Zentrum für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Medizinische Klinik und Poliklinik I

Direktor: Prof. Dr. med. Heiner Greten

Zytokin-Profile nach Knochenmarktransplantation

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Carolin von dem Busche

aus Karlsruhe

Hamburg, 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsauschuss: 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

In der Arbeit verwendete Abkürzungen

1 Einleitung 1
1.1 Knochenmarktransplantation 1
1.2 Zytokine 4
1.3 Interleukin-6 5
1.4 IL-6-Rezeptor 6
1.5 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha 7
1.6 TNF-Rezeptoren 7
1.7 Stammzellfaktor 8
1.8 Zielsetzung der Arbeit 9

2 Material und Methoden 11
2.1 Patienten 11
2.2 Knochenmarktransplantation 12
2.3 Definition des Engraftments 14
2.4 Blut- und Urinproben 14
2.5 Zytokin-Messungen 14
2.5.1 IL-6-Assay 14
2.5.2 SCF-Assay 15
2.5.3 sIL-6-Rezeptor-Assay 15
2.5.4 TNF-α-Assay 16
2.5.5 TNF-Rezeptor-Assay 16
2.6 Statistische Auswertung 16

3 Ergebnisse 18
3.1 Serum- Interleukin-6-Spiegel nach Knochenmarktransplantation 18
3.1.1 Zeitlicher Verlauf der IL-6-Serum-Spiegel 18
3.1.2 Beziehung zwischen IL-6 und CRP, Fieber und Bilirubin 19
3.1.3 IL-6 in Zusammenhang mit Leukozyten,- und Thrombozyten-Engraftment 21
3.1.4 IL-6 und Graft-versus-Host-Disease (GvHD) 22
3.1.5 Inverse Korrelation von IL-6 und sIL-6-Rezeptor 22
3.2 Stammzellfaktor 24
3.2.1 SCF-Serum-Spiegel bei Patienten nach Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen 24
3.2.2 Beziehung zwischen SCF und Leukozyten, bzw. Thrombozyten-Engraftment 26
3.2.3 SCF und Graft-versus-Host-Disease (GvHD) 28
3.3 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha 29

3.3.1 TNF-α- Serum-Spiegel : ... 29
3.3.2 Beziehung zwischen TNF-α und verschiedenen Laborparametern ... 30
3.3.3 TNF-α-Spiegel in Serum und Urin ... 31
3.3.4 TNF-α und seine Rezeptoren ... 32
3.3.5 Beziehung der TNF-α-Rezeptoren zu verschiedenen Laborparametern ... 34
3.3.6 TNF-α und Graft-versus-Host-Disease (GvHD) ... 36
3.3.7 TNF-α und Venocclusive Disease of the liver (VOD) ... 37

4 Diskussion ... 39
4.1 Interleukin-6 ... 39
4.2 Stammzellfaktor ... 44
4.3 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha ... 47
4.4 TNF-Rezeptoren ... 49

5 Zusammenfassung ... 51

6 Literaturverzeichnis ... 53

7 Publikationen ... 65

8 Danksagung ... 66

Lebenslauf ... 67

Eidesstattliche Versicherung ... 68

In der Arbeit verwendete Abkürzungen

AA	Aplastische Anämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BC	Brustkrebs (breast cancer)
Bu	Busulfan
CML	Chronische myeloische Leukämie
Cy	Cyclophosphamid
ELS	Endothelial leakage syndrome
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Colony-stimulating-Faktor
G-CSF	Granulozyten-Colony-stimulating-Faktor
GCT	Extragenitaler Keimzelltumor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HD	Hodgkin Disease
IL-6	Interleukin-6
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
KMT	Knochenmarktransplantation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MM	Multiples Myelom
Mit	Mitoxantrone
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBSCT	Periphere Blutstammzell Transplantation
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
SCF	Stammzellfaktor
TBI	Ganzkörper-Bestrahlung (total body irradiation)

Thio	Thiotepa
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R1 / -R2	Tumor Nekrose Faktor-Alpha-Rezeptoren
t-PA	Tissue-type plasminogen activator (Gewebe-Plasminogen-Aktivator)
VOD	Venoocclusive Disease of the liver
VP	Etoposid
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Knochenmarktransplantation

Das Prinzip der Knochenmarktransplantation besteht in der Transfusion einer Suspension gesunder Knochenmarkzellen in Empfänger, deren Blutbildung aus verschiedensten Gründen gestört ist. Die im transfundierten Knochenmark enthaltenen hämatopoetischen Stammzellen sollen sich dabei in den Markräumen des Empfängers ansiedeln und nach Proliferation und Differenzierung die Blutbildung ersetzen. Der entscheidende Unterschied der Knochenmarktransplantation zu der Transplantation anderer Organe liegt in der Tatsache, daß im Transplantat eine große Menge immunkompetenter Zellen enthalten ist, die gegen den immungenetisch fremden Empfänger reagieren können. Diese Reaktion nennt man Graft-versus-Host-Reaktion; sie stellt eines der Hauptprobleme der Knochenmarktransplantation dar.
Je nach Herkunft der Stammzellen unterscheidet man zwischen der allogenen (Familien- und Fremdspender) bzw. syngenen (identischer Zwilling) und der autologen (Eigenspende) Transplantation von Knochenmark bzw. peripherer Stammzellen.
Eine Indikation zur KMT besteht grundsätzlich bei Krankheiten, bei denen hämatopoetische Stammzellen primär betroffen sind oder im Verlauf einer zytostatischen Chemotherapie oder Bestrahlung sekundär geschädigt werden.
Für die allogene Knochenmarktransplantation gibt es zur Zeit 4 Haupt-Indikationsbereiche:

1. Patienten mit angeborener Störung des Immunsystems (SCID) aber normaler hämatopoetischer Knochenmarkfunktion.

2. Patienten mit angeborener Anämie (z.B. Fanconi-Anämie) bzw. erworbener Störung der Hämatopoese bei ansonsten intaktem Immunsystem (z.B. Aplastische Anämie).

3. Patienten mit malignen systemischen hämatologischen Erkrankungen (z.B. akute Leukämie, chronische myeloische Leukämie, Lymphome).

4. Patienten mit schwerwiegenden angeborenen Defekten des stammzellabhängigen hämatopoetischen und / oder Immunsystems (z.B. Thalassaemia major, Osteopetrosis).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten stammen zum größten Teil aus der dritten Gruppe. Diese Patienten können durch eine Knochenmarktransplantation nach Präparation und Konditionierung potentiell kurativ behandelt werden.
Die Vorteile der allogenen KMT bestehen in der Tatsache, daß das Knochenmark nicht mit malignen Zellen kontaminiert sein kann und daß es zu einer sog. antileukämischen Reaktion (Graft-versus-leukemia-Reaktion) des Transplantats gegen verbliebene Leukämie-Zellen des Empfängers kommt, was die Rezidiv-Rate der Patienten signifikant senkt. Die Nachteile liegen in den immunologischen Komplikationen wie GvHD und Abstoßung und natürlich in der Schwierigkeit, einen passenden Spender zu finden (ein Familienmitglied kommt nur für 25 - 30 % der Transplantationskandidaten in Frage).

