

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll)**

**Einfluss von Rituximab auf die
akute Graft-versus-Host-Reaktion nach allogener
Stammzelltransplantation**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)**

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von **Vincent Manuel Schütte**
geboren am **26.10.1983** in **Halle/Saale**

Betreuer: PD Dr. med. G. Behre

Gutachter:

1. PD Dr. med. G. Behre
2. Prof. Dr. med. F. Griesinger (Göttingen)

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 02.06.2009

Verteidigung: 04.02.2010

B-Lymphozyten sind bei der Vermittlung chronischer T-zellulärer Auto- und Alloimmunreaktionen, wie zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose, an zentraler Stelle beteiligt. B-Zellen scheinen eine größere Rolle als bisher angenommen auch bei akuten GvH-Reaktionen zu spielen. Rituximab ist der erste für therapeutische Zwecke zugelassene chimäre Antikörper. Er richtet sich spezifisch gegen das CD20-Antigen und depletiert zuverlässig B-Zellen. In den letzten Jahren hat sich Rituximab unter anderem als effektive Therapie der steroidrefraktären chronischen GvH bewährt. Die vorgelegte Studie untersucht den Einfluss von Rituximab auf die akute GvH. Des Weiteren werden Daten zur Generierung von Hypothesen über mögliche Pathomechanismen vorgestellt.

Es wurden 34 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei allen wurde im Zeitraum von Juli 2005 bis Februar 2007 eine allogene HSZT im Universitätsklinikum Halle durchgeführt. Die GvH-Prophylaxe bestand bei allen Patienten aus Ciclosporin A und Mycophenolat Mofetil bzw. Ciclosporin A und Methotrexat. 17 Patienten erhielten Rituximab in ihrer Konditionierung. Nur bei drei dieser Patienten ist aGvH aufgetreten (17.6%). Ohne Rituximab lag die aGvH-Rate bei 82.3% (14/17; $p < 0,01$). Berücksichtigt man lediglich aGvH II-IV° ergab sich eine Rate von 52,9% (9/17; $p = 0,03$). Wenn Patienten Rituximab und ATG in der Konditionierung zusammen erhielten ($n = 10$), war die aGvH-Rate sogar bei 0% (0/10). In der Vergleichsgruppe „ATG ohne Rituximab“ ($n = 17$) waren es zehn aGvH-Fälle (58.8%; $p < 0,01$) bzw. fünf mit aGvH II-IV° (29,4%; $p < 0,01$). Das Odds Ratio für aGvH nach Rituximabtherapie lag bei 0,043, während es im direkten Vergleich für ATG bei 0,94 lag. Patienten mit Rituximab hatten weniger Monocyten und B-Lymphozyten nach der Transplantation. Die CD8⁺ T-Zell-Rekonstitution war beschleunigt. Die Leukozytenbildung war ebenfalls verbessert bei gleichzeitig verringerten Thrombozytenzahlen in der Rituximabgruppe.

Die Wirkung von Rituximab gegen aGvH stellt diese Arbeit deutlich dar. Schon jetzt ist davon auszugehen, dass Rituximab mit ATG in der Konditionierung vor allogenen HSZT eine noch wirkungsvollere aGvH-Prophylaxe ist als ATG allein. Über die genaue Pathogenese dieses Effektes kann in dieser Arbeit nur spekuliert und muss in größeren Studien geklärt werden.

Schütte, Vincent: Einfluss von Rituximab auf die akute Graft-versus-Host-Reaktion nach allogener Stammzelltransplantation.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 65 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Graft-versus-Host-Erkrankung	1
1.1.1. Allgemeine Pathogenese	1
1.1.2. Immunologische Pathogenese	2
1.1.3. Klinik	6
1.1.4. Prophylaxe und Behandlung der GvH	7
1.1.5. GvL oder GvH	8
1.2. Allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen	9
1.3. Rituximab	11
1.3.1. Indikationen	12
1.3.2. Pharmakokinetik und Wirkung	13
1.3.3. Nebenwirkungen	14
2. ZIELSETZUNG	15
3. PATIENTEN UND METHODEN	16
3.1. Fragestellungen	16
3.2. Studiendesign	16
3.3. Datenerhebung	17
3.3.1. Patientencharakteristika	17
3.3.2. Patientencharakteristika: Rituximab	18
3.3.3. Patientencharakteristika: ATG & Rituximab gegen ATG	19
3.3.4. Patientencharakteristika: aGvH	20
3.3.5. Transplantatanalyse	22
3.3.6. Die transplantierten Zellmengen bei Patienten, die mit und ohne Rituximab behandelt worden sind, wiesen keine signifikanten Unterschiede auf	22
3.3.7. Lymphozytenregeneration nach Transplantation	26
3.3.8. Blutbildanalyse	26
3.3.9. Infektionen	27
3.4. Statistik	27
3.4.1. Streupunktdiagramme (Lymphozytenregeneration nach Tx)	27
3.4.2. Boxplots (tx Zellmenge vs. aGvH-Inzidenz)	28
3.4.3. Logistische Regression	28
4. ERGEBNISSE	29
4.1. Rituximab reduziert die Inzidenz von aGvH	29
4.2. Rituximab nach der Transplantation reduziert die Inzidenz von aGvH	30

4.3. Die Inzidenz der aGvH wird durch eine Kombination aus Rituximab und ATG reduziert	31
4.4. Logistische Regression: Im direkten Vergleich senkt Rituximab das aGvH-Risiko wesentlich stärker als ATG	32
4.5. Immunrekonstitution nach Rituximabtherapie: Patienten, die mit Rituximab behandelt worden sind, hatten eine schnellere CD3⁺/CD8⁺-Rekonstitution	32
4.5.1. CD3 ⁺ -Zellen regenerieren bei Patienten mit Rituximab schneller	33
4.5.2. CD3 ⁺ /CD4 ⁺ -Zellen zeigen keinen Unterschied bei Patienten mit R.	33
4.5.3. CD3 ⁺ /CD8 ⁺ -Zellen regenerieren bei Patienten mit Rituximab schneller	34
4.5.4. CD16 ⁺ /CD56 ⁺ -Rekonstitution ist bei Patienten mit Rituximab geringer	35
4.5.5. CD19 ⁺ /CD20 ⁺ -Rekonstitution ist bei Patienten mit Rituximab gehemmt	35
4.6. Unspezifisches Immunsystem nach der Transplantation: Vergleich der Patienten mit Rituximab gegen Patienten ohne Rituximab	36
4.6.1. Bei Patienten mit Rituximab war die Monozytenzahl verringert	36
4.6.2. Bei Patienten mit Rituximab war die Leukozytenzahl höher	37
4.6.3. Bei Patienten mit Rituximab war die Thrombozytenzahl reduziert	38
4.7. Bei Patienten, die eine aGvH hatten, wurden durchschnittlich mehr CD34⁺ HSZ transplantiert	39
4.7.1. Bei Patienten mit einer aGvH wurden mehr CD34 ⁺ transplantiert	39
4.7.2. Die transplantierten Mengen von CD3 ⁺ -Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied	40
4.7.3. Die transplantierten Mengen von CD3 ⁺ /CD4 ⁺ -Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied	41
4.7.4. Die transplantierten Mengen von CD3 ⁺ /CD8 ⁺ -Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied	41
4.7.5. Die transplantierten Mengen von CD16 ⁺ /CD56 ⁺ -Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied	42
4.7.6. Die transplantierten Mengen von CD19 ⁺ /CD20 ⁺ -Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied	43
4.8. CD3⁺/CD8⁺ Lymphozyten erhöhen das Risiko einer aGvH	43
4.9. Rituximab hat den größten Einfluss auf das aGvH-Risiko	44
4.10. Bei verwandten Spendern tritt wesentlich häufiger aGvH auf	45
5. DISKUSSION	46
5.1. Rituximab oder ATG?	46
5.2. Welche Wirkung hat Rituximab auf andere Zelltypen abgesehen von CD20⁺?	48
5.2.1. Adaptives Immunsystem	48
5.2.2. Angeborene Immunität	49

5.3. Warum korreliert die Menge von HSZ im Transplantat mit dem aGvH-Risiko?	50
5.4. Sollte ATG und R. generell als aGvH-Prophylaxe indiziert werden?	51
6. SCHLUSSFOLGERUNG	53
Literaturverzeichnis:	54
Anhang:	59
<i>THESEN:</i>	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Stadieneinteilung von GvH nach Glucksberg	7
Tab. 2: Gruppencharakteristika für Rituximab in der Konditionierung	19
Tab. 3: Gruppencharakteristika für ATG mit und ohne Rituximab in der Konditionierung	20
Tab. 4: Gruppencharakteristika hinsichtlich aGvH	21
Tab. 5: Mit Rituximab in der Konditionierung tritt weniger aGvH auf	29
Tab. 6: Es tritt weniger aGvH auf, wenn Rituximab in der Konditionierung oder später (aber vor den ersten GvH-Symptomen) gegeben wurde	30
Tab. 7: Rituximab senkt das relative Risiko für aGvH stärker als ATG	32
Tab. 8: T-Zellen erhöhen das Risiko der aGvH am stärksten	44
Tab. 9: Rituximab reduziert das relative Risiko für aGvH am stärksten	45
Tab. 10: Patientencharakteristika	59
Tab. 10: Fortsetzung	60
Tab. 11: Infektionen im Zusammenhang mit GvH	61
Tab. 12: Rituximab nach der Transplantation mit Beginn der aGvH	62
Tab. 13: Rituximab (vor / während / nach der Konditionierung) und ATG	63
Tab. 14: GvH in Abhängigkeit zum Spender-Status	64

Abkürzungsverzeichnis:

a / cGvH	akute / chronische GvH
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zellen
ATG	Antithymozytenglobulin
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie-Virus
CR	komplette Remission
CTL	zytotoxische T-Zelle
CVP	Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison
EBV / EB-Virus	Epstein-Barr-Virus
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse, Durchflußzytometrie
G-CSF	Granulozyten - koloniestimulierender Faktor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen - koloniestimulierender Faktor
GvH	Graft-versus-Host
GvL	Graft-versus-Leukämie
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HWZ	Halbwertszeit
IBMTR	International Bone Marrow Transplantation Registry
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KI	Karnofsky-Index
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
KMT	Knochenmarktransplantation
KO	Körperoberfläche
mAk	monoklonaler Antikörper

Max.	Maximum
MCL	Mantelzell-Lymphom
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
MiHA	Minor Histokompatibilitätsantigen
Min.	Minimum
MM	Multipl. Myelom
MMF	Mycophenolat Mofetil
Mmrd	mismatched-related donor
Mmud	mismatched-unrelated donor
Mrd	matched-related donor
Mud	matched-unrelated donor
MW	Mittelwert
n.v.	nicht verfügbar
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NW	Nebenwirkung
OS	Gesamtüberleben
PBSZT	Periphere Blutstammzelltransplantation
PD	progrediente Erkrankung
PR	partielle Remission
PTLD	post-transplantationsassoziierte Lymphozyten-Proliferationsstörung
R	Rituximab
SAA	schwere aplastische Anämie
SZT	Stammzelltransplantation
TBI	Ganzkörperbestrahlung
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	Tumor-Wachstumsfaktor beta
TH	T-Helferzelle
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor alpha
Treg	regulatorische T-Zelle
TRM	behandlungsassoziierte Mortalitätsrate
Tx / tx	Transplantation / transplantiert
UCBT	Nabelschnurblutstammzelltransplantation

1. Einleitung

1.1. Graft-versus-Host-Erkrankung

Nicht nur bei vielen hämatologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel akuten myeloischen³⁷ und lymphatischen³⁵ Leukämien, sondern auch bei soliden Tumoren¹⁵ und benignen Krankheiten stellt die allogene Stammzelltransplantation (SZT) eine wichtige kurative Therapiemöglichkeit dar. Die gefährlichste Komplikation nach einer solchen Transplantation ist die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvH). Sie ist die Hauptursache für die Transplantations-assoziierte Mortalität (treatment related mortality, TRM) und stellt damit eine der zentralen Herausforderungen in der SZT dar. Die akute GvH hat eine Mortalität von 15 bis 40 Prozent⁴⁰.

Entdeckt und nachgewiesen wurde die GvH Anfang der sechziger Jahre unter anderem durch van Bekkum in Experimenten mit bestrahlten Mäusen. Man infundierte diesen Mäusen allogene Knochenmark- und Milzzellen und stellte fest, dass die Tiere nicht an den Strahlenschäden sondern vielmehr an einer „secondary disease“⁴⁶ verstarben, die sich in Entzündungen bis hin zu Nekrosen der Haut-, Leber- und Gastrointestinaltraktzellen zeigte. Zur gleichen Zeit formulierte Billingham⁶ drei Voraussetzungen für eine GvH-Reaktion. Erstens müssen immunkompetente Zellen (T-Zellen) im Transplantat enthalten sein. Zweitens muss der Empfänger ein supprimiertes Immunsystem haben, da dieses sonst im Rahmen einer normalen Immunreaktion die fremden Zellen sofort angreifen und abstoßen würde. Und drittens müssen die Zellen des Empfängers Oberflächenantigene exprimieren, die sich von denen des Spenders unterscheiden. Auch heute noch haben diese Thesen Bestand.

1.1.1. Allgemeine Pathogenese

Die Menge der reifen T-Lymphozyten im Transplantat korreliert direkt mit dem Auftreten von GvH²¹, was die Hypothese, dass T-Zellen die Haupteffektorzellen bei einer GvH-Reaktion sind, nahe legt. Nach der Transplantation befinden sich die T-Zellen des Spenders im Körper des Empfängers, der Major- und Minor-Histokompatibilitätsunterschiede zum Spender aufweist. Diese Antigene werden von den T-Zellen des Spenders als fremd erkannt. Die Erkennung läuft über die

Vermittlung durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) ab, zu denen hauptsächlich dendritische Zellen und Monozyten aber auch B-Lymphozyten zählen. Vorwiegend präsentieren dabei die Empfänger-APC den Spender-T-Zellen Antigene auf MHC-Molekülen. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) bindet direkt an die jeweiligen MHC-Moleküle und eine Signalkaskade aktiviert die T-Zellen. $CD4^+$ T-Helfer-Zellen binden an Klasse-II MHCs und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen an Klasse-I MHCs. Die zytotoxischen T-Zellen attackieren direkt die „fremden“ Zellen und zerstören sie. Diese Reaktion ist die direkteste und schnellste. T-Helfer-Zellen greifen die erkannten antigenbeladenen Zellen nicht direkt an, sondern setzen Zytokine frei, aktivieren dadurch Makrophagen sowie Granulozyten und lösen so eine generalisierte Entzündungsreaktion aus, die sich dann als Graft-versus-Host-Reaktion manifestiert.

1.1.2. Immunologische Pathogenese

Die Entstehung der GvH wird nach einem Modell von Reddy und Ferrara in drei Phasen unterteilt³³:

- Phase 1: Aktivierung der Empfänger-APC
- Phase 2: Aktivierung, Differenzierung und Migration der Spender-T-Zellen
- Phase 3: Effektorphase (s. *Abb. 2*)

Die *erste Phase* ist eine Reaktion des Immunsystems, die vor der Transplantation stattfindet. Durch die intensiven Konditionierungsmaßnahmen, die aus Ganzkörperbestrahlung (TBI), Chemotherapie oder aus einer Kombination dieser beiden Elemente bestehen, werden nicht nur immunkompetente Zellen eradiziert und das Immunsystem supprimiert sondern auch erhebliche epitheliale Zellschädigungen hervorgerufen. Dies führt zu einer Zytokinfreisetzung, besonders von $TNF-\alpha$ und IL-1, welche proinflammatorisch wirken und zu einer Aktivierung der APC beitragen. Je aggressiver die gewählte Konditionierung ausfällt, desto größer ist auch der epitheliale Schaden und das Risiko der GvH¹⁷. Mit zunehmender Intensität der Konditionierung steigt die Menge dieser Zytokine, die im Blut gemessen worden sind, deutlich stärker an. Während der Aktivierung der APC werden nicht nur

inflammatorische Zytokine freigesetzt, sondern auch die HLA-Moleküle auf der Oberfläche der APC vermehrt exprimiert.

Die HLA (*humane Leukozytenantigene*), auch MHC-Antigene („major histocompatibility complex“) genannt, sind spezifische Oberflächenantigene, die auf nahezu allen kernhaltigen Zellen zu finden sind und einen sehr hohen Polymorphismus aufweisen. Sie werden in Klasse I und II eingeteilt. Bei allogenen Transplantationen hat die HLA-Kompatibilität einen besonders hohen Einfluss auf die Inzidenz von GvH und das Gesamtüberleben (Overall-Survival, OS). Mit steigender Zahl an HLA-mismatches steigen auch das GvH- und das Mortalitätsrisiko signifikant an²⁷.

Die entscheidenden Zellen, die die *zweite Phase* der GvH auslösen, sind die Spender-T-Lymphozyten, welche mit dem Transplantat in den Empfänger transplantiert werden. Zwar werden auf diesem Weg auch APC des Spenders übertragen, aber hauptsächlich sind es die vorher schon aktivierten Empfänger-APC, die mit den T-Zellen interagieren. Die T-Zellen bekommen sowohl von den eigenen als auch von den allogenen APC Antigene präsentiert.

Die Aktivierung der T-Zellen basiert auf einer sehr komplexen Reihe von Signalen, die parallel und über mehrere Rezeptoren ablaufen (s. *Abb. 1*). Der bekannteste ist der TCR, welcher die MHC-Moleküle erkennt und daran bindet. Die CD4- bzw. CD8-Komponente der T-Helfer- (TH) bzw. Zytotoxischen-T-Lymphozyten (CTL) diskriminiert, an welche Art von MHC-Molekülen die Bindung erfolgen kann. Ist eine T-Zelle an ein entsprechendes MHC-Molekül gekoppelt, erkennt der TCR die auf die MHC-Moleküle geladenen Antigene und unterscheidet zwischen „fremd“ oder „eigen“. Da Spender-T-Lymphozyten von den APC des Empfängers präsentierte Peptide als „fremd“ erkennen würden, ist man natürlich stets bemüht, eine möglichst hohe HLA-Kompatibilität zu gewährleisten. Aber selbst bei einer nahezu vollständigen Major-Kompatibilität treten Reaktionen in Folge einer Fremderkennung auf. Dies ist auf weitere spezifische Moleküle zurückzuführen, die MiHAs (Minor-Histocompatibility-Antigens) genannt werden. Auch bei einem HLA-identischen Spender-Empfänger-Paar kann es zu GvH-Reaktionen kommen.

