

Diplomarbeit

**Immunrecovery nach Alpha-Beta-T-Zell-depletierter
Stammzelltransplantation**

Eingereicht von

Roland Michael Wilfing

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für pädiatrische Hämato-Onkologie

unter der Anleitung von

Ao.Univ.-Prof.Dr.med.univ. Wolfgang Schwinger

Dr.ⁱⁿ med.univ. Daniela Sperl

Graz, am 23.2.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 23.2.2015

Roland Wilfing eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich im Laufe meines Studiums und beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. univ. Wolfgang Schwinger bedanken, dass er mir dieses spannende Thema bereitgestellt hat. Ebenso bei Dr. med. univ. Daniela Sperl, die jederzeit zur Verfügung stand, wenn ich Fragen hatte und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne sie wäre es mir viel schwerer gefallen, einen Einblick in die Thematik zu erhalten.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei meiner Familie bedanken, die es mir ermöglicht hat, mein Studium zu absolvieren und mir immer Rückhalt gegeben hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen Freunden und meiner Freundin bedanken, die meine Studienzeit zu einer Zeit gemacht haben, an die ich gerne zurückdenken werde.

Inhaltsverzeichnis

<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	<u>I</u>
<u>DANKSAGUNGEN</u>	<u>II</u>
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>III</u>
<u>GLOSSAR UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>IV</u>
<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>VI</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>VII</u>
KAPITEL 1 EINFÜHRUNG	1
KAPITEL 2 HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION	3
2.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation Begriffe	3
2.1.1. Human Leukocyte Antigen (HLA)	3
2.1.2. HLA-idente Spenderzellen und GvL Effekt	6
2.1.3. Haploidente Spenderzellen	7
2.1.4. α/β -Depletion	8
2.1.4. CD19 ⁺ Depletion	10
2.1.5. CD34 ⁺ Megadose Infusion	13
KAPITEL 3 STAMMZELLSPENDE	14
3.1. Stammzellspende	14
3.1.1. Knochenmark	14
3.2.2. Stammzellapherese	15
3.2.3. Nabelschnurblut	17

KAPITEL 4 KONDITIONIERUNG	19
4.1. Definition	19
4.2. Auswirkungen der Konditionierung auf die Fertilität	21
4.2.1. Fertilität von Mädchen	22
4.2.2. Fertilität von Jungen	23
4.3. Myeloablative Konditionierung (MA)	25
4.3.1. Total-body Irradiation (TBI)	25
4.3.2. Alkylanzien und Purinanaloga	27
4.3.3. Polyklonale Antikörper	30
4.4. Nicht-myeloablative Konditionierung (NMA)	32
4.5. Reduced intensity Konditionierung (RIC)	32
KAPITEL 5 GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE (GVHD)	34
5.1. Akute GvHD	35
5.1.1. Pathophysiologie	35
5.1.2. Klinik der aGvHD	36
5.1.3. Therapie der aGvHD	37
5.2. Chronische Graft-versus-Host Disease (cGvHD)	40
5.2.1. Pathophysiologie der cGvHD	40
5.2.2. Klinik der cGvHD	42
5.2.2. Behandlung der cGvHD	45
KAPITEL 6 IMMUNE REKONSTITUTION	46
6.1. Die Kinetik der Immunrecovery nach HSCTx	46
6.1.1. Neutrophile Granulozyten	46
6.1.2. Natürliche Killerzellen	47
6.1.3. Monozyten	49
6.1.4. Dendritische Zellen	50
6.1.5. CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen	52
6.2. Immunrekonstitution nach alpha-/beta Depletion	54

KAPITEL 7 SPEZIELLER TEIL	58
7.1. Datensammlung	58
7.2. Patientinnen/Patienten	58
7.3. Methoden	62
7.3.1. Transplantationsvorgang	62
7.4. Engraftment	66
7.4.1. CD3 ⁺ Zellen	68
7.4.2. CD56/3 ⁻ Zellen	69
7.4.3. CD19 ⁺ Zellen	70
7.4.4. α/β^+ T-Zellen	71
7.4.5. γ/δ^+ T-Zellen	72
7.4.6. α/β - γ/δ A/B-G/D Verlauf	73
7.5. Verlauf	74
7.5.1. Outcome	74
7.5.2. GvHD	74
7.5. Diskussion	77
KAPITEL 8 LITERATURVERZEICHNIS	79

Glossar und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	akute Graft-versus-Host Krankheit
ALC	absolute Lymphozyten-Zahl
ALL	akute lymphatische/lymphoblastische Leukämie
alloHSCTx	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
ALT	Alanin-Aminotransferase
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigen-präsentierende Zelle
ASBMT	American Society for Blood and Marrow Transplantation
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATG	Antithymozytenglobulin
AUC	Area unter the Curve
BAFF	B-cell activation Faktor
BEAM	Therapieplan Carmustin, Etoposid, Cytarabin und Melphalan umfassend
BO	Bronchiolitis obliterans
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony-forming Unit
cGvHD	chronische Graft-versus-Host Krankheit

cGy	Zenti-Gray – 100 Gray
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
Clo	Clofarabin
CMV	Cytomegalie Virus
CSA	Cyclosporin A
Cy	Cyclosporin
DAMP	damage-associated molecular Pattern
DC	dendritische Zelle
DFS	disease-free Survival – krankheitsfreies Überleben
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBMT	European Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr Virus
ECT	extrakorporale Photochemotherapie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	event-free Survival
FACS	fluorescence-activated cell sorting – Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie
Flu	Fludarabin
G-BM	G-CSF geprimtes Knochenmark
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GI	gastrointestinal
GnRH	Gonotropin Releasing Hormon - Gonadoliberin
GSG	Gewerbesicherheitsgesetz
GSS	GvHD-specific Survival

GvHD	Graft-versus-Host-Krankheit
GvL	Graft-versus-Leukemia
Gy	Gray – Joule/kg aufgenommene Strahlung
h	Stunde
haploHSCTx	haploidente hämatopoetische Stammzelltransplantation
HBTBI	hyperfractionated total body irradiation
HHV	humanes Herpesvirus
HLA	Human Leukocyte Antigen – humanes Leukozyten Antigen
HLH	hämophagozytische Lymphohistiozytose
HSCTx	hämatopoetische Stammzelltransplantation
i.v.	intravenös
IBMTR	International Bone Marrow Transplant Registry
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNKT	invariant natural-killer-T-cells
IVF	in-vitro Fertilisation
JMLD	juvenile metachromatische Leukodystrophie
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Rezeptor
KM	Knochenmark
L	Liter
LFS	Leukämie-freies Überleben

MA	myeloablative Konditionierung
Mb	Megabasenpaar
MDS	myelodysplastisches Syndrom
Mel	Melphalan
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
mHA	minor Histocompatibility Antigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolat Mofetil
MMRD	mismatched related Donor
MMUD	mismatched unrelated Donor
MRD	matched related Donor
MSD	matched sibling donor
MUD	matched unrelated Donor
myDC	myeloische dendritische Zelle
NIH	National Institute of Health
NK	natürliche Killerzelle
NMA	non-myeloablative Konditionierung
NRM	non-relapse Mortality
OS	overall survival
PAMP	pathogen-associated molecular Patterns
PBS	phosphate buffered Saline – phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction – Polymerase-

Kettenreaktion

pDC	plasmazytoische dendritische Zelle
PFS	progression-free Survival
pSCTx	Stammzelltransplantation aus peripherem Blut
PTLD	post-transplant lymphoproliferative Disorder – lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation
rez.	rezidivierend
RIC	reduced intensity conditioning
RSC	revised Seattle-Criteria
SAA	schwere aplastische Anämie
SCD	Sichelzellerkrankung
SCTx	Stammzelltransplantation
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SOP	Standard of Protocol
STBI	single dose total body irradiation
TBI	total body irradiation - Ganzkörperbestrahlung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TRD	treatment-related Deaths
TREC	T-cell receptor excision circle
Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zelle
Treo	Treosulfan
TRM	Therapy-related Mortality
TTP	Thiotepa

Tx	Transplantation
UCB	umbilical cord Blood
US	united states
UV	ultraviolett
VOD	venöse okklusive Leberkrankheit
α GelCer	α -Galaktosylceramid
μ l	Mikroliter

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Krankheiten
Tabelle 2	Patienten, Konditionierung und Spenderprofile
Tabelle 3	Zellzahlen im Transplantat
Tabelle 4	Immunrekonstitution Verlauf
Tabelle 5	immunsuppressive Therapie
Tabelle 6	Outcome

Grafikverzeichnis

Grafik 1	CD3 ⁺ Zellen Verlauf
Grafik 2	CD56/3 ⁻ Zellen Verlauf
Grafik 3	CD19 ⁺ Zellen Verlauf
Grafik 4	α/β^+ T-Zellen Verlauf
Grafik 5	γ/δ^+ T-Zellen Verlauf
Grafik 6	α/β - γ/δ Verlauf

Zusammenfassung

Vielen Patientinnen/Patienten an hämato-onkologischen Abteilungen kann nur durch eine Transplantation hämatopoetischer Stammzellen geholfen werden. Bei diesem Prozess wird das blutbildende System der/des Patientin/Patienten durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung zerstört und durch Stammzellen eines gesunden Spenders ersetzt.

Wie die Transplantation solider Organe stellt auch diese Art der Transplantation hohe Ansprüche an das durchführende Team und birgt große Risiken für die Patientinnen/Patienten. Durch das Einbringen eines neuen Immunsystems in den Körper entsteht eine Vielzahl an Problemen. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass das transplantierte Immunsystem nicht oder nur spät seine physiologische Funktion übernimmt und die/der Patientin/Patient dadurch über lange Perioden Pathogenen schutzlos ausgeliefert ist. Andererseits führt eine überschießende Immunreaktion, in der der neue Wirt als fremd erkannt und angegriffen wird, zu einer schweren Krankheit, die Graft-versus-Host-Krankheit genannt wird, die nicht selten zum Tod der/des Patientin/Patienten führt.

In dieser Arbeit wird die Immunrekonstitution von 17 Patientinnen/Patienten, die an der Universitätsklinik Graz und der Universitätsklinik Tübingen behandelt wurden, untersucht.

Die Stammzelltransplantationen wurden nach α/β -T-Zell-Depletion und CD19⁺ B-Zell-Depletion durchgeführt. Man erhofft sich, dass durch die teilweise Entfernung der immunkompetenten Zellen, die/der Patientin/Patient vor einer überschießenden Reaktion geschützt, aber durch die verbliebenen Zellen das Einwachsen des neuen blutbildenden Systems und der Schutz vor Krankheitserregern gewährleistet bleiben.

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass die angewandte Methode der α/β -T-Zell-Depletion bei den untersuchten Patientinnen/Patienten mit Erfolg durchgeführt wurde. Trotz sehr schwerer Krankheitsbilder konnte den meisten Patientinnen/Patienten geholfen werden. Auch eine umfangreiche Recherche in der Literatur deutet darauf hin, dass die Stammzelltransplantation nach α/β -T-Zell-Depletion eine gute Methode ist, Risiken zu minimieren und das bestmögliche Outcome für die Patientinnen/Patienten zu erzielen.

Abstract

Many patients in hemato-oncologic medicine can only be helped via a transplantation of hematopoietic stem cells. In this process the patient's own hematopoietic system is destroyed using chemotherapy or irradiation and replaced with a donor's hematopoietic system.

Like the transplantation of solid organs, the transplantation of stem cells is a complex undertaking for the performing team and is associated with a high risk for the patient. The introduction of an alien immune system into the patient's body may cause a wide spectrum of severe problems. On the one side of the spectrum is the fact that the transplant's engraftment may be delayed or even fail to regain its physiological abilities. The result is a long period in which the patient is defenceless against all pathogens. On the other side the new immune system developing from the transplanted cells may recognise its own host as alien and proceeds to attack the patient's body. This immune reaction is called graft-versus-host disease, which is associated with a high mortality.

In this paper the immune recovery of 17 patients, who were treated at the university hospitals at Graz and Tübingen, is examined.

The stem-cell-transplantations were performed after the depletion of α/β -T-cells and CD19⁺ B-cells. This procedure is meant to alter the transplants properties to not attack the host and to enable engraftment as much as defend the host from pathogens. The α/β -T-cells especially are held responsible for the graft-versus-host disease and the depletion should prevent these adverse effects.

The results show the effectiveness of the used method. Although the treated illnesses were severe and the stem-cell-transplantation is often a last resort treatment the results are encouraging. Most patients' diseases were treated effectively and only a few suffered from graft-versus-host disease. Also extensive research in literature suggests the effectiveness of the stem-cell transplantation after α/β -T-cell-depletion in minimizing the risks as well as achieving the best possible outcome for the patients.

Kapitel 1 Einführung

Das Immunsystem ist ein komplexes Gebilde, das sich aus hoch-spezialisierten Zellen zusammensetzt und sich über mehrere Organsysteme erstreckt. Fehlfunktionen des Immunsystems wirken sich auf den gesamten Körper aus, weswegen hämatologische Erkrankungen zu den am schwierigsten behandelnden Krankheiten zählen.

Vor allem bei malignen Erkrankungen ist es oft nicht möglich, die gesunden Zellen, die für das Überleben des Organismus essentiell sind, zu schützen und gleichzeitig alle Krebszellen zu vernichten. Dieser Fakt führt zur Notwendigkeit, das hämatopoetische System auf andere Art zu schützen oder wenn möglich, auch zu ersetzen. Auch gibt es angeborene und erworbene Fehler, die es notwendig machen, ein komplett neues System zu etablieren, da ohne Ersatz, gleich wie bei anderen Organen, das Überleben nicht möglich ist.

Hierzu wurden Methoden entwickelt, Knochenmarkszellen und später noch gezielter Stammzellen gesunder Spenderinnen/Spender zu entnehmen und diese auf die Patientinnen/Patienten zu übertragen. Die Möglichkeit, dies zu tun, rettete vielen, todkranken Patientinnen/Patienten das Leben. Doch kam die Behandlung nicht ohne ihren Preis und nicht ohne ihre Risiken. Ähnlich der Transplantation solider Organe, wie Herz oder Niere, erkennt das Immunsystem auch hier Fremdes als fremd und reagiert mit dem Angriff auf die neue Umgebung. Diese Reaktion wird als Graft-versus-Host Krankheit (=GvHD) bezeichnet und stellt eines der größten Risiken bei dieser Behandlung dar.

Die gezielte Eliminierung von immunkompetenten Zellen kann ähnlich einer starken immusuppressiven Therapie den Angriff auf die neue Umgebung unterbinden, allerdings mit dem Preis, dass der Körper anderen Angriffen durch Krankheitserreger schutzlos ausgeliefert ist.

Durch intensive Forschung und neuen Erkenntnissen über das Immunsystem versucht man nun, selektiv Zellen aus dem Transplantat zu entfernen, die für die GvHD verantwortlich sind, und dabei gleichzeitig alle Zellen, die den Körper vor Pathogenen schützen, im Transplantat zu belassen. Die Depletion von α/β -T-Zellen soll diese Aufgabe erfüllen.

In dieser Arbeit wird die Therapie von 17 Patientinnen/Patienten, die im Zeitraum zwischen 2010 und 2015 an den pädiatrischen, hämato-onkologischen Abteilungen der Universitätsklinik Graz und der Universitätsklinik Tübingen behandelt wurden, untersucht.

Es wird untersucht, ob durch die α/β -T-Zell-Depletion den Patientinnen/Patienten effektiver und sicherer geholfen werden kann und welche Methoden und Entwicklungen sich für die Zukunft noch ergeben können.

Kapitel 2 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

2.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation Begriffe

2.1.1. Human Leukocyte Antigen (HLA)

1958 erschienen 3 Publikationen von Jean Dausset, Jon van Rood und Rose Payne, die die Grundlage für das, was später als HLA-Komplex bekannt werden soll, legten. Sie beschrieben Antikörper, die bei Patientinnen/Patienten nach mehreren Geburten oder erhaltenen Bluttransfusionen gegen Leukozyten gebildet werden, aber nicht gegen alle Leukozyten. Aus der Reaktion gegen menschliche Leukozyten ergab sich auch der Name HLA – Human Leukocyte Antigen. Dem musste also ein System zu Grunde liegen, das nur gegen verschiedene Klassen von Leukozyten reagiert. Die Entdeckung, dass es Antigene gibt, die zwischen eigenen und fremden Leukozyten unterscheiden, brachte Dausset 1980 den Nobelpreis für Medizin, den er sich mit George Snell und Baruch Benacerraf für ihre Beiträge an der Erforschung teilte.¹ Trotzdem war die komplizierte Beziehung des Polymorphismus der Moleküle und dessen genetische Kodierung lange Zeit eine ungeklärte Frage für die Wissenschaft und wurde erst nach und nach durch internationale Zusammenarbeit gelöst. In den 1980ern war das allgemeine Bild soweit, dass man eine chromosomale Region am kurzen Arm von Chromosom 6 identifizierte, das sechs unterschiedliche, sehr variable Moleküle kodierte. A, B und C wurde auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und als Klasse I beschrieben und DR, DQ und DP die hauptsächlich auf Antigen-präsentierenden Zellen zu finden sind als Klasse II. Des Weiteren wurden noch HLA-G, -E und -F Antigene beschrieben, die nur in sehr spezifischen Geweben vorkommen und deswegen als nicht-klassische HLA-Klasse-I-Antigene bezeichnet wurden. Später wurden noch mehr Genloci beschrieben, die den HLA-Komplex bilden. Dieser besteht aus insgesamt 7,6 Mb (Megabasenpaaren), die 252 Gene bilden, von denen viele Immunfunktionen ausführen und damit in der Immunologie und der Transplantationsmedizin eine große Rolle spielen.² Vor allem in der Entwicklung der Knochenmarkstransplantation spielte die durch ein HLA-Mismatch ausgelöste GvHD

ein Hindernis für den Erfolg der Therapie. Hier wurde erkannt, dass bei Patientinnen/Patienten, die ihr Transplantat von HLA-identen Geschwistern bekamen, bessere Chancen auf Heilung hatten.

Aber was ist nun die genaue Funktion der HLA-Klasse I und II Antigene?

An Experimenten mit Mäusen fand man heraus, dass die HLA-Moleküle, die bei anderen Spezies MHC (Major Histocompatibility Complex) genannt werden, die hoch-spezifischen Immunantwort auf fremde Peptide steuern. Damit T-Lymphozyten auf Antigene reagieren können, müssen sie zuvor von anderen Zellen präsentiert werden und diese Präsentation basiert auf den MHC-Molekülen. Diese Interaktion von MHC-Antigen und T-Zelle wurde 1974 von Rolf Zinkernagel und Peter Doherty erstbeschrieben. Wird ein Antigen über das MHC-II Molekül einer APC präsentiert, wird im Gegensatz zu ein MHC-I nicht die Apoptose der präsentierenden Zelle eingeleitet, sondern das Immunsystem über die T-Helferzellen aktiviert.³ Daher kann man sagen, dass die Benennung des Proteins als Human-Leukozyte-Antigen oder Major-histocompatibility-Antigen an der eigentlichen Funktion des Komplexes vorbeigeht und nur ein Nebenprodukt der Funktion beschreibt. Viel passender wäre wahrscheinlich der Name Major-Immune-Response-Complex, aber der historische Name wird weiterhin bestehen bleiben.⁴

Wenn man von Zwillingspenden und autologen Spenden absieht, werden Spenderinnen/Spender und Empfängerinnen/Empfänger in ihrem genetischen Code immer Unterschiede aufweisen. Dies betrifft die Genomstruktur, minor-histocompatibility-Antigene, Killer-cell immunoglobulin-like Rezeptor (KIR) Gene und noch einige Gene mehr. Die für die Transplantation am relevantesten Antigene sind die HLAs, die von mehreren Genen im MHC-Locus definiert werden. Wie in späteren Kapiteln beschrieben, verleihen die MHC Moleküle dem Immunsystem die Fähigkeit Eigen von Fremd zu unterscheiden. Dadurch hat Diversität an diesem Ort die größte Auswirkung auf die Reaktion zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger. Momentaner Standard ist die Bestimmung der A-, B-, C-, DRB1- und DQB1-Genloci, obwohl zu erwähnen ist, dass die mögliche Wichtigkeit der Bestimmung der DPB1- und DRB3/4/5- und weiterer Loci auch eine Relevanz für das Gelingen der Transplantation haben könnte. Vor allem im Hinblick auf den möglichen Einfluss von zirkulierenden HLA-Antikörpern nach der Sensibilisierung durch Kontakt mit HLA fremden Gewebe, wie zum Beispiel nach Transfusionen oder Schwangerschaft, könnte eine Ursache für Graftversagen nach

HLA-identer Transplantation sein. Diese Antikörper sind auf verschiedene HLA-Antigene gerichtet, die in der üblichen Prüfung nicht erfasst werden.⁵ Die/der optimale Spenderin/Spender ist dabei eine/ein Geschwisterspenderin/Geschwisterspender, die/der in beiden Allelen der HLA-A-, B-, C-, DRB1- und DQB1-ident ist. So eine/ein Spenderin/Spender existiert in 15-30% aller Fälle, abhängig von der Anzahl der Geschwister.⁶ Für all jene für die keine passenden Geschwisterspenderinnen/Geschwisterspender oder andere HLA-idente, verwandte Spenderinnen/Spender, wie in manchen Fällen Eltern oder andere nahe Verwandte, zur Verfügung stehen, besteht die Möglichkeit, nach einer/einem nicht-verwandten 'fully-matched' Spenderin/Spender zu suchen. Je nach Ethnie der/des Empfängerin/Empfängers kann die Chance eine/einen passende/passenden Spenderin/Spender zu finden zwischen 30-70% schwanken.⁷ Die übrigen 15-50%, für die sich unter diesen Optionen keine/kein Spenderin/Spender finden lässt, brauchen alternative Spenderinnen/Spender, womit Spenderinnen/Spender mit verschieden großen HLA-Unterschieden gemeint sind.

Die drei Hauptgruppen von alternativen Spendern sind:

- haploidentische verwandte Spender (5-8/10 passende Allele), die vor allem im pädiatrischen Setting eine große Bedeutung haben, da die Eltern der Patientinnen/Patienten in der Regel haploident sind,
- teilweise oder vollständig mismatched Nabelschnurblutspenden (3-6/6 Allele in A-, B- und DRB1-Loci)
- partiell mismatched, nicht-verwandte Spenderinnen/Spender (7-8/10 Allele).

Grundsätzlich ist es nicht zulässig, größere Risiken bei der Ausprägung des Mismatches einzugehen, was aber im Alltag bei schwierigen Fällen, in denen keine/kein passende/passender Spenderin/Spender gefunden wird, eine Transplantation aber imminent notwendig ist, oft nicht berücksichtigt werden kann.⁸

Die Größe des Mismatches wirkt sich dabei auf die Inzidenz der aGvHD, cGvHD, das Graftversagen und das Survival der Patientinnen/Patienten aus. Untersuchungen einer Studie aus Japan im RIC-Setting (RIC – reduced intensity conditioning), eine Variante der vorbereitenden Chemotherapie, die in einem späteren Kapitel beschrieben wird) ergaben, dass die Inzidenz der aGvHD von 39% bei matched Spenderinnen/Spendern auf 50% ansteigt, wenn zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger 2-3 Allele nicht

ident sind. Die cGvHD Inzidenz unterscheidet sich in den 3 Gruppen nicht so stark wie die aGvHD, obwohl auch auffällt, dass bei einem größeren Mismatch der Verlauf und der Zeitpunkt des Eintretens von Symptomen ungünstiger ausfallen. Auch das Graftversagen nimmt von 3,7% auf 10,3% zu. Diese Ergebnisse zusammengenommen, verändern das OS (overall survival) der Patientinnen/Patienten nach im Median 1 Jahr von 48% bei Patientinnen/Patienten mit matched Spenderinnen/Spendern und 51% mit Spenderinnen/Spendern mit nur einem mismatch auf 18% bei Patientinnen/Patienten, die Transplantate erhielten, die in 2-3 Loci unterschiedlich waren. Dies zeigt, dass ein einzelner Mismatch eine valide Alternative darstellt, wenn keine/kein andere/anderer Spenderin/Spender verfügbar ist. Alle Abweichungen, die darüber hinausgehen, senken die Chancen auf eine erfolgreiche Transplantation, da durch den HLA-Unterschied die Erfolgsaussichten stark eingeschränkt werden.⁹ Der HLA-Typ ist demnach einer der wichtigsten prognostischen Faktoren neben der Grunderkrankung für das weitere Überleben der Patientinnen/Patienten nach SCTx. Dies gilt für verwandte Spenderinnen/Spender als auch nicht-verwandte.¹⁰

2.1.2. HLA-idente Spenderzellen und GvL Effekt

Im Gegensatz zu der GvHD, die ein unerwünschter Effekt nach einer Stammzelltransplantation ist, ist der GvL (Graft-versus-Leukemia) Effekt ein erwünschter und auch einer der Gründe, weshalb es vorzuziehen ist, Immunzellen im Transplantat zu belassen. Die CD8⁺-Zellen, sowie die NK-Zellen suchen bei der GvL-Reaktion nach der Chemotherapie verbleibende Tumorzellen auf und lysieren diese. Da diese Reaktion ähnlich abläuft wie die GvHD, besteht die Überlegung, bewusst durch die Allogentität der SCTx diese Reaktion hervorzurufen und damit die Tumorthherapie zu verbessern. Das zeigt sich in Hinsicht auf das Auftreten der cGvHD, die mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eines Tumorrelapses assoziierbar ist.¹¹ Dabei kommt es aber nicht auf die Schwere der GvHD an. Zwar ist die Relapse-Rate geringer, wenn eine GvHD auftritt, doch mit Verschlechterung der GvHD tritt keine Verbesserung der GvL-Reaktion ein. Im Gegenteil sinkt dann das OS durch die schlimmeren Folgen der cGvHD.¹²

Es gibt mehrere Erklärungen für diese Entkopplung der Schwere der GvHD und der Stärke des GvL-Effekts.