Die autologe KMT wird dann angewendet, wenn das Knochenmark selber nicht von der Erkrankung betroffen ist, die angestrebte Behandlung der Grunderkrankung aber so agressiv ist, daß sich das Knochenmark nicht oder nur mit lebensbedrohlicher Verzögerung erholen würde. Außerdem wird in Remission entnommenes autologes Knochenmark den Patienten bei Auftreten eines Rezidivs transplantiert. Bei der autologen KMT ist die Verfügbarkeit des Knochenmarks sowie das Fehlen immunologischer Komplikationen natürlich von Vorteil, die mögliche Kontamination des Knochenmarks mit malignen Zellen, sowie das Fehlen einer Graft-versus-leukemia-Reaktion sind hier als die hauptsächlichen Nachteile anzusehen.
Gegenüber der Übertragung von autologem Knochenmark, wird die Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBSCT) wegen leichterer Durchführbarkeit und größerer Wirtschaftlichkeit zunehmend bevorzugt. Für den Patienten entfällt das Risiko des operativen Eingriffs der Knochenmarkentnahme, bzw. es kann die Methode auch noch bei Patienten, bei denen eine Knochenmarkentnahme aus verschiedensten Gründen nicht möglich ist, erfolgreich angewendet werden. Desweiteren sind die peripheren Blutstammzelltransplantate möglicherweise mit weniger Tumorzellen kontaminiert.
Die Spender- bzw. Empfänger-Auswahl ist für die Knochenmarktransplantation von großer Bedeutung. Aufgrund der Gefahr der Transplantatabstoßung und der Entwicklung einer GvHD , ist eine möglichst hohe HLA-Identität von Spender und Empfänger anzustreben. Am besten als Spender geeignet sind in diesem Zusammenhang HLA-identische Geschwister, bzw. unverwandte HLA-identische Spender. Sie unterscheiden sich nur in Minor-Histokompatibilitätsantigenen, die nicht von der HLA-Region kodiert werden. Finden sich solche Geschwister oder Spender nicht, sucht man nach HLA-teilidentischen Familienmitgliedern, d.h. solchen mit bestehender serologischer Identität der Determinanten HLA-A und HLA-B sowie negativer MLC (HLA-D).
Außer bei den SCID-Patienten, ist bei allen Patienten vor der Transplantation eine sog. Konditionierungs-Behandlung notwendig, wobei mit Hilfe einer Polychemotherapie das eigene Knochenmark des Patienten zerstört wird, um einerseits die Abstoßung des Transplantats zu verhindern und andererseits bei malignen hämatologischen Erkrankungen die malignen Zellpopulationen, also das „kranke Knochenmark“ zu entfernen. Bei den Patienten mit nicht-hämatologischen malignen Erkrankungen, wie z.B. Mammacarcinom, entspricht die Hochdosis-Chemotherapie als Teil der Therapie, bei der die Zerstörung des Knochenmarks billigend in Kauf genommen wird, der Konditionierung.
Es gibt eine Reihe typischer, durch die Knochenmarktransplantation und die Konditionierung bedingte Komplikationen, deren frühe Erkennung und Behandlung entscheidend für den Verlauf und Erfolg der Therapie ist.
Im Unterschied zur Transplantation anderer Organe, wird bei der Knochenmarktransplantation eine große Menge immunkompetenter Zellen übertragen, die mit dem immungenetisch fremden Empfänger reagieren können. Diese sog. Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) stellt eines der Hauptprobleme der Knochenmarktransplantation dar.
Die akute GvHD wird durch immunkompetente T-Lymphozyten des Spenders, die gegen Alloantigene auf den Zellen des Empfängers reagieren, ausgelöst (Billingham et al., 1966). Die Häufigkeit dieser Komplikation liegt zwischen 50 % bei HLA-Identität von Spender und Empfänger und 75% bei HLA-Mismatch bei Verwandten, bzw. phänotypischer Identität bei Nicht-Verwandten (Ostendorf et al.,1997).
Klinisch manifestiert sich eine akute GvHD meist zuerst an der Haut (Rötung bis hin zur Epitheliolyse), dann am Gastrointestinaltrakt (Diarrhö), sowie an der Leber (cholestatische Hepatitis). Aufgrund des unterschiedlichen Schweregrades der Erkrankung teilt man die GvHD in 4 Stadien ein. In die Beurteilung gehen hierzu ein: Prozent der von Rötung und / oder Desquamation betroffenen Körperoberfläche, die Höhe des Bilirubins (in mg %) sowie

die Diarrhö-Menge (in ml / d) und das Auftreten von abdominalen Schmerzen (Storb et al., 1985).
Da es bei den Hautmanifestationen und auch bei Diarrhö leicht zu Verwechslungen mit nicht durch GvHD bedingten Veränderungen kommen kann, ist eine Biopsie und histologische Beurteilung für die Diagnose der GvHD wichtig. Bei den Hautveränderungen handelt es sich um vakuoläre Degeneration, Nekrose und Dyskeratose von epidermalen Zellen, sowie epidermal-dermale Separation. Die Leberbeteiligung ist charakterisiert durch Degeneration und Nekrose der paraazinären Zellen sowie der Epithelzellen der kleinen Gallengänge. Am schwierigsten in der Einteilung sind die Läsionen des Intestinaltraktes, die von Nekrosen einzelner Epithelzellen, bis hin zum diffusen Untergang der Mukosa reichen (Sale & Shulman, 1984). Die Folge der Läsionen an Haut und Intestinaltrakt ist eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, was durch die verzögerte Erholung des Immunsystems bei GvHD noch verstärkt wird.
Zur Prophylaxe einer akuten GvHD hat sich eine Kombinationstherapie mit Methotrexat und Ciclosporin A durchgesetzt. In der Behandlung der manifesten GvHD stehen Antithymozytenglobulin, Kortikosteroide, Cyclosporin und monoklonale Antikörper gegen T-Zellen zur Verfügung, unterstützt durch Maßnahmen wie Hyperalimentation, parenterale Ernährung und konsequente Infektionsprophylaxe,- und Therapie.
Bei 25 - 30 % der Patienten entwickelt sich 100-500 Tage nach der KMT eine chronische GvHD, die klinisch eher dem Bild einer Autoimmunerkrankung ähnlich ist. Symptome sind hierbei Keratokonjunktivitis, Mukositis, Cholestase, Ösophagus- sowie Darmstrikturen, Sicca-Syndrom oder obliterierende Bronchiolitis (Sullivan et al., 1984). Man vermutet als Auslöser nichtspezifische T-Supressorzellen.
Ein weiteres großes Feld an Komplikationen entsteht durch Infektionen mit Bakterien, Viren oder Pilzen, die die Patienten insbesondere in der neutropenischen Phase nach der Transplantation bedrohen. Isolation des Patienten, sorgfältige mikrobielle Dekontamination, sowie engmaschiges Kontrollieren hinsichtlich Infektionszeichen und breitgefächerte antibiotische Therapie bei Auftreten von Fieber und / oder anderen Infektionszeichen sind der Versuch diese Gefährdung des Patienten einzudämmen.
Eine seltene, aber schwerwiegende Komplikation bei Patienten nach KMT ist die sogenannte Venoocclusive Disease der Leber (VOD). Es kommt zu einer nichtthrombotischen Obliteration der kleinen intrahepatischen Venen, was zu massiver hepatozellulärer Nekrose führt und mit einer hohen Mortalität behaftet ist. Eine Hypothese für das Entstehen ist, daß während der Konditionierungstherapie durch lokale Aktivierung der Gerinnungskaskade ein Endothelschaden entsteht, der zuerst sinusoidal, dann postsinusoidal zur Okklusion führt (Shulman et al., 1992). Gestützt wurde diese Annahme durch den Nachweis von Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen und Faktor Vlll) in VOD-Läsionen in autoptischem Material (Shulman et al., 1987), sowie durch den Nachweis erhöhter TNF-α-Werte bei Patienten mit VOD (Holler et al.,1990). TNF-α vermittelt verschiedene gerinnungsfördernde Mechanismen, wie die „Downregulation“ der gerinnungshemmenden Faktoren Protein C, Protein S und Antithrombin lll und die Zunahme von Faktor V und Faktor Vlll (van der Poll et al., 1990).
Die klinischen Kriterien zur Diagnose einer VOD sind das Auftreten einer Hyperbilirubinämie (> 2 mg/dl) und zwei der drei folgenden Kriterien: Hepatomegalie, Aszites, Gewichtszunahme > 5 % (Jones et al., 1987).
Bei dem Versuch, Risikofaktoren für das Entstehen einer VOD zu identifizieren, sind verschiedene Arbeitsgruppen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. Die Konditionierung wird als eigentlicher Auslöser der Erkrankung angesehen. Ein erhöhtes Risiko scheint zu bestehen bei höherdosierter (> 12 Gy) Bestrahlung, (Bearman et al., 1988) und bei Regimen, in denen Busulfan (v.a. in einer Dosierung > 16 mg/kg) enthalten ist