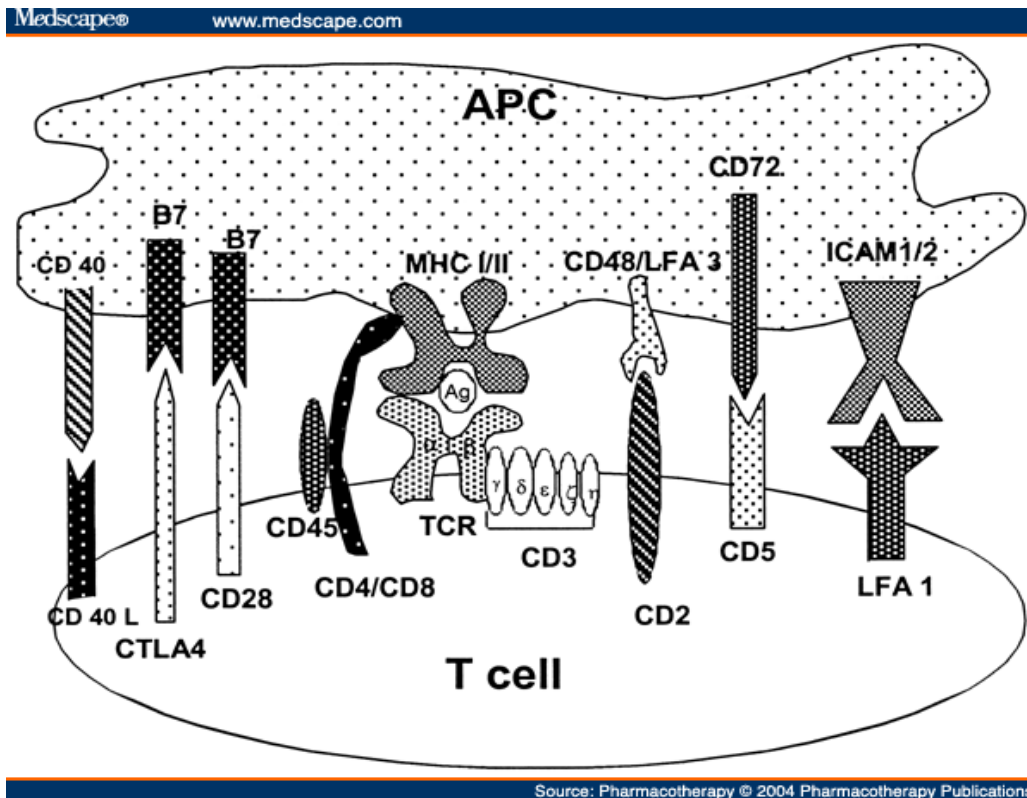


Abb. 1: T-Zellaktivierung

Zur endgültigen Aktivierung von T-Zellen sind kostimulatorische Moleküle nötig, die ebenfalls auf den Oberflächen der APC und der T-Zellen exprimiert werden (s. Abb. 1). Das zweite Signal, das nach der MHC-Erkennung stattfindet, wird von den Molekülen B7.1 und B7.2 (CD80 bzw. CD86, auf der Oberfläche der APC), die mit dem CD28-Molekül der T-Zellen interagieren, produziert. Ein weiteres wichtiges kostimulatorisches Molekül ist CD40, das sich ebenfalls auf der Oberfläche der APC befindetet, mit seinem zugehörigen Liganden auf der T-Zell-Oberfläche. Diese Bindung löst unter anderem eine Freisetzung von IL-12 aus, welche CD4⁺ Zellen in TH-1-Zellen proliferieren lässt, die CTL stimuliert und die Freisetzung von IFN- γ induziert. IFN- γ ist dabei nicht nur proinflammatorischer Mediator sondern auch ein direkter CTL-Aktivator. Die Antagonisierung der Bindung der CD80/86- sowie der CD40-Moleküle mindert die T-Zellaktivierung deutlich und verringert die Inzidenz schwerer GvH^{8,9}. Es werden hauptsächlich CTL und TH-1-Lymphozyten aktiviert, welche wiederum neben IFN- γ vor allem auch IL-2 und TNF- α ausschütten.

Die aktivierten T-Lymphozyten und die freigesetzten Transmitter führen danach in die *Effektor-Phase*, die dritte Phase nach Reddy und Ferrara. CTL, die

bereits Zielzellen (APC) erkannt haben und durch diese aktiviert worden sind, bewirken eine direkte Zerstörung dieser Zellen mittels Ausschüttung von Perforin und Granzym, die zuerst die Zellmembranen zerstören (bzw. „perforieren“) und danach Apoptose induzieren. TH-1-Lymphozyten hingegen bewirken über $\text{IFN-}\gamma$ eine zusätzliche Aktivierung und Rekrutierung von CTL. Ebenfalls durch $\text{IFN-}\gamma$ werden Makrophagen rekrutiert und eine allgemeine proinflammatorische Reaktion getriggert. $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ regulieren zu dem noch die Expression von Fas-Rezeptoren auf vielen Zellen hoch. IL-2 dagegen stimuliert das Wachstum weiterer T-Zellen. Dadurch können diese T-Zellen mit ihren Fas-Liganden an diese Zellen binden und über eine direkte zytotoxische Wirkung Apoptose einleiten. Diese Art von T-Zellinteraktion und Gewebeschädigung findet sich besonders häufig bei der GvH der Leber und der Haut^{44,48}. Die GvH des Gastrointestinaltraktes wird vermutlich durch $\text{TNF-}\alpha/\text{TNF-Rezeptor}$ vermittelte Apoptose bewirkt¹¹. Die stimulierten Makrophagen setzen $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 frei und verstärken dadurch auch die Immunreaktion.

Die Effektorphase stellt zusammengefasst einen sehr effektiven Synergismus von angeborenem und erworbenem Immunsystem, getriggert und gesteuert durch eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen, dar.

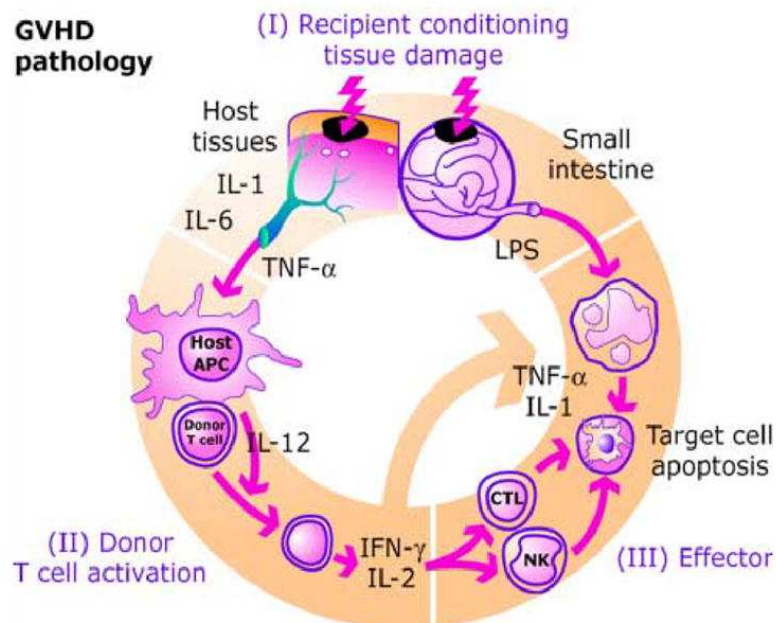


Abb. 2: 3-Phasenmodell der Graft-versus-Host-Erkrankung;

(I) Aktivierung der Empfänger-APC durch Konditionierung, (II) Aktivierung, Differenzierung und Migration der Spender-T-Zellen, (III) Effektorphase³³

1.1.3. Klinik

„GvH“ ist meistens eine klinische Diagnose. Die klassischerweise betroffenen Organe sind Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt (GIT). Die Patienten klagen meist über ein unangenehmes Jucken und Spannen der Haut, verbunden mit einer zunehmenden Rötung, die sich zu einer ausgeprägten makulopapulösen Dermatitis entwickeln kann. Die ersten Symptome können überall am Körper auftreten, häufig sind dabei die Hand- und Fußflächen involviert. Die GvH des GIT macht sich in Form von akuten Durchfällen, Erbrechen, Übelkeit, bis hin zu intestinalen Blutungen (entspricht intestinaler GvH Grad IV nach Glucksberg) bemerkbar. Falls es nach einer Transplantation zu einem Bilirubin-Anstieg kommt, muss man differentialdiagnostisch von einer GvH der Leber ausgehen. Eine atypische GvH der Leber zieht in der Regel einen Anstieg der Serumtransaminasen nach sich¹. Es können aber es müssen keinesfalls alle genannten Organsysteme gemeinsam betroffen sein. Insgesamt sind die Symptome einer GvH unspezifisch und bedürfen einer genauen Differentialdiagnose, um daraus eine sichere GvH-Diagnose zu erheben.

Differentialdiagnosen der GvH sind insbesondere Virusinfektionen (z.B. CMV, Parvovirus B19, Hepatitiden), allergische Reaktionen, unter anderem auf Medikamente (Antibiotika), und medikamentös-toxische Geschehen. Um das zu differenzieren, wird bei entsprechendem Verdacht eine Biopsie des betroffenen Gewebes entnommen und ein pathologisches Gutachten erstellt. Die Biopsie ist jedoch keine Voraussetzung für die Diagnose oder gar Therapie einer GvH.

Man unterscheidet zwischen einer akuten (aGvH) und einer chronischen (cGvH) Form. Dabei ist klassischerweise der Zeitpunkt des Auftretens der GvH entscheidend. Man bezeichnet landläufig eine GvH, die bis einschließlich zum 100. Tag nach einer Transplantation aufgetreten ist, als „akut“ und alle anderen als „chronisch“. Durch die inzwischen zu verzeichnende Vielzahl an Konditionierungsschemata ist diese Unterscheidung aber aufgeweicht worden und es treten häufig auch nach Tag 100 GvH-Erkrankungen auf, deren Reaktionsmuster klinisch und histologisch dem einer akuten GvH entspricht. Diese Konstellation wird auch als chronische GvH mit akutem Reaktionsmuster bezeichnet. Die aGvH ist wesentlich häufiger als die cGvH.

Zur Einteilung des Schweregrades einer GvH benutzt man seit langem die Glucksberg-Seattle-Kriterien, welche die Erkrankung in vier Grade nach der Organbeteiligung klassifizieren (0-IV). Eine neuere Methode ist das Staging nach der Vereinbarung der IBMTR (International Bone Marrow Transplantation Registry), die sich auf ähnliche Parameter stützt. Die Einteilung erfolgt hier in die Indices 0-D und legt eine etwas differenziertere Wichtung der Symptome an den jeweiligen Organen zugrunde. Momentan sind beide Schemata gängig, wenn auch dem IBMTR-Staging ein höherer prädiktiver Wert im Bezug auf Outcome und Mortalitätsrate beigemessen wird^{19,28}.

Tab. 1: Stadieneinteilung von GvH nach Glucksberg;
Einteilung nach Ausmaß der Organbeteiligung von Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt¹⁹.

Stadium	Haut	Leber (Bilirubin)	GIT (Diarrhoe/Tag)
0	kein Erythem	< 2 mg/dl	< 500 ml/Tag oder dauerhafte Übelkeit
1	Makulopapulöses Erythem < 25% KO	2–3 mg/dl	500–999 ml/Tag
2	Makulopapulöses Erythem 25 – 50% KO	3.1–6 mg/dl	1000–1500 ml/Tag
3	Makulopapulöses Erythem > 50% KO	6.1–15 mg/dl	Adulte: >1500 ml/Tag
4	generalisiertes Erythem / bullöse Erscheinungen	>15 mg/dl	starker abdomineller Schmerz mit/ohne Ileus
Grad			
I	Stadium 1–2	Keine	Keine
II	Stadium 3 oder	Stadium 1 oder	Stadium 1
III	-	Stadium 2–3 oder	Stadium 2–4
IV	Stadium 4 oder	Stadium 4	-

1.1.4. Prophylaxe und Behandlung der GvH

Die Kombination des Calcineurininhibitors Ciclosporin mit dem Antimetaboliten Methotrexat oder mit Mycophenolat Mofetil ist der Goldstandard in der Prophylaxe der GvH. Die Standardbehandlung einer GvH, die trotz der genannten Immunsuppression auftritt, sind Steroidgaben. Die steroidrefraktäre GvH hat eine sehr schlechte Prognose. Es existiert keine etablierte Therapie gegen diese Verlaufsform. Einige Versuche sind mit verschiedenen Antikörpern unternommen

worden, die nicht den durchschlagenden Erfolg erzielen konnten. Viel versprechenderes Potential scheint aber zum Beispiel Mycophenolat Mofetil zu besitzen^{23,41}. Am wirkungsvollsten zeigte sich die Interventionstherapie, die darauf beruht, die GvH in den drei Phasen (s. *oben*) ihrer Entstehung gezielt zu blockieren und dadurch aufzuhalten oder zumindest zu reduzieren.

Die Aktivierungsphase versucht man zu minimieren, indem man heute vermehrt dosisreduziert konditioniert. Das vermindert den Zellschaden im Empfänger und trägt zu einer geringeren Aktivierung der APC bei. Der zweite Weg, in dieser Phase zu intervenieren, besteht in einer bewussten Gabe von Spender-NK-Zellen die ein KIR-mismatch gegen den Empfänger aufweisen, was dazu führt, dass dessen APC eliminiert werden noch bevor sie mit den T-Zellen interagieren können^{39,47}.

Die zweite Phase bietet weitaus mehr Ansatzpunkte. Gut untersucht sind die positiven Effekte einer gezielten Blockierung der kostimulatorischen Signale bei der T-Zell-Aktivierung, wie zum Beispiel CD28 oder CD40^{7,8}. Ein weiteres Ziel stellt die Unterdrückung des IL-2 dar, welches maßgeblich an der Expansion einer GvH beteiligt ist. Zur Verfügung stehen dafür beispielsweise Cyclosporin, Tacrolimus und monoklonale Antikörper - sowohl gegen das Interleukin selbst als auch gegen seinen Rezeptor (Basiliximab und Daclizumab). Auch mit den zwei immunsuppressiven Zytokinen IL-10 und TGF- β konnte man die aGvH verringern^{4,24}.

Die Rolle von TNF- α für die Effektor-Phase der aGvH wurde als eine der ersten hypothetisiert und genauer untersucht. Mittlerweile gibt es schon Phase I und II Studien, die mit entsprechenden Antagonisten, wie Infliximab oder Etanercept, eine deutliche GvH-Reduktion erzielen konnten¹⁶.

Besteht eine aktuelle GvH, ist davon auszugehen, dass alle drei Phasen parallel ablaufen. Daher hat es sich als am effektivsten erwiesen, die GvH mit einer Kombinationstherapie aus diesen Interventions-Möglichkeiten zu behandeln.

1.1.5. GvL oder GvH

Die GvH ist nicht von ihren positiven und erwünschten Effekten zu trennen. Diese nennt man Graft-versus-Leukämie-Effekte (GvL). Der Mechanismus entspricht in den Grundprinzipien denen der GvH und bezieht sich auf die tumorattackierende Wirkung alloreaktiver Lymphozyten. Die T-Lymphozyten und NK-Zellen, die die gesunden Zellen des Empfängers angreifen und eine GvH auslösen, erkennen und

vernichten auch die Zellen des Tumors. Es ist erwiesen, dass mit einer totalen Eliminierung oder Inaktivierung der T-Zellen zwar die GvH-Inzidenz drastisch gesenkt werden kann, aber dass sich in Folge dessen auch die progressionsfreie Überlebensrate verringert²⁶. Das Gleiche gilt auch direkt auf die GvH bezogen. Horowitz hat die Bedeutung der akuten und chronischen GvH für das rezidivfreie Überleben verdeutlicht (Abb. 3). Die Mechanismen dieser beiden Krankheitsbilder sind seit langem Bestand aktueller Forschung. Das Ziel ist, sie voneinander zu trennen, damit in Zukunft die GvH bei gleich bleibendem GvL-Effekt unterbunden werden kann.

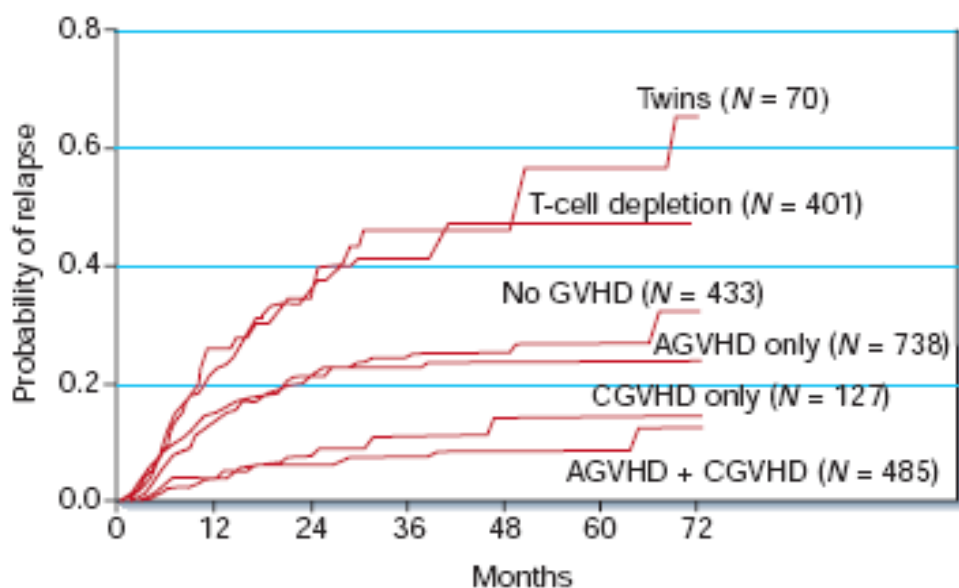


Abb. 3: Rezidivrate nach allogener Knochenmarktransplantation;

Die Rezidivrate ist bei den Patienten, die sowohl akute als auch chronische GvH (AGVHD + CGVHD) bekommen hatten, am niedrigsten. Im Vergleich dazu war sie höher, wenn keine klinische GvH aufgetreten ist (No GVHD) und am höchsten nach Verwendung von T-Zell-depletierten Transplantaten (T-cell depletion)¹⁸.

1.2. Allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

Für viele Erkrankungen des blutbildenden Systems, wie zum Beispiel akute myeloische und akute lymphatische Leukämien, stellt eine allogene Stammzelltransplantation oft, je nach Krankheitsstadium und Risikoprofil, die einzige kurative Therapieoption dar.

Stammzellen der Blutbildung bei Erwachsenen befinden sich im Knochenmark. Die Quelle hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) ist heute hauptsächlich das periphere Blut nach Mobilisation der Stammzellen mit Wachstumsfaktoren. Es werden aber auch Knochenmarktransplantate hergestellt. Desweiteren wird verstärkt die Möglichkeit der Transplantation von Nabelschnurblut (Umbilical cord blood transplantation, UCBT) genutzt.

Die Knochenmarkspende ist das invasivere Verfahren, dass in heutiger Zeit immer weniger angewandt wird. Einem Spender werden in Vollnarkose aus dem Bereich der Spinae iliacae posteriores etwa ein bis maximal anderthalb Liter Knochenmarkaspirat entnommen. Dies wird anschließend von Knochen- und Markpartikeln gereinigt, gegebenenfalls aufbereitet (zum Beispiel von Erythrozyten oder Plasma zur Verhinderung von ABO-Inkompatibilitätsreaktionen depletiert) und danach dem Empfänger als Transfusion zugeführt. Bei der PBSZT wird mittels Zytokinstimulation (G-CSF, GM-CSF u.a.) die Mobilisierung der für den Oberflächenmarker CD34 positiven hämatopoetischen Stammzellen in das periphere Blut induziert. Mittels Leukapherese kann man diese Zellen gezielt aus dem Blut per Zentrifugation sortieren. Für 200 Milliliter Transplantat werden etwa fünf Liter Blut prozessiert. Ein Transplantat beinhaltet häufig sogar 600 Milliliter. Die Übertragung an den Empfänger erfolgt ebenfalls per Transfusion. Der Vorteil der PBSZT liegt vor allem in der leichteren Gewinnung, da es keiner Vollnarkose bedarf und der Vorgang ohne Narkoserisiko mehrmals wiederholt werden kann. Außerdem kann man schon mit der Leukapherese eine wesentlich höhere Konzentration von CD34⁺ Zellen erzielen und danach durch Separation sogar noch einzelne Bestandteile aussortieren. Bei der Separation werden mit immunologischen und medikamentösen Methoden bestimmte Zelltypen, wie T- oder B-Zellen, depletiert oder angereichert. Die Lagerung und Konservierung eines solchen Transplantats ist in der Regel unproblematisch. Aber besonders die raschere Regeneration der Hämatopoese des Empfängers im Gegensatz zu einer klassischen Knochenmarktransplantation macht die PBSZT zusätzlich überlegen (ca. 4 : 2 Wochen)². Die Rate der akuten GvH ist nach PBSZT geringfügig höher als nach KMT⁵. Die Transplantation von Nabelschnurblut nach Kryokonservierung ist noch an ihrem Anfang. Obwohl in einer Nabelschnur nur wenig CD34⁺ Stammzellen vorhanden sind, scheint die Regeneration nach Transplantation nicht langsamer abzulaufen.