- Erstens ist es möglich, dass kein intrinsischer Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung besteht. Die Reaktion gegen die Tumorzellen könnte immer beschränkt sein, egal wie schwer die GvHD ausfällt.
- Zweitens muss man den Einfluss der iatrogenen Immunsuppression bedenken. Bei schwerer GvHD oder bei frühem, aggressivem Auftreten der Krankheit muss auch dementsprechend aggressiv therapiert werden und diese immunsuppressive Therapie könnte gleichzeitig auch die GvL-Reaktion unterdrücken, was zu einer höheren Relapse-rate führen kann.
- Drittens könnte auch ein statistisches Problem der Patientenauswahl zu diesen Ergebnissen führen. Patientinnen/Patienten die für eine nicht-verwandte oder mismatched Transplantation in Frage kommen, haben sehr wahrscheinlich Grunderkrankungen, die von ihrer Natur her mit einer schlechteren Prognose einhergehen und deswegen die Relapse-rate höher ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Alloreaktivität der GvHD der GvL-Reaktion ähnlich ist, aber ihr nicht gleichzusetzen ist. Die GvHD ist ein eigener Risikofaktor für das Überleben der Patienten und ein HLA-Mismatch verbessert nicht zwangsläufig die Prognose von Hochrisiko-Patientinnen/Patienten.¹³

2.1.3. Haploidente Spenderzellen

Durch die bessere Verfügbarkeit von Spenderzellen aufgrund einer größeren Anzahl infrage kommender Spenderinnen/Spender und verbesserter Methoden ist die haploidente, hämatopoetische Stammzelltransplantation (haploHSCTx) eine akzeptable Alternative für viele Patientinnen/Patienten. Die zunehmende ethnische Vermischung in der Gesellschaft und die damit immer größer werdende HLA-Diversität erschweren zunehmend die Suche nach einer/einem HLA-identen Spenderin/Spender. Doch der HLA Unterschied kommt zum Preis von erhöhten Risiken, was GvHD oder Graft Versagen betrifft. Dadurch ist die Anwendung der haploHSCTx in der Regel mit einem schlechteren Überleben als bei HSCTx von einer/einem HLA-identen Spenderin/Spender verbunden. Um das Überleben zu verbessern und den speziellen Gefahren der haploSCTx Herr zu werden, wurden verschiedene Verfahren, wie die T-Zell-Depletion oder die CD19 Negativselektion entwickelt, die die Behandlung sicherer und erfolgreicher machen sollen.¹⁴

2.1.4. α/β -Depletion

Die HLA-Barriere zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger ist für viele Patientinnen/Patienten ein wesentlicher Risikofaktor für das Gelingen der Transplantation. Vielen Patientinnen/Patienten fehlt eine/ein HLA-idente/identer Spenderin/Spender und eine sichere Form der haploidenten Transplantation hätte den enormen Vorteil, dass praktisch alle pädiatrischen Patientinnen/Patienten praktisch sofort eine/einen Spenderin/Spender hätten und behandelt werden könnten. Dies betrifft eine große Anzahl an Patientinnen/Patienten, da nur 25% ein HLA-identen Geschwisterkind haben und für weniger als 60% aller Patientinnen/Patienten eine/ein passende/passender nicht-verwandte/verwandter Spenderin/Spender zu finden ist. Und auch die Suche nach einer/einem passenden Spenderin/Spender dauert oft 3-4 Monate, wertvolle Zeit, die diese Patientinnen/Patienten oft nicht haben.¹⁵

Um die negativen Effekte einer Transplantation mit HLA-mismatch auszugleichen, wurden über die Jahre Strategien entwickelt, die auf der einen Seite auf der pharmakologischen Immunsuppression und auf der anderen Seite auf der T-Zell-Depletion aus dem Graft basieren. Die T-Zell-Depletion zeigte sich dabei als besonders erfolgreich, da sie es zum ersten Mal möglich machte, eine Transplantation mit Mismatches in allen 3 HLA-Hauptloci durchzuführen. Der andere, nicht weniger wichtige Durchbruch in der Entwicklung des Verfahrens, lag in der Vorbereitung und Mobilisierung so genannter 'Megadose' Stammzellen durch G-CSF, einem Wachstumsfaktor, der die Proliferation der Stammzellen aktiviert und damit Stammzellen im peripheren Blut der/des Spenderin/Spenders entnehmbar macht. Die Transfusion einer großen Anzahl von Stammzellen wirkt sich auch vorteilhaft auf das Engraftment und den Verlauf der SCTx aus. Zum ersten Mal wurde diese Methode der Stammzellaufbereitung von einer Gruppe in Perugia durchgeführt, beschrieben und 1994 veröffentlicht. Die Transplantation dieser T-Zell-depletierten Stammzellmegadosen ohne weiterführender GvHD Prophylaxe führte zu einer Engraftmentrate von 90% und einer kumulativen Inzidenz der akuten und der chronischen GvHD Grad II-IV von unter 10%.¹⁶ Die Methode der Depletion wurde weiterentwickelt und die Selektion und Depletion durch magnetische 'Beads' mithilfe des CliniMACS® (Miltenyi) Systems eingeführt. Durch weitere erfolgreiche Behandlungen an Erwachsenen mit Leukämie zeigte sich mehr und mehr, dass sich die Methode eignet, um

HLA-Barrieren zu überwinden.¹⁷ Eine große Studie die durch die 'Acute Leukemia and Pediatric Working Parties of the European Blood and Marrow Transplantation' (EBMT) Gruppe durchgeführt wurde, analysierte das Outcome einer Kohorte Kinder mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), die mit einer T-Zell-depletierten, haploidenten HSCTx behandelt wurden. Die Studie zeigte, dass das 5-Jahres Überleben in Remission (LFS – leukemia free survival) ungefähr 30% betrug. Diese Studie zeigte auch, dass das Outcome besser ist, wenn die Patientinnen/Patienten 12×10^6 oder mehr CD34⁺ Progenitorzellen/kg KG erhalten, als wenn die Zahl der transplantierten Stammzellen geringer ist.¹⁸

Der GvL-Effekt ist eine wichtige Säule in der Behandlung maligner Krankheiten mittels SCTx. Dabei stellt sich aber die Frage, ob durch die Depletion der T-Zellen diese wichtige Kontribution des Immunsystems zur Tumorbekämpfung unterdrückt wird, da der Effekt vor allem durch Spender T-Zellen, die fremde HLA-Antigene, die durch die Tumorzellen präsentiert werden, erkennen und die Zellen infolge vernichten. Der verminderte Einfluss der T-Zell-Depletion ist zwar zum Teil gegeben, aber Untersuchungen des Langzeitüberlebens ergaben, dass dieser geringer als erwartet ist. Vor allem in Fällen der haploidenten SCTx übernehmen die natürlichen Killer Zellen (NK) diese Aufgabe. NK Zellen haben die positive Eigenschaft, Tumorzellen anzugreifen, ohne dabei eine GvHD zu verursachen. Tatsächlich werden die von den NKs erkannten Liganden nur in viral infizierten, tumorös entarteten oder anders gestressten Geweben hochreguliert. Dadurch wird gesundes Gewebe zum größten Teil verschont, während Tumorzellen angegriffen werden.^{19 20}

γ/δ Zellen sind eine weitere Säule, auf die sich die Therapie der α/β -Depletion stützt. Im Gegensatz zu den α/β -T-Lymphozyten nehmen die γ/δ -T-Lymphozyten einen besonderen Platz zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr ein. Ihr γ/δ -TCR (T-cell-receptor) ist weniger variantenreich und gegen Liganden gerichtet, die noch nicht vollständig erforscht wurden. Eine außergewöhnliche Eigenschaft der γ/δ -T-Lymphozyten liegt vor allem darin, dass sie sozusagen voraktiviert aus dem Thymus kommen und ohne Rezeptor-Interaktion von Zytokinen aktiviert werden können.²¹ Sie nehmen an der Regulation der Immunantwort und der Gewebeheilung teil. Sie erkennen Pathogene und Allergene und können auch die Rolle von APCs übernehmen, was sie zu einem Bindeglied zwischen beiden Arten der Immunabwehr macht und die Grenzen zwischen den beiden verwischt.²² Ähnlich den NK-Zellen wird in ihnen ein sowohl gegen Pathogene als auch

gegenüber einer überschießenden Immunreaktion wie der GvHD gerichteter Effekt vermutet, ohne dass ein HLA-mismatch zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger eine gegen gesundes Gewebe gerichtete Reaktion hervorruft.²³ Die Eigenschaften dieser Zellen, wenn auch größtenteils unverstanden, scheinen einen positiven Effekt auf das Outcome nach SCTx zu haben. Eine Untersuchung von Godder et al. ergab, dass große Zahlen dieser Zellen die Chance auf eine langfristige Remission erhöhen, ohne gleichzeitig das Risiko der GvHD zu steigern.²⁴

Locatelli et al. verwenden die Methode, die auch in Graz verwendet wird, schon seit November 2010. Diese Depletionsart beruht auf der negativen Selektion der T-Lymphozyten, die α - und β - Ketten auf ihren TCRs tragen, und der negativen Selektion der B-Lymphozyten. Es wurden bis 2013 60 Patientinnen/Patienten mit malignen als auch benignen Erkrankungen behandelt und es stellte sich heraus, dass die α/β -Depletion eine verlässliche Art der Graft-Manipulation ist. Sie ist konstant reproduzierbar und führt zu einer 4,1-log Depletion von α/β -TCR-T-Zellen. Solange die transfundierten T-Zellen die Zahl $1 \times 10^5/\text{kg KG}$ nicht überstiegen, wurde sogar auf eine post-Transplantations-Immunsuppression verzichtet, und die Ergebnisse sind positiv und werden des Weiteren im Laufe dieser Arbeit durch die Ergebnisse der Patientinnen/Patienten, die in Graz und Tübingen mittels dieser Methode behandelt wurden untersucht.²⁵

2.1.4. CD19⁺ Depletion

Als PTLD (post-transplant lymphoproliferative Disorder – Lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation oder posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung) wird ein Formenkreis an Krankheiten bezeichnet, der auf der Grundlage einer EBV-Infektion in Verbindung mit einer immunsuppressiven Therapie auftritt. Die Schwere der Symptome reicht dabei von gutartigen Mononucleose-ähnlichen Manifestationen bis sehr schweren, in vielen Fällen tödlich verlaufenden Formen, die Lymphomcharakter haben. Es gibt keine allgemein akzeptierte Definition der PTLD. Generell wird aber eine B-Zell-Hyperproliferation mit benignem bis fulminantem Verlauf gemeint. Das EBV (Epstein-Barr Virus oder HHV 4 – humanes Herpesvirus 4) befällt vorwiegend B-Zellen und hat die Fähigkeit diese zu immortalisieren und so auch maligne Erkrankungen wie das Burkitt Lymphom²⁶, das Nasopharynxkarzinom und andere lymphoproliferative Syndrome auf einer infektiologischen Grundlage auszulösen. Dabei teilt sich EBV die Eigenschaften

der fast ubiquitären Verbreitung mit anderen Herpesviren. Der hauptsächliche Übertragungsmodus liegt in der Übertragung von Speichel, wie es beispielsweise beim 'Küssen' geschieht, weswegen die Krankheit auch als 'kissing disease' bezeichnet wird. Die Durchseuchung liegt in Industrienationen im Erwachsenenalter bei ungefähr 80%. In Ländern mit niedrigerem Hygienestandard kann sie auch 100% bei Erwachsenen betragen. Der Angriffsort nach dem Eindringen in den Organismus sind die gewebeinfiltrierenden B-Lymphozyten. Zwar sind diese ein gutes Ziel für virusspezifische, zytotoxische T-Lymphozyten, was bei immunkompetenten Erkrankten für ein rasches Abklingen der Krankheit führt, doch auch in so einem Fall gelingt es dem Virus, einen latenten Zustand zu etablieren. Diese Zellen stellen dann ein lebenslanges Reservoir für Neuinfektionen dar und sind daher als ein beträchtliches Risiko bei der Stammzellspende.^{27 28}

Durch die Einführung neuer Methoden zur Verbesserung des Überlebens nach SCTx vor allem in der Hinsicht auf die GvHD wurde die PTLD zu einem weiteren Problem, dessen man sich annehmen musste. Das Risiko an der PTLD zu erkranken, stieg nämlich von 2% im Jahr 1998 auf 6% im Jahr 2011. Dieser Anstieg ist mit den veränderten Methoden und der vermehrten Durchführung von mismatched SCTXs erklärbar. Diese Transplantationsgegebenheiten wurden untersucht und man identifizierte folgende Risikofaktoren für die Entstehung einer PTLD:

- ein HLA-Mismatch zwischen Empfängerin/Empfänger und Spenderin/Spender
- ein EBV-Mismatch, bei dem die/der Empfängerin/Empfänger seronegativ, die/der Spenderin/Spender aber seropositiv ist
- eine RIC ("reduced-intensity conditioning"-Konditionierungschemotherapie)
- eine Erkrankung mit aGvHD II-IV
- eine prätransplantative Splenektomie
- die Infusion von mesenchymalen Stromazellen.

Die RIC in Kombination mit in vivo oder ex vivo T-Zell-Depletion ist dabei ein besonders wichtiger Risikofaktor, da durch die RIC die infizierten B-Zellen größere Überlebenschancen haben und durch die T-Zell-Depletion die Zellen mit der Fähigkeit zur Kontrolle fehlen. Andere Untersuchungen ergaben, dass auch neben den genannten Risikofaktoren die Verwendung von ATG und intensiviert Konditionierungsregime das Risiko der PTLD erhöhen, da die Rekonstitution der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen verspätet

erfolgt und damit EBV sich leichter unkontrolliert ausbreiten kann.²⁹ Das EBV-Mismatch ist vor allem im pädiatrischen Bereich von großer Bedeutung, da fast alle erwachsenen Spenderinnen/Spender mit EBV infiziert sind, die Empfängerinnen/Empfänger aufgrund ihres geringen Lebensalters jedoch noch nicht. Die aGvHD ist einerseits durch den Pathomechanismus der ausgelösten Zytokinkaskade ein Risikofaktor, andererseits verschlimmert sie durch die immunsuppressive Therapie den Verlauf der PTLD. Aufgrund der gegengleichen Wirkung und Behandlung der aGvHD und der PTLD liegt die 3 Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen/Patienten mit PTLD trotz oft initial erfolgreichen Behandlungen nur bei rund 20%.³⁰

Da die Erkrankung oft fatal verläuft und eine frühe Behandlung die Chancen verbessert, liegt ein großer Fokus der Bemühungen in der frühen Diagnose der PTLD. Zwar kann man bei vielen Patientinnen/Patienten mit PTLD hohe EBV-DNA-Level mittels PCR im peripheren Blut nachweisen, doch ist diese Untersuchungsmethode nicht sensitiv genug um eine klare Aussage zu treffen. Die EBV-DNA-Konzentration schwankt stark von Patientin/Patient zu Patientin/Patient und im Endeffekt kann eine/ein Patientin/Patient trotz PTLD niedrigere Untersuchungswerte aufweisen als eine/ein in dieser Hinsicht gesunde/gesunder Patientin/Patient. In der präemptiven Diagnostik erreichen PCR Untersuchungen nur eine Sensitivität von 50-80%. Aus diesem Grund stellt die frühzeitige Diagnostik ein noch ungelöstes Problem dar.³¹

Um die PTLD gänzlich zu vermeiden, gibt es noch einen präventiven Ansatz der Behandlung. Gleich der Depletion der T-Zellen werden CD3⁺/CD19⁺ Zellen aus dem Transplantat entfernt. Diese Behandlung reduziert die Zahl der B-Zellen und damit die Zahl der potentiellen EBV-Trägerzellen drastisch und verhindert damit die Entstehung der PTLD trotz T-Zell-Depletion. Die Entfernung der CD19⁺/CD34⁺-Progenitorzellen führt laut Untersuchungen an der Universitätsklinik Tübingen auch nicht zu einer verlängerten B-Zell-Rekonsituation, was von großer Bedeutung für das Langzeitüberleben und den Schutz vor anderen Infektionen ist. Die Kombination aus Graft-Manipulation und engmaschigem PCR-Screening bei Infektionsverdacht unter zur Berücksichtigung der Risikofaktoren stellen nach der heutigen Erkenntnis den bestmöglichen Schutz vor PTLD dar.³²

2.1.5. CD34⁺ Megadose Infusion

Die Methode mittels CliniMACs und gezielten Antikörpern lässt sich auch dazu verwenden, alle nicht CD34⁺ Zellen zu entfernen und nur diese im Transplant zu belassen. Vor allem bei Patientinnen/Patienten ohne passender/passendem Spenderin/Spender, die an nicht malignen Krankheiten leiden, besteht ein Therapieansatz darin, alle kernhaltigen Zellen bis auf die CD34⁺ und wenige Immunzellen zu übertragen. Das Engraftment ist bei diesen 'Megadosen' von im Median 22x10⁶/kg an Stammzellen gut (bis 90%) und das Recovery der neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten geschieht rasch. Durch die fehlenden T-Zellen und das spätere Wiederkehren ebendieser ist auch die aGvHD Inzidenz gering. Man verzichtet zwar auf den frühen GvL Effekt, weswegen die 'Megadose Infusion' für Tumorpatientinnen/-patienten außerhalb der Remission ungeeignet ist, geht aber bei Patientinnen/Patienten, die diesen nicht benötigen, geringere Risiken ein.³³ Aus diesem Grund wird an unserer Abteilung die CD34⁺ Selektion mit der α / β -Depletion kombiniert. An Tag 0 erhalten die Patienten zuerst ein CD19⁺/CD3- α / β depletiertes Apheresat und am nächsten Tag (+1) ein CD34⁺ hochgereinigtes Apheresat.³⁴ Mit der Kombination der beiden Methoden kann man die Vorzüge beider kombinieren und versuchen das beste Engraftment bei geringstem Risiko zu gewährleisten.³⁵

Kapitel 3 Stammzellspende

3.1. Stammzellspende

Im Laufe des Lebens wird das Blut an mehreren Orten im Körper gebildet. In der Fetalperiode wird der größte Teil der Blutzellen nicht im Knochenmark, sondern in der fetalen Leber gebildet. Ab dem Zeitpunkt der Geburt aber ist die Hämatopoese unter physiologischen Bedingungen auf das Knochenmark beschränkt. Stammzellen können aber so stimuliert werden, dass man sie auch an anderen Stellen im Körper entnehmen kann.

3.1.1. Knochenmark

Die Knochenmarksaspiration ist neben dem Zweck der Entnahme von CD34⁺-Zellen auch ein wichtiges Mittel für die Diagnostik von hämato-onkologischen Erkrankungen.³⁶ Das Knochenmark ist das größte Reservoir an hämatopoetischen Stammzellen und ist aus diesem Grund auch ein geeigneter Ort, um Stammzellen zu entnehmen. Für die diagnostische Knochenmarksaspiration erhält die/der Spenderin/Spender an unserer Abteilung eine Analgosedierung mit Midazolam, Fentanyl oder Tramal und Propofol. Die Entnahme von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark wird in Allgemeinnarkose durchgeführt. Studien haben gezeigt, dass es für das Outcome keinen Unterschied macht, welche Art der Narkose man verwendet. Nach 30 Tagen hat keine der beiden Patientengruppen weder mehr noch schwerere Nebenwirkungen zu erwarten.³⁷ Dann kann unter sterilen Bedingungen aus dem Sternum (nicht bei Kindern), den Darmbeinschaufeln oder der Tibia mittels einer Biopsienadel Knochenmark aspiriert oder eine Feinnadelbiopsie durchgeführt werden, wobei gesagt werden muss, dass vor allem bei der Entnahme aus dem Sternum zum Teil schwere Komplikationen auftreten können, weswegen die Biopsie an den Darmbeinschaufeln bevorzugt wird.³⁸ Dabei ist darauf zu achten, dass das Volumen des einzelnen Aspirats nicht größer als 3-5ml ist, da ein erhöhtes Aspiratsvolumen nicht wesentlich mehr Knochenmarkszellen, sondern mehr Blut befördert. Durch die wiederholte Aspiration aus dem Knochenmark werden ungefähr 10

bis 15 ml/kg KG der/des Spenderin/Spenders gesammelt bzw. $17-24 \times 10^9$ kernhaltige Knochenmarkszellen.³⁹ Die Stammzellgewinnung mittels Knochenmarksbiopsie kann als sicheres Verfahren angesehen werden. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Blutungen, was aber auch daran liegt, dass die Biopsie als diagnostisches Mittel bei hämatologischen Patientinnen/Patienten eingesetzt wird, die sehr schlechte Gerinnungswerte haben. Insgesamt liegt laut Studien die Komplikationsrate um die 0,12%, was vor allem unter dem Aspekt gesehen werden muss, dass viele Spenderinnen/Spender sich freiwillig der Prozedur unterziehen und daher das Risiko für diese auf ein Minimum beschränkt werden muss.⁴⁰

Auf die Vor- und Nachteile im Vergleich mit der peripheren Stammzellapherese wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

3.2.2. Stammzellapherese

Als Alternative zur Knochenmarkspunktion gibt es die zweite Möglichkeit, Stammzellen aus dem peripheren Blut zu gewinnen. Diese Methode hat für die/den Spenderin/Spender mehrere Vorteile. Da keine Allgemeinnarkose erforderlich ist, kann man so das Risiko, das mit der Anästhesie verbunden ist, ausschalten. Man kann Stammzellen gewinnen, auch wenn das Knochenmark in den üblichen Entnahmestellen geschädigt wurde. Durch die Gabe von Wachstumsfaktoren können höhere und konzentriertere Zahlen an CD34⁺ Zellen im Apheresat erreicht werden und die wiederholte Entnahme bzw. die Stammzellentnahme bei Kindern ist durch diese Methode einfacher.⁴¹

Schon 1909 machte Prof. Maximow die Entdeckung, dass sich nicht nur im Knochenmark hämatopoetische Stammzellen befinden, sondern auch im peripheren Blut Zellen gefunden werden können, die pluripotente Eigenschaften besitzen.⁴² Trotzdem konnte man lange Zeit nicht das Potential nutzen, das in diesen Zellen verborgen war,⁴³ da es viel zu wenige waren, um sie für therapeutische Zwecke zu nutzen.

Um diese Anzahl zu erhöhen, müssen die Stammzellspender einer vorbereitenden Behandlung unterzogen werden. Vor jedem Eingriff werden sie auf Krankheiten und Risikofaktoren untersucht, es wird der HLA Typ festgestellt und sie werden über die Risiken von einer/einem Ärztin/Arzt, die/der kein Mitglied des Transplantationsteams ist, aufgeklärt.⁴⁴ Danach folgen die 2 Phasen der Stammzellapherese.

- die Mobilisation

Die Mobilisation erfolgt durch die Gabe von Cytokinen, genauer G-CSF. Dieser Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor stimuliert die Teilung der pluripotenten Stammzellen, die sich danach in viel höheren Konzentrationen im peripheren Blut finden lassen. Diese Therapie mit Filgastrim oder Lenogastrim, zwei für diese Methode verwendete Präparate, findet über 4 bis 5 Tage statt, bis die/der Spenderin/Spender bereit für die Apherese ist.

- die Entnahme

In der zweiten Phase filtert das Apheresegerät die Stammzellen über Zentrifugen aus dem Restblut heraus. Das übrige Blut wird der/dem Spenderin/Spender wieder refundiert, wobei das totale Blutvolumen der/des Spenderin/Spenders bis maximal 4 mal ausgetauscht und filtriert wird. Dieser Prozess dauert um die 2 bis 5 Stunden und da bei der Benützung des Apheresegeräts eine Antikoagulation mit Citrat oder Heparin vonnöten ist, besteht in diesem Schritt das größte Risiko für die/den Spenderin/Spender.⁴⁵

Trotzdem ist die peripherer Stammzellspende ein sehr sicheres Verfahren, bei dem nur in ungefähr 0,6% der Fälle die Nebenwirkungen so groß sind, dass ein Krankenhausaufenthalt nötig ist. Trotzdem sei gesagt, dass nur 5% aller Spenderinnen/Spender überhaupt keine Nebenwirkungen erfahren. Die Bandbreite reicht von Übelkeit und Kopfschmerz, über Knochenschmerzen bis Blutungen, worüber die Spenderinnen/Spender auf jeden Fall aufgeklärt werden müssen.⁴⁶

Das Apheresat soll am Ende mindestens 2×10^6 CD34⁺/kg KG der/des Empfängerin/Empfängers erhalten. Je größer aber die Zahl der CD34⁺-Zellen ist, desto rascher und sicherer gelingt das Engraftment, weswegen eher eine Zahl zwischen $5-10 \times 10^6$ CD34⁺/kg Körpergewicht der/des Empfängerin/Empfängers angestrebt werden soll.⁴⁷

Die zweite Möglichkeit an Stammzellen zu kommen, wird mittlerweile von vielen Transplantationszentren bevorzugt, da es keinen eindeutigen Vorteil im Überleben nach Knochenmarkstransplantation oder Stammzellapherese aus peripherem Blut für die Patientinnen/Patienten gibt. Des Weiteren haben Stammzellen aus dem peripheren Blut den Vorteil, das weniger Nebenprodukte, wie zum Beispiel Knochenstücke, im Apheresat sind und die Weiterverarbeitung dementsprechend einfacher ist.⁴⁸ Es wurde zwar festgestellt, dass durch die Übertragung von Stammzellen aus dem peripheren Blut die GvHD eher ausgelöst wird.⁴⁹ Nach α/β -Depletion ist das GvHD Risiko nach peripherer SCTx jedoch deutlich geringer als nach Knochenmarkstransplantation. Dadurch kann durch die

Anwendung der peripheren Stammzellapherese ein insgesamt positiver Effekt verzeichnet werden.⁵⁰ Selbst wenn man die Lebensqualität unter immunsuppressiver Therapie in die Rechnung miteinbezieht, haben Patientinnen/Patienten, die Stammzellen aus dem peripheren Blut bekommen haben, einen Vorteil von 7 Monaten gegenüber denen, die Stammzellen aus dem Knochenmark bekommen haben.⁵¹

3.2.3. Nabelschnurblut

Schon 1982 wurde von Hal Broxmayer vorgeschlagen, Nabelschnurblut als Quelle für hämatopoetische Stammzellen zu verwenden. Ihm erschien es als Verschwendung, so hochwertige und aktive Zellen, wie sie sich im kindlichen Restblut der Plazenta und der Nabelschnur befinden, einfach zu verwerfen. Diese Idee führte zur Gründung der 'Biocyte Corporation' und in den folgenden Jahren wurde intensiv an der Handhabung und den Eigenschaften des Nabelschnurbluts geforscht.⁵² Das Ergebnis war die erste erfolgreiche Stammzelltransplantation aus Nabelschnurblut im Jahr 1988 an einem 5-jährigen Jungen mit Fanconi Anämie. Die neugeborene HLA-idente Schwester, deren HLA-Status zuvor durch Amniocentese festgestellt wurde, war die Spenderin. Die ersten Zeichen des Engraftments traten nach 22 Tagen in Erscheinung und es wurden keine Symptome der GvHD beobachtet. Damit war bewiesen, dass fetales Nabelschnurblut zumindest für die Transplantation des hämatopoetischen Systems ausreichend ist.⁵³

Die Vorteile des Nabelschnurbluts im Vergleich zu anderen Quellen für Stammzellen sind durchaus beachtlich. Es gibt kein Risiko für die/den Spenderin/Spender, da das Nabelschnurblut selbst, wenn es nicht zu Transplantation genutzt werden würde, verworfen wird, also für das Neugeborene keinen unmittelbaren Nutzen mehr hat. Die Stammzelle in Nabelschnurblut lassen sich bis zu 20 Jahre kryopräservieren, ohne dass sie ihre Fähigkeit zum Engraftment verlieren, was vor allem Empfängerinnen/Empfängern helfen kann, die einen sehr seltenen HLA Typen besitzen und so durch die lange Lagerdauer auf eine große Vielfalt an HLA Typen zurückgegriffen werden kann.⁵⁴ Das Risiko der Krankheitsübertragung durch die Transplantation ist bei Nabelschnurblut geringer als bei anderen Arten der Transplantation und das Risiko der/des Empfängerin/Empfängers eine

GvHD zu entwickeln, ist laut Studien an Mäusen nach SCTx aus Nabelschnurblut geringer als nach Knochenmarkstransplantation oder peripherer SCTx.⁵⁵

Diese Vorteile sind aber nur für Kinder relevant, da zur Übertragung auf Erwachsene die Zahl der Zellen im Transplantat zu gering ist. Es ist nämlich anzustreben, dass das Nabelschnurbluttransplantat mindestens 3×10^7 kernhaltigen Zellen pro kg Körpergewicht der/des Empfängerin/Empfängers enthält. Die Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut der deutschen Bundesärztekammer geben als unteren Grenzwert eine Mindestzellzahl von 5×10^8 kernhaltigen Zellen oder 60ml Nabelschnurblut an.⁵⁶ Neben der absoluten Zahl an übertragenen kernhaltigen Zellen von mehr als 37 Millionen pro kg Körpergewicht ist das Outcome besser, wenn die Patientinnen/Patienten:

- weniger als 20kg Körpergewicht,
- ein Alter von weniger als 6 Jahren,
- HLA Gleichheit zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger
- einen negativen Cytomegalie Virusstatus aufweisen.⁵⁷

Vor allem in den USA wird viel Forschung betrieben, die Zellzahl im Transplantat zu erhöhen. Eine der Möglichkeiten ist das 'Pooling' von mehreren Transplantaten. Dabei wird nicht nur eine, sondern es werden zwei Quellen zur Übertragung genutzt. Die Ergebnisse sind aber eher durchwachsen und haben bis jetzt zur Erkenntnis geführt, dass Nabelschnurblut zumindest bei Erwachsenen nicht die beste Quelle für Stammzellen ist.⁵⁸

Im pädiatrischen Bereich sind die Ergebnisse aber ermutigend, weswegen die Möglichkeit, Stammzellen aus Nabelschnurblut zu gewinnen, im Hinblick auf den derzeitigen Forschungsstand eine Alternative darstellt.⁵⁹ 60

Kapitel 4 Konditionierung

4.1. Definition

Um Stammzellen zu transplantieren, muss man ihn zuerst darauf vorbereiten. Diese Vorbereitung nennt man Konditionierung und sie geschieht aus 3 Gründen:

- um die zu Grunde liegende Erkrankung weitgehend zurückzudrängen und die dysplastischen Zellen unter ein nachweisbares Level zu bringen.
- um das Immunsystem der/des Patientin/Patienten soweit auszuschalten, dass das Transplantat nicht sofort angegriffen und abgestoßen wird.
- um im Knochenmark Platz für das Einwachsen neuer Zellen zu schaffen, obwohl Studien Hinweise darüber lieferten, dass die Spenderzellen sich selbst Platz schaffen können um einzuwachsen.⁶¹

Frühe Konditionierungspläne beruhten auf einer sehr hohen Intensität, um einerseits die Zahl der vorhandenen Tumorzellen zu reduzieren und andererseits das Immunsystem auszuschalten, um den Spenderzellen das Einwachsen zu ermöglichen. Doch als man erkannte, dass die transplantierten Zellen neben einer Immunreaktion gegen die HLA-fremden Zellen der/des Empfängerin/Empfängers auch gegen die nach Bestrahlung verbliebenen Tumorzellen reagierten, es also zu einem Graft-versus-Tumor Effekt kommt, kam es zu einem Paradigmenwechsel in der Stammzelltherapie.^{62 63} Durch diesen Effekt kann man mit geringeren Dosen an Bestrahlung oder Chemotherapeutika dasselbe Survival erzielen, kann aber, dadurch dass die Belastung durch die Konditionierung geringer ist, potentiell mehr Patientinnen/Patienten behandeln. Seitdem wird die Konditionierungstherapie in drei Klassen eingeteilt:

- high-dose oder myeloablative Conditioning (MA)
- reduced-intensity Conditioning (RIC)
- non-myeloablative Conditioning (NMA)

Von einer myeloablativen oder high-dose Konditionierung spricht man, wenn Chemotherapeutika oder Bestrahlung in einer Dosis angewendet werden, die das hämatopoetische so nachhaltig zerstören, dass sich die Hämatopoese ohne Transplantation

nicht mehr regenerieren kann. Im Gegensatz dazu benötigen Patientinnen/Patienten nach einer nicht-myeloablativen Konditionierung keinen Stammzellsupport.

Von der RIC spricht man, wenn keine der beiden ersten Definitionen genau auf die angewandte Form zutrifft. Die genaue Unterscheidung ist zwar noch immer Diskussionsgrundlage in Fachkreisen, doch bemühte man sich 2006 am Reduced-Intensity Conditioning Regimen Workshop veranstaltet vom Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR), während des Bone Marrow Transplantation Tandem Meeting um eine Einigung. Dabei stimmten 56 HSCTx-Spezialistinnen/Spezialisten von 44 Institutionen aus 9 Ländern zu, dass die 'Champlin Kriterien' für die RIC zutreffend sind. Demnach gilt als RIC, wenn es ungefähr 28 Tage nach Therapiebeginn zu einer deutlichen, aber ohne Stammzellsupport reversiblen, Myelosuppression kommt, wenn 28-35 Tage nach der Stammzelltransplantation ein gemischter Chimärismus bei der ersten Untersuchung festgestellt wird und die Therapie mit geringer hämatologischer Toxizität verbunden ist. Weiters einigte sich der Großteil der Expertinnen/Experten, dass man von einer RIC dann spricht, wenn 500cGy oder weniger Ganzkörperbestrahlung (TBI) als Einzeldosis oder 800cGy oder weniger bei Fraktionierung der Dosis, <9mg/kg Bulsulfan oral (oder das intravenöse Equivalent), <140mg/m² Melphalan, <10mg/kg Thiothepa oder der BEAM Therapieplan (Carmustin, Etoposid, Cytarabin und Melphalan) angewendet wird.⁶⁴ ⁶⁵

4.2. Auswirkungen der Konditionierung auf die Fertilität

Die Infertilität als Folge der Konditionierungstherapie ist eine klinische Tatsache, der in Anbetracht der Schwere der Erkrankungen und der anderen, potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen im Zuge der SCTx oft nur wenig Beachtung entgegengebracht wird. Doch vor allem bei der Behandlung von Kindern muss man auch solche lebenslang wirkenden und lebensverändernden Effekte berücksichtigen.