(Vassal et al., 1992). Desweiteren ist ein geringeres Risiko bei autolog transplantierten Patienten dokumentiert (Bearman et al., 1988) und ein erhöhtes Risiko bei vorbestehenden Lebererkrankungen (Gluckmann et al., 1990). In anderen Publikationen wurde ein derartiger Zusammenhang zwischen der Inzidenz von VOD und dem Konditionierungs-Regimen oder der Transplantationsart nicht nachgewiesen (Jones et al., 1987).
Die Therapie der manifesten VOD ist sehr begrenzt. Zur Prävention wurde im Rahmen einer kontrollierten, randomisierten Studie kontinuierlich Heparin infundiert und damit eine signifikante Inzidenzverringerung gegenüber der Kontrollgruppe erzielt (Attal et al., 1992). In zwei anderen Studien konnte die Wirksamkeit von Heparin zur Vermeidung einer VOD nicht bewiesen werden (Marsa-Vila et al., 1991).
Zusammenfassend kann man sagen, daß trotz der doch erheblichen therapiebedingten Begleiterkrankungen die Hochdosischemotherapie und / oder Bestrahlung mit anschließender KMT oder Transplantation peripherer Stammzellen eine durchaus gerechtfertigte Therapie zur Behandlung maligner, hämatologischer Erkrankungen ist. Für die chronische myeloische Leukämie stellt die allogene KMT mit HLA-identischen Familien,- oder Fremdspendern bislang die einzige Heilungschance dar.
Es ist zu hoffen, dass die KMT durch die weitere Erforschung der Regulation der Hämatopoese durch Zytokine und die weitere Verbesserung der Behandlung konditionierungsbedingter Komplikationen, in Zukunft mit noch besseren Ergebnissen eingesetzt werden kann.

1.2 Zytokine

Zytokine sind endogene Proteinhormone mit einem großen Spektrum biologischer Eigenschaften, denen eine zentrale Rolle als Mediatoren der Immunregulation und als Regulatoren der Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zukommt. Sie kontrollieren direkt oder indirekt über die Induktion von weiteren Zytokinen unspezifische und spezifische Immunität, systemische Entzündungsreaktionen sowie Proliferation und funktionelle Regulation hämatopoetischer Zellen.
Als Hauptbildungsorte der Zytokine konnten das Monozyten-Makrophagen-System, T-Zellen, Endothelzellen, Mesothel-Zellen, Osteoblasten, Fibroblasten sowie aktivierte B-Zellen identifiziert werden. Die ursprüngliche Annahme, daß die Zytokine ausschliesslich der funktionellen Verständigung von Leukozyten untereinander dienen, führte zu dem Begriff „Interleukine“.
Zu den Zytokinen zählen die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF oder GM-CSF) . Sie sind für die Regulation und Nachbildung der verschiedenen Zellelemente der Hämatopoese zuständig. Für die Hämato-Onkologie und die KMT hat v.a. das G-CSF eine Bedeutung. Seine Zielzellen sind granulopoetisch geprägte hämatopoetische Vorläuferzellen. Die endogene G-CSF-Produktion korreliert invers mit dem Grad der Neutropenie (Cairo et al., 1992). Man setzt daher rekombinantes, humanes G-CSF zur Prävention der Neutropenie nach myelosuppressiver Chemo - und / oder Strahlentherapie ein.

1.3 Interleukin-6

IL-6 ist ein pleiotropes Peptid. Es hat ein Molekulargewicht von 21-28 kDa und ist aus 212 Aminosäuren aufgebaut. Die Gene liegen auf Chromosom 5 und 7. (Sehgal et al., 1986). Freigesetzt wird es von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems, von T-Zellen, B-Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Mesangiumzellen und diversen Tumorzellen. Stimulatoren der Synthese sind andere proinflammatorische Zytokine (TNF-α, IL-1). Die Produktion von IL-6 durch T-Zellen wird durch mitogene oder antigene Stimulation der Zellen induziert (Horii et al., 1988). Ursprünglich war IL-6 als Lymphokin identifiziert, welches v.a. in der späten Phase der B-Zell-Reifung zu Antikörper-produzierenden Zellen mitwirkt. Außer der Wirkung auf B-Zellen, hat IL-6 aber auch Einfluß auf T-Zellen. Neben der T-Lymphozyten-Aktivierung (Helle et al., 1989) induziert IL-6 das Zellwachstum und die Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten (Uyttenhove et al., 1989). Desweiteren ist es aber auch für folgende Effekte verantwortlich : es induziert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen (z.B. C-reaktives Protein, ß2-Fibrinogen, Haptoglobin und Hämopexin) an Hepatozyten, stimuliert das Wachstum differenzierter B-Zellen, dient als Kostimulator der T-Zell-vermittelten Immunabwehr, wirkt auf pluripotente hämatopoetische Progenitorzellen durch Steigerung der Granulopoese und insbesondere der Megakaryopoese, stimuliert Osteoklasten und hat eine in vitro beobachtete direkt proliferationshemmende Wirkung auf verschiedene Tumorzellinien z.B. Zelllinien von Mamma-Carcinomen und bei Myeloischer Leukämie (Ostendorf et al., 1997). Daneben konnte allerdings auch nachgewiesen werden, daß IL-6 als autokriner Wachstumsfaktor für reife B-Zell-Neoplasien, z.B. bei Multiplem Myelom, fungiert (Kawano et al., 1988). Diese Beobachtung wurde in einer Untersuchung bestätigt, in der effektiv monoklonale Antikörper gegen humanes IL-6 bei Patienten mit Multiplem Myelom eingesetzt wurden (Klein et al., 1992). Hohe Konzentrationen von IL-6 konnten weiterhin in der Synovia-Flüssigkeit der Gelenke von Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis entdeckt werden (Hirano et al., 1988). Diese Beobachtung ist eine mögliche Erklärung für die lokalen sowie die generalisierten Symptome der rheumatoiden Arthritis, wie Infiltration von Plasma-Zellen in Synovia-Gewebe und Anstieg von Akut-Phase-Proteinen, wie CRP und Serum-Amyloid.
Seine vielfältigen Wirkungen auf verschiedene Zellen (Tabelle 1-1) entfaltet IL-6 durch Bindung an ein spezifisches Rezeptor-System.