Vor jeder Transplantation allogener Blutstammzellen muss eine Konditionierung des Empfängers stattfinden. Die besteht meist aus TBI und / oder Chemotherapie und darauf folgender medikamentöser Immunsuppression. Das gewährleistet eine deutliche bis maximale Tumorreduktion und eine minimierte Immunantwort zwischen den Zellen des Empfängers und dem allogenen Transplantat.

1.3. Rituximab

Der monoklonale Antikörper (mAk) Rituximab wurde als eine der ersten überhaupt für therapeutische Zwecke in der Hämatologie zugelassen. Seine Entwicklung begann schon im Jahre 1979 durch den amerikanischen Hämatologen Lee M. Nadler, der damals den ersten rein CD20-bindenden Antikörper herstellte. Rituximab, das unter den Handelsnamen Mabthera® (Europa) und Rituxan® (USA) vertrieben wird, ist ein chimärer anti-CD20 Antikörper. Das bedeutet, dass nur die variable Region dem ursprünglich murinen Antikörper (anti-CD20) entstammt und der Rest aus einem humanen IgG-Molekül genommen wurde. Ein Vorteil des Konzepts der chimären Antikörper liegt darin, dass weniger Immunreaktionen und damit weniger anaphylaktische Reaktionen auf den künstlichen Antikörper selbst erwartet werden.

Das CD20-Antigen ist hochspezifisch für die B-Zellen in fast allen Entwicklungsstadien. Lediglich die pro-B-Lymphozyten und die Plasmazellen (terminal differenzierte B-Zellen) weisen kein CD20 auf. Dadurch ist Rituximab im Prinzip ein Anti-B-Zell-Agens. Aus in vitro Experimenten sind drei wesentliche Reaktionswege postuliert worden³¹:

1. komplementvermittelte Zytotoxizität
2. Antikörper-induzierte zellvermittelte Zytotoxizität
3. Induktion von Apoptose

In vivo ist aber vermutlich der erste Punkt am häufigsten anzutreffen³¹.

1.3.1. Indikationen

Rituximab ist indiziert bei Erkrankungen, in denen es zu einer Überproduktion bzw. Entartung von B-Zellen kommt oder in denen autoimmune Prozesse zugrunde liegen. Getestet und zugelassen wurde es zuerst für die Behandlung von CD20⁺ Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Die Therapie erfolgt als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie (z.B. CVP- oder CHOP-Schema). Neben der hohen Bedeutung in der Primärtherapie diverser NHL zeigt Rituximab auch bei refraktären und nicht-chemosensiblen Lymphomen eine hohe Wirkung. Außerdem findet Rituximab immer mehr Anwendung bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Eine Kombination mit Methotrexat (MTX) hat sich besonders bei rheumatoider Arthritis als wirkungsvoll erwiesen³⁶.

Daneben gibt es noch diverse *off-label*-Anwendungen von Rituximab. Einige wichtige im Rahmen von Transplantationen sind die Behandlung von Posttransplantationsassoziierten Lymphozyten-Proliferationsstörungen (PTLD), Prävention und Behandlung von Transplantatabstoßung sowie steroidrefraktärer chronischer GvH¹² und die Therapie von Infektionen, wie zum Beispiel mit dem Epstein-Barr-Virus.

Eine *PTLD* stellt eine schwere und typische Komplikation nach jeglicher Art von Organtransplantation dar. Ursächlich dafür ist eine starke endogene und exogene Immunsuppression. Das EB-Virus spielt in der Entstehung solcher Lymphozyten-Proliferationsstörungen eine zentrale Rolle. Die Symptome dieser Erkrankung sind sehr unspezifisch, was ihre Diagnose und Abgrenzung gegen andere Entitäten erschwert. Sie können sich in latenter Mononukleose, Lymphadenopathie oder einfachen Zytopenien äußern. Oft führt eine *PTLD* zu einem Transplantatversagen, das klinisch als eine (vorgetäuschte) Transplantatabstoßung imponiert. Nicht selten manifestiert sich eine *PTLD* auch in diffuser GvH⁴³.

Das *Epstein-Barr-Virus (EBV)* gehört zur Gruppe der Herpesviren und führt zu einer der häufigsten Infektionen, die während immunsuppressiver Perioden auftreten. Das Virus bindet an den CD21-Rezeptor der B-Zellen und benutzt diese Zellen, um sich zu reproduzieren und sein eigenes Genom zu verbreiten. In einem gesunden Organismus verlaufen solche Infektionen meist klinisch unauffällig, da die T-Zellen die fremden Proteine auf den B-Zellen schnell erkennen und diese Zellen vernichten.

In seltenen Fällen, meist bei T-Zelldefekten oder Patienten unter Immunschwäche, kann sich die Primärinfektion jedoch auch als Pfeiffersches Drüsenfieber bzw. infektiöse Mononukleose zeigen. Im Falle einer normalen Infektion geht das Virus nach der Immunreaktion der T-Zellen in eine Latenzphase über, in der es sich „versteckt“ in den B-Zellen aufhält und erst wieder beginnt sich zu reproduzieren, sobald der Wirtsorganismus eine Immunschwächephase aufzeigt. Das EBV zeigt außerdem eine onkogene Potenz. In manchen Zellen führt es zu einer malignen Transformation, die zu einem B-Zell-Lymphom führen kann (= Burkitt-Lymphom)³⁴. Das Risiko einer EBV-Infektion bei allogenen transplantierten Patienten besteht hauptsächlich in der Auslösung einer PTLD oder sogar einer GvH, was jeweils zum Transplantatversagen führen kann. Eine mögliche und in manchen Zentren angewandte Therapie ist hier, der oben beschriebenen Logik folgend, die Rituximabgabe²². Es kommen ferner diverse Virustatika (Cidofovir, Foscarnet) zur Anwendung. Diese Strategie ist aber durch ihr hohes Nebenwirkungsspektrum, vor allem die Nephrotoxizität, limitiert.

1.3.2. Pharmakokinetik und Wirkung

Rituximab wird in Dosen von 100-1000, am häufigste aber in einer Dosis von 375 mg/m² KO per Infusion verabreicht. Schon nach der ersten Dosis ist wird die Zahl der B-Zellen im Körper drastisch verringert. Als günstig hat sich der Effekt erwiesen, dass dabei die Antikörper-produzierenden Plasmazellen mangels CD20 nicht eliminiert werden. Die IgG-Konzentration im Serum bleibt also vorerst konstant und die Immundefizienz gering. Nach zirka drei Zyklen wurde bei mehr als 80% der Patienten eine vollständige Depletion erzielt, die etwa sechs bis neun Monate bestehen blieb. Rituximab konnte durchschnittlich drei bis sechs Monate nach der Anwendung noch im Serum nachgewiesen werden. Die Serumverfügbarkeit unmittelbar nach der Therapie zeigte einen direkten negativen Zusammenhang zur absoluten Menge der B-Zellen, unabhängig ob tumoröser Genese oder physiologisch vorhandene. Nach etwa sechs Monaten setzte die B-Zell-Regeneration ein. Nach rund einem Jahr war in den meisten Fällen die ursprüngliche Konzentration wiederhergestellt^{31,45}.

1.3.3. Nebenwirkungen

Nebenwirkungen (NW) von Rituximab sind hauptsächlich mit der ersten Infusion assoziiert. Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit, Urtikaria, Bronchospasmen und Dyspnoe traten am häufigsten auf. Zur Reduktion der NW werden vor oder mit der Infusion ein Antipyretikum und ein Antihistaminikum verabreicht. Bei NHL gibt man zusätzlich noch Glukokortikoide. Sollten dennoch Reaktionen dieser Art auftreten, ist die Unterbrechung der Infusion bzw. Anpassung der Infusionsgeschwindigkeit indiziert³¹. Es herrscht keine Einigkeit über die Richtung der Beeinflussung der Infektneigung von Lymphompatienten oder transplantierten Patienten. Eine amerikanische Studie, in der Patienten mit einem NHL nach AIDS – Erkrankung mit R-CHOP versus CHOP behandelt wurden, zeigte eine erhöhte Infektneigung in dem Rituximab-Arm²⁰. Dies wurde in folgenden Studien jedoch nicht bestätigt und retrospektiv auf niedrige CD4⁺ Zellzahlen der entsprechenden Patienten zurückgeführt¹⁰. Man geht davon aus, dass AIDS-Patienten mit Lymphom und einer nur moderat erniedrigten CD4⁺ Zellzahl von einer Chemotherapie in Kombination mit Rituximab profitieren. In einer Studie, in der Rituximab gegen Rheumatoide Arthritis angewandt wurde¹³, zeigte sich kein Unterschied in der Infektionsinzidenz zwischen den Armen. In vitro Untersuchungen zeigten eine erhaltene Immunität gegen EBV nach Rituximabtherapie³⁰. Zusammengefasst lässt dies vermuten, dass ein T-Zell-Defekt neben der B-Zell-Depletion nötig ist, um zu einer erhöhten Infektionsinzidenz zu führen.

2. Zielsetzung

Diese retrospektive Untersuchung schließt 34 Patienten, die zwischen Juli 2005 und Februar 2007 eine allogene Stammzelltransplantation im Uni-Klinikum Halle erhalten haben, ein. Primäres Endziel dieser Untersuchung ist das „Auftreten von aGvH“.

Als Haupteinflussgrößen wurden Rituximab, Art der Konditionierung, Zusammensetzung der Transplantate, Alter und körperliche Verfassung der Patienten erfasst.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob Rituximab einen Einfluss auf die Inzidenz der aGvH hat. Für den Fall eines positiven Ergebnisses soll Rituximab mit den anderen Variablen verglichen werden. Auch die Suche nach möglichen Pathomechanismen wurde darin eingeschlossen.

Abschließend soll durch diese Arbeit ein möglicher Ausblick geliefert werden, welchen Stellenwert Rituximab in der KMT und analog eventuell in der Therapie autoimmuner T-Zell-vermittelter Erkrankungen zuzuordnen ist und in wie weit weitere Untersuchungen in dieser Richtung sinnvoll wären.

3. Patienten und Methoden

3.1. Fragestellungen

Welchen Einfluss hat Rituximab auf die aGvH-Inzidenzrate nach allogener Knochenmarktransplantation bzw. PBSZT?

Hat Rituximab auch vor oder nach der Transplantation noch einen Effekt auf aGvH?

Wie wirkt sich die Kombination aus Rituximab und ATG auf die Inzidenz von aGvH aus?

Was beeinflusst die aGvH mehr: Rituximab oder ATG?

Wie beeinflusst Rituximab die Entstehung von aGvH?

Hat Rituximab einen Effekt auf die Rekonstitution von Lymphozyten und NK-Zellen nach der Transplantation?

Beeinflusst Rituximab die Rekonstitution anderer immunkompetenter Zellen nach der Transplantation?

Welche Bedeutung hat die Menge von HSZ, Lymphozyten und NK-Zellen im Transplantat auf die Häufigkeit von aGvH?

Wie ist der Einfluss von Rituximab auf aGvH im direkten Vergleich zum Karnofsky-Index, Gewicht, Alter, ATG und TBI zu bewerten?

Wie sind die Unterschiede bei Familien- und Fremdspendertransplantationen in Bezug auf die aGvH-Inzidenz?

Korreliert das Auftreten von aGvH-Episoden mit Infektionen, wie z.B. EBV, CMV oder Parvo-Virus B19?

Treten bei Patienten unter Rituximabtherapie häufiger Infektionen mit EBV, CMV oder Parvo-Virus B19 auf?

3.2. Studiendesign

Diese Arbeit ist eine monozentrische retrospektive Untersuchung nach den Daten der KMT des Universitätsklinikums Halle. Die Gruppen wurden nach der jeweiligen GvH-Inzidenz verglichen. Die Gruppe der exponierten Personen hat Rituximab in der Konditionierung erhalten und die Vergleichsgruppe nicht.

3.3. Datenerhebung

3.3.1. Patientencharakteristika

Für meine Untersuchung sind mir sämtlich Patientenakten und Behandlungsprotokolle der Patienten, die eine allogene Knochenmarktransplantation bzw. PBSZT am KMT-Zentrum der Uni-Halle bekommen haben, zur Verfügung gestellt worden.

Im Zeitraum von Juli 2005 bis Februar 2007 sind 34 Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, allogent transplantiert worden.

Einschlusskriterien:

- Mindestens eine allogene Stammzelltransplantation (KMT / PBSZT)
- Mindestens 30 Tage follow-up nach Transplantation

Ausschlusskriterien:

- unvollständige Dokumentation
- Zeitraum der Nachsorge weniger als 30 Tage

Von den Patienten waren 22 männlich sowie 12 weiblich. Sie befanden sich im Alter von 22 bis 70 Jahren (MW = 56). Der mittlere Beobachtungszeitraum war 218 Tage ab Transplantation (Median = 156 Tage), wobei der längste 556 und der kürzeste 32 Tage betragen. Zu den Grunderkrankungen gehörten AML (n=7), CLL (n=6), NHL (n=5), MM (n=7), ALL (n=4), MCL (n=3) sowie MDS (n=2). Nach dem Karnofsky-Index war der Zustand der Patienten zwischen 60 bis 100% (MW = 85%).

In 17 Fällen konnte eine aGvH diagnostiziert werden. In einem Fall gab es eine cGvH. Die Diagnose ist nach Möglichkeit durch histologische Befunde sowie anhand der klinischen Symptomatik erstellt worden. 14 Patienten der Studie sind während dieses Zeitraums verstorben und acht davon schon vor dem 80. Tag nach Transplantation.

Alle Patienten haben mindestens eine allogene Transplantation erhalten. Die Standardkonditionierung bestand aus TBI (0 – 12 Gy), Fludarabine (60 – 120 mg/kg) und ATG (0 – 60 mg/kg). Zur GvH-Prophylaxe wurden Cyclosporin A und Methotrexat oder Cyclosporin A und MMF gegeben. Nach der Transplantation

erreichten 14 Patienten komplette Remission (CR), 13 partielle Remission (PR) und bei sieben Patienten zeigte sich ein Progress (PD). s. *Tabelle 10, Anhang*

3.3.2. Patientencharakteristika: Rituximab

13 Patienten erhielten Rituximab als Element ihrer Konditionierung und 21 nicht. Das mittlere Alter in beiden Gruppen war jeweils bei 56 Jahren und der durchschnittliche Zustand war nahezu gleich (84 zu 86% nach KI). Jedoch war die Geschlechterverteilung sehr ungleich (eine Frau erhielt Rituximab in der Konditionierung bei 12 Männern). In der Gruppe, deren Konditionierung kein Rituximab enthielt, war es mit 10 Männern und 11 Frauen jedoch recht ausgeglichen. Die mit Rituximab konditionierten Patienten erhielten eine geringfügig höhere Strahlendosis (5,8 Gy) als die ohne Rituximab konditionierten (3,2 Gy). Die Verteilung von ATG differierte mit 20 zu 26,5 mg/kg nur marginal. Nach der Transplantation konnte in der Gruppe 1 (mit Rituximab) zu 23% CR und zu 61% PR erzielt werden – in Gruppe 2 (ohne Rituximab) dagegen 52% bzw. 24%. Der größte Unterschied besteht neben der Geschlechtsverteilung im durchschnittlichen follow-up-Intervall. Mit 265 Tagen ist Gruppe 2 deutlich länger beschrieben worden als die Vergleichsgruppe (= 143 Tage; Mediane = 243 bzw. 83 Tage).

Zudem fiel auf, dass sechs Patienten in Gruppe 1 schon vor dem 80. Tag nach Transplantation verstorben sind. In Gruppe 2 waren es nur zwei Patienten. Obwohl aGvH mit einem Auftreten bis zum 100. Tag nach Transplantation definiert ist, tritt sie meistens schon in den ersten 40 Tagen auf. Daher sollten diese frühen Todesfälle nur einen unwesentlichen Einfluss auf meine Auswertung haben.

Tabelle 2: Gruppencharakteristika für Rituximab in der Konditionierung

Angegeben sind Mittelwerte (Alter, KI, TBI, ATG, Follow-Up) bzw. absolute und relative Häufigkeiten (Spender-, Remissions-Status sowie Todesfälle vor dem 80. Tag nach Transplantation).

	Rituximab in Konditionierung	
	Nein (n=21)	Ja (n=13)
Alter bei Tx	56	56
♂ / ♀	10 / 11	12 / 1
Karnofsky-Index (%)	86	84
TBI	3,2	5,8
ATG (mg/kg KG)	26,5	20
Spender-Status	5x mrd (24%) 1x mmrd (5%) 12x mud (57%) 3x mmud (14%)	3x mrd (23%) 7x mud (54%) 3x mmud (23%)
Remissions-Status	11x CR (52%) 5x PR (24%) 5x PD (24%)	3x CR (23%) 8x PR (61%) 2x PD (16%)
Follow-Up (Tage)	265	143
Todesfälle < 80 Tage nach Tx	2	6

3.3.3. Patientencharakteristika: ATG & Rituximab gegen ATG

Vergleicht man die Patienten, die ATG mit (n = 10) und Patienten, die ATG ohne Rituximab (n = 17) in der Konditionierung erhalten haben, fällt auf, dass das durchschnittliche Transplantationsalter fast gleich ist (59 bzw. 58 Jahre). Der KI ist im Mittel ebenfalls ausgeglichen (83 bzw. 85%). Die Geschlechtsverteilung ist in der Gruppe mit Rituximab deutlich zu Gunsten der Männer verschoben (9 : 1). In der anderen Gruppe ist bei acht Frauen und neun Männern ein ausgeglicheneres Verhältnis. Die TBI war für Patienten der Gruppe mit Rituximab im Durchschnitt höher als in der Gruppe ohne Rituximab (6,0 bzw. 2,5 Gy). In beiden Gruppen gab es je drei Fremdspendertransplantationen mit HLA-mismatches (mmud). Hauptsächlich wurden aber HLA-passende Fremdspendertransplantationen (mud) vorgenommen (je 70% der Transplantationen). Besonders auffällig ist, dass der durchschnittliche

follow-up-Zeitraum der Gruppe mit Rituximab deutlich geringer war (127 gegen 296 Tage). Außerdem verstarben aus dieser Gruppe auch sechs Patienten schon in den ersten 80 Tagen nach der Transplantation. In der Gruppe ohne Rituximab war es nur einer.

Tabelle 3: Gruppencharakteristika für ATG mit und ohne Rituximab in der Konditionierung; angegeben sind Mittelwerte (Alter, KI, TBI, Follow-Up) bzw. absolute und relative Häufigkeiten (Spender-, Remissions-Status sowie Todesfälle vor dem 80. Tag nach Transplantation).

	ATG + Rituximab (n = 10)	ATG (n = 17)
Alter bei Tx	59	58
♂ / ♀	9 / 1	8 / 9
Karnofsky-Index (%)	83	85
TBI	6,0	2,5
Spender-Status	7x mud (70%) 3x mmud (30%)	1x mrd (6%) 1x mmrd (6%) 12x mud (70%) 3x mmud (18%)
Remissions-Status	3x CR (30%) 5x PR (50%) 2x PD (20%)	9x CR (53%) 4x PR (23,5%) 4x PD (23,5%)
Follow-Up (Tage)	127	296
Todesfälle < 80 Tage nach Tx	6	1

3.3.4. Patientencharakteristika: aGvH

Aus meinen Daten bot es sich an, nicht nur nach den Einflüssen der Medikamente auf die Inzidenz von aGvH zu blicken, sondern auch eine mögliche Rolle der Transplantatgrößen auf aGvH zu untersuchen. Dafür habe ich das Modell der Fall-Kontroll-Studie angewandt.