Eine Studie, die 2012 im Journal für Bone Marrow Transplantation veröffentlicht wurde, zeigte die Problematik zum ersten Mal im großen Stil auf. Es wurden Patientinnen/Patienten (138 weibliche und 208 männliche Patientinnen und Patienten) aus 7 europäischen Zentren auf ihre Fertilität nach SCTx untersucht. Die Patientinnen/Patienten waren zum Zeitpunkt der Therapie im Median 13 Jahre alt und zum Zeitpunkt des Follow-ups 19 Jahre alt. Drei Viertel (75%) dieser Patientinnen/Patienten waren im Follow-up unfruchtbar, 83% der Mädchen und 69% der Jungen. Dies zeigt wie viele Patientinnen/Patienten von diesem Problem betroffen sind. In dieser Studie stellte sich heraus, dass Mädchen, die die Behandlung mit ≥ 13 Jahren und deren Konditionierung mit Busulfan durchgeführt wurde, das höchste Risiko tragen, nach der Therapie unfruchtbar zu sein. Bei Jungen ist die TBI der größte Risikofaktor, gefolgt von einem Therapiebeginn vor dem Beginn der Pubertät.⁶⁶

Schon zwei bis drei Jahre nach der HSCTx kann man bei den meisten Patientinnen/Patienten schon von Infertilität sprechen. Die Zeit ist kürzer, wenn gonadotoxische Medikamente wie Busulfan eingesetzt werden, wobei die Dosis zwar einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung der Infertilität hat, doch der Unterschied zwischen Hoch- und Niederdosistherapie ist geringer als angenommen. Die Erholung der Fruchtbarkeit ist leider sehr unwahrscheinlich. Nur rund 5% der Patientinnen/Patienten erholen sich, nach der Diagnose der Infertilität wieder, was zeigt, dass die Behandlung und Erhaltung der Fertilität vor Therapiebeginn eingeleitet werden soll, da die Schädigung vergleichsweise rasch und zu einem hohen Prozentsatz irreversibel ist.⁶⁷ Dabei muss vor allem bei jungen Mädchen, die zum Beginn der Pubertät oder vor dem Beginn behandelt werden, ein großes Augenmerk auf die hormonelle Entwicklung gelegt werden. Gut die Hälfte der betroffenen Patientinnen benötigen eine hormonelle Initialtherapie zur Induktion der Pubertät und 44% der Patientinnen benötigen eine

fortlaufende Hormontherapie. Dies ist nicht nur wichtig für die Psyche der Patientinnen, sondern auch als Behandlung der Nebenwirkungen, wie beispielsweise Osteoporose und die eingeschränkte, kardiale Gesundheit, die der Mangel an Geschlechtshormonen auslöst.⁶⁸

Da es sehr schwer und unwahrscheinlich ist, dass sich die Fertilität wieder herstellen lässt, sobald sie einmal verloren wurde, muss der Fokus auf der Erhaltung der Fortpflanzungsfähigkeit liegen. Die dabei verwendeten Methoden und Möglichkeiten sind je nach Geschlecht und Alter der Patientinnen/Patienten teils stark unterschiedlich, sowohl in ihrer Effektivität als auch in ihrer Durchführbarkeit.

4.2.1. Fertilität von Mädchen

Für erwachsene Frauen und pubertäre Mädchen gibt es mehrere Möglichkeiten. Die In-vitro-Fertilisation (IVF) mit anschließender Kryopräservierung des Embryos stellt eine erprobte und gut durchführbare Methode dar. Hierbei werden die Frauen über 2-3 Wochen hormonell stimuliert, mehr Reife Follikel auszubilden. Die reifen Eizellen werden dann ultraschallgezielt mit einer Nadel aspiriert und extrakorporal befruchtet. Die daraus entstandenen Embryonen können über Jahre gefroren gelagert werden und schließlich bei einem Kinderwunsch in den Uterus eingesetzt und ausgetragen werden. Diese Methode ist weltweit gut etabliert und durchführbar, stößt aber im Rahmen der SCTx auf praktische Hindernisse. Für viele junge Patientinnen gibt es zum Zeitpunkt der Therapie noch keinen Partner, der in Frage kommt, die Eizellen zu befruchten und auf Samenzellen aus einer Samenbank wollen viele Patientinnen nicht zurückgreifen. Weiters ist die Dauer der Stimulation zu lange für viele Patientinnen, die oft rasch mit der Konditionierung beginnen müssen. Außerdem werden die Kosten für diese Behandlung oft nicht von den Versicherungen abgedeckt, was wiederum viele Patientinnen ausschließt.⁶⁹

Eine weitere Möglichkeit, die sich schnell teilenden Zellen der Follikel zu schützen, ist gonadales 'Shielding'. Bei der Bestrahlung kann der Bereich um die Ovarien mit Bleiplatten abgeschirmt werden, um sie zu schützen. Doch muss man beim Shielding auch daran denken, dass auch Leukämiezellen unter dem Schutz der Strahlung entgehen können und man muss im Langzeit-Follow-up klären, ob die Fähigkeit zur Fortpflanzung tatsächlich ansteigt, ohne dass das Risiko des Leukämie Relapses gleichzeitig größer wird.⁷⁰

Die Gabe von oralen Antikonzeptiva und GnRH-Agonisten während der Therapie könnte durch die herabgesetzte Follikelaktivität einen protektiven Effekt haben. Dies soll einen positiven Effekt auf die weitere Fertilität der Patientinnen haben. Diese Wirkung konnte zwar in einigen Studien bei Lymphompatientinnen erzielt werden, bei anderen hämatologischen Erkrankungen scheint die Therapie jedoch keine statistisch darstellbare Wirkung zu haben.^{71 72}

Die Oozytenkryopräservierung löst das Problem der Embryokryopräservierung, da hier kein Partner vonnöten ist, was vor allem jüngeren Patientinnen sehr entgegen kommt. Doch das erfolgreiche Konservieren von Eizellen und die Erhaltung deren Funktion ist eine große Herausforderung und kann nur von sehr spezialisierten Zentren durchgeführt werden. Da auch hier die Follikel vor der Eizellentnahme stimuliert werden müssen, ist der Faktor Zeit ein entscheidendes Problem. Die Oozytenkryopräservierung ist ein noch höchst experimentelles Verfahren, deshalb lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt der wahre Nutzen für die Patientinnen aufgrund der geringen Datenlage noch nicht feststellen.⁷³

Das 'Ovarian Tissue Banking', also die Entnahme und Aufbewahrung von Ovarialgewebe umgeht dieses Problem. Außerdem können hier auch jüngere Mädchen vor ihrer Pubertät behandelt werden, da die hormonelle Induktionstherapie wegfällt. Die Prozedur wird laparoskopisch durchgeführt und es wird entweder der Cortex oder ein ganzes Ovarium entnommen. Nachdem die gonadotoxische Therapie abgeschlossen wurde, kann das gelagerte Ovarialgewebe wieder eingesetzt werden. Bei orthotroper Einpflanzung kann sogar eine natürliche Schwangerschaft erzielt werden, bei heterotroper Verpflanzung muss auf IVF zurückgegriffen werden. Die Methode ist noch nicht sehr weit verbreitet und dementsprechend gibt es noch wenige Daten. Trotzdem besteht gerade bei hämatologischen Patienten mit malignen Erkrankungen die Gefahr der Wiedereinpflanzung von Tumorzellen, weswegen es nicht empfohlen ist, das 'Ovarian Tissue Banking' bei Patienten mit solchen Krankheiten durchzuführen.⁷⁴

4.2.2. Fertilität von Jungen

Bei Männern und Jugendlichen ist die Samenspende die Methode der ersten Wahl. Sie ist nicht-invasiv, relativ kostengünstig und weitverbreitet verfügbar. Trotzdem wird das Thema oft nicht angesprochen und daher haben nicht alle Patienten die Möglichkeit ihre

Spermien zu lagern. Die Zahlen steigen und bestätigen, dass das Bewusstsein um die Möglichkeit der Erhaltung der Zeugungsfähigkeit zunimmt, trotzdem kommt es auf den einzelnen behandelnden Arzt an, den Patienten darauf anzusprechen. Der multidisziplinären Zusammenarbeit zwischen Onkologen und Reproduktionsmedizinern kommt hier ein großes Augenmerk zu.⁷⁵

Bei männlichen Kindern steht man vor dem Problem, dass die Samenspende oft aus Gründen des Alters oder aus sozialen Gründen, die die Masturbation nicht zulassen, nicht möglich ist. Da vor allem die TBI das größte Risiko für die männliche Fertilität darstellt, wird versucht die Gonaden vor der Bestrahlung zu schützen, was sich aber nur bei sehr gezielten, lokalen Anwendungsformen als effektiv erweist. Weiters werden alternative Methoden wie die invasive Aspiration von Spermien und Gonadalstammzellen oder Elektroejakulation unter Sedierung getestet. Doch die Proben aus diesen Entnahmen lassen sich nur schlecht lagern und verwenden. Die erfolgreiche Insemination und Zeugung eines gesunden Embryos bleibt bis jetzt noch auf Einzelfälle beschränkt.⁷⁶

Abschließend bleibt zu sagen, dass die Infertilität nach SCTx ein wichtiges Thema für die Patienten darstellt und auf jeden Fall vor Beginn der Therapie angesprochen und bedacht werden sollte.⁷⁷

4.3. Myeloablative Konditionierung (MA)

Die Definition der myeloablativen Konditionierung (MA) liegt in einer Kombination von Mitteln, die eine lang anhaltende, schwere Panzytopenie innerhalb von 1-3 Wochen nach Anwendung hervorrufen. Die Panzytopenie ist langanhaltend, üblicherweise irreversibel und in den meisten Fällen tödlich, sofern die Hämatopoese nicht durch die Transplantation von Stammzellen wiederhergestellt wird.

4.3.1. Total-body Irradiation (TBI)

Eine Möglichkeit eine Konditionierungstherapie hoch dosiert durchzuführen ist die Ganzkörperbestrahlung (TBI). Sie ist effektiv gegen die meisten malignen Erkrankungen wie Leukämien und Lymphome durch Eigenschaften, die sie zu einer guten Konditionierungsform vor SCTx machen. Die Bestrahlung erreicht auch 'sanctuary' sites, wie Hoden und Zentralnervensystem, die mit Chemotherapeutika oft nur schwer zu erreichen sind. Die Dosis lässt sich unabhängig vom Blutvolumen der/des Patientin/Patienten verabreichen. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass es zu Kreuzreaktionen mit andern antineoplastischen Medikamenten kommt. Die Ausscheidung und Verstoffwechslung spielt bei der Bestrahlung keine Rolle und durch 'Shielding' und eine genaue Einstellung und Beschränkung auf die zu bestrahlenden Gebiete lässt sich die Therapie sehr gezielt anwenden.^{78 79}

In der Anwendung gibt es mehrere Schemata, die in der Dosis, der Anwendungsdauer und der Häufigkeit der Anwendungen unterschiedlich sind. Bei der 'single dose total body irradiation' (STBI), also der Ganzkörperbestrahlung in einer Sitzung werden der/dem Patientin/Patienten um die 8 Gy in relativ kurzer Zeit verabreicht. Die Strahlendosis lässt sich aber fraktionieren bzw. hyperfraktionieren. Dann spricht man von einer 'hyperfractionated total body irradiation' (HTBI), bei der eine insgesamt höhere Dosis, über mehrere Sitzungen 3 pro Tag über 3 Tage à 1,2 Gy, angewendet wird. Insgesamt ist zu sagen, dass es Hinweise darauf gibt, dass das Langzeit-Outcome nach Bestrahlung v.a. bei Kindern und Jugendlichen durch ein erhöhtes Risiko für Sekundärmalignome und Wachstumsstörungen deutlich eingeschränkt ist.⁸⁰

Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass das Auftreten bestimmter Langzeitnebenwirkungen, wie Katarakte, stark von der Art des Bestrahlungsschemas abhängt.⁸¹ An unserer Abteilung wird aufgrund der Nebenwirkungen keine TBI durchgeführt.

2002 wurde eine Studie in Massachusetts durchgeführt, die herausfinden sollte, wie sich das Outcome innerhalb der empfohlenen Grenzen für die Patienten verändert. Als Ergebnis dieser Studie wird eine Dosis zwischen 12 und 16 Gy in Kombination mit Cyclophosphamid empfohlen. Es wurden 200 Erwachsene mit hämatologischen Krankheiten einer Stammzelltransplantation mit T-Zell-Depletion unterzogen und dafür als Konditionierungstherapie bestrahlt. Die Patientinnen/Patienten wurden in drei Kohorten aufgeteilt und mit 15,6, 14,8 und 14 Gy bestrahlt. Alle Bestrahlungen wurden fraktioniert angewandt, wobei die 14 Gy-Gruppe 7x200-cGy, die 14,8 Gy-Gruppe 8x185-cGy und die 15,6 Gy-Gruppe 8x195-cGy erhielten. Die erhöhte Dosis bei der 15,6 Gy Kohorte erhöhte nicht die Remissionsrate nach 2 Jahren, aber senkte das 2-Jahres-Überleben auf 36% im Vergleich zu den Patientinnen/Patienten die 14 Gy (55%) und 14,8 Gy (58%) erhielten. Dies zeigte, dass durch Steigerung der Dosis das Outcome nicht verbessert wird und man durch die schlechtere Verträglichkeit der Therapie das Langzeitüberleben negativ beeinflusst.⁸²

Die Nebenwirkungen betreffend kann man frühe Intoleranzzeichen und Langzeitnebenwirkungen unterscheiden. Auch hier kann man Unterschiede zwischen der single-dose und der fraktionierten Anwendung der Bestrahlung erkennen. Die fraktionierte Bestrahlung wird im Allgemeinen besser vertragen und führt zu weniger Nebenwirkungen, sowohl was die lang- und die kurzfristigen betrifft, obwohl sich vor allem bei den kurzfristigen Nebenwirkungen der Unterschied als statistisch nicht signifikant herausgestellt hat. Über die Hälfte der Patientinnen/Patienten leiden bei beiden Anwendungsformen unter Mucositis, Übelkeit und Erbrechen. Häufig kommt es auch zur Entzündung der Ohrspeicheldrüse und Bauchschmerzen und es werden auch Hauterosionen innerhalb einer Woche bis 3 Monate nach der Behandlung beobachtet. Bei den langfristigen Nebenwirkungen stehen die Lunge, Leber, Nieren und Augen im Vordergrund. Bei fast der Hälfte der Behandelten entsteht in den ersten 4 Jahren nach der Bestrahlung eine interstitielle Pneumonie. Die Ursache dafür sind oft Infektionen mit CMV, bakterielle sowie Pilzinfektionen oder die pulmonale GvHD. Die Hepatitis und die venöse okklusive Leberkrankheit (venoocclusive disease, VOD) tritt bei bis zu 20% der

Patientinnen/Patienten auf. Weiters beobachtet man renale Funktionseinschränkungen, Myokarditis und Perikarditis.⁸³ Die Kataraktbildung ist eine Nebenwirkung die der Bestrahlungstherapie häufiger, in bis zu der Hälfte der Patientinnen/Patienten behandlungsbedürftig und in fast allen klinisch messbar, als bei anderen Konditionierungsarten vorkommt und auch öfter chirurgisch behandelt werden muss, wenn eine Bestrahlung stattgefunden hat. Dabei gilt aber zu berücksichtigen, dass auch die Steroidtherapie, die alle Patientinnen/Patienten zur Vorbeugung oder zur Behandlung der GvHD erhalten, Katarakte auslösen kann. Trotzdem scheint die Bestrahlung den größten Risikofaktor für die Kataraktausbildung darzustellen, worauf die Patientinnen/Patienten im follow-up untersucht werden sollten.⁸⁴

Da nur wenige Studien zu den Nebenwirkungen für Kinder und aufgrund der kleinen Kohorten, die Ergebnisse oft unsicher sind, kann man oft nicht genau sagen, ob und wie sich Therapien auf diese Patientengruppe auswirken. Studien weisen aber darauf hin, dass bei Kindern das akute Nebenwirkungsprofil milder als bei Erwachsenen ausfällt. Die pulmonalen und cardialen Langzeitnebenwirkungen sind klinisch weniger signifikant. Zu bedenken ist aber, dass es durch die Bestrahlung das Wachstum der Kinder zuweilen stark reduziert wird. Andere Hormone scheinen weniger stark betroffen zu sein, doch im Wachstum bleiben diese Kinder hinter den anderen zurück.⁸⁵

4.3.2. Alkylanzien und Purinanaloga

Um die lang- und kurzfristigen Nebenwirkungen der TBI zu verhindern, wurden Konditionierungsschemata entwickelt, die nicht auf dem Prinzip der Bestrahlung, sondern auf der Alkylierung der DNA von sich schnell teilenden Zellen beruht. Der Einsatz solcher Substanzen hat ein günstigeres Nebenwirkungsprofil und richtet weniger Schaden bei den Zellen an, die keine Zielzellen der Therapie sind.

4.3.2.1. Busulfan

Busulfan wurde 1954 als Erhaltungstherapie bei chronischer myeloischer Leukämie in oraler Form zugelassen.⁸⁶ Da der Plasmaspiegel bei der oralen Darreichungsform stark von der gastrointestinalen Aufnahme abhängt und dadurch Schwankungen ausgesetzt ist, wurde

eine i.v.-Variante entwickelt, die nun aufgrund der besseren Steuerbarkeit eingesetzt wird. Die Einhaltung des therapeutischen Fensters ist nicht unerheblich, da bei zu niedriger Dosierung die Häufigkeit der Graft-Rejection bei zu hoher Dosierung die der venös-okklusiven Leberkrankheit (VOD) zunimmt. Vor allem bei Kindern ist dabei die enge Messung des Plasmaspiegels von Busulfan wichtig, da diese eine höhere Eliminationsrate und niedrigere AUC-Werte (Area under the curve) haben.⁸⁷ Die Therapie sollte dabei auch individuell angepasst werden, da Studien gezeigt haben, dass die verabreichten Dosen je nach Patienten oft nicht die gewünschte Konzentration im Körper erreichen.⁸⁸ Die therapeutische Breite des Busulfan Einsatzes ist aber nicht sehr groß und Studien berichten, dass er bei Kindern in einem Bereich von 74-82mg*h/L liegen sollte.⁸⁹ Zusätzlich zur Dosis des Medikaments kommt es auch darauf an, mit welchen anderen Substanzen es im jeweiligen Regime kombiniert wird. Wird es mit Cyclophosphamid kombiniert, treten bei den Patientinnen/Patienten vermehrt toxische Nebenwirkungen wie die VOD auf. Auch die Kombination mit Thiohepa wird kritisch betrachtet, da die Kombination mit diesen Substanzen, die einerseits bereits sehr enge therapeutische Breite weiter beschränkt. Auch Melphalan ist kein guter Partner für Busulfan, da beide Substanzen über die Glutathion-S-Transferase enzymatisch abgebaut werden und somit die Spiegel beider Medikamente die toxische Schwelle leicht überschreiten.⁹⁰

Die Umstellung auf i.v.-Busulfan verbesserte die Verträglichkeit und die Steuerbarkeit der Medikamente, trotzdem wurde das Risiko der VOD bei der Kombination mit anderen Alkylantien nicht genügend reduziert. Fludarabin besitzt diese Nebenwirkung nicht und ist in seiner immunsupprimierenden Wirkung mit Cyclophosphamid gut vergleichbar.⁹¹ Die Kombination mit Busulfan scheint aber verträglicher zu sein, da die verwendeten Busulfan Dosen geringer sind und sich die Nebenwirkungen nicht überlappen, da der Fludarabinabbau nicht leberabhängig ist, sondern Fludarabin renal ausgeschieden wird.^{92 93}

Die Reduzierung der therapiebedingten Toxizität ist vor allem im Setting der RIC und bei der Behandlung von non-malignen Erkrankungen zu berücksichtigen. Beispielsweise besteht die übliche Konditionierung bei der Therapie der schweren Sichelzellanämie aus einer Kombination von hoch dosiertem Busulfan, Cyclophosphamid und Antithymozytenglobulin (ATG). Die Anwendung ist zwar effektiv und die transplantationsabhängige Sterblichkeit ist bei diesen Kindern gering, trotzdem verringern die eingesetzten Substanzen aufgrund ihrer Nebenwirkungen die Lebensqualität der Kinder und verlängern infolge dessen ihre Krankenhausaufenthalte. In US-amerikanischen

Krankenhäusern wurde schließlich der Versuch unternommen, durch die Einführung von Fludarabin in das Behandlungsschema, die Dosen der anderen Substanzen zu reduzieren, ohne Einbußen im Therapieerfolg hinzunehmen. Dabei stellte sich bei gleichem Outcome, ein besseres Nebenwirkungsprofil bei den Patientinnen/Patienten und eine damit erfolgreichere Behandlung ein. Zwar war das Patientenkollektiv zu klein, um endgültige Schlüsse zu ziehen, doch zeichnet sich Fludarabin als Option zur Ergänzung zur Standardtherapie ab.⁹⁴

4.3.2.2. Treosulfan

Treosulfan (Dihydroxybusulfan) ist eine weitere alkylierende Substanz, die in ihrer Wirkung dem Busulfan sehr ähnlich ist. Ursprünglich wurde es entwickelt um damit solide Tumoren zu behandeln, doch war eine der Nebenwirkungen eine sehr potente immunsupprimierende und myeloablative Wirkung. Daraus entstand die Idee, Treosulfan als Medikament zur Konditionierung vor HSCTx einzusetzen. Es zeigt eine gute Wirkung gegenüber Leukämiezellen und aktivierten sowie inaktiven Progenitorzellen. Durch seine geringeren extramedullären Nebenwirkungen kann es zusammen mit Fludarabin in Form einer 'reduced toxicity myeloablative' Konditionierung verwendet werden, aber auch in Rahmen einer RIC.⁹⁵ Da die Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie bei vielen nicht-malignen, hämatologischen Erkrankungen im Kindesalter ein wesentlicher Faktor für die 'therapy related mortality' (TRM) darstellt, ist eine solche Substanz für die Behandlung ebendieser Krankheiten interessant. Klinische Studien zeigen auch vielversprechende Ergebnisse, die in die Richtung deuten, dass einerseits das Engraftment nach einer Treo-Flu Konditionierung gut ist und auch das OS und DFS der Kinder, die wegen einer nicht-malignen Erkrankung eine SCTx erhielten, verbessert wurden.^{96 97} Durch eine Intensivierung der Behandlung können aber auch im high-risk Setting bei Patientinnen/Patienten mit AML, ALL und MDS (=myelodysplastisches Syndrom) gute Ergebnisse mit einer Treo-Flu Therapie erzielt werden. Vor allem durch die gute Verträglichkeit kann bei diesem Kollektiv mit höheren Dosen gearbeitet werden, ohne dass die Nebenwirkungen der Therapie das Outcome der Behandlung stark beeinträchtigt, weswegen dieser Therapieplan gerade bei Kindern eine Alternative darstellt.⁹⁸

4.3.2.3. Thiotepa

Thiotepa (N, N', N''-Triethylenethiophosphoramid, TTP) ist eine weitere Substanz, die der Gruppe der Alkylanzien zugeordnet wird und die bei der Konditionierungstherapie zum Einsatz kommt. Ursprünglich wurde Thiotepa zur Behandlung von soliden Tumoren, wie Mammakarzinome oder Ovarialkarzinome, in den 1950er Jahren entwickelt, wobei es eine hohe Wirksamkeit erzielt. Doch eine der Nebenwirkungen stellte sich als limitierender Faktor für die Hochdosistherapie heraus. Einerseits wirken sich die Nebenwirkungen sehr stark auf den GI-Trakt und das Nervensystem aus, aber andererseits ist die Wirkung von Thiotepa äußerst toxisch für das Knochenmark.⁹⁹ Die Dosen, in denen Thiotepa eingesetzt wird, können demnach drastisch erhöht werden, wenn die Komponente der Knochenmarkssuppression die gewünschte Wirkungsweise des Medikaments ist, beziehungsweise bei der Konditionierung ein erwünschter Effekt ist.¹⁰⁰ Andererseits können durch die autologe pSCTx Patientinnen/Patienten erfolgreich behandelt werden, die aufgrund ihrer Grunderkrankung eine Hochdosistherapie benötigen.¹⁰¹ Bei hämatologischen Patientinnen/Patienten wird Thiotepa auch bei solchen angewandt, die an malignen Krankheiten leiden, die mit einem hohen Risiko verbunden sind. Dabei wird Thiotepa in Kombination mit Substanzen wie Treosulfan und Fludarabin kombiniert, um eine maximale Wirksamkeit bei möglichst geringer Dosis zu erzielen. In dieser Kombination wird eine relativ gute Verträglichkeit, mit geringer Inzidenz der GvHD und gutem Engraftment auch bei Patientinnen/Patienten beobachtet, die wegen ihren schweren Grundkrankheiten schon vor der Therapie intensiv behandelt wurden.¹⁰²

4.3.3. Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antithymozytenantikörper oder Antilymphozyten Globuline (ATG) sind die hoch gereinigte IgG-Antikörper-Fraktion aus den Seren von Kaninchen, Pferden und selten Ziegen, die mit aktivierten T-Lymphozyten immunisiert wurden. Dabei muss unterschieden werden, ob es sich um ATG von Pferden oder von Kaninchen handelt. Obwohl natürlich viele Eigenschaften sehr ähnlich sind, kommen in der Herstellung unterschiedliche Prozesse zur Anwendung und damit handelt es sich um unterschiedliche Produkte. In Graz

findet das Kaninchen ATG Fresenius der Fresenius-Biotech-GMBH Anwendung, das ausschließlich Kaninchen Antikörper beinhaltet, die durch die Immunisierung mit aktivierten T-Zellen der Jurkat Zell-Linie produziert wurden. Durch die polyklonale Herkunft des Produkts ist auch die Wirkung von ATG nicht auf einen einzelnen Lokus beschränkt, sondern das Medikament wirkt an verschiedenen Stellen immunmodulatorisch. Der vordergründigste Effekt ist die T-Zell-Depletion in Blut und in peripheren lymphoiden Geweben. Dies geschieht durch Opsonierung der Zellen durch die Antikörper und die anschließende Aktivierung des Komplement-Systems, aber auch durch direkte Aktivierung der T-Zellen und Einleitung der Apoptose. Weiters werden die Oberflächenmoleküle, die zur Interaktion von Lymphozyten und Endothelzellen benötigt werden, moduliert. Auch die B-Zell-Linien werden apoptotisch reduziert, die dendritischen Zellen werden in ihrer Funktion gehemmt und regulatorische T-Zellen und NK-Zellen werden induziert. Das Zusammenwirken all dieser Wirkmechanismen führt zu einer starken Immunsuppression, die zur Prävention der GvHD und der Graft Rejection beitragen kann.¹⁰³ ATG hat eine unterstützende Funktion und wird als Ergänzung zu anderen Immunmodulatoren verabreicht und hat dabei in klinischen und experimentellen Versuchsreihen gezeigt, dass es in einer hohen Rate die akute zelluläre Abstoßung bei Organtransplantationen verhindert und die Graft Funktion verbessern kann.¹⁰⁴

Auf der anderen Seite besteht durch die starke apoptotische Wirkung auf T- wie B-Zellen die Gefahr der 'Überimmunsuppression' mit verzögerter Immunrekonstitution und damit einem Anstieg der NRM (non-relapse mortality). Die Wirkung auf die CD19⁺ B-Zellen und die CD27⁺ Memory B-Zellen führt zu einem erhöhten Infektionsrisiko, das sich lange nach der ATG Gabe noch auswirken kann.¹⁰⁵ Diesem Effekt kann man entgegenwirken, indem man die Dosis anpasst. Bei einer low-dose Anwendung Thymoglobulin von 3,5mg/kg KG bei HLA identen und 5mg/kg KG bei HLA mismatch Transplantationen die an den Tagen -2 und -1 zusammen mit Cyclosporin A und Methotrexat gegeben wird, erreicht man auch eine ausreichende GvHD Prophylaxe, bei gutem Engraftment und einer prompten Immunrekonstitution. Es zeigt sich, dass dieser low-dose Zugang ebenso effektiv sein kann, wie die Gabe von 10mg/kg KG, wobei sich die Frage nach der idealen Dosierung weiterhin stellt, da sowohl die verschiedenen ATG Präparate in Studien schwierig miteinander zu vergleichen sind, als auch bei den Indikationen große Unterschiede im Patientengut herrschen.¹⁰⁶

4.4. Nicht-myeloablative Konditionierung (NMA)

Diese Form der Konditionierung ist dadurch definiert, dass sie nur eine minimale Zytopenie hervorruft und keine Stammzelltransplantation notwendig ist. Nur wenige Regime sind tatsächlich NMA, wie FLU-CY, TBI-ATG, da zum Beispiel niedrig dosierte Bestrahlung auch zu einem bestimmten Grad eine Ablation der hämatopoetischen Zellen verursacht, aber eine Stammzellgabe ist trotzdem nicht zwingend notwendig. Der Begriff bezieht sich auch nur auf die Konditionierungstherapie selbst, da die Stammzellgabe und die Einführung allogener T Zellen zu einer Myeloablation führen, die dann aber durch die Transplantation selbst bewirkt werden.⁶⁴

4.5. Reduced intensity Konditionierung (RIC)

Im Grunde genommen, fällt jede Art der Konditionierung, deren Effekt nicht durch die Definitionen der MA und NMA beschrieben wird, unter den Begriff der RIC. Die RIC ist keine NMA, da sie eine Zytopenie hervorruft, die langfristig besteht und Stammzellsupport erfordert. Es ist zwar möglich, dass sich die Hämatopoese autolog erholt, aber durch die lange Zeit der Panzytopenie wäre das mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden.⁶⁴

Die exakte Zusammensetzung der einzelnen angewandten Substanzen bleibt aber schwer fassbar, da es je nach Indikation, Zustand und Alter der/des Patientin/Patienten, Kofaktoren und dem Zentrum an dem die Behandlung durchgeführt wird eigene Protokolle gibt. Eine Analyse aller angewandten RIC an 161 Zentren in 30 Ländern aus dem Jahr 2015 ergab eine Zahl von 139 RIC Therapieplänen, dabei aber nicht einbezogen wurden die Verwendung von Antikörperpräparaten und der Einsatz von low dose TBI, was die Zahl weiter vergrößert hätte. Es wurden auch nur pädiatrische Patientinnen/Patienten einbezogen, was zeigt wie groß in diesem Feld die Spannbreite der Möglichkeiten ist.¹⁰⁷

Auf Fludarabin basierende RIC dominierten, oft in Kombination mit Melphalan oder Cyclophosphamid. Fludarabin mit einem gezielten Einsatz von Busulfan scheint ein besseres Profil betreffend Toxizität, GvHD und post-Tx Neutropenie zu haben, weswegen es auch über viele Zentren und Indikationen verwendet wird.¹⁰⁸

Weiters wird oft eine RIC bei besonders jungen Patientinnen/Patienten eingesetzt, da das Survival bei ähnlichen Ergebnissen die Grundkrankheit betreffend im Vergleich zu myeloablativen Konditionierung verbessert ist. Auch leiden diese Patientinnen/Patienten oft an nicht malignen, angeborenen hämatologischen Erkrankungen, für die die RIC in vielen Fällen vorzuziehen ist.¹⁰⁹ Bei malignen Erkrankungen wie AML ist auch nicht auszuschließen, dass die myeloablative Konditionierung klar bessere Ergebnisse liefert als die RIC. Eine Studie aus Japan durchgeführt in den Jahren 2000 bis 2011 an 136 Kindern und Jugendlichen, die wegen einer AML in Behandlung waren, zeigt, dass das Outcome der beiden Gruppen (RIC und MA) ähnlich war. Die Patientengruppe, die eine RIC erhielt, war mit 34 Personen zwar zu klein um eine definitive Aussage zu treffen. Darüber hinaus wurde die Studie nur retrospektiv bewertet, was die Aussagekraft der Ergebnisse mindert. Dennoch liefert die Studie Hinweise, dass man aufgrund des besseren Nebenwirkungsprofils der RIC und den besseren Langzeitfolgen auch bei der AML die RIC als Konditionierungsschema in Betracht ziehen kann.¹¹⁰

Zusammenfassend ist über die RIC zu sagen, dass sie im pädiatrischen Setting weite Anwendung findet. Vor allem bei Kindern sind die reduzierte Toxizität sowie das bessere langfristige Nebenwirkungsprofil, wie zum Beispiel eine geringere Verminderung der Fertilität, in die Entscheidungsfindung einzubeziehen. Anhand der großen Anzahl von verschiedenen Therapiemodellen ist es im Moment aber noch unmöglich, eine klare Aussage zu treffen, welche Therapiezusammensetzung die objektiv Beste für die Patientinnen/Patienten ist. Die 'patient adapted strategies' sind hier von Fall zu Fall entscheidend wie auch die jeweilige Erfahrung des durchführenden Teams.