Tabelle 1-1
Biologische Aktivität des Interleukin-6

a) Induktion und Differenzierung bzw. spezifische Gen-Expression
- Ig-Induktion von B-Zellen
- Induktion von Akut-Phase-Proteinen in Hepatozyten
- Induktion der Differenzierung zytotoxischer T-Zellen
- Induktion der Differenzierung verschiedener Neuralzellen
- Aktivierung hämatopoetischer Stammzellen von der G0 in die G1-Phase

b) Stimulation des Zellwachstums
- Induktion des Wachstums von Myelom- / Plasmozytomzellen
- Induktion des T-Zellwachstums
- Induktion des Zellwachstums von Mesangium-Zellen

c) Inhibition von Zellwachstum
- Wachstumshemmung von myeloischen Leukämie-Zellen
- Wachstumshemmung von Mamma-Carcinom-Zellinien

1.4 IL-6-Rezeptor

IL-6 bindet an einen Rezeptor (IL-6-R), der an der äußeren Membran verschiedener Zelltypen präsentiert wird, z.B. an normalen Knochenmarkzellen, peripheren Blutzellen, Hepatozyten und epidermalen Keratinozyten (Sonne et al., 1990; Hirata et al., 1989; Wognum et al., 1993). Die Zahl der Rezeptoren pro Zelle ist ca. 100fach geringer als die für andere Hormone oder Wachstumsfaktoren (Taga et al., 1987; 1989). Der Komplex aus IL-6 und IL-6-Rezeptor interagiert dann mit einem Glykoprotein (gp 130), das die Signaltransduktion ermöglicht. gp130 funktioniert als Signalüberträger auch für verschiedene andere Zytokine und Zytokin-Rezeptoren.
Eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors (sIL-6-R) mit einem Molekulargewicht von 50-55 kDa konnte in menschlichem Urin, sowie in Serum von gesunden Probanden nachgewiesen werden (Novick et al., 1989). Erhöhte sIL-6-R-Werte fanden sich bei HIV-positiven Serumproben (Honda et al., 1992), bei Patienten mit monoklonaler Gammopathie, Non Hodgkin Lymphom und chronisch lymphatischer Leukämie (Lavabre-Bertrand et al., 1995).
Erniedrigte Werte fanden sich demgegenüber im Serum von Patienten mit systemischer juveniler rheumatoider Arthritis im Vergleich zu gesunden Kindern (De Benedetti et al., 1992). Diese Daten lassen vermuten, daß sIL-6-R bei verschiedenen (auto-)immun-entzündlichen und hämatologischen Erkrankungen ein Rolle spielt.
sIL-6R scheint agonistische Aktivität zu IL-6 zu haben. Dies ist vor allem bei Patienten mit Multiplem Myelom beobachtet worden. Die hohen Konzentrationen von sIL-6-R bei diesen Patienten deuten hier besonders auf eine klinische Relevanz des Rezeptors hin (Gaillard et al., 1993). Über die Regulation der sIL-6-R-Produktion und die Interaktion des Rezeptors mit IL-6 gibt es allerdings nach wie vor unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Es wird postuliert, daß sIL-6-R eine Rolle in der IL-6-Kinetik spielt und zirkulierendes IL-6 vor dem zu raschen Abbau bewahrt (Frieling et al., 1994) und daß die bekannte Downregulation von sIL-6-R durch seinen Liganden dem Schutz des Organismus vor einer Überstimulation dient

(Zohlnhöfer et al., 1992). Der Komplex aus IL-6 und sIL-6-R bewirkt außerdem eine Zunahme von Akut-Phase-Proteinen (Mackiewicz et al., 1992).

1.5 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha

TNF-α ist ein Molekül aus 157 Aminosäuren, dessen Gen auf Chromosom 6 lokalisiert ist (Nedwin et al., 1985). Das 17 kDa große Peptid wird überwiegend von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems gebildet, aber auch von Granulozyten, natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten. Die physiologische Rolle von TNF-α ist die eines zentralen Mediators der systemischen Entzündungs- und Immunreaktion. Bakterielle, virale und parasitäre Organismen bzw. deren Produkte führen zur Induktion der TNF-α-Synthese, wobei das Lipopolysaccharid einiger Bakterien als stärkster biologischer Stimulus der TNF-α-Produktion durch Makrophagen gilt. Dies kann soweit führen, daß eine überschießende Ausschüttung von TNF-α als Antwort auf Endotoxin gramnegativer Bakterien zum klinischen Bild des septischen Schocks mit Verbrauchskoagulopathie führt (Manogue et al., 1991).
TNF-α übt seine Wirkung auf eine Vielzahl von Zielzellen aus. Bei Granulozyten kommt es zu einer funktionellen Aktivierung und Steigerung der Adhäsion. Besonders vielfältig sind auch die Wirkungen auf Endothelzellen. Neben der Induktion einer Entzündungsreaktion kommt es auch zur Gerinnungsaktivierung. TNF-α aktiviert auch den Gewebefaktor (Nawroth et al., 1985), steigert die Synthese des t-PA und fördert die Ausschüttung von PAI und vWF (Seeber et al., 1992). Im Rahmen von lokalen Entzündungsreaktionen kommt es zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, die mit Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten interagieren. TNF-α regt Hepatozyten zur Synthese von Akut-Phase-Proteinen an, es wirkt in vivo fieberauslösend (Wirkung auf den Hypothalamus) und es hemmt die Lipoproteinlipase der Fettzellen, was zu Katabolismus und Inappetenz führt. TNF-α gilt als einer der Hauptmediatoren der durch Monozyten-/ Makrophagen vermittelten Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen; außerdem regt es diese Zellen zur Produktion zahlreicher weiterer Zytokine an (Ostendorf et al., 1997).
Die besondere Bedeutung von TNF-α in Zusammenhang mit der KMT und hierbei vor allem mit transplantationsbedingten Komplikationen wie GvHD, VOD oder interstitieller Pneumonie wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Es ist aber inzwischen in mehreren Studien ein derartiger Zusammenhang gezeigt worden (Holler et al., 1990; Symington et al., 1990). Auch in Fällen, in denen das transplantierte Knochenmark abgestoßen wurde bzw. es nicht zum „Engraftment“, das heißt zum Anwachsen der transplantierten Zellen kam, konnten signifikant hohe Werte für TNF-α gemessen werden, die sich nach erfolgreicher Retransplantation normalisierten (Nagler et al., 1995). Dies zeigt Wege zur Früherkennung von Risikopatienten durch Überwachen von Zytokinspiegeln auf, bzw. bietet die Möglichkeit eines therapeutischen Eingreifens durch gezielte Blockade der TNF-α-Produktion mittels monoklonaler Antikörper.