Für die Auswertung des Einflusses der Transplantatgröße auf die Inzidenzrate von aGvH, habe ich das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 (keine aGvH) zählt 16 und Gruppe 2 (aGvH aufgetreten) 17 Patienten. Ein Patient wurde ausgenommen, da dieser eine cGvH entwickelt hat und somit in dieser

Auswertung „außer Konkurrenz“ gewertet wird. Die Mittelwerte der Konditionierungsdosen von ATG und TBI sowie der durchschnittliche KI und das Alter sind in beiden Gruppen sehr ausgeglichen und zeigen nur einen sehr geringen Unterschied. Am Deutlichsten fällt auf, dass in Gruppe 2 nur drei Patienten (18%) Rituximab in der Konditionierung bekommen haben – in Gruppe 1 dagegen zehn Patienten (62,5%). Der zweite wichtige Unterschied der beiden Gruppen liegt im durchschnittlichen Transplantationsgewicht. Mit 81,3 kg waren die Patienten, die keine aGvH bekommen haben, im Mittel fast 10 kg schwerer als die der Vergleichsgruppe (72,3 kg).

Eine Differenz besteht auch in der Geschlechtsverteilung der beiden Gruppen. In Gruppe 1 waren drei weibliche bei 13 männlichen Fällen enthalten. Das Verhältnis in Gruppe 2 war mit acht zu neun ausgeglichener. Des Weiteren ist auch der durchschnittliche Beobachtungszeitraum (nach Transplantation) in Gruppe 2 deutlich größer als in Gruppe 1 (250 / 172 Tage).

Tabelle 4: Gruppencharakteristika hinsichtlich aGvH;

Angegeben sind Mittelwerte (Follow-Up, ATG, TBI, KI, Gewicht, Alter) bzw. absolute und relative Häufigkeiten (Geschlecht, Rituximab in Konditionierung); ein Patient wurde ausgeschlossen (cGvH).

	Akute GvH		
	Nein (16)	Ja (17)	gesamt
♂ / ♀	13 / 3	8 / 9	21 / 12
R. in Konditionierung (ja/nein)	10 (62,5%) / 6 (37,5%)	3 (18%) / 14 (82%)	13 / 20
Follow-Up (Tage)	172	250	218,5
ATG (mg/kg KG)	26,06	19,85	23,96
TBI	4,38	3,82	4,21
Karnofsky-Index (%)	85,00	85,88	85,29
Gewicht bei Tx (kg)	81,31	72,35	76,35
Alter bei Tx (Jahre)	58	54,5	56,21

3.3.5. Transplantatanalyse

Bei der Quantifizierung der Bestandteile der Transplantate in Bezug auf CD34⁺-HSZ sowie Lymphozytensubpopulationen (CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, CD16⁺/CD56⁺, CD19⁺/CD20⁺) standen mir die Daten aus den FACS-Analysen des interdisziplinären Hämatologischen Labors des Universitätsklinikums Halle zur Verfügung. Die Dokumentation der HSZ war für alle 34 Patienten vorhanden. Die Lymphozyten-Analyse lag bei 27 (CD3⁺) bzw. 25 Patienten (CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, CD16⁺/CD56⁺, CD19⁺/CD20⁺) vollständig vor.

Die Anzahl der transplantierten HSZ betrug im Mittel $7,5 \times 10^6$ Zellen / kg KG (bezogen auf den Empfänger) bei einem Wertebereich von $1,3 \times 10^6$ (Min.) bis $14,5 \times 10^6$ (Max.). [CD3⁺: MW = 2,6 / Min. = 0,16 / Max. = $10,9 \times 10^8$ Zellen; CD3⁺/CD4⁺: 1,7 / 0,1 / $7,9 \times 10^8$; CD3⁺/CD8⁺: 0,9 / 0,1 / $2,4 \times 10^8$; CD16⁺/CD56⁺: 0,5 / 0,02 / $1,9 \times 10^8$; CD19⁺/CD20⁺: 0,8 / 0,03 / $4,4 \times 10^8$] s. *Tabelle 10, Anhang*

3.3.6. Die transplantierten Zellmengen bei Patienten, die mit und ohne Rituximab behandelt worden sind, wiesen keine signifikanten Unterschiede auf

Um größere Unterschiede in der Zusammensetzung der Transplantate zwischen den Patienten, die mit bzw. die ohne Rituximab behandelt worden sind, auszuschließen, wurden die einzelnen Zelltypen in Bezug auf Rituximab gruppiert und verglichen. Dabei wurde deutlich, dass weder bei den CD34⁺ HSZ („mit Rituximab“ = 6,8; „ohne Rituximab“ = $7,7 \times 10^6$ Zellen / kg KG des Empfängers; $p > 0,05$) noch bei den CD3⁺- ($2,4$; $2,2 \times 10^8$; $p > 0,05$), CD3⁺/CD4⁺- ($1,5$; $1,3 \times 10^8$; $p > 0,05$), CD3⁺/CD8⁺- (je $0,9 \times 10^8$), CD16⁺/CD56⁺- (je $0,4 \times 10^8$) oder CD19⁺/20⁺- Lymphozyten ($0,5$; $0,7 \times 10^8$; $p > 0,05$) ein signifikanter Unterschied vorlag.

s. *Abb. 4 - 9*

Rituximab in Konditionierung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
CD34(+) 10 ⁶ /kg KG	Nein	20	7,7150	2,33057	,52113
	Ja	13	6,7877	4,67435	1,29643

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Signifikanz	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
CD34(+) 10 ⁶ /kg KG	Varianzen sind gleich	10,564	,003	,758	31	,454	,92731	1,22312	-1,567	3,42189

Abb. 4: Transplantierte CD34⁺ Zellmengen bei Patienten mit / ohne Rituximab waren ohne signifikanten Unterschied

Rituximab in Konditionierung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
CD3(+) 10 ⁸ /kg KG	Nein	15	2,37833	1,369663	,353646
	Ja	10	2,24100	1,542060	,487642

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Signifikanz	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
CD3(+) 10 ⁸ /kg KG	Varianzen sind gleich	,419	,524	,234	23	,817	,137333	,587708	-1,078	1,3531

Abb. 5: Transplantierte CD3⁺ Zellmengen bei Patienten mit / ohne Rituximab waren ohne signifikanten Unterschied

Rituximab in Konditionierung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
CD3/CD4(+) 10 ⁸ /kg KG	Nein	13	1,53277	1,003978	,278453
	Ja	10	1,32550	,909565	,287630

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Signifikanz	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
CD3/CD4(+) 10 ⁸ /kg KG	Varianzen sind gleich	,006	,939	,511	21	,615	,207269	,405752	-,6365	1,0511

Abb. 6: Transplantierte CD3⁺/CD4⁺ Zellmengen bei Patienten mit / ohne Rituximab waren ohne signifikanten Unterschied

Rituximab in Konditionierung		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
CD3/CD8(+) 10 ⁸ /kg KG	Nein	13	,88215	,487208	,135127
	Ja	10	,85140	,632345	,199965

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	Df	Signifikanz	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
CD3/CD8(+) 10 ⁸ /kg KG	Varianzen sind gleich	,785	,386	,132	21	,896	,030754	,233060	-,4539	,5154

Abb. 7: Transplantierte CD3⁺/CD8⁺ Zellmengen bei Patienten mit / ohne Rituximab waren ohne signifikanten Unterschied

	Rituximab in Konditionierung	N	<u>Mittelwert</u>	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
CD19(+) 10 ⁸ /kg KG	Nein	13	,54231	,391855	,108681
	Ja	10	,71230	,431426	,136429

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifi- kanz	T	Df	<u>Signif ikanz</u>	Mittlere Differenz	Standard- fehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
CD19(+) 10 ⁸ /kg KG	Varianzen sind gleich	,293	,594	-,987	21	,335	-,169992	,172153	-,5280	,1880

Abb. 8: Transplantierte CD19⁺/CD20⁺ Zellmengen bei Patienten mit / ohne Rituximab waren ohne signifikanten Unterschied

	Rituximab in Konditionierung	N	<u>Mittelwert</u>	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
CD16(+) 10 ⁸ /kg KG	Nein	13	,40969	,242092	,067144
	Ja	10	,39270	,332930	,105282

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifi- kanz	T	Df	<u>Signif ikanz</u>	Mittlere Differenz	Standard- fehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
CD16(+) 10 ⁸ /kg KG	Varianzen sind gleich	,090	,767	,142	21	,888	,016992	,119707	-,2319	,2659

Abb. 9: Transplantierte CD16⁺/CD56⁺ Zellmengen bei Patienten mit / ohne Rituximab waren ohne signifikanten Unterschied

3.3.7. Lymphozytenregeneration nach Transplantation

Die Entwicklung der Lymphozyten (bzw. Immunrekonstitution) nach der Transplantation wurde anhand der Befunde der FACS-Analysen, die im Zeitraum von bis zu 529 Tagen bei insgesamt 27 Patienten durchgeführt worden sind, untersucht. Die Konditionierung mit ATG war zwingendes Einschlusskriterium bei dieser Auswertung, damit eine Vergleichbarkeit gewährleistet werden kann. Um den Zeitverlauf als „Entwicklung der Lymphozytensubpopulationen“ darzustellen, wird der Tag der Transplantation als „Tag 0“ festgelegt und die Befunde in „Tage nach Tx“ chronologisch eingetragen. Es wurde nach der Behandlung mit oder ohne Rituximab unterschieden – als einzige Variable. Es ergaben sich zwei Gruppen mit je 8 (mit R.) bzw. 13 (ohne R.) Patienten, deren Daten in die Auswertung der Lymphozytenregeneration einbezogen werden konnten.

Die Konditionierung der Patienten in den beiden Gruppen wies keine relevanten Differenzen auf. Bei Patienten, denen Rituximab im Verlauf nach der Transplantation gegeben worden ist, gingen die Daten nur bis zu diesem Zeitpunkt in die Auswertung ein.

3.3.8. Blutbildanalyse

Die Daten aller Blutbildkontrollen, die an den Patienten meiner Studie vorgenommen worden sind, wurden mir vom Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle zur Verfügung gestellt. Sortiert habe ich die Daten nach Patienten, die Rituximab und Patienten, die kein Rituximab in der Konditionierung erhalten haben. In den Fällen, bei denen Rituximab nach der Transplantation aus irgendeinem Grund gegeben worden ist, habe ich die Daten nur bis zum Zeitpunkt der Rituximabgabe eingehen lassen. Bei einigen Patienten wurden bis über drei Monate Blutbildkontrollen durchgeführt. Der größte Teil erfolgte aber in den ersten 70 Tagen. Daher wurde Tag 70 nach der Transplantation zum Endpunkt der Analyse bestimmt.

Zu allen 34 Patienten waren Datensätze verfügbar. 13 Patienten haben Rituximab in der Konditionierung erhalten. Zwei bekamen es unmittelbar (weniger als drei Monate) vor der Transplantation und wurden zu den 13 Patienten hinzugezogen. Also bestand die Gruppe, die mit Rituximab behandelt worden ist, insgesamt aus 15 Personen. Demgegenüber Befanden sich 19 Patienten in der Gruppe, die ohne

Rituximab behandelt worden sind. Die Gruppencharakteristika entsprechen denen, die in „Gruppencharakteristika für Rituximab in der Konditionierung“ aufgeführt sind. s. *Tabelle 2, S. 19*

3.3.9. Infektionen

Zu den diversen Gründen, die eine GvH auslösen bzw. beeinflussen können, gehören auch die Infektionen durch Viren der Herpes-Gruppe (Herpes-Viridae). Von diesen habe ich mich speziell auf CMV und EBV konzentriert. Das erforderliche Datenmaterial wurde aus dem Computersystem des mikrobiologischen Institutes des Universitätsklinikums Halle gewonnen, da dort alle mikrobiologischen Tests und Resistenzbestimmungen der Patienten dieser Studie durchgeführt und katalogisiert worden sind.

Bei fünf (von 17) Patienten, die eine GvH bekommen haben, ist innerhalb von höchstens 30 Tagen vor Beginn der GvH-Symptome eine EBV- bzw. CMV-Infektion abgelaufen. Bei den übrigen Patienten war kein Zusammenhang zu einer entsprechenden Infektion erkennbar. Auch die Analyse des CMV-IgG-Status von Empfänger und Spender ergab keine Auffälligkeiten oder einen prädiktiven Wert im Hinblick auf Infektionshäufigkeiten und GvH-Wahrscheinlichkeit nach einer allogenen PBSZT. s. *Tabelle 11, Anhang*

3.4. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 14.0 vorgenommen.

3.4.1. Streupunktdiagramme (Lymphozytenregeneration nach Tx)

Die Analyse der Lymphozyten erfolgte durch die Erstellung von Streupunktdiagrammen, die jeweils den Verlauf nach bzw. ohne Behandlung mit Rituximab zeigen. Basierend auf einer linearen Regressionsgeraden wurden die entsprechenden Werte für etwa den 300. Tag nach Transplantation approximiert und in der Auswertung angegeben.

Das lineare Modell ist sicherlich nur sehr bedingt geeignet, um diesen Zusammenhang einwandfrei darzustellen. Ein besseres Modell, um eine Vergleichbarkeit der Diagramme herzustellen, war bei der geringen Zahl der

Patienten in dieser Studie nicht vorhanden. Für MW- oder Median-Vergleiche zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation lagen leider nicht ausreichend Daten vor. Vor allem aber wurden die FACS-Analysen in zu unterschiedlichen Zeitintervallen durchgeführt.

3.4.2. Boxplots (tx Zellmenge vs. aGvH-Inzidenz)

Um den Zusammenhang zwischen transplantierte Zellmenge und aGvH-Inzidenzrate zu untersuchen, wurden die Patienten wie unter *Abs. 3.3.3.* beschrieben unterteilt und aus den jeweiligen Daten Boxplots angefertigt. Dazu wurden die p-Werte mittels t-Test errechnet. Trotz eines relativ kleinen Stichprobenumfangs mit vielen Ausreißern wurde der parametrische Test gewählt. Allerdings lag bei den Werten der beiden Gruppen eine Normalverteilung vor, was gegen einen nicht-parametrischen Test gesprochen hat. Die Varianzen waren gleich. Eine Korrektur des Signifikanzniveaus für multiples Testen wurde nicht durchgeführt.

3.4.3. Logistische Regression

Die logistischen Regressionen beziehen sich auf das relative Risiko (Odds-Ratio) für das Auftreten von aGvH nach allogenen PBSZT. Diese multivariate Analyse ermöglicht es die verschiedenen Faktoren und deren Effekte auf ein bestimmtes Outcome (hier: aGvH) gleichzeitig zu berechnen und direkt miteinander zu vergleichen.

4. Ergebnisse

4.1. Rituximab reduziert die Inzidenz von aGvH

Die Vermutung bestand darin, dass Rituximab, als ein in der Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation verwendetes Medikament, die Inzidenz der aGvH reduzieren würde. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Patientenakten von 34 konsekutiv in einer Institution transplantierten Patienten retrospektiv ausgewertet (*Tabelle 10, Anhang*). Rituximab war primär als antineoplastisches Medikament bei Patienten mit CD20-positivem NHL eingesetzt worden. Die aGvH wurde entsprechend der Glucksberg-Kriterien (s. *Einleitung – Abs. 1.1.3.*) gradiert. Wenn möglich, wurde eine Histologie gewonnen.

Von den in dieser Studie eingeschlossenen 34 Patienten erhielten 13 im Rahmen ihrer Konditionierung Rituximab ($375\text{mg}/\text{m}^2$). Mit Rituximab bekamen nur drei Fälle eine aGvH (23%). Dagegen gab es in 14 von 21 Fällen eine aGvH (66,7%), wenn kein Rituximab gegeben wurde ($p = 0,03$). Dies zeigt, dass signifikant weniger Patienten, deren Konditionierung Rituximab enthielt, an aGvH litten als Patienten, die ohne Rituximab konditioniert worden sind.

Tabelle 5: Mit Rituximab in der Konditionierung tritt weniger aGvH auf; Auswertung durch Chi-Quadrat-Test für Kreuztabellen, $p\text{-Wert} = 0,03$

Rituximab	Keine GvH	aGvH	Summe
Nein	7	14	21
Ja	10	3	13
Summe	17	17	34

Zieht man die vier Patienten hinzu, denen Rituximab erst nach der Transplantation aber noch vor den ersten GvH-Symptomen gegeben wurde, wird diese Aussage noch stärker. Von diesen vier Fällen hatte ebenfalls keiner eine aGvH.

4.2. Rituximab nach der Transplantation reduziert die Inzidenz von aGvH

Wir stellten weiterhin die Hypothese auf, dass Patienten, die nicht mit einem Rituximab beinhaltendem Schema konditioniert wurden und die Rituximab zur Prophylaxe einer PTLD oder gegen PD nach allogener PBSZT erhielten, weniger aGvH zeigen würden als Patienten, die Rituximab weder in der Konditionierung noch nach allogener PBSZT verabreicht bekamen. Um diese Frage zu beantworten, extrahierte ich erneut Daten aus den Unterlagen von 21 Patienten, die ohne Rituximab konditioniert worden waren. 13 der 21 Patienten, die ohne Rituximab konditioniert wurden, haben Rituximab in der Zeit nach ihrer Transplantation erhalten.

Bei genau vier dieser Patienten, die Rituximab erst nach der Transplantation bekommen haben, erfolgte die Applikation noch vor den ersten Anzeichen einer möglichen aGvH. Und interessanterweise konnten dann im weiteren Verlauf dieser vier Patienten auch keine derartigen Komplikationen mehr festgestellt werden. s. *Tabelle 12, Anhang (Patienten Nr. 6, 14, 16 und 17)*

Fasst man nun diese vier Fälle mit der Gruppe „Rituximab in der Konditionierung erhalten“ (s. oben: Abs. 4.1.) zusammen und bildet daraus die Kategorien „*Rituximab erhalten* - vor den ersten Anzeichen einer aGvH“ gegen „*Kein Rituximab erhalten* - weder in der Konditionierung noch im weiteren Verlauf vor einer aGvH“, dann ergibt sich eine noch höhere Differenz in den Inzidenzraten (s. *Tabelle 6*). 17 Patienten haben *kein Rituximab* erhalten und davon aber 14 eine aGvH bekommen. Die 17 Patienten, die *Rituximab erhalten* haben, zeigten nur in drei Fällen eine aGvH (82.3% bzw. 17,6%; $p < 0,01$).

Tabelle 6: Es tritt weniger aGvH auf, wenn Rituximab in der Konditionierung oder später (aber vor den ersten GvH-Symptomen) gegeben wurde; $p < 0,01$

Rituximab	keine aGvH	aGvH	Summe
Nein	3	14	17
Ja	14	3	17
Summe	17	17	34

4.3. Die Inzidenz der aGvH wird durch eine Kombination aus Rituximab und ATG reduziert

Die nächste Frage war, ob die Kombination aus Rituximab und ATG die Inzidenz der aGvH stärker reduzieren würde als ATG allein. Bei der Auswertung ergab sich folgende Verteilung:

- 10 Patienten erhielten Rituximab und ATG,
- 17 Patienten erhielten ATG aber kein Rituximab,
- 3 Patienten erhielten Rituximab aber kein ATG und
- 4 Patienten erhielten weder Rituximab noch ATG.