Kapitel 5 Graft-versus-Host Disease (GvHD)

Der immunologische Angriff des transplantierten Immunsystems auf den Körper der/des Empfängerin/Empfängers ist einer der größten Risikofaktoren im Bereich der Stammzelltransplantation. Diese Reaktion ist immer dann möglich, wenn immun-kompetente Zellen in einen Körper übertragen werden, dessen Oberflächenantigene als fremd erkannt werden und dessen eigene Abwehr nicht im Stande ist, sich gegen die Angreifer zu wehren. Wenn diese Faktoren zutreffen, spricht man von einer Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD).¹¹¹

Die hauptverantwortlichen Zellen sind T-Zellen, wobei die verschiedenen Subtypen der T-Zellen verschiedene Rollen in der GvHD übernehmen.¹¹² T-Helfer Zellen erkennen die fremden HLA-Klasse II Oberflächenantigene. Diese Klasse II Proteine (DR, DQ und DP) befinden sich auf Zellen des hematopoietischen Systems, vor allen auf den B-Zellen, den dendritischen Zellen und den Monozyten, aber auch auf anderen Zellen im Zuge eines Entzündungsprozesses. Daraufhin werden sie aktiviert, proliferieren und setzen Lymphokine frei, die wiederum die B-Zellen aktivieren, woraufhin die Freisetzung von Antikörpern beginnt. Im Gegensatz dazu brauchen zytotoxische T-Zellen diese Vorbereitung nicht, da sie die Proteine der HLA-Klasse-I erkennen und die Zielzellen direkt angreifen können. HLA Klasse I Proteine (A, B und C) kommen in unterschiedlichen Konzentrationen auf allen kernhaltigen Zellen vor. Das Auftreten der GvHD steht in einem direkten Verhältnis zum Grad des Mismatches zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger, weswegen die exakte Bestimmung der HLA Typen vor der Transplantation unumgänglich ist.¹¹³

5.1. Akute GvHD

5.1.1. Pathophysiologie

Die vier Schritte des pathophysiologischen Ablaufs der aGvHD sind:

- Trigger (Auslöser)
- Sensoren, die die Auslöser erkennen
- Mediatoren, die die Entzündung in Gang setzen
- Effektoren, die letztendlich die Schäden an den betroffenen Organen verursachen¹¹⁴

Die wichtigsten Trigger sind Mismatches in den MHC-Molekülen zwischen Empfänger und Spender, vor allem denen der Typen HLA-A, -B, -C und DRB1.¹¹⁵ Doch auch die klassische Aktivierung der Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) des angeborenen Immunsystems findet statt. Durch die der Transplantation vorhergehende Konditionierung werden pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) freigesetzt und durch die toll-like Receptors (TLRs) der APCs erkannt. Diese wiederum reagieren mit der Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, TNF- α , IL-6 und anderen Interferonen, die als 'cytokine storm' bezeichnet wird.¹¹⁶ Zusätzlich zu den PAMPs können auch andere TLR-Liganden die GvHD verstärken. Die damage-associated molecular patterns (DAMPs), die bei Zellschäden endogen eine Immunreaktion hervorrufen, können eine wichtige Rolle bei der aGvHD spielen.¹¹⁷ Da viele Zellen im Rahmen der Konditionierung untergehen, können auch die DAMPs zu einem großen Teil für die Freisetzung von Zytokinen und damit für das Auslösen der Immunreaktion verantwortlich sein. Zusätzlich dazu ist die Rolle von nicht pathologischen Bakterien und nicht-mikrobiologischen Faktoren, wie Allergenen noch weitgehend unerforscht.

Als Sensoren fungieren die APCs, allen voran die dendritischen Zellen (DCs), die eine der Hauptrollen in der Antigenpräsentation spielen.¹¹⁸ Sie spüren die DAMPs auf, präsentieren die HLA-mismatch-Proteine und sorgen mit ihrer Zytokinfreisetzung für die Ko-Stimulation der alloreaktiven T-Zellen. Sowohl die DCs der/des Spenderin/Spenders als auch die der/des Wirtin/Wirts sind aktiv beteiligt und sie präsentieren endogene und exogene Antigene über die MHC-I und MHC-II Wege den Spender-CD8+ und -CD4+ Zellen.¹¹⁹

Die Spender-T-Zellen sind die Mediatoren der aGvHD. CD4 und CD8 sind die Ko-Rezeptoren für MHC Klasse I und II Rezeptoren und beide Arten sind sowohl für die GvHD als auch für den GvL Effekt verantwortlich, worauf in den folgenden Kapiteln noch eingegangen wird.

Die Effektoren verursachen die Schäden in den Zielorganen der GvHD. Dies geschieht sowohl auf zellulärer Ebene, als auch auf molekularer Ebene. Zelluläre Effektoren töten Zielzellen durch direkten Zell-Zell Kontakt über Perforin/Granzym, Fas/FasL oder TNFR/TRAIL, wobei CD8+ Zellen hauptverantwortlich sind.¹²⁰

5.1.2. Klinik der aGvHD

Von einer akuten GvHD (aGvHD) spricht man, wenn die Symptome innerhalb von 100 Tagen nach der SCTx auftreten.¹²¹ Die dabei betroffenen Organe sind Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber, wobei das Grading der Schwere sich nach diesen Organen richtet. Dabei werden je nach System unterschiedliche Kriterien in die Bewertung einbezogen. Das am weitest verbreitete Gluckberg System nimmt Bezug auf diese 3 Organe und gibt ihnen Werte zwischen 0 und 4. Dabei wird sowohl die objektive Funktion als auch die subjektive Performance des Organs in Betracht gezogen. Letztendlich wird die GvHD in 4 Schweregrade eingeteilt, wobei es durch die Subjektivität Schwankungen zwischen den Untersucherinnen/Untersuchern gibt. Die International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) wollte in den 90ern das Grading weniger abhängig von der/vom Untersuchenden machen, indem sie vorschlug nur objektive Kriterien in die Bewertung aufzunehmen, aber es sind nach wie vor beide Systeme im Einsatz und es wird weiterhin versucht, die Einteilung objektiver und prognostisch aussagekräftiger zu machen.¹²²

Eine Studie an der Universität von Minnesota an 864 Patientinnen/Patienten, die eine Therapie mit Prednisolon aufgrund der GvHD erhielten, untersuchte die Verteilung und die Schwere der aGvHD. 57% der Patientinnen/Patienten zeigten nur Hautbeteiligung, 17% nur Beteiligung des oberen oder/und unteren GI-Trakts, 1% eine reine Leberbeteiligung und bei 25% waren mehrere Organsysteme gleichzeitig betroffen. Was den Schweregrad betrifft, litten 27% an einer Grad I GvHD, 58% einer Grad II, 14% einer Grad III und 1% an einer Grad IV GvHD nach Minnesota Grading Systems, einer Weiterentwicklung des

Gluckberg Systems. Nach dem Grading Systems der IBMTR litten 8% an einer Grad A, 45% einer Grad B, 45% einer Grad C und 2% einer Grad D GvHD.¹²³ Diese Zahlen zeigen, wie häufig die Haut beteiligt ist und wie wichtig sie deswegen für die Diagnostik der GvHD ist.

Hautbiopsien als diagnostisches Mittel sind aufgrund der komplexen Situation nach einer Stammzelltransplantation schwierig zu bewerten. Die histologischen Zeichen einer aGvHD werden nach Glucksberg et al. in 4 Grade eingeteilt. Bei Grad I kommt es zu einer Vakuolisierung der Basalzellen und lymphozytäres Entzündungsinfiltrat in der oberen Dermis oder Epidermis. Bei Grad II erkennt man die Dyskeratose einzelner Keratinozyten, Exozytose von Lymphozyten in die unmittelbare Umgebung von nekrotischen Keratinozyten in der Epidermis (Satellitenphänomen). Bei Grad III beginnt die Spaltbildung in der Basalmembranzzone und die teilweise Nekrose der Epidermis und bei Grad IV kommt es zur kompletten Abhebung der nekrotischen Epidermis.¹²⁴ Dabei besteht die Schwierigkeit, dass die Haut durch die vorangehende Therapie, durch Medikamente und die Bestrahlung ohnehin geschädigt und entzündet ist. Deswegen sind Grad I Veränderungen und nekrotische Keratinozyten erst mit einigem zeitlichen Abstand von der Konditionierungstherapie als Hinweis auf eine aGvHD zu bewerten. Außerdem sollte man Biopsien immer im Verlauf beobachten, da Reaktionen auf die Therapie innerhalb von 2 bis 3 Tagen eher zurückgehen, während Manifestationen der GvHD zunehmen. Aber selbst dann ist eine einzelne Hautbiopsie ohne klinische Begutachtung oder ergänzende Biopsien des GI-Trakts oder der Leber als diagnostisches Mittel unzureichend.¹²⁵

5.1.3. Therapie der aGvHD

Durch ihre gute antiinflammatorische und antilymphozytäre Wirkung sind Kortikosteroide die Therapie der ersten Wahl bei der aGvHD. Vor allem bei Grad I lassen sich topische Steroide auf die Haut auftragen und können so die Symptome lindern. Bei schwereren Ausprägungen der oberflächlichen GvHD und bei jeder viszeralen Beteiligung wird auf eine Hochdosistherapie zurückgegriffen. Dabei stößt man aber sehr schnell an die Grenzen dessen, was mit einer reinen Steroidtherapie möglich ist.¹²⁶ Eine retrospektive Studie der University of Minnesota aus dem Jahr 2002 an 443 Patientinnen/Patienten über 10 Jahre stellte fest, dass man an 55% der Patientinnen/Patienten, die man einer Steroidtherapie

unterzog, eine langfristige Verbesserung ihrer Prognose beobachten konnte. In dieser Studie wurden die Patientinnen/Patienten 7 Tage lang mit Prednison $60\text{mg}/\text{m}^2$ pro Tag p. o. therapiert. Sprachten sie auf die Therapie an, erhielten sie die Behandlung für weitere 7 Tage und anschließend wurden die Steroide über 8 Wochen ausgeschlichen. Zusätzlich erhielten 74% Cyclosporin A und 3% Tacrolimus zur Immunsuppression und weitere Medikamente zu Infektionsprophylaxe. Dabei stellte man fest, dass vor allem in Fällen mit Beteiligung des unteren GI-Trakts die Patienten auf die Steroidtherapie schlechter (nur 42%) ansprachen, als jene ohne Beteiligung des unteren GI-Trakts (58%). Die Anzahl der beteiligten Organe wies sich als statistisch nicht ausschlaggebend heraus. Trotzdem zeigte sich, dass die Therapie mit Kortikosteroiden nur bei der Hälfte der Patientinnen/Patienten ausreichend ist und dass man andere Therapiearten ins Auge fassen sollte.¹²⁷

Eine alternative oder second-line Methode die aGvHD zu behandeln, ist die extracorporale Photochemotherapie (ECT). Hierbei werden bei jedem Zyklus 240ml buffy coat und 300ml Plasma mittels Apherese gesammelt und mit 200ml Kochsalzlösung, die mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP) versetzt wurde, behandelt. Anschließend wird die Lösung als 1mm dicker Film einer UV-A Lichtquelle ($2\text{ J}/\text{cm}^2/\text{cell}$) für 90 Minuten ausgesetzt und dann der/dem Patientin/Patienten wieder infundiert.¹²⁸ Dabei macht das Psoralen die Leukozyten empfindlich gegenüber UV-Strahlung und die anschließende Bestrahlung induziert die Apoptose der Zellen. Die Infusion der apoptotischen Zellen dürfte dabei noch einen zusätzlichen immunmodulatorischen Effekt auf die APCs der Milz und Lymphknoten haben, was auf die Aktivität der T- und B-Zellen einen regulatorischen Einfluss haben könnte.¹²⁹

Die Ergebnisse der Therapie sind durchaus positiv. An der medizinischen Universität Wien wurde die ECT bei Patientinnen/Patienten eingesetzt die auf die übliche Steroidtherapie nicht mehr ansprachen. Es handelte sich um ein Kollektiv von 59 Patientinnen/Patienten mit aGvHD der Grade II-IV. Dabei kam es bei 82% der Patientinnen/Patienten mit Hautbeteiligung, 61% mit Leberbeteiligung und 61% mit GI-Beteiligung zu einer kompletten Remission der GvHD. Die Überlebensrate betrug 59% bei Patientinnen/Patienten, die auf die ECT ansprachen, verglichen mit nur 11% bei den Patientinnen/Patienten, bei denen diese Therapie keinen Effekt hatte. Dabei stellte sich heraus, dass das Outcome besser war, wenn man mit der ECT früher begann und bei einer Grad II schon zeitgleich mit der Steroidtherapie eine ECT startete.¹³⁰

Die Empfehlung der Guideline des 'Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology' sehen die ECT als second-line Therapie an. Patientinnen/Patienten mit aGvHD, die auf eine Therapie mit Kortikosteroiden á 2mg/kg/d nicht ansprechen, sollten eine ECT erhalten. Dieses 'Nicht-Ansprechen' ist definiert als Fortschreiten der aGvHD nach ≥ 3 Tagen Behandlung oder einer ausbleibenden Verbesserung der Symptome nach ≥ 7 Tage nach Behandlungsbeginn. Die Patientinnen/Patienten sollen dann 2-3 mal in der Woche therapiert werden, bis die Symptome zurückgehen. Da es im Moment keine Evidenz gibt, dass eine Aufrechterhaltung der Therapie ohne Symptomatik einen Benefit ergibt, kann die Therapie bei Erreichen des Therapieziels beendet werden. Danach soll man die Patientinnen/Patienten wöchentlich auf ein Wiederaufflammen der GvHD untersuchen.¹³¹

5.2. Chronische Graft-versus-Host Disease (cGvHD)

5.2.1. Pathophysiologie der cGvHD

Die Pathophysiologie der cGvHD ist weitgehend noch ungeklärt. Die klinische Präsentation ähnelt oft anderen Autoimmunkrankheiten, wie dem Sjögren Syndrom oder systemischen Lupus erythematodes (SLE), aber die Mechanismen, die dieser Krankheit zu Grunde liegen, sind noch unbekannt. Es gibt grundsätzlich Überschneidungen mit der aGvHD.

Die cGvHD kann aus der aGvHD übergehen (progressiv), sie kann nach abgeklungener aGvHD und nach einem symptomfreien Intervall wieder entflammen (quiescent) oder de-novo ohne vorhergehende aGvHD auftreten (de-novo late onset).¹³²

Weiters entsteht die cGvHD nur nach alloHSCTx und das Risiko des Entstehens der cGvHD kann durch T-Zell-Depletion reduziert werden. Doch es gibt nur Hinweise auf die Pathophysiologie und noch keine allgemein gültige, vollständige Erklärung, was die Diagnostik sowie die Behandlung erschwert.

Bei der cGvHD scheinen nicht nur T-Zellen, sondern auch B-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Krankheit zu spielen. Männliche Patienten, die Stammzellen von weiblichen Spenderinnen bekommen, leiden öfter an cGvHD als männliche Patienten, die Stammzellen von männlichen Spendern erhalten. Der Grund dafür sind minor histocompatibility Antigens (mHA), die in diesem Fall durch die Gene DBY, UTY, ZFY, RPS4Y und EIF1AY auf dem Y-Chromosom codiert sind. IgG Antikörper gegen diese mHAs können in 52% der männlichen Patienten mit weiblichen Spenderinnen und in 8% der männlichen Patienten mit männlichen Spendern nachgewiesen werden. Die H-Y Antikörper treten mehrere Monate bis ein Jahr nach der SCTx auf und verbleiben dann lange Zeit nachweisbar. In einer Untersuchung von 75 männlichen Patienten, die geschlechtlich mismatched transplantiert worden sind, trat die cGvHD in 60% der Fälle auf. Die statistische Analyse ergab keine Korrelation mit dem Auftreten der aGvHD, wohl aber mit dem der cGvHD. Nach 5 Jahren stieg die kumulative Inzidenz auf 89% bei Patienten mit Antikörpern gegen mindestens ein mHA gegenüber 31% bei Patienten ohne

H-Y Antikörper. Zu erwähnen bleibt dabei die Assoziation mit der Tumorrelapserate, die bei Patienten ohne H-Y Antikörpern 48% betrug und 0% bei Patienten mit Antikörpern. Obwohl die Fallzahl dieser Studie keine entgeltliche Aussage über den Effekt der B-Zell-Beteiligung zulässt, kann eine Beteiligung der Antikörper als evident angenommen werden.¹³³

Da die B-Zellen eine Rolle in der Entstehung der cGvHD spielen, nehmen auch die Faktoren, die ihre Proliferation steuern, Einfluss auf die Entstehung der cGvHD. Der B cell activation factor (BAFF) regelt die Rekonstitution nach HSCTx und die Differenzierung der B-Zellen und in Konsequenz kommt es bei niedrigen BAFF Werten zu B-Zell-Lymphopenien.¹³⁴ Hohe BAFF Level sind mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten assoziiert.¹³⁵ Da der cGvHD ähnliche Pathomechanismen zugrunde zu liegen scheinen, wie anderen Autoimmunkrankheiten, wurden auch hier die BAFF Level mit der Inzidenz der cGvHD verglichen. In einer Studie an 412 Patientinnen/Patienten nach alloHSCTx wurden die BAFF Level und die B-Zell Zahl kontrolliert, um eventuell auf einen Einfluss auf cGvHD schließen zu können. In Patientinnen/Patienten, die keine cGvHD entwickelten, waren die BAFF Levels anfangs hoch, was mit den niedrigen B-Zell-Zahlen zusammenhängt. Sowie sich die B-Zellen wieder stabilisierten, sanken im selben Maß auch die BAFF Level. Bei Patientinnen/Patienten, die eine cGvHD im ersten Jahr entwickelten, blieben die anfangs hohen BAFF Level konstant hoch und die B-Zell Zahlen erholten sich nicht so schnell wie in der Vergleichsgruppe. Diese BAFF-zu-B-Zell-Ratio über einen längeren Zeitraum, scheint hier also ein guter Indikator für die Entstehung einer cGvHD zu sein.¹³⁶

Ein weiterer Ansatz den Pathomechanismus der cGvHD zu erklären, liegt auf zellulärer Ebene. CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (Tregs) tragen einen großen Teil in der physiologischen Verhinderung von Autoimmunkrankheiten bei. Diese Zellen stammen zu einem großen Teil aus dem Thymus und dieser ist nach einer HSCTx bzw. deren Konditionierungstherapie in seiner Funktion eingeschränkt. Die Tregs haben die Funktion, autoreaktive Lymphozyten zu unterdrücken und Immunreaktionen zu kontrollieren.¹³⁷ Eine verringerte Anzahl an Tregs könnte bei der Entstehung der cGvHD eine Rolle spielen. Dabei sind die absoluten Zahlen bei Patientinnen/Patienten nach HSCTx allgemein erniedrigt, bei Patientinnen/Patienten die eine cGvHD ausbilden, sind die Tregs zusätzlich noch prozentuell seltener als in Patientinnen/Patienten, die die Krankheit nicht ausbilden. Hier könnte also die verminderte Immunkontrolle und die mangelnde Suppression von

autoreaktiven Lymphozyten eine der Ursachen sein, die zur Ausbildung der cGvHD führt.¹³⁸

5.2.2. Klinik der cGvHD

Da die allgemeine Definition der cGvHD mit jeder GvHD nach Tag +100 nach Tx denkbar ungenau ist, wurden mehrere Grading-Systeme erarbeitet, um die Einschätzung über die Schwere der Erkrankung und die Vorhersagbarkeit des Verlaufs zu verbessern. Das Standardsystem wurde 1980 in Seattle definiert und mittlerweile überarbeitet. Demnach wurde ursprünglich die cGvHD in eine limited und eine extensive Form eingeteilt. Von einer limited cGvHD nach den überarbeiteten Seattle Kriterien spricht man, wenn orale Abnormalitäten mit einer positiven Biopsie, aber ohne andere Manifestationen der cGvHD auftreten, leicht erhöhte Leberwerte festgestellt werden ($AST \leq 2x$ oberes normales Limit, $ALT \leq 3x$ oberes normales Limit), weniger als 6 papulosquamösen Plaques gefunden werden, bei einem Sicca Syndrom (Schirmer Test $\leq 5mm$) oder bei vaginalen/vulvären Abnormalitäten mit positiver Biopsie ohne der Beteiligung anderer Organsysteme.

Die Kriterien für die extensive-cGvHD bilden größtenteils eine Erweiterung der Symptome und eine Verschlechterung des Zustandsbildes der/des Patientin/Patienten. Wenn 2 oder mehr Organe von der cGvHD betroffen sind, fällt die/der Patientin/Patient unter die extensive Kriterien, sowie wenn die Hautbeteiligung ausgeprägter und die Leberwerte schlechter sind ($AST > 2x$ oberer Normalwert, $ALT > 3x$ oberer Normalwert). Weiters sind die Patientinnen/Patienten als der extensive-cGvHD zuzuordnen, wenn Sklerodermie oder Morphea, Onycholyse plus bestätigter cGvHD in einem anderem Organ, ein eingeschränkter Bewegungsumfang in Handgelenk und Knöchel oder Kontrakturen, Bronchiolitis obliterans oder eine Fasciitis oder Serositis, die durch keine andere Ursache als cGvHD ausgelöst werden, festgestellt werden können. Eine positive Biopsie des oberen oder unteren GI-Trakts ist ebenso immer als extensive cGvHD zu werten. Ein weiteres Einflusskriterium bei dem erweiterten Seattle Grading sind klinische Scores, wie der Lansky oder der Karnofsky Score, bei denen die subjektive Leistungsfähigkeit der Patientinnen/Patienten Einfluss auf die Bewertung der Schwere der Krankheit hat.¹³⁹

Ein Problem dieser Klassifikation ist bei Betrachtung der zu untersuchenden Kriterien die mangelnde Abgrenzung zur aGvHD. Hier hat sich in den letzten Jahren durch neue

Konditionierungsschemata und durch Modifikation der Stammzelltransplantate auch die Charakteristik der GvHD vor allem in Bezug auf ihren zeitlichen Verlauf verändert.¹⁴⁰ Aus diesem Grund haben die amerikanischen National Institutes of Health daran gearbeitet, einen Konsens zu finden, der eine genauere Einteilung der cGvHD zulässt. Dabei war der erste Punkt auf der Agenda die Differenzierung zwischen aGvHD und cGvHD. Hierfür wurden „diagnostische“ Zeichen und Symptome definiert. Diese sind eindeutig der cGvHD zuordenbar und brauchen keine weiteren Tests, um eine cGvHD nachzuweisen. Dazu gehören als Symptome der Haut Poikilodermie, Lichen planus und Lichen sklerosus ähnliche Manifestationen, Sklerodermie und Morphea. Diese Symptome können auch im Bereich des Mundes und der Genitalien auftreten und sind dann auch als „diagnostische“ Symptome zu bewerten. Im GI-Trakt gehören die ösophageale Web-Stenose und andere Strikturen und Stenosen im oberen und mittleren GI-Trakt zu den sicheren Diagnosekriterien. In der Lunge zählt die durch eine Biopsie bestätigte Bronchiolitis obliterans (BO) und in den Gelenken eine Steifigkeit, die sekundär durch die Sklerose entstanden ist zu diesen Symptomen. Andere, im oberen Absatz genannte Symptome sind oft nur hinweisend auf eine cGvHD und müssen durch weitere Test bzw. durch die Zusammenschau aller Symptome bewertet werden. Auch die jeweilige Organbeteiligung selbst wurde in ein Scoring-Schema eingefügt. Hier werden die Organe mit Punkten zwischen 0 und 3 bewertet und konsequent die Schwere der cGvHD in 3 Grade (mild, moderate und severe) eingestuft. Die milde cGvHD involviert nur 1-2 Organe bei denen keine signifikante Einschränkung ihrer Funktion vorliegen darf (Score=1). Bei der moderaten cGvHD liegt eine signifikante Einschränkung der Organfunktion vor, aber noch kein schwerer Funktionsverlust (Score=2) oder 3 oder mehr Organe werden mit einem Score von 1 bewertet. Auch ein Lungenscore von 1, selbst wenn er isoliert vorliegt, ist automatisch ein Zeichen einer moderaten cGvHD. Eine schwere cGvHD besteht, wenn irgendein Organ so schwer betroffen ist, dass es mit einem Score von 3 zu bewerten ist, oder ein Score von 2 in der Lunge, denn je nach Studie schwankt die Inzidenz der BO zwischen 2-3% aller transplantierten Patientinnen/Patienten und ungefähr 6% aller cGvHD Patienten. Das Überleben bei bestehender BO ist trotz optimaler Versorgung in vielen Fällen nur sehr schlecht, da sie nur sehr schlecht auf immunsuppressive Behandlung ansprechen, über Wochen und Monate die Lungenfunktion mehr und mehr verloren geht und letztendlich gänzlich versagt.¹⁴¹ Zusätzlich zur Klassifikation der Schwere der Erkrankung soll noch zwischen klassischer cGvHD, also ohne Symptomen, die auch einer

aGvHD zuordenbar sind, eines Overlap-Syndroms (Krankheitsbeginn nach Tag +100, Zeichen der cGvHD und der aGvHD), einer klassischen aGvHD (Krankheitsbeginn vor Tag +100, keine Zeichen der cGvHD) und der persistenten, wiederkehrenden oder late-onset aGvHD (Krankheitsbeginn nach Tag +100 aber keine Merkmale der cGvHD) unterschieden werden. Diese Einteilung soll die Indikationsstellung zur Behandlung und die Prognose des Krankheitsverlaufs erleichtern.¹⁴²