1.6 TNF-Rezeptoren

Es sind zwei Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2) für TNF-α bekannt. TNF-R1 hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und besteht aus 426 Aminosäuren, wovon 182 Aminosäuren den extrazellulären und 221 Aminosäuren den intrazellulären Abschnitt bilden. TNF-R2 hat

ein Molekulargewicht von 75 kDa und besteht aus 439 Aminosäuren; 235 als extrazellulärer- und 174 als intrazellulärer Anteil (Tartaglia et al., 1992). Der extrazelluläre Abschnitt der beiden Rezeptoren zeigt homologe Abschnitte, was auf die bestehende Verwandtschaft der Rezeptoren hindeutet. Im Gegensatz dazu sind die intrazellulären Anteile verschieden, so daß man von unterschiedlichen Signalübermittlungen ausgehen muß. Neben diesen Unterschieden in der Primärstruktur scheint auch die Expression unterschiedlich reguliert zu werden. Obwohl in vielen Zellen eine Ko-Expression beider Rezeptoren vorliegt, gibt es typische quantitative Dominanzen für einen der beiden Rezeptoren. Lymphoide Zellen z.B. exprimieren vornehmlich TNF-R2, während Epithelzellen typischerweise eher TNF-R1 exprimieren (Grell et al., 1994). TNF-α hat eine höhere Affinität zu TNF-R2 als zu TNF-R1 und bindet demnach in niedrigen Konzentrationen eher an TNF-R2. Über die möglichen Rollen der TNF-Rezeptoren in der Signalübermittlung und ihre unterschiedlichen Funktionen gibt es konträre Ergebnisse. TNF-R1 ist nach Tartaglia et al., 1993 derjenige Rezeptor, der Zytotoxizität, antivirale Aktivität und Fibroblasten-Proliferation vermittelt, während TNF-R2 eher eine Rolle bei der Proliferation von Thymozyten und zytotoxischen T-Zellinien spielt, aber keine direkt zytotoxischen Effekte vermittelt. In anderen Studien hingegen konnte für beide Rezeptoren die Fähigkeit, Zelltod herbeizuführen, demonstriert werden (Grell et al., 1993). Dies liegt nach Tartaglia et al., 1993 an der Fähigkeit von TNF-R2, die Konzentration von TNF-α an der Zelloberfläche zu erhöhen und damit die Assoziation mit TNF-R1 zu verbessern. Es scheint jedoch unbestritten, daß TNF-R1 in der Vermittlung zytotoxischer Effekte TNF-R2 überlegen ist (Thoma et al., 1990). Dies konnte u.a. auch an Ovarial-Carcinom-Zellinien gezeigt werden, wo durch Blockade von TNF-R1, die TNF-α-vermittelte Zytolyse inhibiert werden konnte (Kost et al., 1996).

1.7 Stammzellfaktor

Der Stammzellfaktor, auch c-kit-Ligand oder Steel-Factor genannt, ist eines der in jüngerer Zeit entdeckten Zytokine und lag erstmals 1990 in gereinigter Form vor (Zsebo et al., 1990).
SCF kommt als dimeres Molekül vor, das von Knochenmarkstromazellen, wie Fibroblasten und Epithelzellen, von T-Zellen, Gehirn- und Rückenmarkzellen sowie Leberzellen synthetisiert wird. Das verantwortliche Gen liegt auf Chromosom 12 (Morstyn et al., 1994). Es kommen natürlicherweise zwei Varianten von SCF vor. Das Protein besteht in voller Länge aus 248 Aminosäuren. Die lösliche Form aus 165 Aminosäuren wird hiervon abgespalten. Nach Glykosylierung hat es ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Daneben gibt es noch eine membrangebundene Form, bestehend aus 220 Aminosäuren (McNiece et al., 1995).
SCF gehört wie IL-6 zu den Zytokinen, die vor allem in der frühen Hämatopoese an Zellen auf der Ebene der multipotenten Stammzelle agieren. Er hat aber auch Effekte auf weiter differenzierte Zellen. SCF ist der Ligand des Tyrosin-Kinase-Rezeptors (c-kit), der in hoher Dichte auf allen hämatopoetischen Vorläuferzellen vorhanden ist, sowie von Megakaryozyten, primitiven Keimzellen, Melanozyten und auch einigen Tumorzelltypen, wie z.B. AML-Zellen, exprimiert wird. Auch bei CML-Blastenkrisen, bei Non-Hodgkin-Lymphomen, beim Morbus Hodgkin, bei kleinzelligen Bronchial-Carcinomen und Tumoren des weiblichen Genitaltraktes wurde die Expression von c-kit gefunden. (Morstyn et al., 1994, Ostendorf et al., 1997).
An Knochenmarkkulturen ist unter Zugabe von SCF alleine nur eine geringe Stimulation der Hämatopoese zu beobachten. Bei gleichzeitiger Gabe von IL-3, G-CSF, GM-CSF, IL-6 oder

Erythropoetin konnte hingegen eine Potenzierung der Ausbildung von Kolonien aller hämatopoetischer Differenzierungslinien (BFU-E, CFU-GM, CFU-Mix, BFU-MK, CFU-Meg) sowie die Proliferation von Vorläuferzellen gesehen werden. Ein positiver Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung aller Entwicklungsstufen von Mastzellen konnte ebenso nachgewiesen werden wie ein Effekt bei prä-B-Zellklonen. Nach Behandlung mit rekombinantem humanem SCF (r-huSCF) und IL-7 konnte eine Zunahme der Anzahl von Kolonien in Knochenmarkzellkulturen nachgewiesen werden (McNiece et al., 1991). Im Tierversuch konnte nach Gabe von rekombinantem SCF (200 µg / kg / Tag) eine deutliche Zunahme der peripheren hämatopoetischen Progenitorzellen, der Erythrozyten und Retikulozyten, der neutrophilen, aber auch der eosinophilen und basophilen Granulozyten, der Monozyten und Lymphozyten und auch eine Zunahme der CD 34+ Zellen beobachtet werden. Dieser Effekt ist durch die gleichzeitige Verabreichung von G-CSF potenzierbar (Andrews et al., 1994; Bernstein et al., 1991). Auch die Zeit bis zum „Engraftment“ der Leukozyten und Thrombozyten, was in einer Studie mit hochdosisbestrahlten Hunden untersucht wurde, war nach Behandlung mit rhSCF plus rhG-CSF verkürzt (de Revel et al., 1994). Dies führt zu der Annahme, daß SCF einen Einfluß auf das „Engraftment“ nach KMT haben könnte.
Primäres klinisches Einsatzgebiet von SCF ist zur Zeit die ex-vivo Anreicherung hämatopoetischer Progenitorzellen in Verbindung mit zahlreichen anderen synergistisch wirkenden hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Weitere mögliche klinische Einsatzgebiete von rekombinantem humanem SCF wäre eine unterstützende Gabe bei Patienten, die eine Chemotherapie bekommen. Auch im Rahmen der Knochenmarktransplantation kann SCF entweder zum Verbessern des Knochenmarks vor der Entnahme oder zur Beschleunigung des „Engraftments“ nach Transplantation angewendet werden. Desweiteren ist eine Verabreichung bei Patienten, die unter aplastischer Anämie oder anderen Krankheiten mit einer Knochenmarkdepression leiden, denkbar.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, inwieweit verschiedenen Zytokine einen Einfluß auf den klinischen Verlauf und die Entstehung von Komplikationen bei Patienten nach einer Knochenmarktransplantation haben. Nach wie vor wird die Knochenmarktransplantation häufig durch Entzündungen, Infektionen und / oder Erkrankungen wie GvHD und VOD kompliziert und der Verlauf davon beeinträchtigt. Da Zytokine Mediatoren bei entzündlichen und immunologischen Prozessen sind, nahmen wir an, daß die einzelnen Zytokine in mehr oder weniger starkem Zusammenhang mit transplantationsassoziierten Komplikationen wie GvHD, VOD und allgemeinen Infektionen stehen, sowie bei dem Leukozyten- und Thrombozyten – Engraftment von Bedeutung sind. Daher wurden in Serum- und Urinproben von Patienten vor und nach einer Knochenmarktransplantation die Konzentration von IL-6, IL-6-Rezeptor, TNF-α, TNF-Rezeptor (55 kDa), TNF-Rezeptor (75 kDa) und SCF gemessen. Diese wurden korreliert mit laborchemischen Parameter, die Aufschluß über die klinische Situation der Patienten geben konnten: Bilirubin, Kreatinin, C-reaktives Protein, GOT, GPT, γGT, Lipase, Alkalische Phosphatase, Leukozyten, Thrombozyten, sowie Temperatur und Gewicht.
Von besonderem Interesse war der Zusammenhang von SCF und dem „Engraftment“ von Leukozyten und Thrombozyten nach der Transplantation, da die in vitro beobachtete Zunahme von Progenitorzellen unter dem Einfluß des Zytokins solch einen Zusammenhang andeutet. Desweiteren die Verbindung von IL-6 und der Akut-Phase-Reaktion nach der