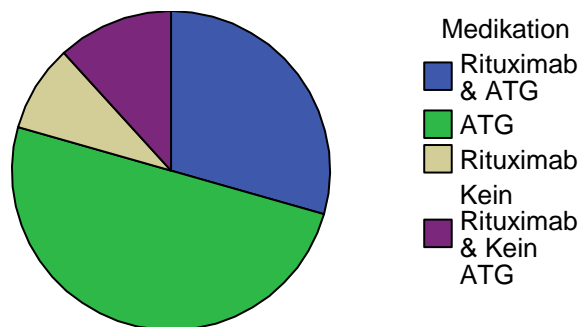


Abb. 10: Verteilung von ATG und Rituximab im Studienkollektiv

Es zeigte sich, dass von den zehn Patienten, die die Kombination aus Rituximab und ATG erhielten, keiner eine aGvH erlitt, während zehn von 17 Patienten, die nur ATG erhielten, aGvH bekamen (0% bzw. 58.8%, $p < 0,01$). Die drei Patienten, die Rituximab aber kein ATG, und die vier Patienten, die weder Rituximab noch ATG erhielten, entwickelten alle eine ausgeprägte aGvH.

s. *Tabelle 13, Anhang*

4.4. Logistische Regression: Im direkten Vergleich senkt Rituximab das aGvH-Risiko wesentlich stärker als ATG

Rituximab und ATG senken jeweils und in Kombination die Inzidenz für aGvH. Aber wie groß ist der Einfluss von Rituximab im direkten Vergleich mit ATG? Dafür wurde das Modell der logistischen Regression angewandt.

Rituximab hat den deutlich größeren risikoreduzierenden Einfluss. Das relative Risiko für eine aGvH bei Patienten, die Rituximab bekommen haben, ist mehr als 95% niedriger als ohne Rituximab (OR = 0,043; p = 0,02). ATG senkt das relative Risiko ebenfalls. Aber mit 6% ist diese Risikoreduktion viel niedriger als bei Rituximab (OR = 0,941; p = 0,08).

Tab. 7: Rituximab senkt das relative Risiko für aGvH stärker als ATG; Rituximab in Konditionierung (RiC), ATG in Konditionierung (ATG)

		Regressions koeffizientB	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz	Odds Ratio
aGvH	RiC	-3,149	1,292	5,939	1	,015	,043
	ATG	-,061	,035	3,059	1	,080	,941
	Konstante	2,236	1,147	3,802	1	,051	9,355

4.5. Immunrekonstitution nach Rituximabtherapie: Patienten, die mit Rituximab behandelt worden sind, hatten eine schnellere CD3⁺/CD8⁺-Rekonstitution

Die nächste Hypothese war, dass der hinter den beobachteten Effekten stehende Mechanismus eine veränderte Immunrekonstitution sein könnte. Um die Ursachen des Einflusses von Rituximab auf die aGvH-Inzidenz zu ergründen, wurden die Verläufe der Regeneration des adaptiven Immunsystems nach und ohne Behandlung mit Rituximab untersucht und miteinander verglichen. Im Detail wurden die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen erfasst (CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, CD16⁺/CD56⁺, CD19⁺/CD20⁺).

4.5.1. CD3⁺-Zellen regenerieren bei Patienten mit Rituximab schneller

Bei den CD3⁺-T-Zellen zeigt sich eine leicht schnellere Regeneration nach der Behandlung mit Rituximab. 300 Tage nach der Transplantation lag der Durchschnitt der absoluten CD3⁺-Lymphozyten in dieser Gruppe bei etwa 2800 Zellen / μ l (vs. 900 Zellen / μ l).

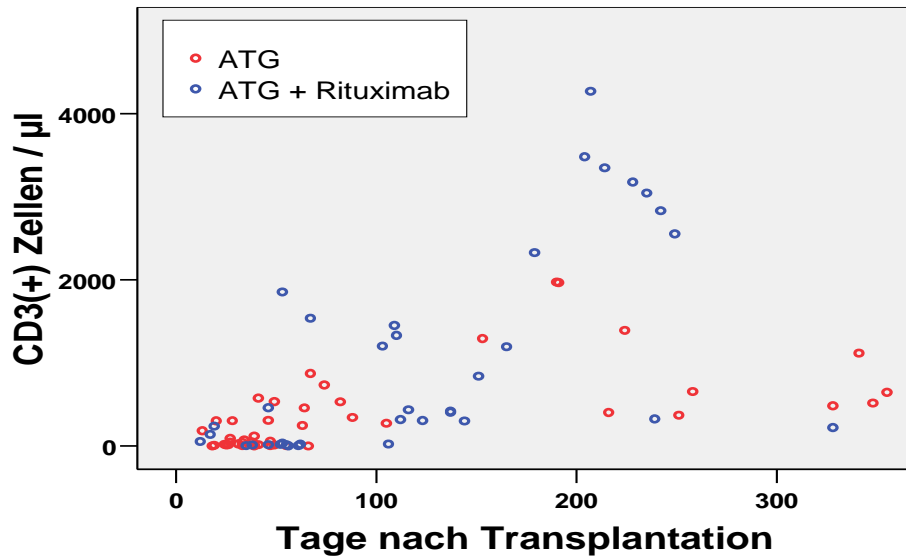


Abb. 11: CD3⁺-Zellen regenerieren bei Patienten mit Rituximab schneller*

4.5.2. CD3⁺/CD4⁺-Zellen zeigen keinen Unterschied bei Patienten mit Rituximab

Die Regenerationen der CD3⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten verhalten sich nahezu unverändert im Vergleich der beiden Gruppen. Die Mittelwerte der absoluten Anzahlen nach 300 Tagen liegen jeweils bei etwa 180 / μ l.

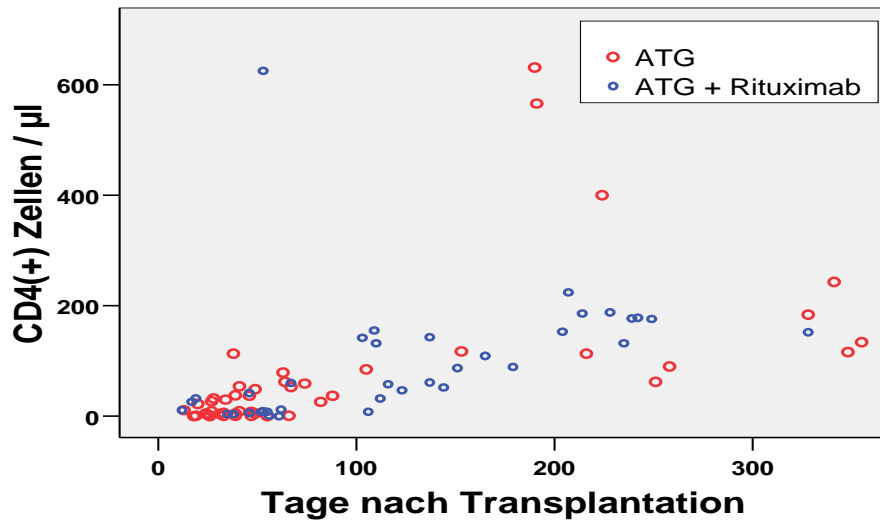


Abb. 12: CD3⁺/CD4⁺ verhalten sich bei Pat. mit Rituximab unverändert*

4.5.3. CD3⁺/CD8⁺-Zellen regenerieren bei Patienten mit Rituximab schneller

Erstaunlicherweise zeigte ein Vergleich der Verläufe der CD3⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten-Regenerationen den deutlichsten Unterschied. Bei den Patienten, die mit Rituximab behandelt worden sind, steigt die Zahl dieser Lymphozytensubpopulation wesentlich schneller an als bei der Vergleichsgruppe. Nach 300 Tagen betragen die absoluten Anzahlen der CD3⁺/8⁺-Zellen durchschnittlich ca. 2400 / µl (mit Rituximab) und 600 / µl (ohne Rituximab).

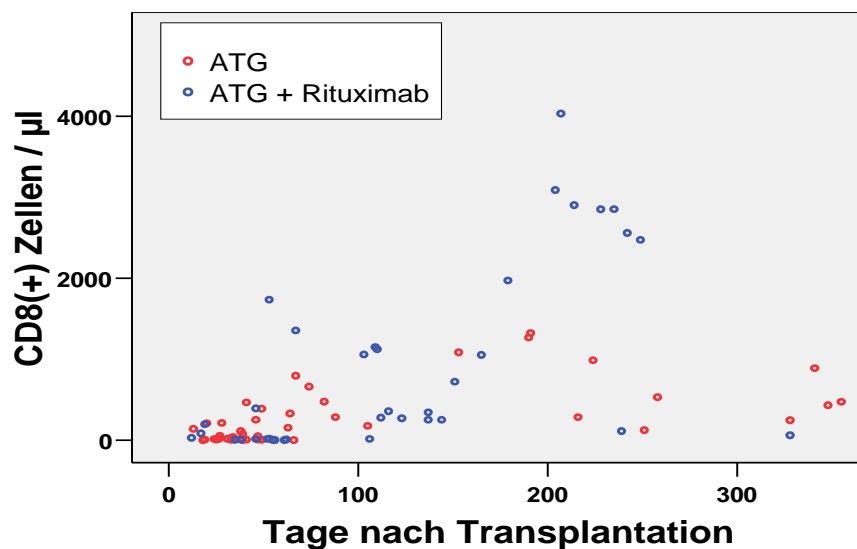


Abb. 13: CD3⁺/CD8⁺ regenerieren bei Patienten mit Rituximab schneller

4.5.4. CD16⁺/CD56⁺-Rekonstitution ist bei Patienten mit Rituximab geringer

Die absoluten Anzahlen der CD16⁺/CD56⁺-NK-Zellen nahmen jeweils im Laufe des Beobachtungszeitraumes ab. Nach 300 Tagen betrugen die Durchschnittswerte der absoluten Zellzahlen etwa 190 / μ l (mit Rituximab) und 260 / μ l (ohne Rituximab).

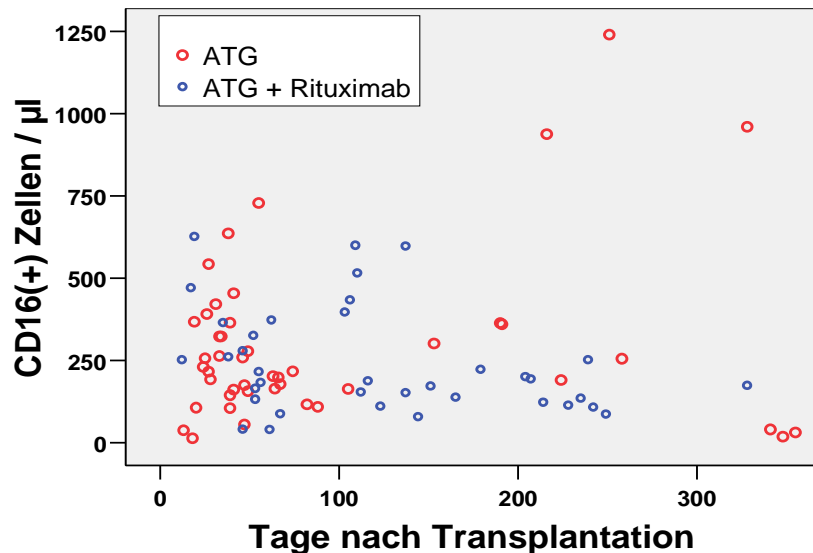


Abb. 14: CD16⁺/CD56⁺-Rekonstitution ist bei Pat. mit Rituximab geringer*

4.5.5. CD19⁺/CD20⁺-Rekonstitution ist bei Patienten mit Rituximab gehemmt

Bei den B-Zellen zeigt sich, dass die Patienten, die Rituximab bekommen haben, zum einen weniger dieser Zellen besitzen und zum anderen auch eine schlechtere Regeneration aufweisen. Der Mittelwert mit Rituximab war bei etwa 10 / μ l und ohne Rituximab bei ca. 100 / μ l.

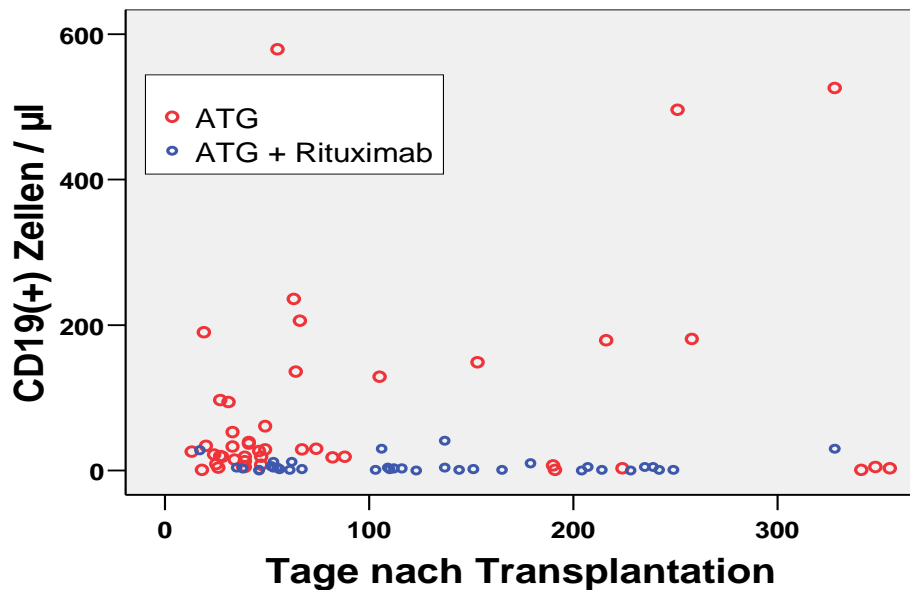


Abb. 15: CD19⁺/CD20⁺-Regeneration ist bei Pat. mit Rituximab gehemmt*

[*] - Einzelne Patienten gingen mehrmals (d.h. zu verschiedenen Zeitpunkten) in die Statistik ein.

4.6. Unspezifisches Immunsystem nach der Transplantation: Vergleich der Patienten mit Rituximab gegen Patienten ohne Rituximab

Weiterhin war das Ziel einen möglichen Pathomechanismus für die Wirkung von Rituximab auf aGvH ausfindig zu machen. Das adaptive Immunsystem wurde bereits untersucht. Aber auch die angeborenen Bestandteile des Immunsystems spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Unterhaltung einer aGvH (s. *Einleitung – Absatz 1.1.2.*). Die Daten für eine derartige Untersuchung konnte ich aus den Blutbildanalysen des Labors entnehmen.

4.6.1. Bei Patienten mit Rituximab war die Monozytenzahl verringert

Der Anteil der Monozyten bei Patienten mit Rituximab liegt nach einem kurzen Anstieg auf über 0,25 (Anteil von Gesamtleukozyten) relativ konstant bei rund 0,12. Der Werteanstieg begann etwa am zehnten Tag und dauerte durchschnittlich sechs Tage bis zur Stabilisierung. Bei den Patienten, die kein Rituximab bekommen haben, stieg die Monozytenfraktion etwas später aber ebenfalls bis auf 0,25 an. Der Anstieg war im Vergleich um zwei Tage verzögert und verlief deutlich langsamer. Erst am 40.

Tag nach Transplantation sind die Werte wieder auf das Niveau der Vergleichsgruppe gesunken. Die Kurve fiel danach weiter. Ab Tag 60 lag die Monozytenfraktion bei rund 0,05 (Normwert: 0,02 – 0,08).

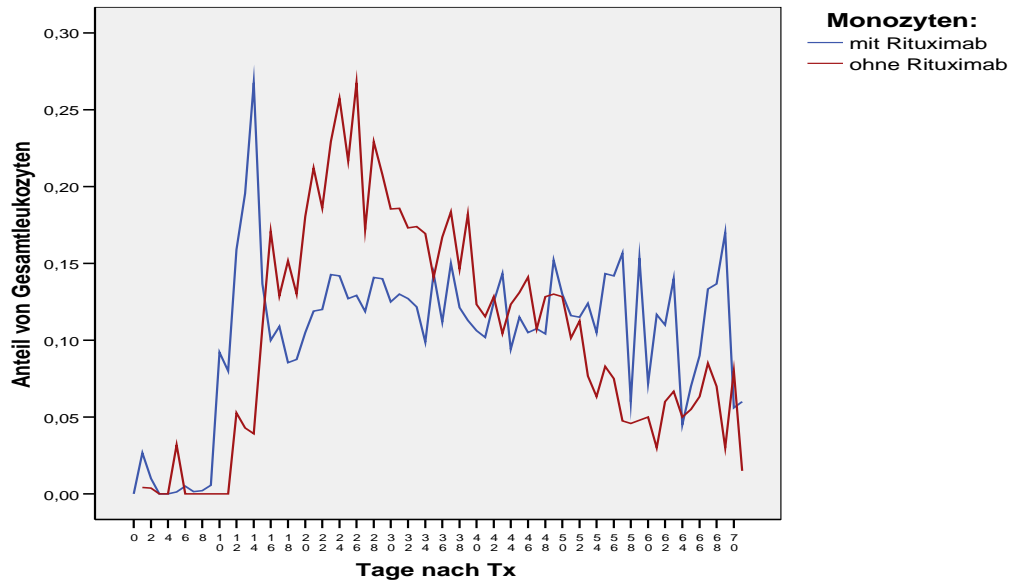


Abb. 16: Patienten mit Rituximab hatten weniger Monozyten

4.6.2. Bei Patienten mit Rituximab war die Leukozytenzahl höher

Bei der Betrachtung der Gesamtleukozyten fiel eine deutlich höhere Menge in der Gruppe der mit Rituximab behandelten Patienten auf. Dieser Unterschied betrifft insbesondere die ersten 35 Tage nach der Transplantation. Die Leukozyten vermehrten sich ab dem zehnten Tag wesentlich schneller als bei Patienten ohne Rituximab und erreichten Werte bis zu $14 \times 10^9/l$. Ab dem 35. Tag gab es keine auffälligen Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen. Ohne Rituximab verlief die Kurve flacher und die Werte stiegen nicht über $5 \times 10^9/l$ (Normwert: $4 - 10 \times 10^9/l$). Die Promyelozyten und Metamyelozyten im Blut waren bei Patienten, die Rituximab erhalten haben, ebenfalls leicht erhöht.

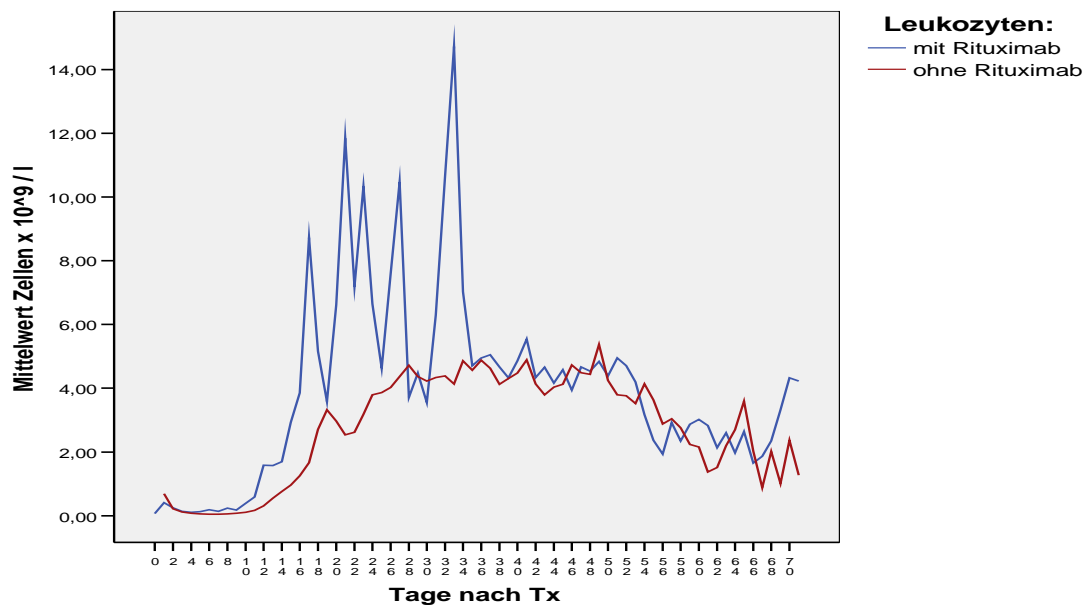


Abb. 17: Patienten mit Rituximab hatten mehr Leukozyten

4.6.3. Bei Patienten mit Rituximab war die Thrombozytenzahl reduziert

Die Regeneration der Thrombozyten nach der Transplantation begann in beiden Gruppen ungefähr ab dem zehnten Tag. Der Anstieg der Thrombozytenzahlen erfolgte nahezu kongruent bis ca. $80 \times 10^9/l$. Erst danach wich die Kurve der mit Rituximab behandelten Patienten deutlich ab. Die Thrombozytenzahl sank erst wieder ab um dann bis Tag 60 lediglich zwischen 60 und $100 \times 10^9/l$ zu schwanken. Ohne Rituximab vermehrten sich die Thrombozyten auf bis zu $140 \times 10^9/l$. Die Kurve fiel erst ab Tag 44 wieder deutlich ab. 60 Tage nach der Transplantation waren die Werte beider Gruppen etwa auf gleichem Niveau (Normwert: $140 - 360 \times 10^9/l$).