2014 wurden die NIH Kriterien durch die ASBMT (American Society for Blood and Marrow Transplantation) auf ihre Aussagekraft im Vergleich zu den RSC (revised Seattle criteria) überprüft. 425 Patientinnen/Patienten, deren Überleben über den Tag +100 nach einer alloHSCTx hinausging, wurden nach den NIHC und den RSC nachträglich klassifiziert. Das OS und das 5-Jahres-GSS (GvHD specific survival) waren ähnlich aussagekräftig nach NIH und RSC, wobei zwischen milder und moderater cGvHD kein signifikanter Unterschied bestand. Die Patientinnen/Patienten, die an einer Overlap-GvHD litten, hatten ein schlechteres Outcome als Patientinnen/Patienten mit klassischer cGvHD. Diese Unterscheidung findet sich auch in den RSC in Form der limited und extensive cGvHD, ist hier aber nicht so differenziert, wie in den NIH Kriterien. Insgesamt sind beide Grading Systeme sehr ähnlich und auch in Bezug auf die Behandlung der cGvHD gibt es keine Unterschiede, weswegen sich kein System als absolut besser herausstellen konnte.¹⁴³ Im Rahmen von Studien scheint es natürlich von Vorteil zu sein, eine genauere Aussage über die cGvHD zu machen, um Ergebnisse besser vergleichen zu können, aber so lange es keine Auswirkung auf die Therapieindikation hat und die Einteilung zwischen später aGvHD und klassische cGvHD eher semantisch ist, sind beide Systeme im klinischen Setting anwendbar.¹⁴⁴

Die cGvHD ist die führende Ursache der späten 'treatment related deaths' (TRD). Dabei ist aber eine Unterscheidung über die Schwere der cGvHD zu treffen. Bei schweren Ausprägungen der GvHD ist die damit verbundene Mortalität hoch, ist die Krankheit dagegen mild ausgeprägt, ist das Überleben der Patientinnen/Patienten gleich oder besser als bei Patientinnen/Patienten, die keine cGvHD ausbildeten. Denn das Auftreten der cGvHD senkt unabhängig von der Schwere der Krankheit die Wahrscheinlichkeit des Tumorrelapses nach SCTx.¹⁴⁵

5.2.2. Behandlung der cGvHD

Die Standardtherapie der cGvHD besteht aus Prednisolon mit oder ohne Cyclosporin oder Tacrolimus. Doch nur wenige Patientinnen/Patienten sprechen wirklich zufriedenstellend auf die Therapie an, weswegen nach anderen Ansätzen gesucht wird.¹⁴⁶ Es gibt keinen Standard für die weitere Behandlung. Empfehlungen inkludieren über 40 Medikamente und Verfahren, doch letztendlich wird die Entscheidung für die weitere Therapie unter den Gesichtspunkten der Logistik, der Kosten, Anzahl der vorhergegangenen Therapieversuche, der Toxizität der Behandlung und nicht zuletzt der Erfahrung des behandelnden Teams. Die Ziele der Therapie sollten dabei immer die Verhinderung des Fortschreitens der Erkrankung oder im Idealfall die Zurückbildung der Symptome sein.¹⁴⁷

Therapien, die in der Behandlung aGvHD vielversprechende Ergebnisse zeigen, sind aber bei der Behandlung der cGvHD oft wirkungslos, die Erkenntnisse von Studien, die im Feld der aGvHD gemacht wurden, können nicht auf die Behandlungsstrategien der cGvHD umgelegt werden. Zum Beispiel ist die Effizienz von Anti-T-Zell-Globulin bei der aGvHD gut, lässt sich aber im Setting der cGvHD nicht belegen.¹⁴⁸

Neuere Ansätze der Therapie inkludieren die Modulation von Zytokinen, die Depletion von Autoantikörper-produzierenden B-Zellen mit monoklonalen Antikörpern und andere immunmodulatorische Medikamente, die präemptive Behandlung von minimaler cGvHD, die Elimination oder Inhibierung von pathogenen T-Zellen auf pharmakologischer oder zellulärer Basis, Interventionen um die Immuntoleranz mit extrakorporaler Photochemotherapie oder die thymische Leistung mittels IL-7 Gabe zu erhöhen oder falls sich die Krankheit überhaupt nicht behandeln lässt, wenigstens den Effekt auf die Zielzellen zu minimieren und die Fibrose sowie Leberschäden zu verhindern.¹⁴⁹ Supportive Care wie gute antimikrobiologische Prophylaxe, regelmäßige Kontrolle des Sicca Syndroms, Hautpflege, psychologische Unterstützung und physische Rehabilitation sind mindestens gleich wichtig, um Komplikationen und Infektionen zu verhindern und die Lebensqualität zu steigern.¹⁵⁰

Kapitel 6 Immune Rekonstitution

Die immune Rekonstitution – die Wiederherstellung der Funktion des Immunsystems nach einer Stammzelltransplantation ist eine der wesentlichen Kriterien, die über den Erfolg der Therapie und das Überleben der/des Patientin/Patienten entscheiden. Die neuen Transplantationsprotokolle, die es ermöglichen haploHSCTx durchzuführen, da sie die Graft-Rejection und die GvHD in den Griff bekommen können. Sie haben aber zur Folge, dass die Rekonstruktion des Immunsystems oft nur verzögert stattfindet. Aus diesem Grund sind unter den beiden häufigsten, tödlichen Komplikationen der haploHSCT schwere Infektionen und das Wiederkehren der Grundkrankheit. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren stark daran gearbeitet, die Mechanismen zu verstehen, nach denen sich das Immunsystem wieder herstellt, die Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen des Immunsystems zu erkennen und die Recovery zu unterstützen und zu beschleunigen.^{151 152}

6.1. Die Kinetik der Immunrecovery nach HSCTx

Verschiedene Zell-Subklassen erholen sich verschieden schnell nach einer HSCTx. Da jede Subklasse eine andere Aufgabe erfüllt und durch unterschiedliche Arten der Differenzierung ein anderes Recovery aufweist, muss man bei der Untersuchung der einzelnen Zellklassen, diese voneinander unterscheiden. Da das Feld der Immunologie ein sehr weites ist und viele Mechanismen noch unerforscht sind, ist es nicht einfach ein klares Bild der Vorgänge zu zeichnen. In den folgenden Kapiteln werden einige Subklassen näher beleuchtet und auf die Unterschiede zwischen dem Recovery mit und ohne α/β -Depletion hingewiesen.

6.1.1. Neutrophile Granulozyten

Der Transplantation folgt eine 'neutropenische' Phase in der kaum kernhaltige Zellen im peripheren Blut nachweisbar sind. Diese Phase dauert an, bis neutrophile Granulozyten als erste zurückkehren. Das neutrophile Engraftment wird definiert als 3 aufeinanderfolgende

Tage, in denen die Zahl der neutrophilen Granulozyten $0,5 \times 10^9$ Zellen/L erreicht oder übersteigt. Dies geschieht bei CD3/CD19 depletierten Grafts und RIC nach einem medianen Zeitraum von 12 Tagen¹⁵³, bei G-CSF geprimtem Knochenmark (G-BM) und nicht-T-Zell-depletiertem peripheren Blut nach 13 Tagen¹⁵⁴, bei haploHSCTx aus Knochenmark nach nicht myeloablativer Konditionierung und post Tx Cyclophosphamidgabe nach 15 Tagen¹⁵⁵ und bei haploidenter, unmanipulierter, G-CSF-geprimter KnochenmarksTx im Median nach 21 Tagen¹⁵⁶. Dieser Anstieg der neutrophilen Granulozyten ist von entscheidender Wichtigkeit in der Zeit nach der Transplantation, da die Wahrscheinlichkeit einer Bakteriämie sinkt, je kürzer die Zeit der Neutropenie ist. Dasselbe kann man auch über Pilzinfektionen sagen, weswegen die neutrophilen Granulozyten ein erster wichtiger Baustein im Wiederaufbau des Immunsystems sind.¹⁵⁷

6.1.2. Natürliche Killerzellen

NK Zellen sind die nächsten Immunzellen, die sich nach der SCTx wieder erholen. Üblicherweise erholen sich ihre Zahlen ca. 30 Tage nach der Transplantation, obwohl die Entwicklung einer GvHD diesen Prozess verzögern kann. Dabei ist zu erwähnen, dass man bei NK Zellen von 2 Subklassen sprechen muss. Die beiden unterscheiden sich durch die Dichte der CD56 Moleküle an ihrer Oberfläche und werden deswegen CD56^{Bright} und CD56^{Dim} Zellen genannt. Diese zwei Zellreihen finden sich beim gesunden Menschen in einem Verhältnis von 90% CD56^{Dim} und 10% CD56^{Bright}. Obwohl man noch keine funktionelle Signifikanz des Unterschieds zwischen der Dichte von CD56 festgestellt hat, nehmen die Subklassen unterschiedliche Rollen in der Immunabwehr ein. Wohl auch durch die Bildung bzw. Nicht-Bildung von anderen Oberflächenproteinen, wie CD16 und den KIR (killer cell Ig-like receptor) Liganden. Dabei bilden CD56^{Bright} NKs diese Proteine in weit geringerem Maß aus als ihre CD56^{Dim} Gegenstücke. Dadurch sind sie weit weniger cytotoxisch, haben aber durch die vermehrte Ausschüttung von Cytokinen eine größere Rolle in der Modulation der Immunantwort.¹⁵⁸ So wie sich das Verhältnis der Anzahl der Zellen zwischen den beiden Subklassen im gesunden Menschen unterscheidet, so unterscheiden sich auch die Geschwindigkeiten der Recovery. Wenn man von der möglichen Verzögerung der Recovery durch die GvHD absieht, erreichen die CD56^{Bright} NKs Normalwerte im Median 14 Tage nach der Tx und ihre Höchstwerte 60 Tage nach Tx. Die CD56^{Dim} NKs sind am Tag 14 nach Tx noch unter dem Spenderlevel und erreichen

diesen erst am Tag 30. Die Vermutung liegt nahe, dass die CD56^{Bright} NKs unreife Vorläuferzellen der CD56^{Dim} NKs sind, aber da die beiden Subklassen sehr unterschiedliche Funktionen ausüben, ist es wahrscheinlicher, dass sie sich separat entwickeln.¹⁵⁹ Ying-Jun Chang et al. untersuchten die Recovery und das Outcome nach einer haplo HSCTx in Bezug auf die NKs und stellten fest, dass eine höhere Anzahl an NKs mit einem besseren Outcome korreliert. Eine schnellere Erholung der NK Zahlen führt anschließend auch zu einem schnelleren Anstieg der CD3⁺ Zellen. Dadurch sind die Patientinnen/Patienten früher und besser gegen Infektionen geschützt und auch das Risiko des Tumorrelapses geht zurück. Doch durch die steigende Zahl der CD3⁺ Zellen wird auch das Risiko, eine GvHD zu entwickeln, höher. Aber die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht die Zahl der CD3⁺ ausschlaggebend für das GvHD Risiko ist, sondern das Verhältnis zwischen CD3⁺ und NKs. Ist das Verhältnis CD3/NK >1 auf Seiten der CD3⁺ Zellen ist das Risiko für die GvHD höher, sind jedoch die NKs in der Überzahl, dürften sie einen modulierenden Einfluss auf die T-Lymphozyten haben, wodurch sich das Outcome verbessert. Aus diesem Grund könnten vor allem die CD56^{Bright} NKs wichtige Rolle für das Überleben nach HSCTx spielen.¹⁶⁰

6.1.2.1. Invariant natural killer T-cells

Invariant natural killer T cells (iNKT) stellen einen Subtyp der T-Lymphozyten dar, der eine invariable V α 24-J α 18 TCR Kette exprimiert. Dieser TCR ist spezifisch für mikrobiologische und endogene Lipid-Antigene und für α -Galaktosylceramid (α GalCer), den man in CD1d findet, und CD161 den NK-Rezeptor. Das macht sie zu Effektorzellen gegen virale und bakterielle Infektionen. Sie können aber auch Tumorzellen in die Apoptose schicken und haben Einfluss auf autoimmunologische Prozesse. Von ihnen existieren 2 Subtypen: der CD4⁺ Helfer oder regulatorische Typus und der CD4⁻ Effektor oder inflammatorische Typus, die in der Regel in einem CD4⁺<CD4⁻ Verhältnis zu finden sind.¹⁶¹ Nach einer haploHSCTx an 33 pädiatrischen Patientinnen/Patienten wurde das Recovery der iNKT Zellen näher untersucht. Dabei stellte man fest, dass sie erst nach 3 Monaten in der Peripherie nachweisbar sind, also 2 Monate später als die restlichen T-Zellen und B-Zellen. Nach 18 Monaten wurden im Median 0,549 iNKT Zellen/ μ l gefunden, was Durchschnittswerten gesunder Gleichaltriger entspricht. Die CD4⁺ Zellen weisen eine schnellere Kinetik auf, da die CD4⁻ iNKT Zellen erst 2-4 Monate später

nachweisbar waren. Bei Patientinnen/Patienten, bei denen ein Tumorrelapse auftrat, fehlte diese Entwicklung und die iNKT Population erholte sich nicht, was vermuten lässt, dass diese Zellen für die Leukämiekontrolle wichtig sein könnten.¹⁶² Im Gegensatz zu T-Lymphozyten gibt es bei NK Zellen Hinweise, dass eine Alloreaktivität der/dem Empfängerin/Empfänger gegenüber einen positiven Effekt auf das Überleben nach HSCTx hat. Die NKs tragen an ihrer Oberfläche 'killer Ig-like receptors' (KIRs), mit denen sie HLA Klasse I erkennen können. Wenn diese auf den Empfängerzellen nicht mit denen der NKs übereinstimmen, bilden sich alloreaktive NK-Klone, die Host-Zielzellen wie AML-Tumorzellen angreifen. In einer Studie aus dem Jahr 2002, bei der 92 Patientinnen/Patienten mit einer high-risk akuten Leukämie eine haploHSCTx erhielten, wurden die HLA-C Loci ermittelt. Bei Patientinnen/Patienten, bei denen der HLA-C Locus zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger übereinstimmte, lag das 'event free survival' (EFS) nur bei 5%, bei der Gruppe, bei der es ein Mismatch gab, betrug das EFS 60%. Auch die GvHD wurde durch das Mismatch im HLA-C Locus beeinflusst, was den Hinweis auf den klinischen Einfluss der NKs auf den Erfolg der HSCTx bestärkt.¹⁶³ Dieses Ergebnis war auch im Mausmodell reproduzierbar. Weiters gibt es Hinweise, dass CD4- iNKT Zellen eine protektive Wirkung in Bezug auf die GvHD haben. In einer Studie durchgeführt vom Londoner Center of Haematology an 57 Patientinnen/Patienten nach pSCTx im Kontext einer HLA-identen allogenen HSCT war die Anzahl der CD4- iNKT ein signifikanter Prädiktor für die aGvHD. Auch hier stellt sich nun die Frage, ob die zusätzliche Gabe von iNKT Zellen bei niedrigen Werten die Patientinnen/Patienten vor aGvHD schützen können.¹⁶⁴

6.1.3. Monozyten

Das Recovery der Monozyten findet in einem ähnlichen Zeitrahmen statt, wie das der NKs. Am Tag +30 wird ein verbessertes Überleben festgestellt, wenn die Monozytenzahl $>0,3 \times 10^9$ Zellen/L ist. Dieser Trend setzt sich fort bis zum Tag +100, wobei niedrige Monozytenwerte zu späteren Zeitpunkten, einen noch größeren Einfluss auf das Outcome zu haben scheinen. Die Patientinnen/Patienten, die höhere Monozytenzahlen am Tag +15 haben, doch am Tag +100 schlechte Werte vorweisen, haben ein schlechteres Überleben, als Patientinnen/Patienten, die zwar am Tag +15 hinter den anderen liegen, bei Tag +100 aber normale Monozytenzahlen entwickeln. Da die Werte der Lymphozyten und der

Monozyten oft korrelieren, vermutet man hier eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Zellreihen, wobei noch untersucht werden muss, was der begründende Faktor für diese Korrelation ist.¹⁶⁵ Eine schwere Monozytopenie mit Zellzahlen $<0,1 \times 10^9/L$ erhöht das Risiko an einer Aspergillose zu erkranken, weswegen den Monozyten eine ähnlich wichtige Rolle wie den neutrophilen Granulozyten in der Abwehr fungaler Infektionen zuzuschreiben ist.¹⁶⁶ Auch im 'reduced intensity setting' korrelieren Monozytenzahlen, die $>0,3 \times 10^9/L$ sind, mit einem besseren Outcome. Patientinnen/Patienten mit einem schlechten Lymphozyten- und Monozyten-Recovery haben ein höheres Risiko, an einer schweren GvHD zu erkranken. Auch hier hat wieder das Cluster der Patientinnen/Patienten das beste Ergebnis, was Tumorrelaps, aGvHD und cGvHD betrifft, das an Tag +15 niedrigere Werte, an Tag +100 aber höhere Werte hat. Diese Daten lassen vermuten, dass es eine optimale Verlaufskurve des Monocyten-Recoverys geben könnte, was aber noch weiter untersucht werden muss.¹⁶⁷

6.1.4. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind mitunter die wichtigsten antigen-präsentierenden Zellen (APCs) des Immunsystems. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung und der Modulation der Immunantwort. Diese Zellen sind nicht nur in der Lage T- und B-Zellen zu aktivieren, in-vitro reicht eine DC aus, um 100-3000 T-Zellen zu stimulieren, sondern sie sind auch Zellen, die die Toleranz der T-Lymphozyten gegenüber körpereigener und fremder Antigene induzieren, was sie im hämatologischen Setting zu einer äußerst interessanten Zellart macht.¹⁶⁸ Es werden 2 Hauptsubgruppen unterschieden:

- die myeloischen DCs (myDCs)
- die plasmazytoischen DCs (pDCs)

Je nach Subgruppe reagieren die Zellen unterschiedlich auf Antigene und interagieren mit verschiedenen anderen Effektorzellen. Dabei herrscht eine gewisse Plastizität zwischen den Subgruppen, was es schwierig macht, die genaue Funktion und Wirkung auf eine bestimmte zurückzuführen, aber Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich um 2 getrennte Linien von DCs handelt.¹⁶⁹ Die Rekonstitution der DCs zeigt sehr niedrige Werte kurz nach HSCTx, die erst nach 1 Jahr nach der Tx die Spenderwerte erreichen.¹⁷⁰ Auf ihre

Rolle in der Pathogenese der GvHD wurde in den vorherigen Kapiteln bereits eingegangen. APCs spielen eine Hauptrolle in der Entstehung der GvHD und damit allen voran den DCs. Die/Der Empfängerin/Empfänger exprimiert Antigene, die in der/im Spenderin/Spender nicht vorhanden sind. Diese Antigene werden auch von den APCs der/des Empfängerin/Empfängers präsentiert. Die Spender-T-Zellen erkennen die präsentierten Antigene und setzen die Immunreaktion in Gang. Dabei haben die DCs sowohl die Fähigkeit, die GvHD zu initiieren als auch eine Immuntoleranz aufzubauen.¹⁷¹ Der Turnover der DCs geht aber sehr rasch vonstatten, weswegen die DCs der/des Empfängerin/Empfängers wahrscheinlich nur in den ersten Tagen nach Tx einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung der GvHD haben. Schon +14 Tage nach Tx sind 80% der nachweisbaren DCs im peripheren Blut der/des Spenderin/Spenders und um den Tag +60 sind es über 95%, wobei aber noch strittig ist, wie groß die Wirkung der verbliebenen DCs ist und wie repräsentativ die Messung im peripheren Blut in Bezug auf den Gesamtbestand der DCs ist.¹⁷² In Bezug auf die Immuntoleranz rücken die myDC2s ins Zentrum der Aufmerksamkeit. Nach einer Transplantation mit PBSC nach G-CSF Stimulierung werden zwar mehr T-Zellen auf die/den Empfängerin/Empfänger übertragen, die Häufigkeit der GvHD steigt aber nicht im selben Maße an. G-CSF stimuliert die Ausbildung von myDC2s, während die Zahl der myDC1s annähernd gleich bleibt. Die beiden Zellreihen sind Untergruppen der myeloischen DCs und fähig, Th1- bzw. Th2-Effektorzellen zu stimulieren. MyDC1s aktivieren allogeneische T Zellen, damit sie IFN- γ produzieren, zytotoxisch gegen die Zellen der/des Empfängerin/Empfängers vorgehen und damit die Abstoßung bzw. die GvHD auslösen. Die myDC2 veranlassen die T-Zellen dazu, IL-4 und IL-10 zu exprimieren, was die zytotoxische Immunreaktion unterdrückt, was wiederum das Engraftment unterstützt. Die Verschiebung im Verhältnis zwischen myDC1 und myDC2 ist ein günstiger Faktor, was das Überleben und die Engraftmentrate nach Tx zu betrifft.¹⁷³ Insgesamt ist aber zu sagen, dass das ambivalente Verhältnis der DCs zu GvHD und dem Engraftment größtenteils noch unklar ist und es weitere Forschung benötigt, um zu sagen, welche Zahl und welcher Subtyp der DCs eindeutig einen Benefit oder einen Schaden bei den Patientinnen/Patienten auslösen kann.

6.1.5. CD4⁺ und CD8⁺ Zellen

Bei der Recovery der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen ist die Herkunft des Transplantats von größerer Bedeutung. Patientinnen/Patienten mit Grafts, die von MUDs kommen und eine aGvHD entwickeln, haben im median ein höheres Verhältnis zwischen CD4⁺/CD8⁺ Lymphozyten und eine früher messbare Zellzahl, am Tag +18 im Vergleich zum Tag +25 bei der krankheitsfreien Gruppe. Im Median liegt die CD4⁺/CD8⁺ Ratio bei 2,1, verglichen mit 0,3 bei Patientinnen/Patienten, bei denen keine aGvHD festgestellt wurde. Interessanterweise ist die Verschiebung des Verhältnisses im Median eine Woche vor Auftreten der ersten Symptome messbar. Auf Patientinnen/Patienten die Grafts aus Nabelschnurblut und von MSD bekommen haben, sind diese prognostischen Faktoren nicht anwendbar, da es keine signifikante Korrelation zwischen Ratio und aGvHD gibt. Hier scheint die Pathogenese ein wenig anders abzulaufen.¹⁷⁴ Eine retrospektive Studie am Dana-Farber Cancer Institut in Boston Massachusetts an 1109 Patientinnen/Patienten, die einer alloHSCTx unterzogen wurden, zeigt die Wichtigkeit der lymphozytären Recovery auf. Die Patientinnen/Patienten wurden anhand ihrer absoluten Lymphozyten-Zahl (ALC) in 2 Gruppen eingeteilt. Die eine mit einer ALC $\leq 0,2 \times 10^9$ Zellen/L und die zweite mit $> 0,2 \times 10^9$ Zellen/L. Dabei stellte sich heraus, dass 1, 2 und 3 Monate nach der HSCTx das OS und PFS (progression free survival) in der Gruppe mit einer niedrigeren ALC geringer, die NRM (non-relapse mortality) signifikant höher war. Dieser Trend zeigte sich selbst im 5 Jahres Überleben, bei dem die beiden Gruppen immer noch ein unterschiedliches Outcome aufwiesen. Auch das Risiko der Grad II-IV aGvHD änderte nicht, dass die Gruppe mit niedrigerer ALC eine schlechtere Prognose hatte. Die Hauptfaktoren, dass die ALC überhaupt geringer war, wurden in der HLA mismatched Transplantation, in einer geringen Anzahl an transfundierten CD34⁺ Zellen und im Einsatz von ATG gefunden. Auch erwähnenswert ist der Fakt, dass ein hoher WBC nicht oder nur wenig innerhalb der ersten 100 Tage nach HSCTx mit einer hohen ALC korreliert (p=0,42 bis 0,47). Aus dieser Studie lässt sich schließen, dass die lymphozytäre Recovery eine der aussagekräftigsten Indikatoren der Immunrekonstitution ist. Vor allem das Langzeitüberleben ist stark von der Recovery der Lymphozyten abhängig, mit dem indikatorischen Stichtag +100 nach Tx. Patientinnen/Patienten, die zu diesem Zeitpunkt eine geringe ALC haben, sollten genauer auf Infektionen, GvHD und andere Komplikationen nach HSCTx untersucht werden.¹⁷⁵

Da die Anzahl der reifen T-Zellen im Graft möglichst gering sein soll, um die GvHD zu verhindern, ist die Rekonstitution dieser Zellen meist stark verzögert. Dies gilt vor allem nach HSCTx von haploidenten Spenderinnen/Spendern. Trotzdem kann in der frühen Post-Transplantationsperiode nach 4 bis 6 Jahren ein annähernd physiologisches Verhältnis von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen gemessen werden. Auch bei Erwachsenen wird die Rekonstitution auf die de-novo T-Zell-Produktion des Thymus zurückgeführt. So wird eine Toleranz für das HLA-Mismatch erreicht und die Diversität des T-Zell-Pools wieder hergestellt.¹⁷⁶ Die Funktion des Thymus kann über die so genannten TRECs gemessen werden. Diese 'T cell receptor excision circles' entstehen bei der T Zell-Differenzierung im Thymus. Dabei werden Abschnitte der TCR-Gene durch Verbinden und Mischen der V-, D- und J-Segmente rekombiniert. Die DNA Fragmente, die bei dieser Rekombination herausgenommen werden, bilden Schleifen und können nachgewiesen werden. Die quantitative Analyse der TRECs lässt Rückschlüsse auf die Aktivität und den Zellumsatz des Thymus zu, wobei zu beachten ist, dass die Langlebigkeit der T Zellen und die Anzahl der übrigen Zellen einen Einfluss auf das Messergebnis haben. Da nach einer T-Zell-depletierten HSCTx der T-Zell-Pool quasi leer ist, kann die thymische Aktivität leicht überschätzt, bei Rheuma Patientinnen/Patienten durch die relative Langlebigkeit der T-Zellen die thymische Aktivität leicht unterschätzt werden.¹⁷⁷ Unter Beachtung dieser Einschränkungen eignet sich die TREC Analyse trotzdem zur Einschätzung der Funktion und des Einflusses der thymischen de-novo T-Zell-Produktion auf das Outcome. Dabei stellt sich heraus, dass Patientinnen/Patienten, die niedrige TREC Werte aufweisen, ein höheres Risiko des Tumor Relapses haben, was zeigt, dass die Erhaltung und der Wiederaufbau der Funktion des Thymus einen Einfluss auf das Immunrecovery haben.¹⁷⁸

6.2. Immunrekonstitution nach alpha-/beta Depletion

Die haploHSCTx ist durch die HLA-Differenz zwischen Empfängerin/Empfänger und Spenderin/Spender eine Therapieoption, die mit einem großen Risiko durch GvHD einhergeht.¹⁷⁹ Die Graft-Abstoßung und die GvHD gehen hauptsächlich von den transfundierten T-Zellen aus, weswegen verschiedene Ansätze getestet wurden, die Anzahl der T-Zellen und somit das damit verbundene Risiko zu minimieren. Einer dieser Ansätze war die positive CD34⁺ Stammzelleselektion und die Transplantation einer Megadosis (>10x10⁶ Zellen/kg KG) dieser Zellen.¹⁸⁰ Damit wurde die HLA Barriere überbrückt und mit high-dose Konditionierung wurden die T-Zellen des Empfängers eliminiert. Diese Behandlung führte zu einem guten Engraftment und zu einer niedrigen GvHD Inzidenz.¹⁸¹ Doch leider kamen neue Probleme hinzu. Mit der high-dose Konditionierung verbundene Toxizität, eine höhere Rate an Graft Abstoßungen und die verspätete Immunrekonstitution gab es Nebenwirkungen der Therapie selbst, die das Outcome für die Patientinnen/Patienten verschlechterten.¹⁸²

Die Überlegung war, nur so viele Zellen wie notwendig gezielt aus dem Transplantat zu nehmen, um zwar das Risiko der GvHD gering zu halten, aber gleichzeitig die Immunrekonstitution zu beschleunigen und eine RIC zu ermöglichen. Damit würde die Therapie auch für Hochrisiko-Patientinnen/Patienten zugänglich werden. Weiters ist die Zahl von >10x10⁶ Zellen/kg KG im Transplantat im pädiatrischen Bereich eher zu erreichen als bei adulten Patientinnen/Patienten. Durch das höhere Körpergewicht der Patientinnen/Patienten ist das Erreichen einer entsprechen großen Zellzahl oft nicht möglich.¹⁸³ Auf der Basis von Forschungen am St. Jude Children's Research Hospital in Memphis an Kindern wurde eine neue Methode entwickelt CD3⁺ Zellen zu eliminieren. Diese Methode führte zu einer neg. T-Zell-Depletion mit einer log-Depletion von im Median 3,4.¹⁸⁴ Etwas später wurde ein anti-CD19 Antikörper eingeführt, wodurch die CD3/CD19 Depletion ermöglicht wurde. Durch anti-CD3- und anti-CD19-beschichtete Microbeads auf einem CliniMACS Gerät (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) war es möglich gezielt Zellen zu entfernen, aber CD34⁺ Stammzellen, CD34⁻ Vorläuferzellen, NK-Zellen, DCs und andere Graft-facilitating Cells im Transplantat zu belassen.¹⁸⁵

Die T- und B-Zell Depletion reduziert das Risiko der GvHD und der EBV abhängigen lymphoproliferativen Krankheit nach Transplantation. Zusätzlich zur Chemotherapie, werden nun auch CD3-monoklonale Antikörper verabreicht, um die T-Zellen der/des Empfängerin/Empfängers zu eliminieren und die Graft-Rejection so gut wie möglich auszuschließen.¹⁸⁶