Knochenmarktransplantation, sowie die Korrelation von IL-6 und seinem Rezeptor. Bei TNF-α wurde vornehmlich der Zusammenhang des Serum-Zytokin-Spiegels mit Komplikationen wie GvHD oder VOD untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Serum- und Urinproben, stammten von Patienten, die zwischen November 1991 und November 1994 in der Abteilung für Knochenmarktransplantation des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg stationär behandelt wurden und eine Knochenmarktransplantation, bzw. eine Transplantation peripherer Stammzellen erhielten.
Das Gesamtkollektiv beträgt 121 Patienten, die zwischen 1930 und 1977 geboren sind , davon sind 57 weiblich, 64 männlich.
Es wurden 59 Patienten allogen, 14 autolog und zwei syngen transplantiert, weitere 46 Patienten bekamen eine Transplantation peripherer Stammzellen.
Die meisten Patienten litten unter malignen hämatologischen Erkrankungen, aufgrund derer sie einer Knochenmarktransplantation zugeführt wurden. Die Diagnosen verteilten sich im Einzelnen wie folgt:

Tabelle 2-1
Diagnosen der untersuchten Patienten

Diagnose	**Anzahl [n]**
Akute myeloische Leukämie (AML)	24
Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)	23
Chronische myeloische Leukämie (CML)	19
Akute lymphatische Leukämie (ALL)	16
Nodal positives Mammacarcinom (BC)	15
Hodgkin-Lymphom (HD)	11
Aplastische Anämie (AA)	5
Multiples Myelom (MM)	4
Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	2
Extragenitaler Keimzelltumor (GCT)	1
Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)	1

2.2 Knochenmarktransplantation

Alle Patienten, die mit einer Knochenmarktransplantation behandelt werden, müssen sich zuvor einer Konditionierungsbehandlung unterziehen. Hierbei wird durch verschiedene Kombinationen potenter und hochdosierter Chemotherapeutika eine komplette Aplasie des Knochenmarks herbeigeführt, was die Notwendigkeit einer Knochenmarktransplantation nach sich zieht.
Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten, waren die zur Konditionierung verwendeten Substanzen:

ANTI THYMOZYTEN GLOBULIN	(ATG)
BEAM	(BCNU+VP-16+ARA-C+MEL)
BUSULFAN	(BU)
CARBOPLATIN	(CARB)
CARMUSTIN	(BCNU)
CYTOSIN ARABINOSID	(ARA-C)
CYCLOPHOSPHAMID	(CY)
DEXAMETHASON	(DEXM)
ETOPOSID	(VP-16)
HOLOXAN	(HOL)
MELPHALAN	(MEL)
MITOXANTRONE	(MIT)
THIOTEPA	(THIO)

Außerdem wurde die Ganzkörperbestrahlung (TBI) alleine oder in Kombination mit der Chemotherapie eingesetzt.
Die in diese Arbeit eingehenden Patienten sind aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Diagnosen mit verschiedenen Konditionierungs-Regimen behandelt worden, die nachfolgend aufgeführt sind:

Tabelle 2-2
Konditionierungs-Regimen

			Anzahl [n]
BU (16 mg/kg KG)	CY (120 mg/kg KG)	VP-16 (30-45 mg/kg KG)	44
CY (100 mg / kg KG)	VP-16 (45 mg/kg KG)	TBI (12 Gy)	28
CY (6 g/m²)	MIT (30 mg/m²)	THIO (600 mg/m²)	15
BU (16 mg/kg KG)	CY (120 mg/kg KG)		10
BEAM + DEXM BCNU(300 mg/m²) VP16 (1200 mg/m²)	ARA C (800 mg/m²) MEL (140 mg/m²)	DEXM (96 mg)	6
CY (200 mg/kg KG)	ATG (100 mg/kg KG)		5
CY (150 mg/kg KG)	VP-16 (1 g/m²)	BCNU (300 mg/m²)	5
BU (480 mg/m²)	CY (120 mg/kg KG)	VP-16 (900 mg/m²)	2
BEAM + TBI BCNU(300 mg/m²) VP16 (1200 mg/m²)	ARA C (800 mg/m²) MEL (140 mg/m²)	TBI (12 Gy)	1
BU (16 mg/kg KG)	CY (120 mg/kg KG)	ATG (120 mg/kg KG)	1
CARB (1500 mg/m²)	VP-16 (2400 mg/m²)	HOL (10 g/m²)	1
MEL (200 mg/m²)			1
CY (100 mg/kg KG)	TBI (12 Gy)		1
BCNU (300 mg/m²)	VP-16 (1200 mg/m²)	MEL (140 mg/m²)	1

Der Tag der Transplantation wird als „Tag 0“ gezählt, die stationären Tage davor mit -x bis -xn, die Tage nach der Transplantation mit 1 bis x.
Vor der stationären Aufnahme wurden alle Patienten sehr genau auf Infektionsherde untersucht, um ein eventuelles Exazerbieren einer latenten Infektion unter der knochenmarksdepressiven Therapie zu verhindern. Dazu gehörten Röntgenaufnahmen der Lunge, der Zähne und der Nasennebenhöhlen. Prophylaktisch bekamen alle Patienten während des gesamten stationären Aufenthaltes Ciprofloxazin, Fluconazol, sowie Cotrimoxazol. Zusätzlich wurde ab Tag 1 Aciclovir verbreicht. Bei Auftreten von Fieber und / oder Zeichen einer bakteriellen Infektion wurde eine breit gefächerte antibiotische Therapie eingeleitet, die bei persistierendem Fieber oder den Zeichen einer Pilzinfektion um Amphotericin B erweitert wurde.
Routinemäßig wurden zwei Mal pro Woche Abstriche von Mund, Nase, Ohren, perianaler Region, Vagina oder Penis genommen, bei Temperaturen über 38 °C wurden Blutkulturen abgenommen. Wenn das Hämoglobin unter 8 g/dl abfiel, erhielten die Patienten Erythrozytenkonzentrate. Bei einem Abfall der Thrombozyten unter 20/nl, wurden Thrombozyten in Form von HLA-A / B- identischen, CMV-seronegativen Thrombozytenkonzentraten verabreicht.

Insgesamt erhielten 102 Patienten aus dem untersuchten Kollektiv 10-30 µg/(kg Tag) G-CSF (Neupogen, Hoffmann- La Roche, Grenzach-Wyhlen) als kontinuierliche Infusion ab Tag 1 (n=88), ab Tag 5 (n=1) bzw. ab Tag 10 (n=13).
Zur Prophylaxe einer Graft-Versus-Host-Reaktion (GVHD) erhielten die Patienten am Tag 1, 4, 7 und 11 niedrig dosiert Methotrexat (5 mg/m²) und von Tag 1-3 Cyclosporin A (3 mg/kg i.v.).