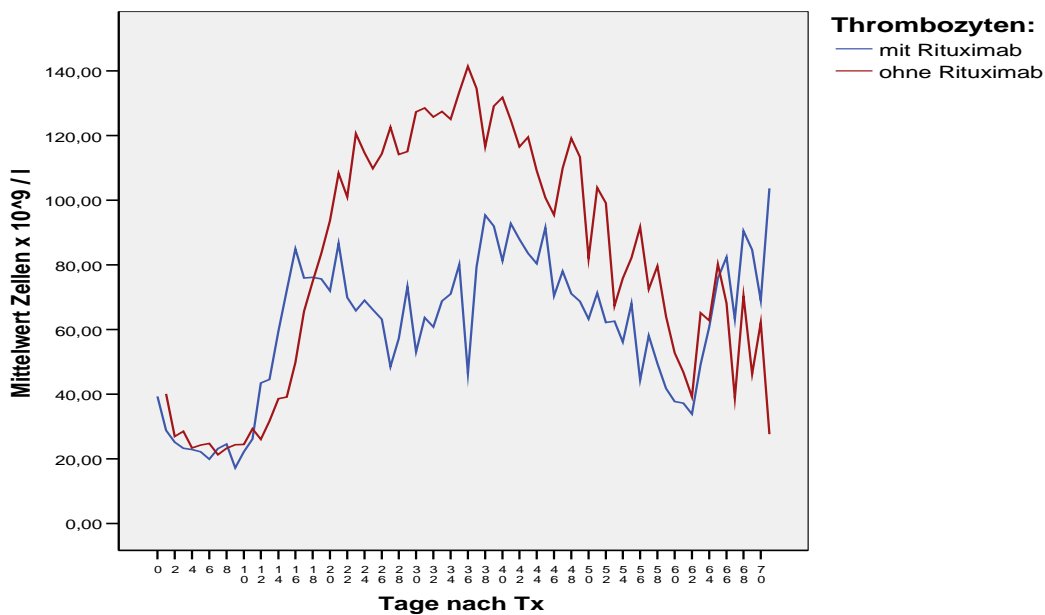


Abb. 18: Patienten mit Rituximab hatten weniger Thrombozyten

4.7. Bei Patienten, die eine aGvH hatten, wurden durchschnittlich mehr CD34⁺ HSZ transplantiert

Nachdem die Transplantatzusammensetzung in Bezug auf die Konditionierung mit Rituximab untersucht wurde, lag die Untersuchung auf einen Einfluss einzelner Zellfraktionen des Transplantates auf die Häufigkeit von aGvH nahe. Dazu wurden die transplantierten Zellmengen (CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, CD16⁺/CD56⁺ und CD19⁺/CD20⁺ Lymphozyten sowie CD34⁺ HSZ) mit dem Auftreten von aGvH korreliert.

4.7.1. Bei Patienten mit einer aGvH wurden mehr CD34⁺ transplantiert

Die Anzahl an transplantierten CD34⁺-Zellen pro kg KG des Empfängers weist einen sehr deutlichen positiven Zusammenhang mit dem Auftreten von aGvH auf. D.h. in der Gruppe der Patienten, die eine aGvH erlitten haben, sind in der Relation zur Vergleichsgruppe (ohne aGvH) überwiegend höhere Mengen von HSZ / kg KG transplantiert worden ($p = 0,05$).

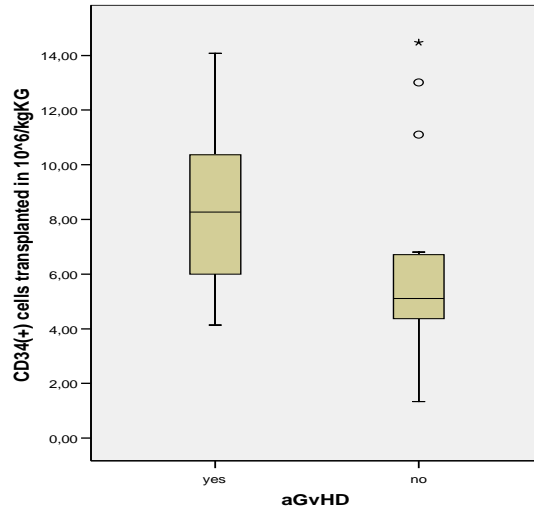


Abb. 19: Bei Patienten mit aGvH wurden mehr CD34⁺ transplantiert;
 Median = 8,27 (aGvH) bzw. 5,11 (keine aGvH), $p = 0,05$

4.7.2. Die transplantierten Mengen von CD3⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied

Bei der Anzahl der transplantierten CD3⁺-T-Lymphozyten / kg KG konnte kein Zusammenhang mit der Inzidenz der aGvH nachgewiesen werden. Wie die *Abbildung 20* zeigt, ist die Verteilung der Werte in beiden Gruppen sehr ähnlich ($p = 0,49$).

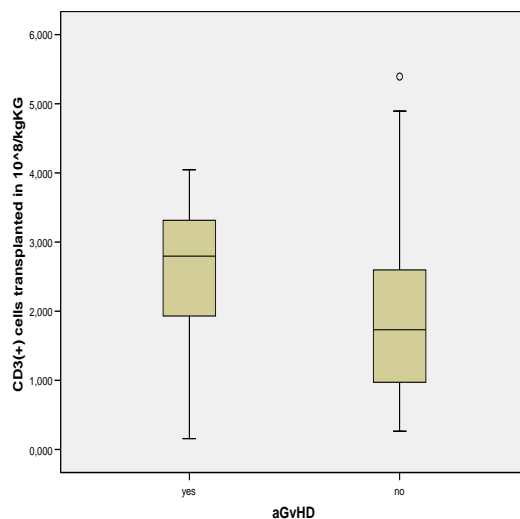


Abb. 20: Die transplantierten Mengen von CD3⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied;

Median = 2,8 (aGvH) bzw. 1,73 (keine aGvH)

4.7.3. Die transplantierten Mengen von CD3⁺/CD4⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied

Auch bei den T-Helfer-Lymphozyten stellt sich der Vergleich sehr indifferent dar. Die Wertebereiche sind annähernd gleich und lassen keinen deutlichen Unterschied erkennen ($p = 0,58$).

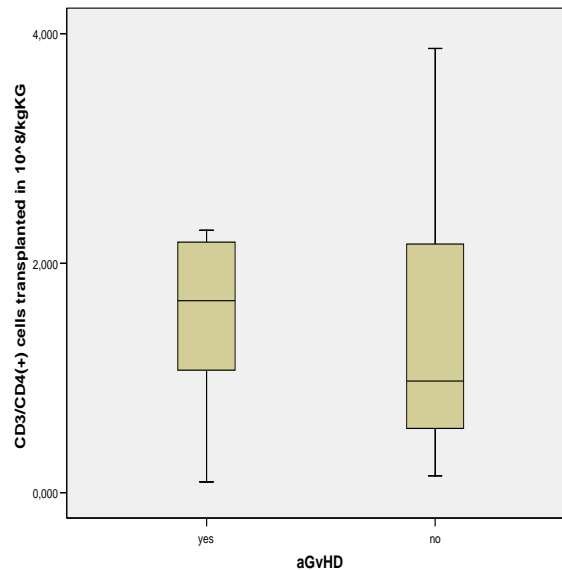


Abb. 21: Die transplantierten Mengen von CD3⁺/CD4⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied;

Median = 1,67 (aGvH) bzw. 0,97 (keine aGvH)

4.7.4. Die transplantierten Mengen von CD3⁺/CD8⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied

Die Anzahl der transplantierten zytotoxischen T-Lymphozyten zeigte in dieser Studie keinen eindeutigen Einfluss auf die Inzidenz von aGvH. Die Werte waren relativ ausgeglichen ($p = 0,6$).

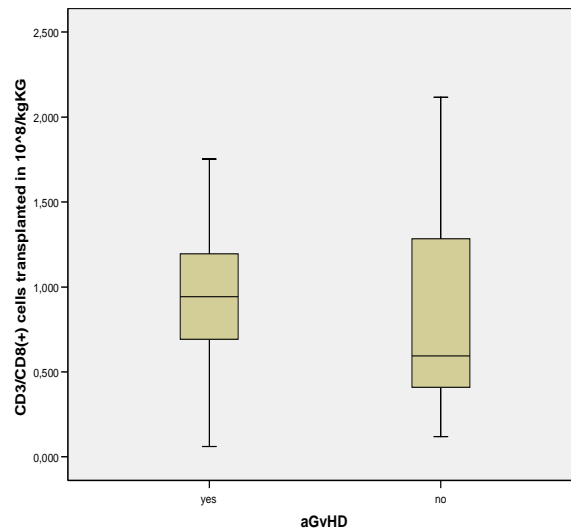


Abb. 22: Die transplantierten Mengen von CD3⁺/CD8⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied;

Median = 0,94 (aGvH) bzw. 0,59 (keine aGvH)

4.7.5. Die transplantierten Mengen von CD16⁺/CD56⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied

Die NK-Zellzahl wies in dieser Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf, wie in *Abbildung 23* zu sehen ist ($p = 0,63$).

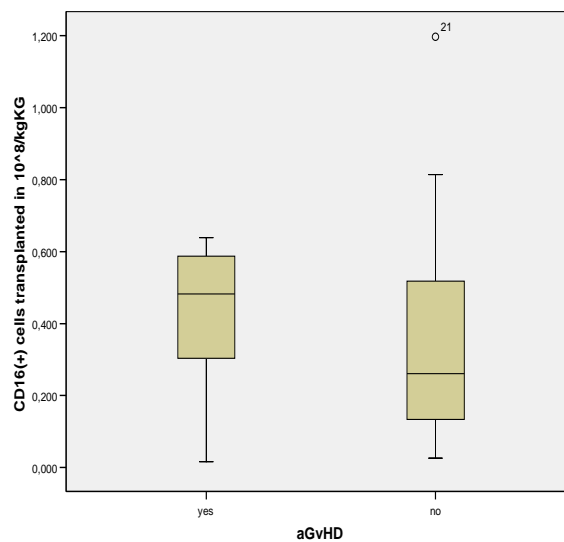


Abb. 23: Die transplantierten Mengen von CD16⁺/CD56⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied;

Median = 0,48 (aGvH) bzw. 0,26 (keine aGvH)

4.7.6. Die transplantierten Mengen von CD19⁺/CD20⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied

In der Auswertung der B-Zellen stellten sich keine relevanten Differenzen dar ($p = 0,91$).

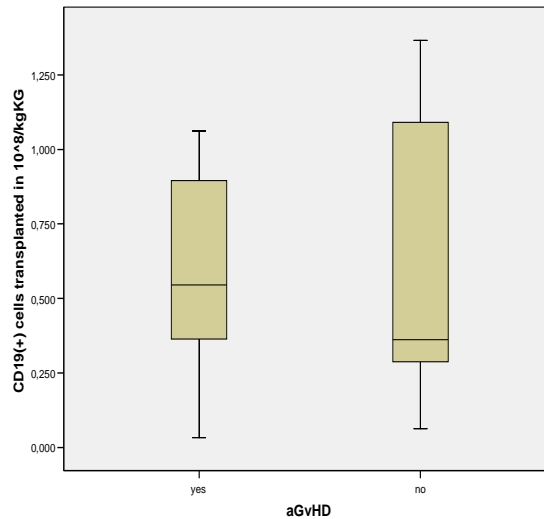


Abb. 24: Die transplantierten Mengen von CD19⁺/CD20⁺-Zellen bei Patienten mit und ohne aGvH zeigten keinen signifikanten Unterschied;

Median = 0,54 (aGvH) bzw. 0,36 (keine aGvH)

4.8. CD3⁺/CD8⁺ Lymphozyten erhöhen das Risiko einer aGvH

In Absatz 4.7. wird deutlich, dass, einzeln betrachtet, von den transplantierten Zellen die Menge an CD34⁺ HSZ den größten Einfluss auf das aGvH-Risiko zu haben scheint. Praktisch werden aber immer alle Zellen des Transplantats gleichzeitig transplantiert. Aus diesem Grund wurde als nächstes eine logistische Regression durchgeführt, die die untersuchten Zelltypen (CD34⁺; CD3⁺; CD3⁺/CD4⁺; CD3⁺/CD8⁺; CD19⁺/CD20⁺; CD16⁺/CD56⁺) gleichzeitig erfassen soll und deren Einfluss auf das aGvH-Risiko (Odds Ratio) ins Verhältnis setzt.

Das Ergebnis zeigte ebenfalls, dass mehr CD34⁺ HSZ das relative Risiko für aGvH erhöhen. Es steigt um rund 25% (OR = 1,275; $p = 0,1$). Viel stärker wird es von den T-Lymphozyten (CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺) beeinflusst. Das relative Risiko wird abhängig von der transplantierten Menge fast 16fach höher (OR =

15,763; $p = 0,66$ bzw. $OR = 16,46$; $p = 0,73$). Auch die NK-Zellen ($CD16^+/CD56^+$) scheinen in der Relation einen größeren Einfluss auf das aGvH-Risiko zu haben als die HSZ. Das Risiko wird mehr als verdreifacht ($OR = 3,218$; $p = 0,73$). Erstaunlich ist, dass, laut der logistischen Regression, die Menge aller $CD3^+$ Zellen im Transplantat (zu denen auch die T-Zellen gehören) eine negative Korrelation zum aGvH-Risiko aufweist. Demzufolge wird das Risiko mit steigender Menge $CD3^+$ Zellen um rund 80% gesenkt ($OR = 0,183$; $p = 0,8$). Auch die $CD19^+/CD20^+$ Zellen haben einen risikoreduzierenden Einfluss auf aGvH ($OR = 0,011$; $p = 0,15$).

Tab. 8: T-Zellen erhöhen das Risiko der aGvH am stärksten;

$CD34^+$ in $n \cdot 10^6 / kg$ KG; $CD3^+$, $CD3^+/CD4^+$, $CD3^+/CD8^+$, $CD19/20^+$, $CD16/56^+$ in $n \cdot 10^8 / kg$ KG

Transplantierte Zellen	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Wald	Df	Signifikanz	Odds Ratio
aGvH CD34	,243	,150	2,640	1	,104	1,275
CD3	-1,700	6,752	,063	1	,801	,183
CD3CD4	2,758	6,264	,194	1	,660	15,763
CD3CD8	2,801	8,122	,119	1	,730	16,460
CD19/20	-4,517	3,156	2,049	1	,152	,011
CD16/56	1,169	3,390	,119	1	,730	3,218
Konstante	-2,134	1,486	2,061	1	,151	,118

4.9. Rituximab hat den größten Einfluss auf das aGvH-Risiko

In den oben aufgeführten Ergebnissen werden die jeweiligen Einflussgrößen für das aGvH-Risiko individuell dargestellt. Um auszumachen was im direkten Vergleich den größten Effekt hat, wurde erneut eine logistische Regression durchgeführt.

Für die Regression wurden die sechs Variablen Rituximab, TBI, ATG, KI, Gewicht und Alter verwendet. Das relative Risiko wird am stärksten von den Faktoren Rituximab und ATG gesenkt. Bei den Fällen, die Rituximab erhalten haben, sinkt das relative Risiko einer aGvH um fast 96% ($OR = 0,043$; $p = 0,02$) und bei ATG im Vergleich um 6% ($OR = 0,939$; $p = 0,12$). Daneben scheint das Gewicht der Patienten auch eine gewisse Rolle zu spielen ($OR = 0,969$; $p = 0,31$). Das Alter ($OR = 0,993$; $p = 0,9$) und der Karnofsky-Index ($OR = 0,977$; $p = 0,66$) haben keinen bedeutenden Einfluss. Eine höhere TBI-Dosis steigert das Risiko der aGvH um ca. 11% ($OR = 1,113$; $p = 0,52$).

Tab. 9: Rituximab reduziert das relative Risiko für aGvH am stärksten;
Rituximab in Konditionierung (RiC), Ganzkörperbestrahlung in Gy (TBI), ATG in Konditionierung, Karnofsky-Index (KI), Gewicht in kg und Alter

		Regressions koeffizientB	Standard- fehler	Wald	Df	Signifikanz	Odds Ratio
aGvH	RiC	-3,140	1,395	5,070	1	,024	,043
	TBI	,107	,168	,404	1	,525	1,113
	ATG	-,063	,041	2,408	1	,121	,939
	KI	-,024	,053	,196	1	,658	,977
	Gewicht	-,032	,031	1,015	1	,314	,969
	Alter	-,007	,056	,015	1	,901	,993
	Konstante	7,160	6,654	1,158	1	,282	1286,713

4.10. Bei verwandten Spendern tritt wesentlich häufiger aGvH auf

Neben den schon untersuchten Variablen sollten in dieser Studie auch weitere wichtige Faktoren, die im Zusammenhang mit aGvH stehen, identifiziert werden. Dazu wurde der Datensatz wieder nach aGvH ausgewertet, ohne Rücksicht auf Rituximab. Relativ große Unterschiede zeigten sich im Hinblick auf die Herkunft des Transplantats. Es fiel auf, dass gerade in der Gruppe der Familienspender-Transplantationen (mrd; mmrd) die höchste Rate von aGvH aufgetreten ist (9/9 = 100%). Demgegenüber entwickelten bei Patienten, die eine Transplantation von einem Fremdspender bekamen (mud; mmud), nur 8 von 25 (32 %) eine aGvH. s.

Tabelle 14, Anhang

5. Diskussion

In dieser Studie wird deutlich, dass Rituximab die Inzidenz von aGvH reduziert. Dass Rituximab als im Prinzip reiner B-Zellantikörper solch einen starken Effekt auf aGvH hat, ist bemerkenswert. In den gängigen Modellen wird aGvH als eine hauptsächlich T-Zell-vermittelte Reaktion beschrieben, was in eklatantem Widerspruch zu den hier vorgestellten Daten zu stehen scheint. Die hier vorgestellten Daten bekräftigen aber die Ergebnisse und Hypothesen der Studien, die von einem starken Einfluss der B-Zellen auf die T-Zellaktivität ausgehen. Sfikakis et al. haben gezeigt, dass nach B-Zelldepletion die kostimulatorischen Moleküle CD40L und der frühe Aktivitätsmarker CD69 auf CD4⁺ T-Helferzellen deutlich verringert waren³⁸. Eine Studie von Tokunaga et al. untersuchte die Expression der T-Zell-aktivierenden Moleküle auf den B-Zellen selbst und ergab eine deutliche Reduktion von CD40 sowie CD80⁴². Es ist erwiesen, dass die Blockade von CD40/CD40L und CD28-CD80/86 die T-Zellaktivität und damit aGvH vermindert^{8,9}. Dies führt zu der Hypothese, dass Rituximab über eine herabgesetzte T-Zell-(Ko-)Stimulation die Inzidenz und Unterhaltung von aGvH senkt bzw. hemmt.