Die Ergebnisse der Engraftment Kinetik sind durchaus positiv. Eine Untersuchung an der Universitätsklinik Tübingen an Patienten, die eine haploHSCTx nach RIC mit Gabe von CD-3 Antikörpern und CD3/CD19 depletierte Grafts erhielten, zeigt ein rasches Engraftment. Im Median hatten die Patientinnen/Patienten nach 12 Tagen >500 Granulozyten/ μl und nach 11 Tagen >20,000 Thrombozyten/ μl . 54% der untersuchten Patientinnen/Patienten litten unter einer aGvHD und 18% bildeten eine cGvHD aus. Das 1-Jahres-Survival beträgt 54% und das 2-Jahres-Überleben liegt bei 31%. Die T-Zell-Recovery war verspätet mit einem Median von 205 CD3⁺ Zellen/ μl an Tag +100 und 369 CD3⁺ Zellen/ μl an Tag +400. Auch die Rekonstitution der T-Zell-Subsets wie CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺, T-Gedächtniszellen sowie B-Zellen war signifikant später. Die NK-Zellen erholten sich rasch und wiesen Normalwerte ab Tag +20 auf. In der ersten Zeit machten die NKs bis zu 70% aller Leukozyten aus und auch über die restliche Zeit, wurden die hohen NK-Werte beibehalten.¹⁸⁷ Auch das DC-Recovery, das eine große Rolle bei der GVL Reaktion spielt, ist rasch. An Tag +60 wird deren Population durch den DC2⁻ Subtyp dominiert. Die Zahl der DCs an Tag +60 korreliert dabei mit der Überlebenszeit der Patientinnen/Patienten. Bei niedriger Zahl ist diese durch fatal verlaufende Infektionen verkürzt. Wenn zur Konditionierung keine CD3 Antikörper verabreicht werden, ist die CD8⁺ T-Zell-Rekonstitution und die NK-Zell-Rekonstitution schneller, die Verzögerung der CD3⁺ und CD4⁺ Zellen bleibt bestehen. Dies kann vor Infektionen schützen.¹⁸⁸

Die α -/ β -Depletion ist eine Technik der Transplantatsbearbeitung, die einerseits eine Vielzahl von Immunzellen im Transplantat belässt, während die Depletion hocheffektiv α -/ β -Zellen aus dem Transplantat entfernt. Mit dieser Methode lässt sich eine Depletion von 4,5-5 log erreichen, was mit der CD34⁺ positiven Selektion vergleichbar ist. Weiters verbleiben NK Zellen, DCs, Monozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen im Transplantat. Dies soll einerseits Infektionen vorbeugen und andererseits das Engraftment fördern, da die Graft Rejection ein Hauptproblem bei der CD3⁺/CD19⁺ Depletion ist. Außerdem ist durch die Depletion der $\alpha\beta$ ⁺ Zellen das Risiko der GvHD weiterhin minimiert. Bei der Durchführung werden zuerst mobilisierte, mononukleäre Zellen mit einem biotinylated anti-TcR $\alpha\beta$

Antikörper inkubiert. Daraufhin wird ein Antibiotin Antikörper, der mit magnetic Microbeads konjugiert ist, zugeführt. Die T-Zellen laufen dann durch ein starkes magnetisches Feld, wodurch nicht-magnetisierte Zellen passieren können, wieder gesammelt werden und der/dem Patientin/Patienten letztendlich transplantiert werden können. Auf die Vorgehensweise bei der Depletion wird in einem späteren Kapitel noch eingegangen.¹⁸⁹

Da die verschiedenen Subsets der T-Lymphozyten diverse Funktionen haben und sich auch in ihrer Alloreaktivität nach HSCTx unterscheiden, liegt der Gedanke nahe, nicht alle CD3⁺ aus dem Apheresat zu entfernen. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen gelten als die Brückenzellen zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. Sie sind nicht alloreaktiv haben aber eine schützende Wirkung vor Infektionen und sind in der GVL Reaktion mitbeteiligt. Aus diesem Grund untersuchte eine Forschergruppe am St. Jude Children's reasearch hospital 102 pädiatrische Patientinnen/Patienten, die in den Jahren von 1996 bis 2011 behandelt wurden, nach $\alpha\beta$ -depletierter HSCTx mit besonderen Augenmerk auf die $\gamma\delta$ -Recovery und ihren Einfluss auf das Outcome. Die Patientinnen/Patienten erhielten MUD, MRD, UCB und haploHSCTx mit Konditionierungsregimen, die sowohl auf Bestrahlung als auch rein chemotherapeutischen Protokollen beruhten. Anschließend wurden die Patientinnen/Patienten in 2 Gruppen eingeteilt. Die eine mit einer erhöhten Anzahl an $\gamma\delta$ -Zellen und die zweite mit niedrigen oder normalen $\gamma\delta$ -Zell-Werten. Im ersten Jahr nach der HSCTx wurde die Zahl der $\gamma\delta$ -Zellen gemessen. Waren 2 aufeinanderfolgende Messungen höher als die Standardabweichung über dem Median (150 Zellen/ μ l) wurden die Patientinnen/Patienten der ersten Gruppe (11%) zugeteilt. Die Patientinnen/Patienten der zweiten Gruppe (89%) hatten somit Werte um bzw. unter 150 Zellen/ μ l. Signifikant war in erster Linie der Unterschied was die Infektionen betrifft. Die Patientinnen/Patienten der ersten Gruppe hatten nur virale und weniger Infektionen und die zweite Gruppe sowohl mehr, als auch virale, bakterielle und fungale Infektionen. Im Engraftment gab es dafür keinen signifikanten Unterschied, bei beiden Gruppen war im Median der Tag +19 bzw. +18,2 der Tag an dem >500 Granulozyten gemessen wurden. Auch im Disease-free-survival 1 Jahr nach SCTx wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt. Da $\gamma\delta$ -Zellen auch CD3⁺ sind, war es zu erwarten, dass mit hohen $\gamma\delta$ -Werten, auch die CD3⁺ Werte hoch waren. Interessanterweise verhält sich die Zahl der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen umgekehrt proportional zur $\gamma\delta$ -Rekonstitution. Bei einigen Patientinnen/Patienten wurden auch ATG und OKT-3 Antikörper eingesetzt, was aber keinen statistisch signifikanten

Einfluss auf die $\gamma\delta$ -Recovery hatte. Zusammenfassend wies diese erste große Untersuchung der $\gamma\delta$ -Recovery positive Effekte nach.¹⁹⁰

Kapitel 7 Spezieller Teil

7.1. Datensammlung

Die Datensammlung ergab sich aus der Zusammenschau aus den Arztbriefen, den FACs Analysen der hämatologischen Labors an der medizinischen Universität Graz und den Daten, die von der hämato-onkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich um 17 Patientinnen/Patienten, die im Zeitraum der Jahre 2010 bis 2015 an den beiden Transplantationszentren behandelt wurden. 7 von ihnen in Graz und 10 in Tübingen.

7.2. Patientinnen/Patienten

Die 17 Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 0 und 23 Jahre alt. Da die HSCTx eine therapeutische Maßnahme bei einem vergleichsweise breiten Feld an Krankheiten eingesetzt werden kann, ist die Zahl der verschiedenen Indikationen dementsprechend groß.

rez. AML akute myeloische Leukämie Rezidiv	3
juvenile metachromatische Leukodystrophie JMLD	2
C-ALL common akute lymphatische Leukämie	2
rez. C-ALL common akute lymphatische Leukämie Rezidiv	2
T-ALL akute T-Zell-Leukämie	2
β-Thalassämie major	1
schwere aplastische Anämie SAA	1
MDS myelodysplastisches Syndrom mit sekundärer AML FAB M5 (Monosomie 7)	1
EBV-getriggerte hämophagozytische Lymphohistiozytose HLH	1
SCD (Sichelzellerkrankung) mit cerebralen Ischämieherden	1
Hoyerall-Hreidarsson Syndrom (schwere Form von Dyskeratosis congenita)	1

Tabelle 1 Krankheiten

Die Breite der vorhandenen Grundkrankheiten ist recht groß. Zu bemerken ist der Altersunterschied bei den Patientinnen/Patienten mit malignen und den Patientinnen/Patienten mit benignen Erkrankungen. Das mediane Alter der Patientinnen/Patienten liegt bei 5 Jahren, wobei die Patientinnen/Patienten mit den benignen Erkrankungen bis auf eine/einen Patientin/Patienten mit hämophagozytischer Lymphohistiozytose an angeborenen Erkrankungen leiden, was sich im medianen Alter von nur 2 Jahren bei Diagnose niederschlägt. Bei den Patientinnen/Patienten mit den malignen Erkrankungen liegt das mediane Alter bei 8,5 Jahren, wobei auch in dieser Gruppe 4 Patientinnen/Patienten 2 Jahre alt oder jünger sind. Dieses geringe Alter der Patientinnen/Patienten und die komplexen Syndrome und Erkrankungen an denen sie leiden wirken sich auf Therapie und Prognosen aus.

Die Vortherapie schwankt stark zwischen den einzelnen Patientinnen/Patienten. Die vorher erwähnten Patientinnen/Patienten mit der sehr frühen Diagnosestellung, erhielten auch früh die HSCTx und dementsprechend ist auch ihre Liste an vortherapeutischen Maßnahmen entsprechend kurz. Andere Patientinnen/Patienten mit aggressiven malignen Erkrankungen erhielten ihre HSCTx erst nach mehreren Jahren von wechselnden Chemotherapie Zyklen, bei denen die HSCTx nicht die Grundkrankheit behandelt, sondern die toxischen Eigenschaften der Tumorbehandlung abfedern soll.

	Fallzahl oder Median	Prozent oder min / max
Patientinnen/Patienten	17	100%
männlich	9	52,9%
weiblich	8	47,1%
Alter bei Diagnose	5	0 (bei Geburt) / 23
Alter bei HSCTx	8,5	0,93 / 25
Zeit von Diagnose zur HSCTx	1	0,33 / 6,5
Vortherapie	14	73,7%
Konditionierung	17	100%
Flu-Mel-TT-ATG	5	29,4%
Flu-Treo-TT-ATG	2	11,8%
Clo-Mel-TT-ATG	2	11,8%
Bu-Flu-TT-ATG	1	10,5%
Flu-Cy-TT-ATG	1	5,8%
Bu-Cy-Mel-ATG	1	5,8%
Flu-Cy-ATG	1	5,8%
Bu-Cy-Mel	1	5,8%
Flu-Treo-TT-Campath	1	5,8%
Flu-Treo-TT	1	5,8%
Flu-Mel-TT-OKT3	1	5,8%
myeloablativ	16	94,1%
Spender	17	100%
related	9	52,9%
unrelated	8	47,1%
HLA matched	17	100%
Blutgruppen match	7	41,2%

	Fallzahl oder Median	Prozent oder min / max
Geschlechtsmismatch	7	41,2%
weiblich → männlich	4	23,5%
männlich → weiblich	3	17,6%
α/β depletiert	17	100%

Tabelle 2 Patienten, Konditionierung und Spenderprofile

Die Aufteilung der beiden Geschlechter entspricht fast einer Halbierung der Patientinnen/Patienten. Da es keine signifikanten Unterschiede in Art der Krankheit und Verlauf der Behandlung zwischen den Geschlechtern gibt, werden die Patientinnen/Patienten zu einer Gruppe zusammengefasst.

Die Altersverteilung umfasst den gesamten Umfang des Patientenguts, das unter die Zuständigkeit der pädiatrischen Medizin fällt, mit einem medianen Alter von 5 Jahren bei der Diagnosestellung und einem medianen Alter von 8,5 Jahren zum Zeitpunkt der HSCTx sind die Patientinnen/Patienten im Allgemeinen eher jung, obwohl der/die älteste Patientin/Patient zum Zeitpunkt der Transplantation schon 25 Jahre alt ist.

14 Patientinnen/Patienten erhielten eine Vortherapie, die sich nach der Grundkrankheit richtet. Diejenigen, die an Krankheiten der Blutbildung litten, erhielten Erythrozyten Transfusionen und Austauschtransfusionen um die Zeit bis zur Transplantation zu überbrücken. Patientinnen/Patienten mit Autoimmunerkrankungen mussten schon vor der Konditionierung immunsupprimiert werden um das Fortschreiten der Erkrankung zu bremsen. Die vielen Patientinnen/Patienten mit malignen Erkrankungen erhielten vielfach schon vor der Transplantation einen oder mehrere Chemotherapiezyklen beziehungsweise ist die HSCTx bei 4 Patientinnen/Patienten eine Möglichkeit ein Rezidiv zu behandeln. Diese unterschiedliche Ausgangssituation führt auch zu unterschiedlichen Erfolgsraten in Bezug auf die Heilung der Patientinnen/Patienten, worauf ich in späteren Kapiteln noch eingehen werde.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Patientinnen/Patienten werden in dieser Arbeit nur Patientinnen/Patienten verglichen, bei denen ein HLA identer Spender gefunden wurde. Bei 9 Patientinnen/Patienten wurde so eine/ein Spenderin/Spender in der Familie gefunden, sei es ein Geschwisterkind, ein Elternteil oder eine/ein andere/anderer nahe/naher Verwandte/Verwandter. Genauer ausgedrückt erhielten 7 Patientinnen/Patienten die Spende von einem Bruder oder einer Schwester, 1 von einem HLA identen Elternteil

und 1 Kind von einer/einem anderen nahen Verwandten. Die übrigen 8 Kinder erhielten ihre Spende von einer/einem nicht-verwandten Spenderin/Spender über die Stammzellbank, was hier noch einmal unterstreicht, dass ohne freiwillige Spenderinnen/Spender über die Hälfte der hier untersuchten Patientinnen/Patienten keine passende Spende erhalten hätten.

7.3. Methoden

7.3.1. Transplantationsvorgang

Die α/β -Depletion wird unter Verwendung der Bechermethode und der Verarbeitung mit CLINIMACS der Firma Miltenyi Biotech durchgeführt. Vom Apheresat der/des Spenderin/Spenders werden $CD3^+\alpha/\beta$ und $CD 19^+$ Zellen depletiert und das entstandene Endprodukt wird danach der/dem Empfängerin/Empfänger transplantiert. Dabei ist zu beachten, dass das Apheresat so frisch wie möglich verarbeitet werden soll, das am besten am Tag der Apherese, was bei externen Apheresen die logistische Herausforderung bedeutet, wie bei jeder anderen Transplantation, die Transportzeiten möglichst kurz zu halten. Sollte das Apheresat doch über Nacht gelagert werden müssen, ist zu beachten, dass die Zelldichte während der Lagerung bei Raumtemperatur nicht 2×10^8 übersteigt. Sollte dies der Fall sein, sind Puffer hinzuzugeben, um die Zelldichte zu vermindern. Auch muss die Manipulation von Stammzellen unter strengsten Hygienemaßnahmen erfolgen und alle Untersuchungen und Analysen sind entsprechend der SOP (standard of protocol) „GSG – Hygienevorschriften“ auszuführen.

Vor dem Beginn der Depletion stehen die Qualitätssicherung und die Vorbereitung der Zellen. Es werden laufend Proben entnommen, im Speziellen aus dem Ausgangsmaterial, dem Material nach dem Zellwaschen, aus der 'Non Target Fraktion', dh. der Anteil an Zellen, den man nach der Depletion nicht im Produkt haben möchte, in diesem Fall die α/β -Zellen, und schließlich auch aus dem Endprodukt, der 'Target Fraktion' im Cell Collection Bag.

Die Aufbereitung des Ausgangsmaterials erfolgt mittels der Zellwaschung (=Cellwash). Das Apheresat wird vor dem magnetischen Markieren mit CliniMACS PBS/EDTA Puffer im Verhältnis 1:3 verdünnt. PBS steht für phosphatgepufferete Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline) und entspricht mit ihrem pH Wert von 7,4, dem physiologischen pH Werts des menschlichen Bluts.¹⁹¹ In ihrer Zusammensetzung aus Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Phosphat besitzt die Lösung einen isotonischen osmotischen Druck. EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) bindet als Chelatbildner das freie Kalzium und verhindert damit die Gerinnung des Bluts. Nach erfolgter Verdünnung wird das Gemisch in 175ml Zentrifugenbehältnisse überführt, in die Zentrifuge gegeben und anschließend bei 200 x g 15 min bei Raumtemperatur (+19°C – 25°C) zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgehoben und das Zellpellet mit einer entsprechenden Menge Puffer versehen, um wieder ein Volumen von 95ml zu erreichen.

Danach werden 500mg humanes Immunglobulin, MgCl und Pulmozyme zugefügt und unter vorsichtigem Schwenken für 15min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wird das CliniMACS TCR $\alpha\beta$ Biotin Reagenz zugeführt und die Lösung wird vorsichtig gemischt. Anzumerken ist dabei, dass eine Dosis Biotin Reagenz 7,5ml beträgt und diese Menge an Biotin zur Markierung von bis zu 24×10^9 TCR $\alpha\beta$ positiven Zellen bei einer totalen Leukozyten Zellzahl von bis zu 60×10^9 Zellen geeignet ist. Diese Mischung wird wiederum für 30min auf einem Orbital Shaker inkubiert. Anschließend wird der Becher mit PBS/EDTA Puffer aufgefüllt und für 15min bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird wieder vorsichtig abgehoben und das Zellpellet mit Pufferlösung resuspendiert. Wiederum wird für 15min bei 300 x g zentrifugiert.

Danach muss man den Überstand abheben und das Zellpellet mit PBS/EDTA Puffer auf ein Gesamtvolumen von 190ml resuspendieren. Dieses Mal wird der gesamte Inhalt von zwei CliniMACS Anti Biotin Reagent (15ml) und von zwei CliniMACS CD19 Reagent (15ml) zugefügt und anschließend wird das Produkt vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur auf einem Orbital Shaker 30min lang inkubiert. 7,5ml CliniMACS Anit-Biotin-Reagent ist zur Markierung von einer Leukozytenzahl von bis zu 40×10^9 geeignet. Der Becher wird wieder mit PBS/EDTA Puffer aufgefüllt und noch einmal 15min bei 300 x g gewaschen. Danach erfolgt die zweite Probenentnahme des Materials.

Nach der Probenentnahme wird das Material in einen 600ml Transferbeutel umgefüllt. Dieser Beutel wird in einem Ultraschallbad entgast und anschließend per Wischdesinfektion mit Acrylan gereinigt. Die Depletion wird vom Clinimacs® Device automatisch durchgeführt. Es werden Parameter wie Ausgangszellzahl, Anteil der Lymphozyten und Volumen eingegeben, das Einmalset angelegt, sowie ein Pufferbeutel angehängt, noch ein Integritätstest durchgeführt und das Verfahren gestartet. Während die Depletion läuft ist darauf zu achten, dass der Flow im System ungehindert erfolgen kann und keine Luftblasen als Zeichen von Undichtigkeiten im System auftreten.

Nachdem das Verfahren beendet wurde wird der Endproduktbeutel von der Non-Target-Fraktion (CD3/19⁺ Zellen) abgeschweißt und aus beiden werden Proben entnommen.

Aus allen Proben (1-4) werden Zellzahl und FACS-Analyse durchgeführt und dokumentiert. Aus dem Endprodukt werden zusätzlich 1ml zu bakteriologischen Untersuchung und weiters 0,5 ml entnommen und ein CFU-Assay (Colony-forming Unit Assay = ein Test der die Fähigkeit hämatopoetischer Progenitorzellen Kolonien zu bilden nutzt und damit zur Kontrolle ebendieser hinzugezogen wird¹⁹² zur Qualitätskontrolle angesetzt.

Das Produkt kann schließlich von der/dem für die Transplantation verantwortlichen Ärztin/Arzt auf die Station überführt werden und für die Transplantation verwendet werden.^{193 194}

	Median	min	max
Gesamt Zellzahl / kg KG	9,17 x 10 ⁸	2 x 10 ⁷	51,6 x 10 ⁸
CD34 ⁺ Zellzahl / kg KG	19,54 x 10 ⁶	5,7 x 10 ⁶	42,01 x 10 ⁶
CD3 ⁺ Zellzahl / kg KG	14,2 x 10 ⁶	1 x 10 ³	35,6 x 10 ⁶
CD19 ⁺ Zellzahl / kg KG	96,3 x 10 ³	4 x 10 ³	6,3 x 10 ⁶
CD56 ⁻⁻⁻ Zellzahl / kg KG	81,89 x 10 ⁶	24,65 x 10 ⁶	198,01 x 10 ⁶
TCR -α/β Zellzahl/kg KG	17,1 x 10 ³	1,5 x 10 ³	245,4 x 10 ³
TCR -γ/δ Zellzahl/kg KG	14,2 x 10 ⁶	2,89 x 10 ⁶	57,9 x 10 ⁶
Verhältnis TCR -α/β / TCR -γ/δ	1 : 874	1 : 33	1 : 19220

Tabelle 3 Zellzahlen im Transplantat

Auch die Apheresate, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten ähnlich gute Ergebnisse der Methode. Die mediane Zellzahl / kg KG beträgt $9,17 \times 10^8$ Zellen. Von diesen Zellen wurden im Median $19,54 \times 10^6$ CD³⁴ positive Stammzellen übertragen. Minimal waren es $5,7 \times 10^6$ und maximal $42,01 \times 10^6$. Auch die Zahlen der CD56⁺ Zellen sind hoch mit einem Median der bei $81,89 \times 10^6$ Zellen/kg KG liegt. Durch die α/β Depletion wurde die Zahl der übertragenen α/β -Zellen verringert, was dazu geführt hat, dass im Median $17,1 \times 10^3$ Zellen/kg KG transplantiert wurden. Dies steht im Kontrast zu den γ/δ -Zellen, die mit einem Median von $14,2 \times 10^6$ in viel höherem Maße übertragen wurden. Das mediane Verhältnis zwischen den beiden Zellgruppen liegt bei 1:874, was zeigt, dass die α/β Depletion erfolgreich durchgeführt wurde. Weiters wurde in den Protokollen keine Störungen oder Unregelmäßigkeiten vermerkt und auch die Transplantation ging bei allen Patientinnen/Patienten ohne Zwischenfällen von statten.

7.4. Engraftment

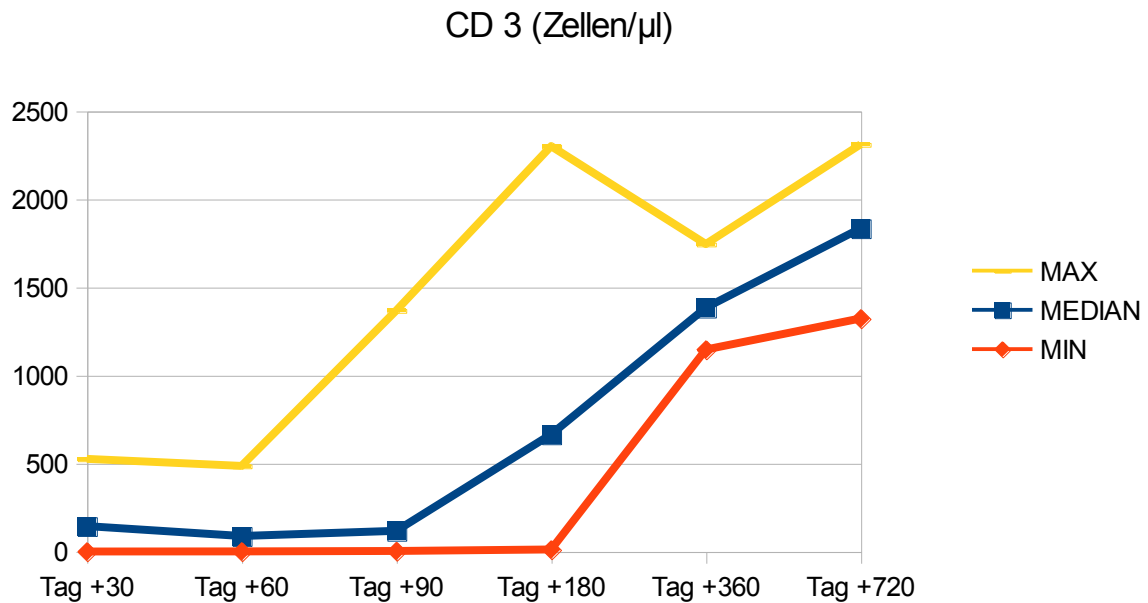
Alle Patientinnen/Patienten bis auf einen zeigten ein frühes komplettes 3-Linien-Engraftment. Als Stichtage für die Anzahl der Zellen wurden der Tag +30, Tag +60, Tag +90, Tag +180, Tag +360 und der Tag +720 gewählt. Durch der geringen Anzahl der Werte nach Tag +180 bei der Zählung der α -/ β - und der γ -/ δ - Zellen wurde hier auf eine Bearbeitung der Daten, die über diesen Tag hinausgehen verzichtet, da ansonsten die Schwankungen der Werte zu groß wäre. Aufgrund der großen Breite der Zahlen, die teilweise 3 Potenzen übersteigt, wurde der Verlauf über den Median der Werte ermittelt.

	Median	Min	Max
CD3 ⁺ Zellen/ μ l			
Tag +30	144	0	525,6
Tag +60	87,9	0,3	485,4
Tag +90	117,2	2,8	1368
Tag +180	664,5	11,1	2300,3
Tag +360	1383,8	1146,1	1745
Tag +720	1834	1322,5	2310,6
CD56 ⁺ /3 ⁻ Zellen/ μ l			
Tag +30	273,9	0	2823,5
Tag +60	144,9	0,7	649,9
Tag +90	136	0	946
Tag +180	264	52,8	590
Tag +360	339,8	96,8	507
Tag +720	269	156,4	638,1

	Median	Min	Max
CD19 ⁺ Zellen/ μ l			
Tag +30	2,2	0	712,4
Tag +60	276,3	0,5	894,4
Tag +90	138,7	0	674
Tag +180	197,5	1,1	685
Tag +360	459,7	0	1635,5
Tag +720	1006,6	17,1	2310,6
TCR α -/ β - Zellen/ μ l			
Tag +30	5,9	2,6	105,6
Tag +60	20,7	9,8	184,6
Tag +90	41,1	8,6	337,9
Tag +180	332,5	9	2218,4
TCR γ -/ δ - Zellen/ μ l			
Tag +30	205,2	71,5	252,7
Tag +60	47,5	0,4	282,4
Tag +90	66	5,8	504,6
Tag +180	118,8	4,1	453,2

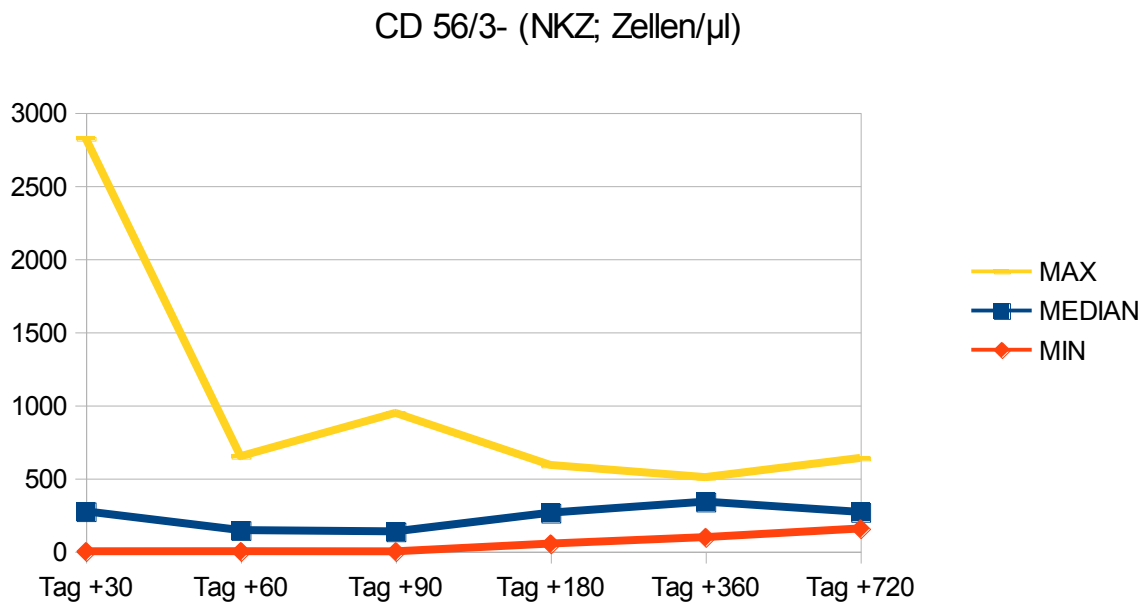
Tabelle 4 Immunrekonstitution Verlauf

7.4.1. CD3⁺ Zellen



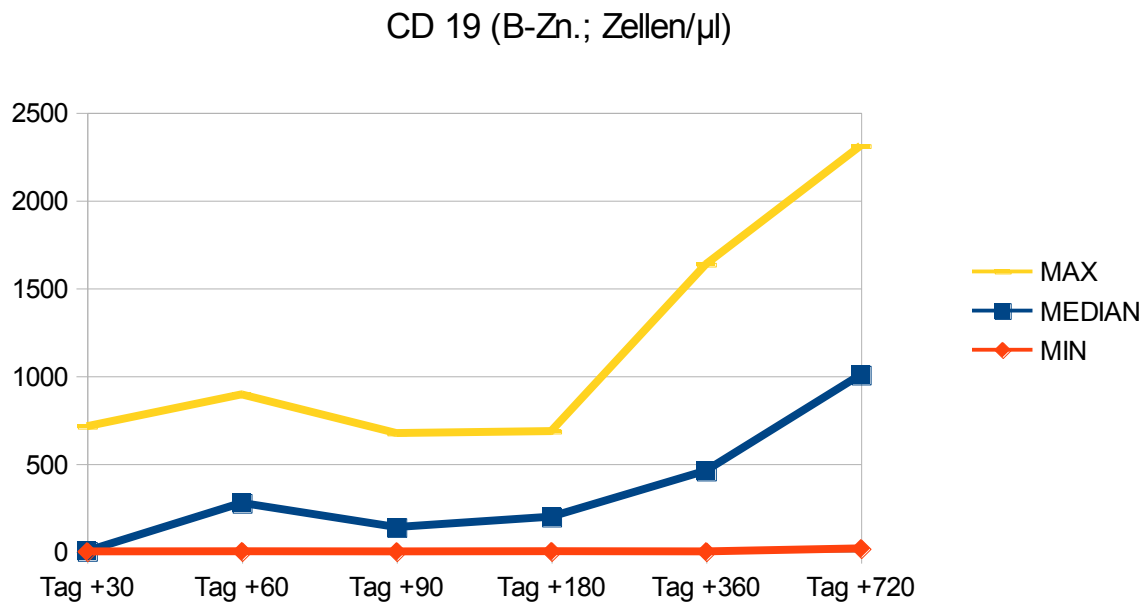
Im Diagramm der „CD3 Zellen/ μ l“ erkennt man den Mangel an CD³⁺ Zellen bis zum Tag +90. Zwischen Tag +90 und Tag +180 erholen sich die Zahlen auch bei den Patienten mit den Minimalwerten. Die hohen Werte Maximalkurve sind durch eine Abnahme des Spenderchimärismus an Tag +83 zu begründen, worauf hin 2x zeitnah zu den Kontrollzeitpunkten Donorlymphozyten verabreicht wurden, was die Maximalwerte zu diesen Zeitpunkten künstlich erhöhte. Die besagte Patientin erholte sich trotzdem sehr gut und befand sich bis zum letzten follow-up Termin in der Patientengruppe, bei der die Behandlung als guter Erfolg gewertet werden kann.

