2012. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), pp.2454–2465.
- Greinix, H.T. et al., 1998. Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 92(9), pp.3098–3104.
- Gurion, R. et al., 2010. 5-azacitidine prolongs overall survival in patients with myelodysplastic syndrome--a systematic review and meta-analysis. *Haematologica*, 95(2), pp.303–310.
- Guyatt, G.H. et al., 1990. Diagnosis of iron-deficiency anemia in the elderly. *The American journal of medicine*, 88(3), pp.205–209.
- Haase, D., 2002. *Untersuchungen zur Biologie von myelodysplastischen Syndromen und sekundären akuten myeloischen Leukämien - Bedeutung für Pathogenese und*

Erkrankungsverlauf, Cuvillier Verlag.

- Haberland, J. et al., 2006. Die zukünftige Entwicklung des Krebsgeschehens in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 49(5), pp.459–467.
- Haferlach, T.T. et al., 2003. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2), pp.256–265.
- Holler, E. et al., 1995. Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F). *Blood*, 86(3), pp.890–899.
- Jamshidi, K. & Swaim, W.R., 1971. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 77(2), pp.335–342.
- Kaatsch, P., 2004. Das Deutsche Kinderkrebsregister im Umfeld günstiger Rahmenbedingungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 47(5), pp.437–443.
- Kanda, J., Kawabata, H. & Chao, N.J., 2011. Iron overload and allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Expert review of hematology*, 4(1), pp.71–80.
- Kansu, E.E., 2012. Thrombosis in stem cell transplantation. *Hematology*, 17 Suppl 1, pp.S159–S162.
- Kataoka, K. et al., 2009. Influence of pretransplantation serum ferritin on nonrelapse mortality after myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 15(2), pp.195–204.
- Kitagawa, M., Kamiyama, R. & Kasuga, T., 2009. Increase in number of bone marrow macrophages in patients with myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology*, 51(1), pp.56–58.
- Kröger, N. et al., 2013. Allogeneic stem cell transplantation for older advanced MDS patients: improved survival with young unrelated donor in comparison with HLA-identical siblings. *Leukemia*, 27(3), pp.604–609.
- Ljungman, P., 1998. Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 21 Suppl 2, pp.S72–4.
- Löwenberg, B., Downing, J.R. & Burnett, A., 1999. Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*, 341(14), pp.1051–1062.
- M Schaich, G.E., 2008. *8.1 Chemotherapie der akuten myeloischen Leukämie*, MMP-Verlag.
- Mahindra, A. et al., 2009. Elevated pretransplant ferritin is associated with a lower incidence of chronic graft-versus-host disease and inferior survival after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *British journal of haematology*, 146(3), pp.310–316.

- Malcovati, L. et al., 2007. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 25(23), pp.3503–3510.
- Maradei, S.C. et al., 2009. Serum ferritin as risk factor for sinusoidal obstruction syndrome of the liver in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 114(6), pp.1270–1275.
- Maurillo, L. et al., 2013. Treatment of acute myeloid leukemia with 20-30% bone marrow blasts. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 5(1), p.e2013032.
- McClune, B.L. et al., 2010. Effect of age on outcome of reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for older patients with acute myeloid leukemia in first complete remission or with myelodysplastic syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 28(11), pp.1878–1887.
- Miyawaki, S. et al., 2005. A randomized, postremission comparison of four courses of standard-dose consolidation therapy without maintenance therapy versus three courses of standard-dose consolidation with maintenance therapy in adults with acute myeloid leukemia: the Japan Adult Leukemia Study Group AML 97 Study. *Cancer*, 104(12), pp.2726–2734.
- Mohamedali, A. & Mufti, G.J., 2009. Van-den Berghe's 5q- syndrome in 2008. *British journal of haematology*, 144(2), pp.157–168.
- n, O.R. et al., 2000. Faster engraftment of neutrophils and platelets with peripheral blood stem cells from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*, 25 Suppl 2, pp.S6–S8.
- Nimer, S.D., 2008. Myelodysplastic syndromes. *Blood*, 111(10), pp.4841–4851.
- O'Donnell, M.R. et al., 2011. Acute Myeloid Leukemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 9(3), pp.280–317.
- Paulin, T.T. et al., 1987. Variables predicting bacterial and fungal infections after allogeneic marrow engraftment. *Transplantation*, 43(3), pp.393–398.
- Pavletic, S.Z.S. et al., 2006. Chronic graft-versus-host disease: implications of the National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials. In *Bone Marrow Transplantation*. pp. 645–651.
- Petrides, P.E., 2007. *Springer-Lehrbuch* G. Löffler, P. E. Petrides, & P. C. Heinrich, eds., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Platzbecker, U. et al., 2008. Red blood cell transfusion dependence and outcome after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with de novo myelodysplastic syndrome (MDS). *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 14(11), pp.1217–1225.
- Pullarkat, V., 2010. Iron overload in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Advances in hematology*, 2010.
- Pullarkat, V. et al., 2008. Iron overload adversely affects outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 42(12), pp.799–805.
- Richman, C.M., Weiner, R.S. & Yankee, R.A., 1976. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood*, 47(6), pp.1031–1039.