5.1. Rituximab oder ATG?

Rituximab reduziert die Inzidenz von aGvH (s. Tab. 5, S. 29). Aber viel interessanter ist, dass bei allen Patienten, die mit ATG konditioniert worden sind und zusätzlich Rituximab erhalten haben, keine aGvH auftrat. Zehn Patienten wurden direkt mit ATG und Rituximab konditioniert. Vier weitere bekamen Rituximab erst nach der Transplantation aber noch vor dem Auftreten irgendwelcher Symptome einer aGvH. Zusammen sind also 14 Patienten (fast die Hälfte der Studienpopulation) mit Rituximab und ATG behandelt worden und haben keine aGvH entwickelt. Daher lautet meine Hypothese, dass Rituximab in Verbindung mit ATG die Inzidenz der aGvH stark senkt.

Im direkten Vergleich mit ATG (*logistische Regression*: Tab. 7, S. 32) zeigt sich, dass Rituximab den größeren Einfluss auf das relative Risiko einer aGvH hat.

ATG senkt zwar das GvH-Risiko erwiesenermaßen⁵⁰, aber verglichen damit ist die Wirkung von Rituximab in dieser Studie um ein vielfaches stärker.

Tab. 6 (S. 30) verdeutlicht, dass unter den Patienten, die mit Rituximab behandelt worden sind, drastisch weniger aGvH zu beobachten waren. Lediglich drei von 17 Patienten mit Rituximab bekamen eine aGvH verglichen mit 14 von 17 Fällen ohne Rituximab. Es muss aber erwähnt sein, dass von den 17 Patienten mit Rituximab 14 ATG bekommen haben. Daher kann man nicht ausschließen, dass der unheimlich stark erscheinende Effekt von Rituximab auch von ATG getriggert worden ist.

Dafür spricht, dass Rituximab allein aGvH kaum vermindert. Alle drei Fälle, die mit Rituximab aber ohne ATG konditioniert worden sind, entwickelten sogar jeweils sehr ausgeprägte aGvH (III-IV). Bestärkt wird dieses Ergebnis durch zwei weitere Patienten, die Rituximab kurz vor der Konditionierung bekommen haben und auch ohne ATG konditioniert worden sind (*s. Tab. 13, Anhang*). Da Rituximab eine relativ lange Wirkphase hat (bis zu sechs Monate), sind diese zwei Patienten praktisch mit den drei mit Rituximab konditionierten Patienten gleich zusetzen. Auch hier waren sehr ausgeprägte aGvH-Symptome die Folge.

Definitiv sind aber fünf Patienten nicht genug, um daraus sicher auf den mangelnden Effekt von Rituximab allein zu schließen. Vorstellbar wäre auch, dass Rituximab bei einer größeren Fallzahl die Inzidenz von aGvH durchaus senkt. Wenn sie aber auftritt, dann in relativ schwerer Form.

Festzuhalten bleibt also, dass man aufgrund dieser Daten nicht definitiv unterscheiden kann, ob nun Rituximab oder ATG als beste aGvH-Prophylaxe bezeichnet und verwendet werden sollte. Aber zusammen verhindern sie äußerst wirkungsvoll die Entstehung von aGvH.

Generell ist die hier vorgelegte Studie eine Pilotstudie, die auf einer begrenzten Zahl von Patienten basiert und an größeren, homogenen Populationen prospektiv verifiziert werden muss.

5.2. Welche Wirkung hat Rituximab auf andere Zelltypen abgesehen von CD20⁺?

5.2.1. Adaptives Immunsystem

Man muss berücksichtigen, dass der Datensatz der vorgelegten Studie für eine wirklich aussagekräftige Analyse zu gering ist. Tendenziell bleibt festzuhalten, dass sich besonders CD3⁺ und CD3⁺/CD8⁺ Zellen in Verbindung mit Rituximab schneller zu erholen schienen. Die CD3⁺/CD4⁺ Zellen ließen dabei keinen Unterschied erkennen. NK-Zellen waren bei Patienten mit Rituximab leicht verringert. s. *Abb. 11 – 14, S. 33 - 35*

Dass die Unterschiede eventuell allein auf unterschiedliche Zellmengen in den Transplantaten zurückzuführen sein könnten, muss anhand der Ergebnisse aus *Abs. 3.3.6.* bezweifelt werden. Es wurden bei Patienten mit Rituximab und ohne in etwa gleiche Mengen relativ zum Körpergewicht transplantiert. Auch die Gruppencharakteristika geben keinen Anhalt für Unterschiede, die für diesen Effekt verantwortlich sein könnten. Nur geringfügige Differenzen in der Konditionierung lagen vor. Die Gruppe, die Rituximab erhalten hatte, wurde im Durchschnitt höher bestrahlt (5,8 Gy gegenüber 3,2 Gy TBI). In der Konditionierung wurde zudem den Patienten mit Rituximab leicht weniger ATG gegeben (20 mg geg. 26,5 mg). ATG wurde allerdings nur über kurze Zeit (= Konditionierung) verabreicht und wirkt vergleichsweise kurz (HWZ laut Fresenius = 4 – 37 Tage). Beide Unterschiede sind somit als eher gering einzuschätzen und sollten nicht in der Lage sein, einen solchen Unterschied zu bewirken.

Damit scheint Rituximab die entscheidende Größe zu sein. Unterstützt werden diese Ergebnisse und Hypothesen durch die Erkenntnisse aus anderen Studien, in denen ebenfalls von einer schnelleren CD8⁺ Rekonstitution und verminderter NK-Zellpopulation berichtet wurde³⁸. Über den genauen Mechanismus dieser Effekte muss weiterhin spekuliert werden. Nachgewiesen ist eine verminderte Expression von kostimulatorischen Oberflächenantigenen (CD40/CD40L, CD28-CD80/86). Aber auch eine höhere Aktivität von regulatorischen T-Zellen (T_{reg} - CD4⁺/CD25⁺) wurde beschrieben. Das lässt vermuten, dass über derartige Wege die T-Zellaktivität indirekt gehemmt wird^{8,9,25,38,42}.

5.2.2. Angeborene Immunität

Bei Patienten mit Rituximab gab es besonders in den ersten 40 Tagen nach Transplantation durchschnittlich weniger Monozyten (s. *Abb. 16, S. 37*). Der kurze steile Anstieg am Anfang der Regeneration ist dabei sehr auffällig und kommt nicht nur durch ein paar Ausreißer zustande, sondern war bei fast allen Patienten, die mit Rituximab konditioniert worden sind, mehr oder weniger ausgeprägt. Ansonsten ist der Monozytenanteil weitestgehend konstant bei etwa 12% (der Leukozyten). Ohne Rituximab ist dieser Anteil viel länger auf deutlich höherem Niveau. Dies korreliert mit dem erhöhten GvH-Risiko in der Gruppe mit durchschnittlich mehr Monozyten.

Dieses Ergebnis ist auch im Vergleich mit anderen Studien sehr plausibel. Monozyten sind sehr potente APC und werden schon länger verdächtigt, sehr großen Einfluss auf GvH-Reaktionen zu haben. Einige Studien haben eine direkte Korrelation zwischen der Monozytenzahl und dem Auftreten von aGvH nach allogenen PBSZT gezeigt^{3,29}.

Die entscheidende Frage ist an dieser Stelle die nach der Kausalität dieses Zusammenhanges: Sind die Monozyten bei Patienten mit Rituximab reduziert, weil weniger aGvH aufgetreten ist, oder verringert Rituximab die Aktivität und die Bildung von Monozyten und somit die aGvH-Inzidenz?

Die Monozytenbildung wird durch GM-CSF, TNF- α und IL-4 stimuliert. Denkbar wäre in diesem Sinne, dass eine durch Rituximab induzierte höhere Aktivität von T_{reg}-Zellen²⁵ einerseits direkt hemmend auf Monozyten wirkt. Andererseits würden durch die T_{reg} auch die T-Helfer-Lymphozyten gehemmt werden. Dadurch würde wiederum weniger GM-CSF, TNF- α und IL-4 ausgeschüttet und demzufolge die Monozytenstimulation vermindert werden. Ungeklärt bleibt dennoch der starke Monozytenanstieg am Anfang der Rekonstitutionsphase. Ausserdem ist es verwunderlich, dass in den ersten 40 Tagen nach Transplantation insgesamt mehr Leukozyten (trotz weniger Monozyten) bei Patienten in der Rituximab-Gruppe gemessen wurden. Gesamtleukozyten als hauptsächlicher Entzündungsparameter wurden noch nicht explizit mit aGvH in Verbindung gebracht. Es sind auch nicht mehr Infekte bei Patienten mit Rituximab aufgefallen. Da aber zu den Gesamtleukozyten auch alle Lymphozyten gezählt werden, würde ich davon ausgehen, dass die sehr schnell angestiegenen CD3⁺ und CD3⁺/CD8⁺ Zellzahlen in gewisser Weise mit für diesen Effekt verantwortlich sind.

Der dritte deutliche Unterschied zwischen Patienten mit Rituximab und ohne war die Thrombozytenentwicklung. Mit Rituximab wurden im Mittel viel weniger Thrombozyten gemessen. Die Werte stiegen in den ersten 50 Tagen nach Transplantation kaum über 80.000/ μ l (ohne Rituximab durchschnittlich 120.000/ μ l). Dieses Ergebnis ist durchaus unerwartet gewesen. Relativ häufig wird nach allogenen PBSZT eine Thrombozytopenie diagnostiziert. Man geht davon aus, dass hauptverantwortlich dafür (von B-Zellen produzierte) anti-Thrombozyten-Ak sind. Auf Grund dessen wäre eine bessere Thrombozytenrekonstitution bei B-Zell-depletierten Patienten einleuchtend gewesen. Rituximab wurde bereits in der Therapie von autoreaktiven Thrombozytopenien erfolgreich eingesetzt¹⁴. Eine aktuelle Publikation von Wilop et al.⁴⁹ berichtet ebenfalls von verringerten Thrombozytenzahlen nach Rituximabtherapien bei NHL-Patienten. Eine genaue Pathogenese dieses Phänomens konnte diese Studie aber auch nicht benennen. Über einen Zusammenhang von Thrombozyten mit GvH existieren nur begrenzt Daten. Vielleicht bestehen noch unbekannt Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und APC oder auch Lymphozyten. Es könnte auch sein, dass Thrombozyten direkt oder indirekt von GvH beeinflusst werden. Jedoch ist das alles reine Spekulation und die Frage nach einem genauen Pathomechanismus dieses vermeintlichen Zusammenhangs bleibt daher an dieser Stelle offen.

5.3. Warum korreliert die Menge von HSZ im Transplantat mit dem aGvH-Risiko?

Eine höhere Menge HSZ im Transplantat bezogen auf den Empfänger bedeutet ein höheres Risiko für aGvH (s. Abs. 4.7. und 4.8.). Einzel betrachtet (s. Abb. 19, S. 40) erscheint der Zusammenhang wesentlich deutlicher als im direkten Vergleich mit transplantierten T- und NK-Zellen (s. Tab. 8, S. 44). Dass alloreaktive T- und NK-Zellen das aGvH-Risiko erhöhen, ist nachgewiesen²¹. Die Aussagekraft der Einflüsse auf das Risiko für aGvH der einzelnen untersuchten Zellen muss aber relativiert werden. Zwar erhöhen T-Zellen das Risiko fast 16-fach und NK-Zellen immerhin gut auf das Dreifache, aber der kleine Datensatz dieser Untersuchung und die enorme Streuung der Werte beinhalten auch eine hohe Fehlerwahrscheinlichkeit (TH / CTL: $p = 0,66 / 0,73$; NK-Zellen: $p = 0,73$). Mehr HSZ steigern das Risiko

dagegen „nur“ um 27%. Mit $p = 0,1$ ist die Fehlerwahrscheinlichkeit aber deutlich geringer.

HSZ differenzieren zu NK-Zellen und dendritischen Zellen bzw. APC. Logisch und vorstellbar wäre, dass mehr HSZ zu mehr NK-Zellen und APC werden können. Die Menge von APC nach einer Transplantation wurde schon mit erhöhtem GvH-Risiko in Verbindung gebracht³². Bei Patienten, die mit und ohne Rituximab behandelt worden sind, wurden in etwa gleiche Mengen HSZ pro kg KG transplantiert. Die interessante Frage ist an dieser Stelle, ob Rituximab einen Einfluss auf die Differenzierung der Stammzellen zu dendritischen Zellen (bzw. APC allgemein) hat?

Das könnte ein weiterer möglicher Pathomechanismus sein, durch den Rituximab seine protektive Wirkung gegen aGvH bewirkt. Eine genauere Festlegung oder Prognose lassen die Daten dieser Studie nicht zu. Dies ist eine bislang nicht untersuchte Hypothese, deren Lösung sicher einiges Potential beinhaltet.

5.4. Sollte ATG und Rituximab generell als aGvH-Prophylaxe indiziert werden?

Die aGvH-Inzidenzrate nach Transplantationen mit verwandten Spendern liegt in meiner Studie bei 100% (9/9). Das erscheint sehr hoch gegenüber einer Rate von rund 30% bei fremden Spendern (8/25). Der auffälligste Unterschied im Rahmen der Transplantationen war, dass bei verwandten Spendern nur in zwei Fällen mit ATG konditioniert wurde. Bei Fremdspendern hingegen bekamen alle Empfänger ATG.

Mit dem Wissen, dass ATG die aGvH-Rate ungemein mindert, stellt sich die Frage, warum nicht gleich alle Patienten prophylaktisch ATG bekommen könnten?

Oder warum man nicht allen Patienten ATG und Rituximab geben sollte, wenn diese Kombination vielleicht sogar kompletten Schutz gegen aGvH bietet?

Der entscheidende Punkt ist der Spagat zwischen größtmöglichem therapeutischem Nutzen (GvL) und einem überschaubaren Risiko (GvH). Denn wenn keine aGvH mehr auftritt, muss davon ausgegangen werden, dass auch der erwünschte GvL-Effekt ausbleibt. Genau dieser Effekt ist aber die Stärke von allogenen Transplantationen. Daher muss in Zukunft genauer untersucht werden, ob Rituximab und / oder ATG ihren Effekt gegen aGvH zulasten von GvL bewirken. Wenn das der Fall ist, würde es in den meisten Fällen eindeutig gegen eine aGvH-

Prophylaxe aus ATG und Rituximab sprechen. Falls GvL aber bestehen bleiben würde, wäre es ein enormer Fortschritt in Bezug auf das Risikomanagement von allogenen PBSZT und sollte unbedingt in größeren randomisierten Studien evaluiert werden.

Allerdings gibt es auch Transplantationsumstände, bei denen eine aGvH in jedem Fall vermieden werden will. Zum Beispiel bei der schweren aplastischen Anämie (SAA), die hauptsächlich bei Kindern auftritt. In solchen Fällen würde ich es schon jetzt für sinnvoll halten, ATG mit Rituximab als aGvH-Prophylaxe in Betracht zu ziehen.

6. Schlussfolgerung

Rituximab reduziert das Risiko für und die Inzidenz von aGvH. Wie groß dieser Effekt im Detail ist und in wie weit eine Abhängigkeit zu ATG besteht, muss in weiterführenden, größeren und randomisierten Studien endgültig geklärt werden. Außerdem sollte die Rolle von B-Lymphozyten in der Entstehung und Mediation von GvH-Reaktionen neu überdacht werden.

Literaturverzeichnis:

- 1 Akpek G, Boitnott JK, Lee LA, Hallick JP, Torbenson M, Jacobsohn DA, et al.: Hepatitic variant of graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusion. *Blood* 100 (2002) 3903-3907
- 2 Anderlini P, Korbling M: The use of mobilized peripheral blood stem cells from normal donors for allografting. *Stem Cells* 15 (1997) 9-17
- 3 Arpinati M, Chirumbolo G, Sauntharajah Y, Stanzani M, Bonifazi F, Bandini G, et al.: Higher numbers of blood CD14+ cells before starting conditioning regimen correlate with greater risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic stem cell transplantation from related donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 13 (2007) 228-234
- 4 Banovic T, MacDonald KP, Morris ES, Rowe V, Kuns R, Don A, et al.: TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 106 (2005) 2206-2214
- 5 Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al.: Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 344 (2001) 175-181
- 6 Billingham RE: The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62 (1966) 21-78
- 7 Blazar BR, Taylor PA, Linsley PS, Vallera DA: In vivo blockade of CD28/CTLA4: B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice. *Blood* 83 (1994) 3815-3825
- 8 Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Buhlman J, Xu J, Flavell RA, et al.: Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J Immunol* 158 (1997) 29-39
- 9 Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Gray GS, Vallera DA: Coblockade of the LFA1:ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex-disparate donor grafts. *Blood* 85 (1995) 2607-2618
- 10 Boue F, Gabarre J, Gisselbrecht C, Reynes J, Cheret A, Bonnet F, et al.: Phase II trial of CHOP plus rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 24 (2006) 4123-4128

- 11 Brown GR, Lee E, Thiele DL: TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal graft-versus-host disease in MHC class II-disparate (C57BL/6J-->C57BL/6J x bm12)F1 mice. *J Immunol* 168 (2002) 3065-3071
- 12 Cutler C, Miklos D, Kim HT, Treister N, Woo SB, Bienfang D, et al.: Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 108 (2006) 756-762
- 13 Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al.: Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350 (2004) 2572-2581
- 14 Garcia Hernandez FJ, Ocana Medina C, Gonzalez Leon R, Garrido Rasco R, Colorado Bonilla R, Castillo Palma MJ, et al.: [Rituximab for treatment of patients with systemic autoimmune diseases]. *Med Clin (Barc)* 128 (2007) 458-462
- 15 Gratwohl A, Schmid O, Baldomero H, Horisberger B, Urbano-Ispizua A: Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe 2002. Changes in indication and impact of team density. A report of the EBMT activity survey. *Bone Marrow Transplant* 34 (2004) 855-875
- 16 Herve P, Flesch M, Tiberghien P, Wijdenes J, Racadot E, Bordigoni P, et al.: Phase I-II trial of a monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody for the treatment of refractory severe acute graft-versus-host disease. *Blood* 79 (1992) 3362-3368
- 17 Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL: Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90 (1997) 3204-3213
- 18 Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75 (1990) 555-562
- 19 Jacobsohn DA, Vogelsang GB: Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* 2 (2007) 35
- 20 Kaplan LD, Lee JY, Ambinder RF, Sparano JA, Cesarman E, Chadburn A, et al.: Rituximab does not improve clinical outcome in a randomized phase 3 trial of CHOP with or without rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin lymphoma: AIDS-Malignancies Consortium Trial 010. *Blood* 106 (2005) 1538-1543
- 21 Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ: Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* 68 (1986) 770-773
- 22 Kinch A, Oberg G, Arvidson J, Falk KI, Linde A, Pauksens K: Post-transplant lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation after introduction of

- monitoring of viral load by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 39 (2007) 235-244
- 23 Krejci M, Doubek M, Buchler T, Brychtova Y, Vorlicek J, Mayer J: Mycophenolate mofetil for the treatment of acute and chronic steroid-refractory graft-versus-host disease. *Ann Hematol* 84 (2005) 681-685
- 24 Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, et al.: Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 349 (2003) 2201-2210
- 25 Liossis SN, Sfikakis PP: Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: potential effects on T cells. *Clin Immunol* 127 (2008) 280-285
- 26 Litvinova E, Maury S, Boyer O, Bruel S, Benard L, Boisserie G, et al.: Graft-versus-leukemia effect after suicide-gene-mediated control of graft-versus-host disease. *Blood* 100 (2002) 2020-2025
- 27 Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, et al.: HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 13 (2007) 965-974
- 28 Martino R, Romero P, Subira M, Bellido M, Altes A, Sureda A, et al.: Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. *International Bone Marrow Transplant Registry. Bone Marrow Transplant* 24 (1999) 283-287
- 29 Mohty M, Blaise D, Faucher C, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM, et al.: Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 106 (2005) 4407-4411
- 30 Nehring AK, Dua U, Mollee P, Gill D, Grimmert K, Khanna R, et al.: Epstein-Barr virus T-cell immunity despite rituximab. *Br J Haematol* 136 (2007) 628-632
- 31 Pescovitz MD: Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 6 (2006) 859-866
- 32 Rajasekar R, Mathews V, Lakshmi KM, Sellathamby S, George B, Viswabandya A, et al.: Plasmacytoid dendritic cell count on day 28 in HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant predicts the incidence of acute and chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 14 (2008) 344-350
- 33 Reddy P, Ferrara JL: Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 17 (2003) 187-194