7.4.2. CD56/3⁻ Zellen



Das Diagramm der CD 56/3- NK-Zellen zeigt einen allgemein gleichmäßigeren Verlauf. Ein Fall der wegen einer rezidivierenden c-ALL behandelt wurde, erhielt bei der SCTx eine große Menge NK-Zellen um das Engraftment zu verbessern und um einen GvL Effekt herbeizuführen. Von diesem Fall abgesehen, verhalten sich die Werte der übrigen Patientinnen/Patienten eher gleichmäßig. Da die NK-Zellen keine Zielzellen der Depletion sind, sind ihre Zahlen beim Großteil der Patientinnen/Patienten stabil. Wie in den Kapiteln zuvor beschrieben, sollen die NK-Zellen das Engraftment verbessern und einen Infektionsschutz aufbauen.

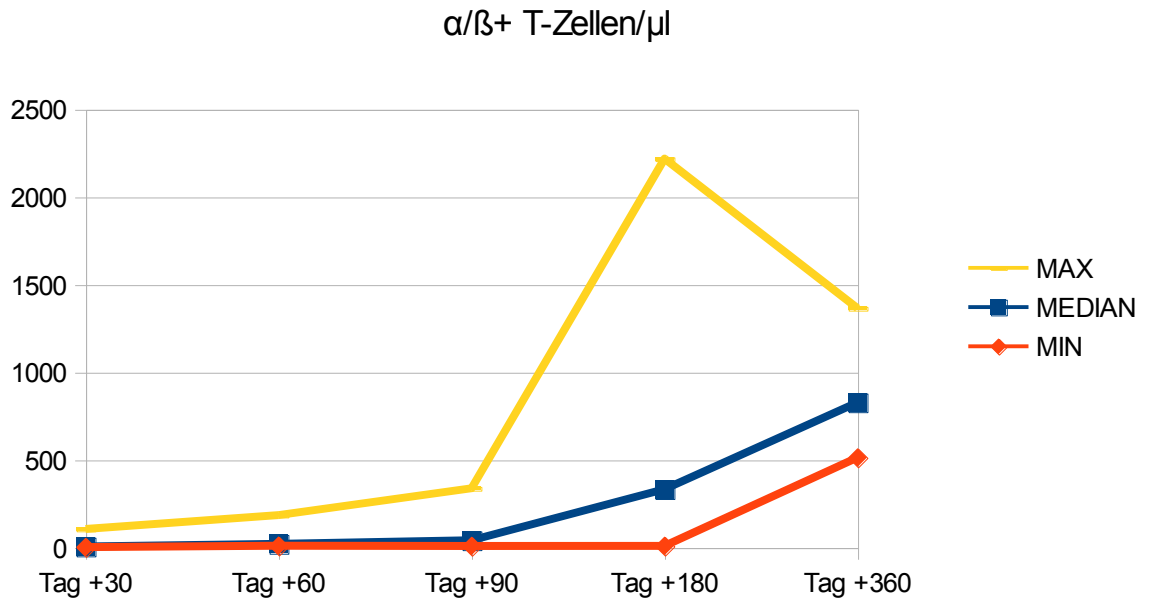
7.4.3. CD19⁺ Zellen



Zusätzlich zur α/β -Depletion wurden die Apheresate auch CD19 depletiert. Dies erkennt man recht eindeutig im Diagramm der CD-19 Zellen. Der Medianwert erholt sich erst sehr spät und man kann erst nach einem Jahr nach der SCTx den Trend zu physiologischen Werten erkennen. 2 der 17 Patientinnen/Patienten weisen im Verlauf hohe CD19-Zellzahlen auf, was die überhöhten Maximalwerte erklärt. Diese beiden sind auch in der Patientengruppe zu finden, bei denen eine GvHD diagnostiziert wurde. Die anderen 3 Patientinnen/Patienten hatten jedoch Werte, die dem Median näher lagen, weswegen hier kein akuter Zusammenhang zu vermuten ist.

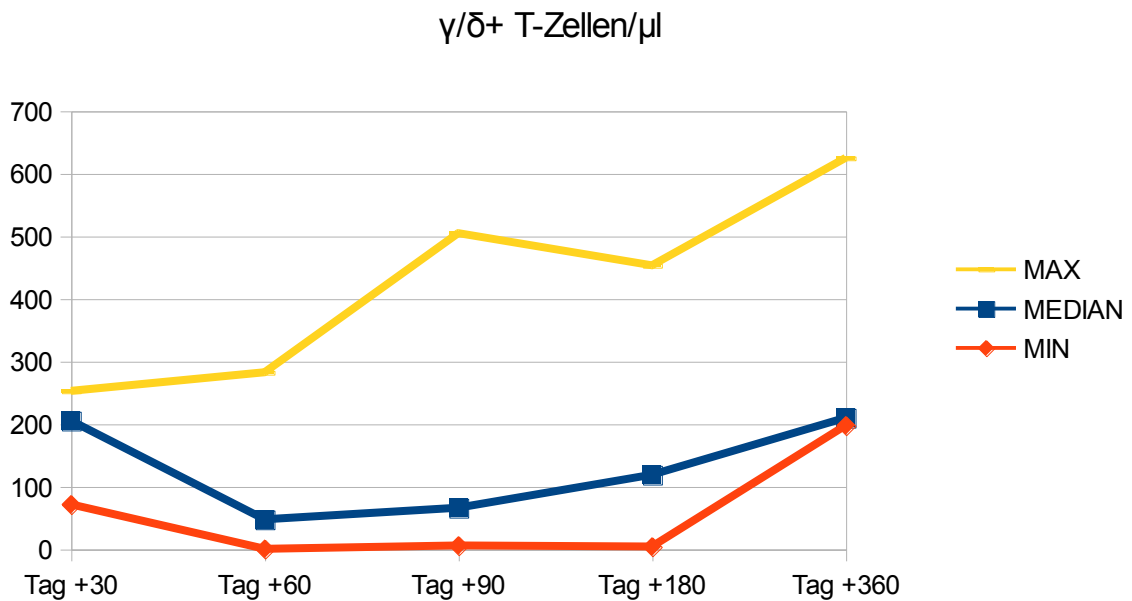
Durch die CD19-Depletion soll das Risiko an einer PTLD zu erkranken minimiert werden. Keiner der untersuchten Patientinnen/Patienten erkrankte an PTLD, was zeigt, dass die CD19-Depletion ein effektives Mittel zur Vorbeugung dieser Krankheit ist.

7.4.4. α/β^+ T-Zellen



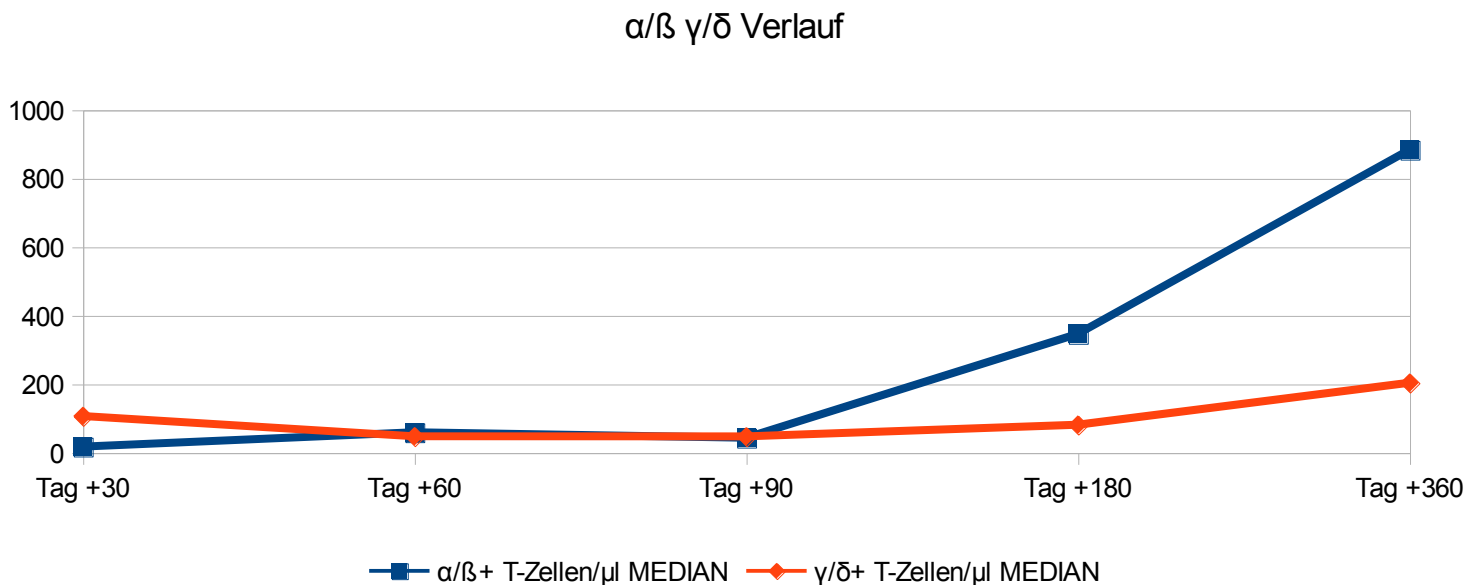
Im Diagramm zum Verlauf der α/β -T-Zellen erkennt man deutlich den Effekt der α/β -Depletion des Apheresats. Bis zum Tag +90 sind bei einem Großteil der Patientinnen/Patienten keine α/β -T-Zellen nachzuweisen. Um einen Ausbruch der GvHD zu verhindern, erhielten 10 Patientinnen/Patienten eine immunsuppressive Prophylaxetherapie, was die Rekonstitution der α/β -T-Zellen bei diesen Patientinnen/Patienten verzögerte. Ein Jahr nach SCTx kann man aber bei allen Patientinnen/Patienten von einem Trend zur Immunrecovery der α/β -Zellen sprechen.

7.4.5. γ/δ^+ T-Zellen



Im Diagramm zum Verlauf der γ/δ -T-Zellen sieht man, dass die γ/δ -T-Zellen im Gegensatz zu den α/β -T-Zellen bei der Depletion geschont werden. An Tag +30 ist die Zellzahl noch weitaus höher, als die der α/β -T-Zellen, was das Engraftment verbessern, die Patientinnen/Patienten vor der GvHD und vor Infektionen schützen soll. 2 Patientinnen/Patienten bilden die weit über dem Median liegenden Maximalwerte. Beide erhielten keine Immunsuppression nach der SCTx und bildeten trotzdem keine GvHD aus, was als Hinweis auf die protektive Wirkung dieser Zellen gedeutet werden kann. Die 5 Patientinnen/Patienten, die an der GvHD erkrankten, hatten im Gegensatz zu den zuvor genannten sehr niedrige γ/δ -Werte, 4 von ihnen von Tag +60 bis Tag +180 sogar Werte im einstelligen bis niedrigen zweistelligen Bereich. Hier darf man nicht die Rolle der massiven immunsuppressiven Therapie außer Acht lassen, die diese Patientinnen/Patienten aufgrund der zum Teil schweren GvHD erhielten, ist es nicht auszuschließen, dass auch die niedrige Zahl an γ/δ -T-Zellen einen Hinweis auf einen schlechteren Verlauf geben kann.

7.4.6. α/β - γ/δ A/B-G/D Verlauf



Anhand des Diagramms „ α/β γ/δ Verlauf“ ist der Einfluss der α/β -Depletion des Apheresats sehr anschaulich präsentiert. Bis zum Tag +30 nach SCTx sind die α/β -Zellen kaum nachzuweisen, während sich die γ/δ -Zahlen schon auf dem Plateau des ersten halben Jahres nach SCTx befinden. Ab Tag +90 nimmt die Proliferation der α/β -Zellen soweit zu, dass das Verhältnis langsam zum physiologischen 10:1 Verhältnis zurückkehrt. Dazu erwähnt sei, dass ausgehend von einer physiologischen Lymphozyten Zahl von 1500-3000 Lymphozyten/ μ l die γ/δ -Zellen nach einem Jahr nach SCTx einen annähernd physiologischen Bereich erreichen, während die α/β -Zellen erst bei 30-50% des physiologischen Wertes liegen. Dies hat natürlich Auswirkungen auf die Infektionsanfälligkeit auch 1 Jahr nach der Transplantation, zeigt aber auch, dass ohne die α/β -Depletion die Immunabwehr aufgrund des zusätzlichen Fehlens der γ/δ -Zellen noch geschwächer wäre.

7.5. Verlauf

7.5.1. Outcome

In nur einem Fall kam es zur Graft Abstoßung am Tag +20. Die anderen 16 Patientinnen/Patienten hatten kein Graftversagen. Bei 3 Patientinnen/Patienten zeigte sich an den Tagen +35, +42 bzw +83 ein abnehmender Spenderchimärismus, was auf ein mögliches Graftversagen hindeuten kann. Aus diesem Grund erhielten diese Patientinnen/Patienten Lymphozytenboosts um das Versagen zu verhindern. Hierbei wurden in 2 Fällen jeweils 1×10^6 /kg KG gegeben und eine Patientin erhielt im Abstand von 42 Tagen jeweils dieselbe Menge des gereinigten Lymphozytenkonzentrats verabreicht. Die Spenderinnen/Spender waren in diesen Fällen dieselben wie bei der ursprünglichen Transplantation. In einem Fall entwickelte bis zum Tag +20 eine Graft Abstoßung, die es nötig machte, ein weiteres Mal von der/vom HLA-identen, verwandten Spenderin/Spender zu transplantieren.

10 Patientinnen/Patienten wurden aufgrund maligner Grundkrankheiten behandelt und von ihnen entwickelten bis zum Zeitpunkt der Datenerfassung 2 ein Rezidiv. Die Beiden litten an einer C-ALL bzw. einer kortikalen T-ALL und die Rezidive nach SCTx wurden an den Tagen +30 und +112 diagnostiziert. Die Zwei verstarben auch in Folge an den Tumorrezidiven.

7.5.2. GvHD

10 Patientinnen/Patienten erhielten nach der Transplantation eine GvHD-Prophylaxetherapie, 7 Patientinnen/Patienten konnten auf diese verzichten. In der folgenden Tabelle wurden die verwendeten Immunsuppressiva post transplantationem aufgelistet.

Immunsuppression	Anzahl	Prozent
keine Immunsuppression	7	41,2%
Cellcept	7	41,2%
MMF (Mycophenolat Mofetil)	3	17,6%

Tabelle 5 immunsuppressive Therapie

Die immunsuppressive Therapie wurde auf alle Patientinnen/Patienten bezogen im Median vom Tag -1 bis zum Tag +26 durchgeführt. Nimmt man nun nur die Patientinnen/Patienten her, die eine Therapie erhalten haben, verlängert sich der Median auf 38 Tage immunsuppressive Therapie. Die kürzeste Periode der Therapiedauer beträgt 3 Wochen, die längste 106 Tage.

5 Patientinnen/Patienten entwickelten nach der Transplantation eine GvHD. Unter diesen Patientinnen/Patienten erhielt eine/einer vom Zeitpunkt der Transplantation an Cyclosporin A, eine/einer Mycophenolat Mofetil, das ab Tag +35 bis +61 durch Rapamycin ersetzt wurde, eine/einer keine GvHD Prophylaxe und 2 Patientinnen/Patienten Mycophenolat Mofetil bis zum Tag +27 bzw. +44. Die GvHD brach bei 4 Patientinnen/Patienten innerhalb der ersten 50 Tage aus und bei einer/einem Patientin/Patienten am Tag +146. Die Schwere der Erkrankung betreffend handelt es sich bei 3 Patientinnen/Patienten um eine Grad I GvHD die mit MMF, Protopic und Soderm bzw in einem der drei Fälle mit CSA, Prednisolon, Protopic und Soderm behandelt wurde. 1 Patientin/Patient entwickelte eine GvHD Grad I-II im Intestinaltrakt am Tag +146, die mit Beclomethason andauernd therapiert wird. 1 Patientin/Patient entwickelte eine Grad IV GvHD die mit Protopic, Soderm, Prednisolon, Tarcolimus, MMF, Infliximab, Enbral und MSC behandelt wurde, wobei MSC für mesenchymale Stromazellen steht, die experimentell zur Bekämpfung von schweren Fällen der GvHD eingesetzt werden.¹⁹⁵ Trotz dieser Bemühungen verstarb diese/dieser Patientin/Patient 208 Tage nach der Transplantation an seiner schweren GvHD, womit sie/er die/der einzige Patientin/Patient ist, der an der GvHD verstorben ist.

Overall Survival nach 16 Monaten im Mittel	Anzahl der Patienten	Prozent
Überleben ohne Krankheit	12	70,6%
Überleben mit krankheitsbedingten Defiziten	1	5,9%
an Grundkrankheit verstorben	3	17,6%
an GvHD verstorben	1	5,9%

Tabelle 6 Outcome

Von den 17 Patientinnen/Patienten sind nach einer mittleren Follow-up Zeit von 16 Monaten 12 Patientinnen/Patienten, sprich 70,6%, am Leben, ohne Zeichen der Grundkrankheit. Bei diesen kann also von einer erfolgreichen Behandlung und Heilung der Krankheit gesprochen werden. Eine Patientin zeigte auch nach der Transplantation fortschreitende neurologische Defizite. Diese Patientin litt an einer juvenilen metachromatischen Leukodystrophie. Durch den eingeschränkten Abbau von Lipiden kommt es zu einer Demyelinisierung im Zentralnervensystem. Durch die SCTx erhofft man sich dass die Krankheit geheilt bzw. gestoppt wird. Neue Makrophagen und anderen Immunzellen wandern ins ZNS und ersetzen dort allmählich die vorhandene Mikroglia durch enzymkompetente Zellen (Arylsulfatase A) und ermöglichen damit den Abbau der anfallenden Sulfatide. Bei einem weiteren Patienten hat diese Behandlung angeschlagen, dieser Patient war aber zum Zeitpunkt der Diagnose 17 Jahre alt, die Patientin bei dem das Fortschreiten der Krankheit nicht aufgehalten werden konnte war zum Zeitpunkt der Diagnose schon 21 Jahre alt. Die Verzögerung des Behandlungsbeginns durch eine relativ späte Diagnosestellung mit schon manifester neurologischer Beeinträchtigung zum Zeitpunkt der SCTX kann der Grund sein, dass das Outcome bei diesen beiden Patienten unterschiedlich ist.

Vier Patientinnen/Patienten verstarben im Verlauf der Behandlung. Wie im Text zuvor erwähnt, bildete sich bei einem Patienten eine ausgeprägte GvHD aus, die letztendlich zum Tod des Patienten, trotz massiver immunsuppressiver Therapie geführt hat. 2 Patientinnen/Patienten mit c-ALL bzw. kortikaler T-ALL verstarben an Tumorrezidiven nach durchgeführter SCTx und ein Patient, der an dem Hoyeraall-Hreidarsson Syndrom, einer schweren Form der Dyskeratosis congenita litt, war aufgrund seiner Grundkrankheit und der damit verbundenen DNA-Reparaturstörung nicht in der Lage, die Strapazen der Konditionierungstherapie auszugleichen und verstarb infolgedessen an der Behandlung der Krankheit.

7.5. Diskussion

Obwohl die Patientinnen/Patienten an einem breiten Spektrum an Erkrankungen litten, kann man trotzdem die Stammzelltransplantation nach α/β -T- und B-Zell-Depletion als effektive Methode zur Behandlung ebendieser betrachten.

Die Recovery des Immunsystems vollzog sich rasch, was durch den Fakt untermauert wird, dass keine/kein Patientin/Patient an Infektionen nach der Transplantation verstarb. Durch lange Perioden starker Immunsuppression durch Fehlen immunologischer Zellen wird das Risiko an schweren Infektionen zu erkranken und in Folge zu versterben drastisch erhöht. Nur durch engmaschige Kontrollen, strenge hygienische Prophylaxe und letztendlich durch eine zeitige Rekonstitution der eigenen Abwehr kann ein langfristiges Überleben gewährleistet werden. Das verspätete Recovery ist der wichtigste Risikofaktor bei vielen Infektionen, wie beispielsweise Adenovirusinfektionen, deren Mortalität bei Transplantationspatienten bis zu 50% beträgt.¹⁹⁶

Der Vergleich der α/β -T-Zellen mit den γ/δ -T-Zellen zeigt außerdem die Effektivität der Depletion. Die α/β -T-Zellen werden erfolgreich reduziert, große Zahlen der γ/δ -T-Zellen bleiben im Transplantat. Das Fehlen von tödlichen Infektionen und die vergleichsweise geringe Inzidenz der GvHD liefern Hinweise, dass der gewünschte Effekt stattgefunden hat. Tatsächlich ist nur ein Patient durch die Folgen der GvHD verstorben. 7 Patientinnen/Patienten kamen ganz ohne Immunsuppression aus.

Diese Ergebnisse sind jedoch auch vor dem Hintergrund zu interpretieren, dass in dieser Arbeit nur Patientinnen/Patienten mit einer/einem verwandten, HLA-identen Spenderin/Spender untersucht wurden. Da die HLA-Differenz und der Verwandtschaftsgrad zwischen Spenderin/Spender und Empfängerin/Empfänger, wie in oberen Kapiteln erwähnt, zwei wesentliche Risikofaktoren zur Ausbildung der GvHD sind, ist es wichtig diese bei der Bewertung der Ergebnisse zu betrachten. Alle Patientinnen/Patienten erhielten ihre Spende von verwandten Spenderinnen/Spendern, deren HLA-Typ ident mit dem der Patientinnen/Patienten war. Die sorgsame Auswahl der Spenderinnen/Spender verringert das Risiko des Graft-Versagens und der GvHD schon bevor die Transplantation durchgeführt wurde. Für die Bewertung der Ergebnisse nach einer Transplantation mit weniger gutem Spenderprofil war die Fallzahl zu gering um Aussagen zu treffen. Doch andere Studien zeigen, dass selbst bei haploidenten

Transplantationen die α/β -Depletion eine gute Methode ist, um einen Erfolg der Behandlung zu ermöglichen.¹⁹⁷

Wie in vorherigen Kapiteln beschrieben herrscht im Feld der immunologischen Vorgänge noch großer Forschungsbedarf. Letztendlich kann man noch keine endgültige Aussage darüber treffen, welche Methode der Stammzelltransplantation tatsächlich die beste ist. Anhand der hier untersuchten 17 Patientinnen/Patienten kann man jedoch sagen, dass die α/β -Depletion eine Therapie ist, die für den Großteil der Patientinnen/Patienten, die eine Transplantation benötigen, eine gute Art der Behandlung ist. Doch Aufgrund der sehr heterogenen Patientengruppe im pädiatrischen Umfeld, der geringen Fallzahlen in Studien und der breiten Palette an Krankheiten, ist es nicht möglich auf ein allgemein gültiges Rezept zu kommen. Jeder Fall muss gesondert betrachtet werden und die individuellen Risiken abgewogen werden. Weiter ist die α/β -Depletion eine hochkomplexe Therapieform, die nur in spezialisierten Zentren angewandt werden kann.

Dort ist die Erfolgsrate abhängig von Krankheit und Verfügbarkeit von Spenderinnen/Spendern gut und viele Krankheiten, die zuvor noch als unheilbar galten, können durch den Einsatz der Stammzelltransplantation behandelt werden.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- 1 *Dausset J. The Major Histocompatibility Complex in Man – Past, Present, and Future Concepts. Nobel Lecture. 1980.*
- 2 *Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering R, Bruford E, Khodiyar V et al. Gene map of the extended human MHC. Nat Rev Genet. 2004;5(12):889-899.*
- 3 *Zinkernagel R, Doherty P. The discovery of MHC restriction. Immunol Today. 1997;18(1):14-17.*
- 4 *Thorsby E. A short history of HLA. Tissue Antigens. 2009;74(2):101-116.*
- 5 *Yoshihara S, Taniguchi K, Ogawa H, Saji H. The role of HLA antibodies in allogeneic Sct: is the 'type-and-screen' strategy necessary not only for blood type but also for HLA?. Bone Marrow Transplant. 2012;47(12):1499-1506.*
- 6 *Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2008;42 Suppl 2: S71-76.*
- 7 *Dehn J, Buck K, Maiers M, Confer D, Hartzman R, Kollman C et al. 8/8 and 10/10 high-resolution match rate for the be the match unrelated donor registry. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;21(1):137-141.*
- 8 *Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2008;42 Suppl 2: S71-76.*
- 9 *Teshima T, Matsuo K, Matsue K, Kawano F, Taniguchi S, Hara M et al. Impact of human leucocyte antigen mismatch on graft-versus-host disease and graft failure after reduced intensity conditioning allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from related donors. Br J Haematol. 2005;130(4):575-587.*
- 10 *Fuji S, Kanda J, Kato S, Ikegame K, Morishima S, Miyamoto T et al. Impact of HLA allele mismatch on the clinical outcome in serologically matched related hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2014;49(9):1187-1192.*
- 11 *Horowitz M, Gale R, Sondel P, Goldman J, Kersey J, Kolb H et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood. 1990;75(3):555-562.*

-
- 12 *Lee S, Klein J, Barrett A, Ringden O, Antin J, Cahn J et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. Blood. 2002;100(2):406-414.*
- 13 *Weisdorf D. How closely related is graft-vs-leukemia to donor/recipient disparity?. Best Pract Res Clin Haematol. 2010;23(4):525-528.*
- 14 *Alpdogan O, Grosso D, Flomenberg N. Recent advances in haploidentical stem cell transplantation. Discov Med.; 2013;16(88):159-165.*
- 15 *Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. Bone Marrow Transplant. 2008;41(2):207-214.*
- 16 *Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. Blood. 1994;84(11):3948-3955.*
- 17 *Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. N Engl J Med. 1998;339(17):1186-1193.*
- 18 *Klingebl T, Cornish J, Labopin M, Locatelli F, Darbyshire P, Handgretinger R et al; Pediatric Diseases and Acute Leukemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size: an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group. Blood. 2010;115(17):3437-3446.*
- 19 *Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari M, Moretta A. Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2011;117(3):764-771.*
- 20 *Ruggeri L, Aversa F, Martelli M, Velardi A. Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. Immunol Rev. 2006;214:202-218.*
- 21 *Kapsenberg M. Gammadelta T cell receptors without a job. Immunity. 2009;31(2):181-183.*
- 22 *Hayday A. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity. 2009;31(2):184-196.*

-
- 23 *Born W, Jin N, Aydintug M, Wands J, French J, Roark C et al. gammadelta T lymphocytes-selectable cells within the innate system?. J Clin Immunol. 2007;27(2):133-144.*
- 24 *Godder K, Henslee-Downey P, Mehta J, Park B, Chiang K, Abhyankar S et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta t cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2007;39(12):751-757.*
- 25 *Locatelli F, Bauquet a, Palumbo G, Moretta F, Bertaina A. Negative depletion of $\alpha\beta^+$ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Immunol Lett. 2013;155(1-2):21-23.*
- 26 *Epstein M, Henle G, Achong B, Barr Y. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. J Exp Med. 1965;121:761-770.*
- 27 *Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie. 3rd ed. Germany: Georg Thieme Verlag; 2005.*
- 28 *Loren A, Porter D, Stadtmauer E, Tsai D. Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. Bone Marrow Transplant. 2003;31(3):145-155.*
- 29 *Xuan L, Huang F, Fan Z, Zhou H, Zhang X, Yu G et al. Effects of intensified conditioning on Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. J Hematol Oncol. 2012;5:46. doi: 10.1186/1756-8722-5-46.*
- 30 *Uhlin M, Wikell H, Sundin M, Blennow O, Maeurer M, Ringden O et al. Risk factors for Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica. 2014;99(2):346-352.*
- 31 *Weinstock D, Ambrossi G, Brennan C, Kiehn t, Jakubowski A. Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. Bone Marrow Transplant. 2006;37(6):539-546.*
- 32 *Lang P, Teltschik H, Feuchtinger t, Müller I, Pfeiffer M, Schumm M et al. Transplantation of CD3/CD19 depleted allografts from haploidentical family donors in paediatric leukamia. Br J Haematol. 2014;165(5):688-698.*
- 33 *Dvorak C, Gilman A, Horn B, Oon C, Dunn E, Baxter-Lowe L et Cowan M. Haploidentical related-donor hematopoietic cell transplantation in children using megadoses of CliniMACs-*

-
- selected CD34(+) cells and a fixed CD3(+) dose. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(4):508-513.
- 34 *Leong C, Habsah A, Teh H, Goh K, Fadilah S, Cheong S. Isolation of purified autologous peripheral blood CD34+ cells with low t cell content using CliniMACS device—a local experience. Malays J Pathol.* 2008;31(1):31-36.
- 35 *Gordon P, Leimig t, Mueller I, Babarin-Dorner A, Holladay M, Houston J, Kerst G et al. A large-scale method for T cell depletion: towards graft engineering of mobilized peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant.* 2002;30(2):69-74.
- 36 *Bain B. Bone marrow aspiration. J Clin Pathol.* 2001: 54: 657-663.
- 37 *Burkle M, Harrison B, Koenig L, Decker P, Warner D, Gastineau D. Morbidity and Mortality of Deep Sedation in Outpatient Bone Marrow Biopsy. Am J Hematol.* 2004: 77: 250-256.
- 38 *Santavy P, Troubil M, Lonsky V. Pericardial tamponade: a rare complication of sternal bone marrow biopsy. Hematol Rep.* 2013: 5(13): 43f.
- 39 *Thomas ED, Storb R: Technique for human marrow grafting. Blood* 36:507-515, 1970
- 40 *Bain B. Bone marrow biopsy morbidity and mortality: 2002 data. Clin Lab Haem.* 2004: 26: 315-318.
- 41 *Urban C, Schwinger W, Benesch M, Lackner H, Kerbl R, Gilli R, et al. Feasibility of Peripheral Blood Stem Cell (PBSC) and Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMNC) Separation I Children With a Body Weight Below 20 KG. Med Pediatr Oncol.* 1997: 29: 115-120.
- 42 *Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. Folia Haematologica.* 1909: 8: 125-141.
- 43 *Micklem H, Anderson N, Ross E. limited potential of circulating hematopoietic stem cells. Nature.* 1975: 256: 41-43.
- 44 *Bundesärztekammer. Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen, erarbeitet vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes. deutsches Ärzteblatt.* 1997: 94(23)1584-1592.