2.3 Definition des Engraftments

Den Tag des Leukozyten-Engraftments definierten wir als den Tag, an dem nach der aplastischen Phase die Leukozyten im Blut wieder über 1/nl angestiegen waren und auch dauerhaft > 1/nl blieben. Das Thrombozyten-Engraftment war definiert als Tag an dem die Thrombozyten im Blut > 20/nl waren und ohne Gabe von Thrombozyten-Konzentraten für mindestens 5 Tage > 20/nl blieben.

2.4 Blut,- und Urinproben

Die Blutproben, in denen die hier untersuchten Zytokine bestimmt wurden, sind täglich morgens um 8 Uhr (mit Ausnahme von Samstag und Sonntag) angefangen zwischen Tag -10 und Tag 10 (im Mittel Tag -3) bis zum Tag der Entlassung abgenommen worden. Das nach dem Gerinnen der Proben gewonnene Serum wurde bei -80 °C eingefroren und bis zur Verarbeitung aufbewahrt.
Der untersuchte Urin war Morgenurin, der an allen Tagen außer Samstag und Sonntag abgegeben wurde.

2.5 Zytokin-Messungen

2.5.1 IL-6-Assay

Die im Serum vorhandene Menge an IL-6 wurde mit einem standardisierten „Enzym Amplified Sensitivity Immunoassay“ (EASIA; Medgenix, Brüssel, Belgien) gemessen, basierend auf einem oligoklonalen System, bestehend aus mehreren monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope von IL-6. Auf diese Weise wurde eine Hypersensitivität verhindert und die Inkubationszeiten waren vergleichsweise kurz. Die Messungen wurden direkt an Plasma, bzw. Serum durchgeführt, ohne daß dieses speziell vorbehandelt werden mußte.
In diesem Assay wurden alle IL-6-Moleküle erfaßt, unabhängig davon ob sie frei, an löslichen IL-6-Rezeptor gebunden oder biologisch inaktiv vorlagen. Die Messungen wurden streng nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und mit kommerziellen Zytokin-Standard-Kurven geeicht, die bei jeder Messung mitgelaufen sind.
Es wurden zunächst monoklonale, sog. „ capture antibodies“ auf der Oberfläche der Plastik-Wells einer Mikrotiter-Platte angehaftet. Dann wurden die Standards, so wie auch die Proben hinzugefügt. Nach Inkubation und Auswaschen von nicht gebundenem Protein, wurden

monoklonale, „horseradish labelled“ IL-6-Antikörper hinzugegeben. Nach wiederum Inkubation und Auswaschen wurde die Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin – H_2O_2) zum Sichtbarmachen der gemessenen Zytokin-Konzentration hinzugefügt und die Reaktion nach einer weiteren Inkubationsphase, mit H_2SO_4 gestoppt. Die Absorption wurde schließlich bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch abgelesen. Sie ist proportional zur gemessenen IL-6-Konzentration. Die IL-6-Konzentration der Probe wurde dann durch Vergleich mit den erstellten Standard-Kurven ermittelt. Die Nachweis-Grenze lag bei 2 pg / ml für IL-6, der Variationskoeffizient des Assays war 5 %.

2.5.2 SCF-Assay

Die SCF-Konzentration im Serum der untersuchten Patienten wurde mittels eines „Solid Phase Sandwich Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA; Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) gemessen.
Es wurde, vom Prinzip her, ein monoklonaler Antikörper, spezifisch für SCF, in die vorgegebene Mikrotiter-Platte eingebracht. Standards und zu untersuchende Proben wurden dazu pipettiert und jegliches vorhandene SCF von dem auf der Platte haftenden Antikörper gebunden. Nachdem dann alle ungebundenen Proteine ausgewaschen waren, wurde ein enzymgebundener, polyklonaler Antikörper, der ebenfalls für SCF spezifisch war dazugegeben, um das während des ersten Schrittes immobilisierte SCF in „Sandwich-Technik“ zu binden. Nach einem weiteren Waschvorgang zum Entfernen von ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexen, wurde eine Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin – H_2O_2) hinzugegeben und die Reaktion wurde nach einer weiteren Inkubationsphase gestoppt. Die Intensität der entstandenen Farbreaktion wurde bei 450 nm photometrisch gemessen und war proportional zur SCF-Konzentration des im ersten Schritt an die Mikrotiter-Platte gebundenen SCF. Durch den Vergleich mit der vorbereiteten Standardkurve, ist die Höhe der SCF-Konzentration in der zu untersuchenden Probe zu bestimmen. Die untere Nachweisgrenze lag bei 3,0 pg / ml SCF, der Variationskoeffizient in dem Assay lag bei 1,5 - 4,5 %.

2.5.3 sIL-6-Rezeptor-Assay

Zur Quantifizierung von löslichem IL-6-Rezeptor im Serum wurde ein „Solid Phase Sandwich Enzym Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA; BioSource, Camarillo, California, USA) verwendet. Der ELISA erkannte sIL-6R als einfaches Molekül oder an IL-6 gebunden, jedoch interferierte er nicht mit IL-6 alleine.
Die Mikrotiter-Platte war mit einem spezifischen anti-IL-6-R-Antikörper beschichtet. Standards und Proben wurden zu diesem „capture“-Antikörper pipettiert und das sIL-6-R Molekül wurde an der Oberfläche der sog.“wells“ gebunden. Im gleichen Schritt wurde ein zweiter biotinylierter monoklonaler anti-IL6-R Antikörper, der gegen ein anderes Epitop gerichtet war, zugegeben. Dieser band an das bereits gebundene sIL-6R Molekül. Durch einen Waschschritt wurde der nicht gebundene Zweitantikörper entfernt und Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde hinzugefügt. Durch die Bindung des Streptavidin an Biotin wurde über die Verwendung einer Streptavidin-Biotin-Brücke ein Verstärkungseffekt und damit eine erhöhte Sensitivität erzielt. Ein weiterer Waschschritt entfernte das nicht gebundene Konjugat und es wurde schließlich die Substratlösung dazugegeben, die mit dem gebundenen Enzym einen Farbkomplex bildet. Die Intensität der Farbe war proportional zur

sIL-6R-Konzentration und wurde bei 450 nm gemessen. Die Nachweis-Grenze für sIL-6-R lag bei 5 pg / ml, der Variationskoeffizient des Assays bei 4 - 7 %.

2.5.4 TNF-α-Assay

TNF-α im Serum der untersuchten Patienten wurde mittels eines „Solid Phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay „ (EASIA; Medgenix, Brüssel, Belgien) gemessen.
Wie auch in dem EASIA zur Messung von IL-6 im Serum wurde ein oligoklonales System mit mehreren monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope von TNF-α verwendet. Es wurde streng nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen und mit geeichten Standard-Kurven verglichen. Das Prinzip der Messung funktionierte über einen monoklonalen TNF-α-Antikörper, der an eine Mikrotiter-Platte adsorbiert wurde und das TNF-α in den dann zugegebenen Proben und Standards gebunden hat. Nach Inkubation und Auswaschen von nicht gebundenem Protein, wurde ein weiterer Antikörper hinzugefügt, der den Komplex aus erstem Antikörper und TNF-α gebunden hat. Zum Sichtbarmachen der TNF-α-Konzentration wurde Tetramethylbenzidin-H_2O_2 als Substrat-Lösung hinzugegeben, und nach einer weiteren Inkubationsphase und dem Stoppen der Reaktion mit H_2SO_4 wurde die Absorption bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Nachweis-Grenze lag bei 3 pg / ml.