- Schaich, M., 01.07.2008. 3.1 *Epidemiologie*,
<http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52389/e52390/>
- Schaich, M., 01.07.2008. 8.1 *Chemotherapie der Akuten myeloischen Leukämie*
<http://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53189/>
- Shander, A. & Sazama, K., 2010. Clinical consequences of iron overload from chronic red blood cell transfusions, its diagnosis, and its management by chelation therapy. *Transfusion*, 50(5), pp.1144–1155.
- Silbernagl, S., 2012. *Taschenatlas Physiologie*, Georg Thieme Verlag, pp. 94-96.
- Spada, P.L. et al., 2009. Iron, zinc and aluminium ferritin content of hemodialysis hyperferritinemic patients: comparison with other hyperferritinemic clinical conditions and normoferritinemic blood donors. *Clinical biochemistry*, 42(16-17), pp.1654–1657.
- Steinberg, M.H. et al., 2009. *Disorders of Hemoglobin*, Cambridge University Press.
- Strasser, S.I. et al., 1998. Iron overload in bone marrow transplant recipients. *Bone marrow transplantation*, 22(2), pp.167–173.
- Stumpf, J.L., 2007. Deferasirox. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 64(6), pp.606–616.
- Swinkels, D.W. et al., 2006. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clinical Chemistry*, 52(6), pp.950–968.
- Takkunen, H., 1976. Iron deficiency in the Finnish adult population. *Scandinavian journal of haematology. Supplementum*, 25, pp.1–91.
- Tefferi, A.A., 2009. Myelodysplastic Syndromes. pp.1–14.
- Tefferi, A.A. & Vardiman, J.W.J., 2009. Myelodysplastic syndromes. *Audio, Transactions of the IRE Professional Group on*, 361(19), pp.1872–1885.
- Vardiman, J.W.J. et al., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Audio, Transactions of the IRE Professional Group on*, 114(5), pp.937–951.
- Vardiman, J.W.J., Harris, N.L.N. & Brunning, R.D.R., 2002. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), pp.2292–2302.
- Vaulont, S.S. et al., 2005. Of mice and men: the iron age. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), pp.2079–2082.
- Visser, O. et al., 2012. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*, pp.1–10.
- Weber, D.M. et al., 2007. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *The New England journal of medicine*, 357(21), pp.2133–2142.
- Zaia, J.A.J., 2002. Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 29(8), pp.633–638.

Publikations-/Präsentationsverzeichnis

Posterpräsentation auf dem 16ten Kongress der European Hematology Association (EHA) in London vom 09.-12. Juni 2011

Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2011 in Basel vom 30. September - 4. Oktober 2011

Eigenständigkeitserklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Konstanz, den 23.12.2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mac K'.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Christian Wittekind danke ich für die Erlaubnis, die vorliegende Arbeit am Zentrum für Pathologie, insbesondere in den Räumen der Hämatopathologie durchführen zu können und für den umfassenden Zugriff auf die Patientendaten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser für die Übernahme der Dissertation. Durch ihre ständige Motivation ihr grenzenloses Engagement und ihre jahrelange Geduld, hat sie den entscheidenden Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Ebenso möchte ich Frau Dr. med. Haifa Kathrin Al-Ali für ihre immer freundliche und kompetente Unterstützung in der Hämatologie danken.

Prof. Dr. Niederwieser möchte ich für die gute Zusammenarbeit zwischen der Hämatologie und der Pathologie danken, ohne diese, wäre die Dr. Arbeit nicht entstanden.

Herrn Dr. Krahl bin ich dankbar für die wertvolle Unterstützung bei den statistischen Berechnungen, die ohne ihn in diesem Umfang nicht möglich gewesen wären.

Auch danke ich dem ganzen Pathologie-Team, die bei der Erstellung der Immunhistochemischen Färbungen und der zusätzlich benötigten Schnitte behilflich waren. Und mich während der Wartezeiten mit netten geschichtlichen Hintergründen zu versorgen wussten.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Ärzten der beteiligten Kliniken, die die Patienten dieser Dissertation therapierten und betreuten und welche die Erfassung der klinischen und hämatologischen Daten erst ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Marc Höppner
Geburtsdatum: 11. Januar 1984
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: röm. kath.
Familienstand: ledig
Eltern: Frank Höppner,
Dorothea Liselotte Oeffelke, geb. Wieser
Anschrift: Mainaustr. 41
78464 Konstanz

Schulbildung:

1990 – 1994 Katholische Grundschule, Bischof von Ketteler, Essen
1994 – 2003 Bischöfliches Gymnasium am Stoppenberg, Essen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

2003 – 2004 Notfallambulanz, St. Vincenz Krankenhaus, Menden

Berufsausbildung:

2004 – 2005 Ausbildung zum Operationstechnischen Assistenten,
Huysenstift Kliniken Essen-Mitte

Hochschulausbildung:

2005 – 2007 Philipps Universität Marburg
09/2007 1. Staatsexamen, Marburg
2007 – 2008 Universität Leipzig
2008 – 2009 Universität Salamanca, Spanien
2009 – 2012 Universität Leipzig
05/2012 2. Staatsexamen, Leipzig

Berufstätigkeit:

10/2012 – 08/2013 Assistenzarzt in der Inneren Medizin des St. Josephs-
Hospitals in Warendorf
Seit 01.10.2013 Assistenzarzt in der Abteilung für Visceral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie im Klinikum Konstanz

Konstanz, den 23.12.2013