- 34 Rezk SA, Weiss LM: Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* 38 (2007) 1293-1304
- 35 Rowe JM, Goldstone AH: How I treat acute lymphocytic leukemia in adults. *Blood* 110 (2007) 2268-2275
- 36 Saito K, Tanaka Y: [Targeting CD20 in rheumatoid arthritis]. *Nippon Rinsho* 65 (2007) 1243-1249
- 37 Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischler J, Kolb HJ: Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 23 (2005) 5675-5687
- 38 Sfrikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, Vigklis V, Fragiadaki KG, Iniotaki A, et al.: Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis Rheum* 52 (2005) 501-513
- 39 Slavin S: New strategies for bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 12 (2000) 542-551
- 40 Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P: Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* 150 (2007) 197-214
- 41 Takami A, Mochizuki K, Okumura H, Ito S, Suga Y, Yamazaki H, et al.: Mycophenolate mofetil is effective and well tolerated in the treatment of refractory acute and chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 83 (2006) 80-85
- 42 Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, et al.: Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 44 (2005) 176-182
- 43 Tsao L, Hsi ED: The clinicopathologic spectrum of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Pathol Lab Med* 131 (2007) 1209-1218
- 44 Ueno Y, Ishii M, Yahagi K, Mano Y, Kisara N, Nakamura N, et al.: Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft versus host disease. *Hepatology* 31 (2000) 966-974
- 45 Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, Risselada A, Klareskog L, van Vollenhoven R, et al.: Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clin Immunol* 122 (2007) 62-74

- 46 van Bekkum DW, de Vries MJ, van der Waay D: Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. *J Natl Cancer Inst* 38 (1967) 223-231
- 47 Velardi A, Ruggeri L, Alessandro, Moretta L: NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol* 23 (2002) 438-444
- 48 Via CS, Nguyen P, Shustov A, Drappa J, Elkon KB: A major role for the Fas pathway in acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 157 (1996) 5387-5393
- 49 Wilop S, Galm O, Dada R, Osieka R, Jost E: Rituximab-associated changes in platelet count in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 49 (2008) 2116-2124
- 50 Zander AR, Kroger N, Schleuning M, Finke J, Zabelina T, Beelen D, et al.: ATG as part of the conditioning regimen reduces transplant-related mortality (TRM) and improves overall survival after unrelated stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Bone Marrow Transplant* 32 (2003) 355-361

Tabelle 10: Fortsetzung

Karnofsky-Index (%)	Gewicht bei Tx (kg)	CD3(+)-Zellen tx (x10 ⁸ /kgKG)	CD3/CD4(+)-Zellen tx (x10 ⁸ /kgKG)	CD3/CD8(+)-Zellen tx (x10 ⁸ /kgKG)	CD19(+)-Zellen tx (x10 ⁸ /kgKG)	CD16(+)-Zellen tx (x10 ⁸ /kgKG)	CD34(+)-Zellen tx (x10 ⁶ /kgKG)	Spender Status	
100	69	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	6,00	mrd	1
80	65	1,488	1,020	,500	,550	,300	14,24	mud	2
80	75	3,698	2,158	1,328	,830	,608	8,27	mmrd	3
80	55	2,241	,861	1,178	,374	,172	6,63	mud	4
100	69	2,428	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	5,36	mud	5
80	83	1,240	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	5,48	mud	6
80	105	,157	,095	,062	,033	,016	5,83	mud	7
90	76	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	8,20	mud	8
100	68	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	6,06	mud	9
80	71	10,891	7,909	2,404	4,369	1,894	5,43	mrd	10
90	63	2,450	1,652	,722	,545	,297	11,15	mmud	11
80	73	3,328	2,287	,942	,416	,559	10,32	mmud	12
70	49	3,234	2,233	1,025	1,037	,619	5,90	mud	13
90	90	5,392	3,870	1,549	1,366	,814	6,17	mud	14
80	70	1,711	,894	,663	,203	,372	11,50	mmud	15
100	85	1,461	1,098	,501	,204	,095	4,32	mud	16
80	105	,973	,593	,395	,273	,258	6,80	mud	17
80	65	4,044	2,206	1,752	,961	,566	9,90	mud	18
90	72	1,170	,738	,428	,311	,311	10,36	mrd	19
90	70	2,148	1,241	,923	,497	,639	9,93	mrd	20
90	60	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	10,69	mrd	21
90	79	4,893	2,573	2,116	1,338	1,197	4,78	mud	22
80	117	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	3,52	mud	23
60	96	,263	,148	,119	,063	,063	1,34	mmud	24
90	94	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	4,43	mud	25
100	73	3,298	1,974	1,349	,771	,482	4,14	mrd	26
90	71	3,967	2,577	1,389	1,145	,600	14,47	mud	27
70	52	1,124	,626	,424	,331	,332	11,10	mud	28
100	90	2,595	1,757	,687	1,036	,436	4,86	mud	29
70	77	2,796	1,674	1,062	1,062	,287	14,08	mrd	30
80	75	1,999	1,086	,784	,724	,241	13,01	mmud	31
80	60	,515	,315	,147	,303	,026	1,51	mud	32
90	94	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	6,15	mrd	33
90	80	,960	,525	,437	,350	,263	4,85	mmud	34
34	34	27	25	25	25	25	34	34	Gesamt

Tabelle 11: Infektionen im Zusammenhang mit GvH

		Auftreten der GvH (Tage nach Tx)	EBV	Auftreten EBV- Infektion (Tage nach Tx)	CMV	Auftreten CMV- Infektion (Tage nach Tx)	Anti CMV IgG Status Empfänger / Spender	
Ja	1	n.v.	nein	.	nein	.	+/+	
	2	78	ja	-22	nein	.	-/-	
	3	16	ja	7	Ja	11	+/+	
	4	22	ja	168	nein	.	-/-	
	5	13	ja	49	Ja	90	+/-	
	6	27	ja	47	Ja	36	+/-	
	7	30	ja	80	Ja	20	+/+	
	8	22	ja	27	Ja	33	+/-	
	9	30	ja	153	Ja	37	+/-	
	10	59	ja	59	nein	.	-/-	
	11	5	nein	.	Ja	5	+/+	
	12	19	nein	.	nein	.	+/+	
	13	16	nein	.	nein	.	-/-	
	14	49	ja	n.v.	Ja	433	+/+	
	15	60	nein	.	nein	.	+/+	
	16	22	ja	4	nein	.	+/-	
	17	27	nein	.	nein	.	+/+	
		Ges.	17	17	11	17	8	17
aGvH	Nein	1	173	nein	.	nein	.	+/-
		2	.	ja	64	nein	.	+/+
		3	.	nein	.	Ja	51	+/-
		4	.	ja	48	Ja	33	+/-
		5	.	ja	76	nein	.	-/-
		6	.	ja	41	Ja	45	+/-
		7	.	ja	24	nein	.	+/-
		8	.	nein	.	nein	.	+/+
		9	.	ja	9	nein	.	-/-
		10	.	nein	.	Ja	7	+/+
		11	.	nein	.	Ja	12	+/-
		12	.	nein	.	Ja	38	+/-
		13	.	ja	-57	Ja	-15	+/-
		14	.	ja	345	nein	.	+/-
		15	.	nein	.	nein	.	+/-
		16	.	nein	.	nein	.	+/-
		17	.	nein	.	nein	.	+/-
		Ges.	1	17	8	17	7	17
	Ges. N	17	34	18	34	15	34	

Tabelle 12: Rituximab nach der Transplantation mit Beginn der aGvH

			Beginn der GvH (Tage nach Tx)	Rituximab nach Tx (EBV / PTLD / PD)	1. Applikation von Rituximab nach Tx (Tage nach Tx)	GvH
Rituximab in der Kondition- ierung	Nein	1	n.v.	Nein	.	aGvH
		2	173	Nein	.	cGvH
		3	78	Nein	.	aGvH
		4	.	Nein	.	-
		5	.	Nein	.	-
		6	.	Ja	49	-
		7	16	Ja	105	aGvH
		8	22	Ja	176	aGvH
		9	13	Ja	52	aGvH
		10	27	Ja	51	aGvH
		11	<30	Ja	88	aGvH
		12	22	Ja	118	aGvH
		13	<30	Ja	156	aGvH
		14	.	Ja	89	-
		15	59	Ja	63	aGvH
		16	.	Ja	49	-
		17	.	Ja	31	-
		18	5	Nein	.	aGvH
		19	19	Nein	.	aGvH
		20	16	Nein	.	aGvH
		21	49	Ja	87	aGvH
Gesamt		N	12	21	13	21

Tabelle 13: Rituximab (vor / während / nach der Konditionierung) und ATG

		Rituximab < 6 Monate vor Tx	1. Applikation von Rituximab nach Tx (Tage)	ATG in Kond.	GvH	
Rituximab in der Kondition- ierung	Nein	1	Nein	.	Nein	aGvH
		2	Nein	.	ja	cGvH
		3	Nein	.	ja	aGvH
		4	Nein	.	ja	Nein
		5	Nein	.	ja	Nein
		6	Nein	49	ja	Nein
		7	Nein	105	ja	aGvH
		8	Nein	176	ja	aGvH
		9	Nein	52	ja	aGvH
		10	Nein	51	ja	aGvH
		11	Nein	88	ja	aGvH
		12	Nein	118	ja	aGvH
		13	Nein	156	ja	aGvH
		14	Nein	89	ja	Nein
		15	Nein	63	ja	aGvH
		16	Nein	49	ja	Nein
		17	Nein	31	ja	Nein
		18	Nein	.	ja	aGvH
		19	Nein	.	Nein	aGvH
		20	Ja	.	Nein	aGvH
		21	Ja	87	Nein	aGvH
Gesamt		N	21	13	21	21
Rituximab in der Kondition- ierung	Ja	1	Ja	.	ja	Nein
		2	Ja	.	ja	Nein
		3	Ja	.	ja	Nein
		4	Ja	15	ja	Nein
		5	Ja	.	Nein	aGvH
		6	Ja	105	ja	Nein
		7	Ja	2	ja	Nein
		8	Ja	424	ja	Nein
		9	Ja	.	Nein	aGvH
		10	Ja	.	ja	Nein
		11	Ja	.	ja	Nein
		12	Ja	10	Nein	aGvH
		13	Nein	.	ja	Nein
		Gesamt		N	13	5
Gesamt		N	34	18	34	34

Tabelle 14: GvH in Abhängigkeit zum Spender-Status

			GvH	Rituximab in der Konditionierung	ATG in der Konditionierung	
Spender- Status	mrd	1	aGvH	Nein	Nein	
		2	aGvH	Nein	Ja	
		3	aGvH	Nein	Nein	
		4	aGvH	Nein	Nein	
		5	aGvH	Nein	Nein	
		6	aGvH	Ja	Nein	
		7	aGvH	Ja	Nein	
		8	aGvH	Ja	Nein	
	Gesamt		N	8	8	8
	mmrd	1		aGvH	Nein	Ja
		Gesamt		N	1	1
	mud	1		cGvH	Nein	Ja
		2		Nein	Nein	Ja
		3		Nein	Nein	Ja
		4		Nein	Nein	Ja
		5		aGvH	Nein	Ja
		6		aGvH	Nein	Ja
		7		aGvH	Nein	Ja
		8		aGvH	Nein	Ja
		9		Nein	Nein	Ja
		10		Nein	Nein	Ja
		11		Nein	Nein	Ja
		12		aGvH	Nein	Ja
		13		Nein	Ja	Ja
		14		Nein	Ja	Ja
		15		Nein	Ja	Ja
		16		Nein	Ja	Ja
17			Nein	Ja	Ja	
18			Nein	Ja	Ja	
19			Nein	Ja	Ja	
Gesamt		N	19	19	19	
mmud	1		aGvH	Nein	Ja	
	2		aGvH	Nein	Ja	
	3		aGvH	Nein	Ja	
	4		Nein	Ja	Ja	
	5		Nein	Ja	Ja	
	6		Nein	Ja	Ja	
Gesamt		N	6	6	6	
Gesamt		N	34	34	34	

Thesen:

1. Die akute Graft-versus-Host-Reaktion (GvH) ist die Hauptursache der transplantationsassoziierten Mortalität nach allogenen Stammzelltransplantationen.
2. Die akute GvH ist eine Immunreaktion zwischen immunkompetenten Spenderzellen und antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers.
3. Ohne immunkompetente Zellen im Transplantat kann es keine Graft-versus-Lymphom-Wirkung (GvL) geben.
4. Rituximab ist ein spezifischer CD20-Antikörper.
5. Unter Rituximab-Therapie treten weniger aGvH-Ereignisse auf.
6. Die Konditionierung mit einer Kombination aus Rituximab und ATG hat einen sehr hohen protektiven Effekt auf die aGvH-Wahrscheinlichkeit.
7. Wird Rituximab erst nach der Transplantation und noch vor den ersten Anzeichen einer aGvH gegeben, tritt ebenfalls keine aGvH mehr auf.
8. Rituximab allein (ohne ATG) zeigt keinen protektiven Effekt auf die aGvH-Inzidenz.
9. Die CD20⁺ B-Zell-Rekonstitution ist bei Patienten mit Rituximab gehemmt.
10. Nach der Transplantation wiesen Patienten mit Rituximab durchschnittlich weniger Monozyten im Blut auf.
11. Patienten, die mit Rituximab konditioniert sind, haben eine schnellere CD3⁺/CD8⁺ T-Zell-Rekonstitution.
12. Die Rekonstitution von CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen zeigte bei Patienten mit Rituximab keine Unterschied.
13. Patienten mit Rituximab wiesen nach der Transplantation mehr Leukozyten im Blut auf.
14. Patienten mit Rituximab wiesen nach der Transplantation weniger Thrombozyten im Blut auf.
15. Nach der Behandlung mit Rituximab besteht keine höhere Infektneigung.
16. Die Menge an CD34⁺ HSZ im Transplantat korreliert positiv mit der aGvH-Inzidenz.

Tabellarischer Lebenslauf

- Persönliche Daten: Vincent Manuel Schütte
Goethestr. 1, 06114 Halle/Saale
E-mail: VincentSchuette@t-online.de
Geb. 26.10.1983 in Halle/Saale (D)
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: ledig
- Eltern: Mutter – Barbara Schütte, geb. 16.6.1960, selbständige Apothekerin in Halle
- Schulbildung: 1990 – 1994 Grundschule Brunnen / Wittekind in Halle
1994 – 2000 Thomas-Müntzer-Gymnasium Halle
2000 – 2001 London Highschool (Ohio, USA)
2001 – 2003 Thomas-Müntzer-Gymnasium Halle und Abschluss mit Abitur (1,7)
- Berufsausbildung: seit 2003 Medizinische Fakultät der MLU Halle-Wittenberg (z. Zt. 12. Fachsemester)
2005 Abschluß des 1. Staatsexamens
10/2006 Beginn der Promotionsarbeit an der Klinik für Innere Medizin IV, Universitätsklinikum der Medizinischen Fakultät der MLU Halle (Saale)
Seit August 2008 Pflichtassistent (PJ) an der Klinik für Orthopädie / Unfallchirurgie der MLU Halle (Saale)
Voraussichtl. Abschluss mit 2. Staatsexamen im Herbst 2009
- Publikationen:
- Maximilian Christopeit*, Vincent Schütte*, Sebastian Theurich, Thomas Weber, Wilfried Grothe, Gerhard Behre. Rituximab reduces the incidence of acute graft versus host disease. Blood 113 (2009) 3130-3131

- Maximilian Christopeit*, Vincent Schütte*, Gerhard Behre. Rituximab attenuates the unspecific immune system. Manuskript zur Publikation eingereicht, 2009
- Maximilian Christopeit*, Vincent Schütte*, Sebastian Theurich, Thomas Weber, Wilfried Grothe, Gerhard Behre. Rituximab significantly reduces the incidence of acute graft-versus-host disease and attenuates the unspecific cellular immune system. Vortrag, Jahrestagung der Europäischen Knochenmarktransplantationsgesellschaft (EBMT) 2009, Göteborg
- Maximilian Christopeit*, Vincent Schütte*, Lutz Peter Müller, Martin Eikam, Wilfried Grothe, Thomas Weber, Anke Mütherig, Sebastian Theurich, Gerhard Behre. Rituximab reduces the incidence of acute graft-versus-host disease in an unselected series of twenty-nine patients undergoing allogeneic stem cell transplantation at a single centre. Poster, Jahrestagung der Europäischen Knochenmarktransplantationsgesellschaft (EBMT) 2007, Lyon
- Maximilian Christopeit*, Vincent Schütte*, Martin Eikam, Thomas Weber, Sebastian Theurich, Anke Mütherig, Mike Becker, Wilfried Grothe, Gerhard Behre. Rituximab reduces the incidence of acute graft-versus-host disease. Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2007, Basel
- Maximilian Christopeit*, Vincent Schütte*, Thomas Weber, Wilfried Grothe, Anke Mütherig, Sebastian Theurich, Mike Becker, Martin Eikam, Gerhard Behre. Is parvovirus B19 infection a trigger of graft-versus-host disease? Poster, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2007, Basel

* Gleichberechtigte Erstautorschaft.

Halle, den

V. Schütte

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend gekennzeichnet habe. Weder diese noch eine andere Dissertation wurde von mir an einer anderen Fakultät zum Zwecke der Promotion eingereicht.

Dies ist mein erstes Promotionsverfahren und ich habe auch vorher noch keine Promotionsversuche unternommen.

Halle, den

V. Schütte

Publikation(en)

- Maximilian Christopeit*, Vincent **Schütte***, Sebastian Theurich, Thomas Weber, Wilfried Grothe, Gerhard Behre. Rituximab reduces the incidence of acute graft versus host disease. **Blood** 113 (2009) 3130-3131
- Maximilian Christopeit*, Vincent **Schütte***, Gerhard Behre. Rituximab attenuates the unspecific immune system. Manuskript zur Publikation eingereicht, 2009

**Gleichberechtigte Erstautorschaft*

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn PD Dr. med. Gerhard Behre für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion in dem von ihm geleiteten Bereich (Knochenmarktransplantationszentrum, Klinik für Innere Medizin IV, Onkologie und Hämatologie, Universitätsklinikum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle (Saale)).

An dieser Stelle danke ich auch Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll als Direktor der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) für die Zulassung zur Promotion an seiner Klinik.

Besonderer Dank geht vor allem auch an Dr. med. Maximilian Christopeit (Klinik für Innere Medizin IV, Onkologie und Hämatologie, Universitätsklinikum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle (Saale)), für die ständige fachliche Unterstützung und Anregung, mit der er mir jederzeit zur Verfügung stand.

Vielen Dank möchte ich auch meinem Freund und treuem Promotionsmitstreiter Andreas Rupprecht sagen. Der ständige Austausch von Erfahrungen sowie der Fortschrittmeldungen unserer eigenen Arbeiten aber auch die zahlreichen regen Diskussionen in der Kleinen Ulrichstraße haben mich immer wieder angetrieben und mir über so manches Motivationstief hinweggeholfen.

Meinem Onkel (W.S.) danke ich für seine gute Beratung bei der Wahl einer geeigneten Arbeit und ebenfalls für den guten Ansporn, den er mir durch regelmäßiges Nachfragen und Anzweifeln meines Fortschritts gegeben hat.

Ebensogroßen Dank möchte ich meiner Mutter sagen, ohne deren Unterstützung ich nicht die Zeit hätte aufbringen können, diese Promotion während meines Studiums fertig zu stellen. Danke!