-
- 45 *The European group for Blood Marrow Transplantation. Haematopoietic Stem Cell Mobilisation and Apheresis: a practical guide for nurses and other allied health care professionals. 2009 Nov.*
- 46 *Pulsipher M, Chitphakdithai P, Miller J, Logan B, King R, Douglas Rizzo J, et al. Adverse events among 2048 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. Blood. 2009 Feb; 113: 3604-3611.*
- 47 *Jansen J, Hanks S, Thompson J, Dugan M, Akard L. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. J Cell Mol Med. 2005; 9(1):37-50.*
- 48 *Oehler V, Radich J, Storer B, Blume K, Chauncey T, Clift R, et al. randomized trial of allogeneic related bone marrow transplantation versus peripheral blood stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Biol Blood Marrow Transplantat. 2005; (11) 85-92.*
- 49 *Friedrichs B, Tichelli A, Bacigalupo A, Russell N, Ruutu T, Shapira M, et al. long-term outcome and late effects in patients transplanted with mobilised blood or bone marrow: a randomized trial. Lancet Oncol. 2010 Apr; 11(4):331-338*
- 50 *Anasetti C, Logan B, Lee S, Waller E, Weisdorf D, Wingard J, et al. peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. N Engl J Med. 2012 Oct; 367(16):1487-1496.*
- 51 *Pidala J, Anasetti C, Kharfan-Dabaja M, Cutler C, Sheldon A, Djulbegovic B. decision analysis of peripheral blood versus bone marrow hematopoietic stem cells for allogeneic hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15:1415-1421.*
- 52 *Ballen K, Gluckman E, Broxmeyer H. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. Blood. 2013; 122: 491-498.*
- 53 *Gluckman E, Broxmeyer H, Auerbach A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med. 1989; 321(17):1174-1178.*
- 54 *Broxmeyer H, Lee M, Hangoc G, Cooper S, Prasain N, Kim YJ, et al. Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23,5-year cryopreserved cord blood. Blood. 2011;117(18):4773-4777.*
- 55 *La Selle V, Gluckman E et Bruley-Rosset M. Newborn blood can engraft adult mice without inducing graft-versus-host disease across non H-2 antigens. 1996; 87:3977-3983.*

-
- 56 *Vilmar K, Kurth R, Bachmann D, et al. Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut (CB=Cord Blood). Dtsch Arztebl. 1999; 96(19):1297-1304.*
- 57 *Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, et al. Outcome of cord-blood transplantation form related and unrelated donors. N Engl J Med. 1997; 337(6)373-381.*
- 58 *Laughlin M, Barker J, Bambach B, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. N Engl J Med. 2001;344(24):1815-1822.*
- 59 *Rocha V, Cornish J, Sievers E, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood. 2001;97(10):2962-2971.*
- 60 *Ringden O, Okas M, Uhlin M, Uzunel M, Remberger M et Mattsson J. Unrelated cord blood and mismatched unrelated volunteer donor transplants, two alternatives in patients who lack an HLA-identical donor. Bone Marrow Transplant. 2008;42(10):643-648.*
- 61 *Stewart FM, Crittenden RB, Lowry PA; Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice; blood 1993 81: 2566-2571;*
- 62 *Barnes D, Corp M, Loutit J et Neal F. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. Br Med J. 1956;2(4993):626-627.*
- 63 *Jones R, Ambinder R, Piantadosi S et Santos G. Evidence of a Graft-versus-lymphoma effect associated with allogeneic bone marrow transplantation. Blood. 1991;77(3):649-653.*
- 64 *Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15(12):1628-1633.*
- 65 *Giralt S, Ballen K, Rizzo D, Bacigalupo A, Horowitz M, Pasquini M et al. Reduced intensity conditioning regimen workshop – defining the dose Spectrum: Report of a workshop convened by the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15(3):367-369.*
- 66 *Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, Hohmann C, Keil T, Schuster F et al. Fertility after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence. Bone Marrow Transplant. 2012;47(2):271-276.*

-
- 67 *Pfitzer C, Orawa H, Balcersek M, Langer T, Dirksen U, Keslova P et al. Dynamics of fertility impairment and recovery after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence: results from a longitudinal study. J Cancer Res Clin Oncol. 2015;141(1):135-142.*
- 68 *Bresters D, Emons J, Nuri N, Ball L, Kollen W, Hannema S et al. Ovarian insufficiency and pubertal development after hematopoietic stem cell transplantation in childhood. Pediatr Blood Cancer. 2014;61(11):2048-2053.*
- 69 *Barcroft J, Dayoub N, Thong K. Fifteen year follow-up of embryos cryopreserved in cancer patients for fertility preservation. J Assist Reprod Genet. 2013;30(11):1407-1413.*
- 70 *Nakagawa K, Kanda Y, Yamashita H, Hosoi Y, Oshima K, Ohtomo K et al. Preservation of ovarian shielding when undergoing total body irradiation for hematopoietic stem cell transplantation: a report of two successful cases. Bone Marrow Transplant. 2006;37(6):583-587.*
- 71 *Blumenfeld Z, Patel B, Leiba R et Zuckerman T. Gonadotropin-releasing hormone agonist may minimize premature ovarian failure in young women undergoing autologous stem cell transplantation. Fertil Steril. 2012;98(5):1266-1270.*
- 72 *Cheng Y, Takagi M, Milbourne A, Champlin R et Ueno N. Phase II study of gonadotropin-releasing hormone analog for ovarian function preservation in hematopoietic stem cell transplantation patients. Oncologist. 2012;4(2):233-238.*
- 73 *Oktay K et Oktem O. Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of an ongoing experience. Fertil Steril. 2010;93(3):762-768.*
- 74 *Donnez J, Squifflet J, Jadoul P, Demylle D, Cheron A, Van Langendonck A et al. Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. Fertil Steril. 2011;95(5):1787.e1-4.*
- 75 *Daudin M, Rives N, Walschaerts M, Drouinead V, Szerman E, Koscinski I et al. Sperm cryopreservation in adolescents and young adults with cancer: results of the French national sperm banking network (CECOS). Fertil Steril. 2014;103(2):478-486.*
- 76 *Fallat M, Hutter J; American Academy of Pediatrics Committee on Bioethics; American Academy of Pediatrics Section on Hematology/Oncology; American Academy of Pediatrics Section on Surgery. Preservation of fertility in pediatric and adolescent patients with cancer. Pediatrics. 2008;121(5):1461-1469.*

-
- 77 *Joshi S, Savani B, Chow E, Gilleece M, Halter J, Jacobsohn D et al. Clinical guide to fertility preservation in hematopoietic cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant. 2014;49(4):477-484.*
- 78 *Wolden S, Rabinovitch R, Bittner N, Galvin J, Giap H, Schomberg P et al. American College of Radiology (ACR) and American Society for Radiation Oncology (ASTRO) practice guideline for the performance of total body irradiation (TBI). Am J Clin Oncol. 2013;36(1):97-101.*
- 79 *Gyurkocza B, Sandmaier B. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. Blood. 2014;124(3):344-353.*
- 80 *Künkele A, Engelhard M, Hauffa B, Mellies U, Müntjes C, Hürer C et al. Long-term follow-up of pediatric patients receiving total body irradiation before hematopoietic stem cell transplantation and post-transplant survival of >2 years. Pediatr Blood Cancer. 2013;60(11):1792-1797.*

-
- 81 *Aristei C, Alessandro M, Santucci A, Aversa F, Tabillo A, Carotti A et al. Cataracts in patients receiving stem cell transplantation after conditioning with total body irradiation. Bone Marrow Transplant. 2002;29(6):503-507.*
- 82 *Alyea E, Neuberg D, Mauch P, Marcus K, Freedman A, Webb I et al. Effect of total body irradiation dose escalation on outcome following T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2002;8(3):139-144.*
- 83 *Ozsahin M, Pène F, Touboull E, Gindrey-Vie B, Dominique C, Lefkopoulos D et al. Total-body irradiation before bone marrow transplantation. Results of two randomized instantaneous dose rates in 157 patients. Cancer. 1992;69(11):2853-2865.*
- 84 *Fahnehjelm K, Törnquist A, Olsson M et Winiarski J. Visual outcome and cataract development after allogeneic stem-cell transplantation in children. Acta Ophthalmol Scand. 2007;85(7):724-733.*
- 85 *Künkele A, Engelhard M, Hauffa B, Mellies U, Müntjes C, Hüer C et al. Long-term follow-up of pediatric patients receiving total body irradiation before hematopoietic stem cell transplantation and post-transplant survival of >2 years. Pediatr Blood Cancer. 2013;60(11):1792-1797.*
- 86 *Blackburn E, King G, Swan H. Myleran in treatment of chronic myeloid leukaemia. Br Med J. 1956.1(4971):835-837.*
- 87 *Krivoy N, Hoffer E, Lurie Y, Bentur Y, Rowe J. Busulfan use in hematopoietic stem cell transplantation: pharmacology, dose adjustment, safety and efficacy in adults and children. Cur Drug Saf. 2008;3(1):60-66.*
- 88 *Bleyzac N, Souillet G, Magron P, Janoly A, Martin P, Bertrand Y et al. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. Bone Marrow Transplant. 2001;29(8):743-751.*
- 89 *Bartelink I, Bredius R, Belitser S, Suttorp M, Bierings M, Knibbe C et al. Association between busulfan exposure and outcome in children receiving intravenous busulfan before hematologic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15(2):231-241.*
- 90 *Bouligand J, Boland I, Valteau-Couanet D, Deroussent A, Kalifa C, Hartmann O, Vassal G. In children and adolescents, the pharmacodynamics of high-dose busulfan is dependent on the second alkylating agent used in the combined regimen (melphalan or thiotepa). Bone Marrow Transplant. 2003 Nov;32(10):979-86.*

-
- 91 *Johnson S, Smith A, Löffler H, Osby E, Juliusson G, Emmerich B et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. Lancet. 1996;347(9013):1432-1438.*
- 92 *Andersson B, de Lima M, Thall P, Wang X, Couriel D, Korbling M et al. Once daily i.v. busulfan and fludarabine (i.v. Bu-Flu) compares favourably with i.v. busulfan and cyclophosphamide (i.v. BuCy2) as pretransplant conditioning therapy in AML/MDS. Biol Blood Marrow Transplant. 2008;14(6):672-684.*
- 93 *Bartelink I, van Reij E, Gerhardt C, van Maarseveen E, de Wildt A, Versluys B et al. Fludarabine and exposure-targeted busulfan compares favorably with busulfan/cyclophosphamide-based regimens in pediatric hematopoietic cell transplantation: maintaining efficacy with less toxicity. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(3):345-353.*
- 94 *Horan J, Haight A, Dioguardi J, Brown C, Grizzle A, Shelman C et al. Using Fludarabine to Reduce Exposure to Alkylating Agents in Children with Sickle Cell Disease Receiving Busulfan, Cyclophosphamide, and Antithymocyte Globulin Transplant Conditioning: Results of a Dose De-Escalation Trial. Biol Blood Marrow Transplant. 2015.pii: S1083-879(15)00042-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.01.015. [Epub ahead of print]*
- 95 *Danylesko I, Shimoni A, Nagler A. Treosulfan-based conditioning before hematopoietic SCT: more than a BU look-alike. Bone Marrow Transplant. 2012;47(1):5-14.*
- 96 *Strocchio L, Zecca M, Comoli P, Mina T, Giogiani G, Giraldi E. Treosulfan-based conditioning regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. Br J Haematol. 2015;169(5):726-36.*
- 97 *Claudian S, Markt S, Piemontese S, Assanelli A, Lupo-Stanghellini M, Carrabba M et al. Treosulfan based reduced toxicity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. Hematol Oncol. 2014; doi:10.1002/hon.2183. [Epub ahead of print]*
- 98 *Nemecek E, Guthrie K, Sorrow M, Wood B, Doney K, Hilger R et al. Conditioning with treosulfan and fludarabine followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk hematologic malignancies. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17(3):341-350.*
- 99 *Lyons A, Edelstyn G. Thiotepa in the treatment of advanced breast cancer. Br J Cancer. 1965;19(3):490-495.*

-
- 100 *Maanen M, Smeets C, Beijnen J. Chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of N, N', N''-triethylenethiophosphoramidate (ThioTEPA). Cancer Treat Rev. 2000;26(4):247-288.*
- 101 *Marec-Berard P, Sequra-Ferlay C, Tabone M, Pacquement H, Lervat C et al. High Dose Thiotepa in Patients with Relapsed or Refractory Osteosarcomas: Experience of the SFCE Group. Sarcoma. 2014;2014:475067. doi: 10.1155/2014/475067. Epub 2014 Feb 4.*
- 102 *Baronciani D, Depau C, Targhetta C, Derudas D, Culurgioni F, Tandurella I et al. Treosulfan-fludarabine-thiotepa conditioning before allogeneic haemopoietic stem cell transplantation for patients with advanced lympho-proliferative disease. A single centre study. Hematol Oncol., 2015; doi:10.1002/hon.2187.[Epub ahead of print]*
- 103 *Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. Leukemia. 2007;21(7):1387-1394.*
- 104 *Beiras-Fernandez A, Thein E, Hammer C. Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. Exp Clin Transplant. 2003;1(2):79-84.*
- 105 *Roll P, Muhammad K, Stuhler G, Grigoleit U, Einsele H, Tony H. Effect of ATG-F on B-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. Eur J Haematol. 2015. doi: 10.1111/ejh. 12524. [Epub ahead of print]*
- 106 *Nachbaur D, Eibl B, Kropshofer G, Meister B, Mitterschiffhaller A, Schennach H et al. In vivo T cell depletion with low-dose rabbit antithymocyte globulin results in low transplant-related mortality and low relapse incidence following unrelated hematopoietic stem cell transplantation. J Hematother Stem Cell Res. 2002;11(4):731-737.*
- 107 *Lawitschka A, Faraci M, Yaniv I, Veys P, Bader P, Wachowiak J et al. Paediatric reduced intensity conditioning: analysis of centre strategies on regimens and definitions by the EBMT Paediatric Diseases and Complications and Quality of Life WP. Bone Marrow Transplant. 2015 Apr;50(4):592-7*
- 108 *Bartelink I, van Reij E, Gerhardt C, van Maarseveen E, de Wildt A, Versluys B et al. Fludarabine and exposure-targeted busulfan compares favorably with busulfan/cyclophosphamide-based regimens in pediatric hematopoietic cell transplantation: maintaining efficacy with less toxicity. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(3):345-353.*
- 109 *Rao K, Amrolia P, Jones A, Cale C, Naik P, King D et al. Improved survival after unrelated donor bone marrow transplantation in children with primary immunodeficiency using a reduced-intensity conditioning regimen. Blood. 2005;105(2):879-885.*

-
- 110 *Ishida H, Adachi S, Hasegawa D, Okamoto Y, Goto H, Inagaki J et al. Comparison of a fludarabine and melphalan combination-based reduced toxicity conditioning with myeloablative conditioning by radiation and /or busulfan in acute myeloid leukemia in Japanese children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(5):883-889.*
- 111 *Ferrara J, Levine J, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host Disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.*
- 112 *Krensky A, Weiss A, Crabtree G, Davis M et Parham P. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med*. 1990;322(8):510-517.*
- 113 *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 Is Strongly Associated with Overall Survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:965-974.*
- 114 *Paczensny S, Hanauer D, Sun Y, Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1-11.*
- 115 *Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Fillipovich A, Horowitz M, Hurley C et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 2004;104:1923-1930.*
- 116 *Xun CQ, Thompson J, Jennings CD, Brown S, Widmer M. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994;83:2360-2367.*
- 117 *Chen GY, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science*. 2009;323(5922):1722-1725.*
- 118 *Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.*
- 119 *Wang X, Li H, Matte-Martone C, Cui W, Li N, Tan HS, Roopenian D, Shlomchik W. Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-versus-host disease: cross-presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood*. 2011;118(24):6426-2437.*
- 120 *Van den Brind M, Burakoff S. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):273-281.*

-
- 121 *Herold G et al. Innere Medizin. 2012; Gerd Herold; 2012.*
- 122 *Cahn JY, Klein J, Lee S, Milpied N, Blaise D, Antin J et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. Blood. 2005;106(4):1495-1500.*
- 123 *MacMillan M, DeFor T, Weishof D. What predicts high risk acute GVHD at onset?: Identification of those at highest risk by a novel acute GVHD risk score. Br J Haematol. 2012;157(6):732-741.*
- 124 *Altmeyer P, Paech V. Therapielexikon Dermatologie und Allergologie: Therapie kompakt von A bis Z. 2. Auflage. Berlin; Heidelberg; New York; Springer. 2005.*
- 125 *Sale G, Lerner K, Barker E, Shulman H, Thomas D. The skin biopsy in the diagnosis of acute graft-versus-host disease in man. Am J Pathol. 1977;89(3):621-636.*
- 126 *Ferrara J, Levine J, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host Disease. Lancet. 2009;373(9674):1550-1561.*
- 127 *MacMillan M, Weisdorf D, Wagner J, DeFor T, Burns L, Ramsay N et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. Biol Blood Marrow Transplant. 2002;8:387-394.*
- 128 *Greinix H, Volc-Platzer B, Rabitsch W, Gmeinhardt B, Gervara-Pineda C, Kalhs P et al. Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. Blood. 1998;92(9):3098-3104.*
- 129 *Xia C, Campbell K, Clare-Salzler M. Extracorporeal photopheresis-induced immune tolerance: a focus on modulation of antigen-presenting cells and induction of regulatory T cells by apoptotic cells. Curr Opin Organ Transplant. 2009;14(4):338-343.*
- 130 *Greinix H, Knobler R, Worel N, Schneider B, Schneeberger A, Hoecker P et al. The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. Haematologica. 2006; 91:405-408.*
- 131 *Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L et al. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. J Eur Acad Dermatol Venerol. 2014;28:1-37.*

-
- 132 *Shulman H, Sullivan K, Weiden P, McDonald G, Striker G, Sale G et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. Am J Med. 1980;69(2):204-217.*
- 133 *Miklos D, Kim H, Miller K, Guo L, Zorn E, Lee S et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. Blood. 2005;105(7):2973-2978.*
- 134 *Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, Kalled S, Zandman D, Scott M. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. J Exp Med. 2003;198(6):937-945.*
- 135 *Scapini P, Hu Y, Chu C, Migone T, Defranco A, Cassatella M, Lowell C. Myeloid cells, BAFF, and IFN-gamma establish an inflammatory loop that exacerbates autoimmunity in Lyn deficient mice. J Exp Med. 2010;207(8):1757-1773.*
- 136 *Jacobson C, Sun L, Kim H, McDonough S, Reynolds C, Schowalter M et al. Post-transplantation B cell activating factor and B cell recovery before onset of chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(5):668-675.*
- 137 *Fehérvári Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. Curr Opin Immunol. 2004;16(2):203-208.*
- 138 *Zorn E, Kim H, Lee S, Floyd B, Litsa D, Arumugarajah S et al. Reduced frequency of FOXP3⁺ CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. Blood. 2005;106(8):2903-2911.*
- 139 *Lee S, Vogelsang G, Flowers M. Chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2003;9(4):215-233.*
- 140 *Anderson D, DeFor T, Burns L, McGlave P, Miller J, Wagner J, Weisdorf D. A comparison of related donor peripheral blood and bone marrow transplants: importance of late-onset chronic graft-versus-host disease and infections. Biol Blood Marrow Transplant. 2003;9(1):52-59.*
- 141 *Chien J, Duncan S, Williams K, Pavletic S. Bronchiolitis obliterans syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-an increasingly recognized manifestation of chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2010;16(1):106-114.*
- 142 *Filipovitch A, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard J, Lee S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-*

-
- host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(12):945-956.
- 143 Moon J, Sohn S, Lambie A, Ellis L, Hamad N, Uhm J et al. Validation of National Institutes of Health global scoring system for chronic graft-versus-host disease (GVHD) according to overall and GVHD-specific survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(4):556-563.
- 144 Socie G, Ritz J, Martin P. Current challenges in chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(1 Suppl):146-151.
- 145 Lee S, Klein J, Barrett A, Ringden O, Antin J, Cahn J et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood.* 2002;100(2):406-414.
- 146 Baird K, Pavletic S. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(6):426-435.
- 147 Linhares Y, Pavletic S, Gale R. Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help?. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(2):203-209.
- 148 Finke J, Bethge W, Schmoor C, Ottinger H, Stelljes M, Zander A et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(9):855-864.
- 149 Lee S. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2005;105(11):4200-4206.
- 150 Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus H, Fu J, Uberti J. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(2):121-129.
- 151 Ho V, Soiffer R. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;98(12):3192-3204.
- 152 Chang Y, Zhao X, Huang X. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(4):440-449.
- 153 Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, Kordelas L, Beelen D, Stuhler G et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica.* 2012;97(10):1523-1531.

-
- 154 Wang Y, Liu D, Liu K, Xu L, Zhang X, Han W et al. Long-term follow-up of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T cell depletion for the treatment of leukemia: nine years of experience at a single center. *Cancer*. 2013;119(5):978-985.
- 155 Luznik L, O'Donnell P, Symons H, Chen A, Leffell M, Zahurak M et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641-650.
- 156 Di Bartolomeo P, Santarone S, De Angelis G, Picardi A, Cudillo L, Cerretti R et al. Haploidentical, unmanipulated, G-CSF-primed bone marrow transplantation for patients with high-risk hematologic malignancies. *Blood*. 2013;12(5):849-857.
- 157 Högglund H, Ringdén O, Remberger M, Lönnqvist B, Sparrelid E, Tammik L et al. Faster neutrophil and platelet engraftment, but no differences in acute GVHD or survival, using peripheral blood stem cells from related and unrelated donors, compared to bone marrow. *Boen Marrow Transplant*. 1998;22(2):131-136.
- 158 Cooper M, Fehniger T, Caligiuri M. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends immunol*. 2001;22(11):633-640.
- 159 Cooper M, Fehinger T, Turner S, Chen K, Ghaehri B, Ghayur T et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-3156.
- 160 Chang Y, Zhao X, Huang X. Effects of the NK cell recovery on outcomes of unmanipulated haploidentical vlood and marrow transplantation for patients with hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(3):323-334.
- 161 Gumperz J, Miyake S, Yamamura T, Brenner M. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med*. 2002;195(5):625-636.
- 162 de Lalla C, Rinaldi A, Montagna D, Azzimonti L, Bernardo M, Sangalli L et al. Invariant NKT cell reconstitution I pediatric leukemia patients given HLA-haploidentical stem cell transplantation defines distinct CD4+ and CD4- subset dynamics and correlates with remission state. *J Immunol*. 2011;186(7):4490-4499.
- 163 Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik W, Tosti A et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-2100.

-
- 164 Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, Chaudhry M, Dazzi F, Kanfer E et al. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2012;119(21):5030-5036.
- 165 Thoma M, Huneke T, DeCook L, Johnson N, Wiegand R, Litzow M et al. Peripheral blood lymphocyte and monocyte recovery and survival in acute leukemia postmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(4):600-607.
- 166 Parody R, Martino R, Sánchez F, Subirá M, Hidalgo A, Sierra J. Predicting survival in adults with invasive aspergillosis during therapy for hematological malignancies or after hematopoietic stem cell transplantation: Single-center analysis and validation of the Seattle, French, and Strasbourg prognostic indexes. *Am J Hematol*. 2009;84(9):571-578.
- 167 DeCook L, Thoma M, Huneke T, Johnson N, Wiegand R, Patnaik M et al. Impact of lymphocyte and monocyte recovery on the outcomes of allogeneic hematopoietic SCT with fludarabine and melphalan conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(5):708-714.
- 168 Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-252.
- 169 Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt R, Kastelein R, Bazan F et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194(6):863-869.
- 170 Chang Y, Zhao X, Huo M, Xu L, Liu D, Liu K et al. Immune reconstitution following unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical transplantation compared with HLA-identical sibling transplantation. *J Clin Immunol*. 2012;32(2):268-280.
- 171 Clark F, Chakraverty R. Role of dendritic cells in graft-versus-host disease. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002;11(4):601-616.
- 172 Auffermann-Gretzinger S, Lossos I, Vayntrub T, Leong W, Grumet F, Blume K et al. Rapid establishment of dendritic cell chimerism in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2002;99(4):1442-1448.
- 173 Arpinati M, Green C, Heimfeld S, Heuser J, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood*. 2000;95(8):2484-2490.
- 174 Huttunen P, Taskinen M, Siitonen S, Saarinen-Pihkala U. Impact of very early CD4(+)/CD8(+) T cell counts on the occurrence of acute graft-versus-host disease and NK cell

-
- counts on outcome after pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(3):522-528.
- 175 Kim H, Armand P, Frederick D, Andler E, Cutler C, Koreth J et al. Absolute lymphocyte count recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;S1083-8791(15)00059-2. doi:10.1016/j.bbmt.2015.01.019.
- 176 Azevedo R, Soares M, Albuquerque A, Tendeiro R, Soares R, Martins et al. Long-term immune reconstitution of naïve and memory t cell pools after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;79(5):703-712.
- 177 Hazenberg M, Verschuren M, Hamann D, Miedema F, van Dongen J. t cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(11):631-640.
- 178 Clave E, Lisini D, Douay C, Giorgiani G, Busson M, Zecca M et al. A low thymic function is associated with leukemia relapse in children given T-cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 2012;26(8):1886-1888.
- 179 Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(2):71-76.
- 180 Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998;339(17):1186-1193.
- 181 Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3447-3454.
- 182 Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Gordon P, Niethammer D. Megadose transplantation of highly purified haploidentical stem cells: current results and future prospects. *Pediatr Transplant*. 2003;7(3):51-55.
- 183 Bethge W, Haegele M, Faul C, Lang P, Schumm M, Bornhauser M et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning in CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp Hematol*. 2006;34(12):1746-1752.
- 184 Gordon P, Leimig T, Mueller I, Babarin-Dorner A, Holladay M, Houston J et al. A large-scale method for T cell depletion: towards graft engineering of mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(2):69-74.

-
- 185 *Grimes H, Schanie C, Huang Y, Cramer D, Rezzoug F, Fugier-Vivier I et al. Graft facilitating cells are derived from hematopoietic stem cells and functionally require CD3, but are distinct from T lymphocytes. Exp Hematol. 2004;32(10):946-954.*
- 186 *Federmann B, Bornhauser M, Meinser C, Kordelas L, Beelen D, Stuhler G et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. Haematologica. 2012;97(10):1523-1531.*
- 187 *Federmann B, Hägele M, Pfeiffer M, Wirths S, Schumm M, Faul C et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. Leukemia. 2011;25(1):121-129.*
- 188 *Pérez-Martínez A, Gonzáles-Vicent M, Valentín J, Aleo E, Lassaletta A, Sevilla J et al. Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. Bone Marrow Transplant. 2012;47(11):1419-1427.*
- 189 *Handgretinger R. Negative depletion of CD3(+) and TcR $\alpha\beta$ (+) T cells. Curr Opin Hematol. 2012;19(6):434-439.*
- 190 *Perko R, Kang G, Sunkara A, Leung W, Thomas P, Dallas M. Gamma delta T cell reconstitution is associated with fewer infections and improved event-free survival after hematopoietic stem cell transplantation for pediatric leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 2015;21(1):130-136.*
- 191 *Recipe Phosphate-buffered saline (PBS). Available at: cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247.full. Accessed May 6, 2015; doi:10.1101/pdb.rec8247. Cold Spring Harb Protoc 2006.*
- 192 *The Human Colony Forming Cell (CFC) Assay using Methylcellulose-based Media. Available at: www.rndsystems.com/literature_CFC.aspx. Accessed May 6, 2015.*
- 193 *SOP TCR alpha/beta Depletion, Clinimacs SOP_TCRalsphabeta_Depletion_Änderungsprotokoll der klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämatologie/Onkologie Graz. qualityaustria certified; ISO 9001:2008; Available at: Intranet. Accessed April 17, 2015.*
- 194 *Schumm M, Lang P, Bethge W, Faul C, Feuchtinger T, Pfeiffer M et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. Cytotherapy. 2013;15(10):1253-1258.*

-
- 195 *Baron F, Storb R. Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease?. Biol Blood Marrow Transplant. 2012;18(6):822-840.*
- 196 *Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, Collingham K, Fegan C, Klapper P et al. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. Blood. 2002;100(5):1619-1627.*
- 197 *Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo M, Masetti R et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B-cells in children with non-malignant disorders. Blood. 2014;124(5):822-826.*