2.5.5 TNF-Rezeptor-Assay

Der sTNF-Rezeptor-ELISA (Medgenix, Brüssel, Belgien), ist ein „enzyme-linked immunosorbent assay“ zur quantitativen Erfassung von löslichem, humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor in Serum, Urin und anderen Körperflüssigkeiten.
Zunächst wurde ein monoklonaler sTNF-R-Antikörper an die „Mikro-Wells“ adsorbiert. An diesen Antikörper hat der in der Probe oder dem Standard vorhandene sTNF-R gebunden. Im nächsten Schritt wurde ein zweiter monoklonaler, HRP-konjungierter (Peroxidase-konjungierter) sTNF-R-Antikörper hinzugefügt, der den Komplex aus sTNF-R und erstem Antikörper band. Nach Inkubation und Herauswaschen des ungebundenen Antikörpers wurde eine Substrat-Lösung, die mit HRP reagiert zugegeben und es entstand ein farbiges Produkt, proportional zu der vorhandenen Menge sTNF-R in der Probe. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und gegen eine Standard-Kurve verglichen.

2.6 Statistische Auswertung

Um eine univariate Darstellung der Zytokinwerte über die Zeit zu geben, wurden jeweils drei Tage zusammengefasst, um so vorhandene Lücken auszugleichen. Die erhaltenen Mittelwerte dienten als Grundlage für die „whisker box plots“, in denen der tägliche Median, das erste und dritte Quartil sowie die Extrem-Werte enthalten waren.
Um zu errechnen, wie stark der Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Zytokin im Serum und den klinischen Parametern (CRP, Temperatur, Bilirubin, Kreatinin, GOT, GPT, γGT, Lipase, Leukozyten, Thrombozyten) war, wurden Spearman Rank Korrelationskoeffizienten (rs), getrennt für jeden Patienten berechnet, beginnend am Tag 0 (Tag der Transplantation). Diese Vorgehensweise war besonders geeignet, um monotone Beziehungen zwischen zwei Variablen aufzudecken und sie hatte den Vorteil, unempfindlich gegenüber Ausreißer-Werten

zu sein. Die Verteilung der einzelnen Korrelationskoeffizienten ist in den entsprechenden Tabellen dargestellt.
Vorzeichen-Tests wurden durchgeführt um zu untersuchen, ob die Korrelationskoeffizienten signifikant von 0 abwichen.
Desweiteren wurde jeder individuelle Korrelationskoeffizient an der Anzahl der Proben pro Patient gewichtet. Dies ergab den mittleren intraindividuellen Spearman Rank Korrelationskoeffizient rs (intraindividuell gewichtet) im Sinne eines zusammenfassenden Wertes.

3 Ergebnisse

3.1 Serum- Interleukin-6-Spiegel nach Knochenmarktransplantation

3.1.1 Zeitlicher Verlauf der IL-6-Serum-Spiegel

Die Höhe des IL-6-Spiegels im Serum wurde bei 66 Patienten täglich (außer Samstag und Sonntag) analysiert. Den Patienten wurde allogenes Knochenmark (n = 37), autologes Knochenmark (n = 8) oder periphere Blutstammzellen (n = 21) transplantiert. Die Messungen wurden drei Tage vor der Transplantation (Tag -3) begonnen und bis zum Tag der Entlassung aus dem Krankenhaus fortgeführt. Aufgrund der Tatsache, daß durch Wochenendlücken nicht an jedem Tag ein IL-6-Wert vorhanden war, wurden jeweils drei Tage zusammengefaßt. Bei 47 Patienten war von Tag -3 bis Tag 11 mindestens ein IL-6-Wert im Zeitraum von drei Tagen vorhanden (Abbildung 3-1). Getrennt für die drei verschiedenen Transplantationsarten wurde der natürliche Logarithmus der mittleren IL-6-Serum-Konzentrationen von drei aufeinanderfolgenden Tagen aufgetragen. In allen drei Gruppen fanden sich die höchsten IL-6-Werte am Tag 7 nach der Transplantation. Es zeigte sich kein Unterschied in der Höhe des IL-6-Spiegels zwischen Patienten, die G-CSF ab Tag 1 oder ab Tag 10 oder überhaupt nicht erhalten hatten.

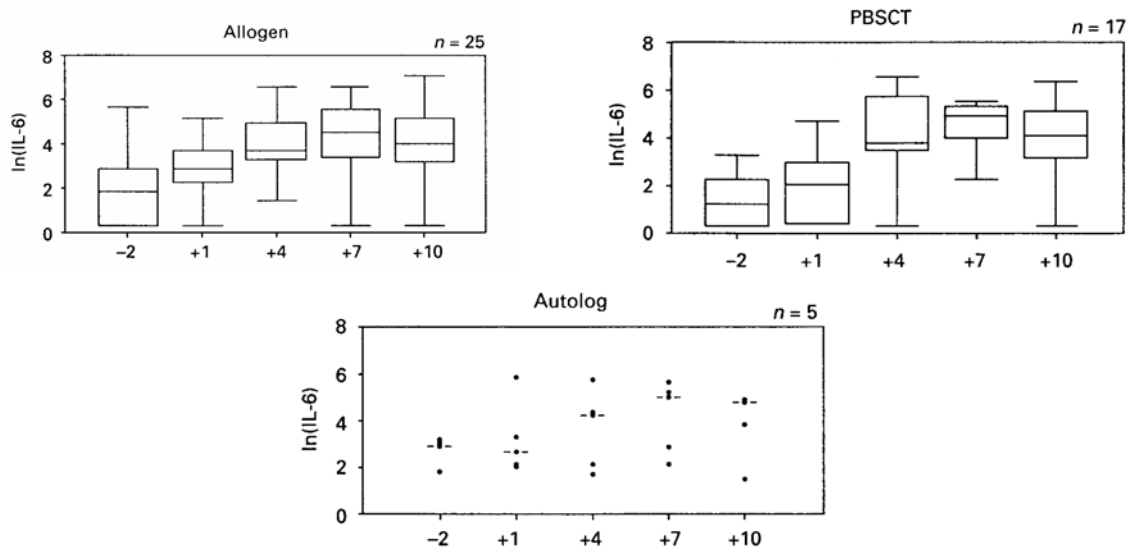

Abbildung 3-1
Der natürliche Logarithmus der mittleren IL-6-Serum-Konzentrationen (ng / ml) von jeweils 3-Tages-Intervallen wurde verwendet um Minimum, Maximum, 1. und 3. Quartil und den Median zu berechnen. Graphisch in Form von „Boxplots“ dargestellt für Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation und nach Transplantation peripherer Blutstammzellen. Wegen der geringen Anzahl von Proben wurden für die Patienten nach autologer Knochenmarktransplantation die individuellen IL-6-Serum-Werte graphisch dargestellt und der Median durch Querbalken angezeigt.

3.1.2 Beziehung zwischen IL-6 und CRP, Fieber und Bilirubin

Bei allen 66 Patienten wurden täglich morgens aus den Blutproben auch CRP und Bilirubin bestimmt und mit den IL-6-Spiegeln verglichen. Ebenfalls täglich wurde die Körpertemperatur gemessen.
Die jeweilige Beziehung zwischen IL-6 und CRP, Bilirubin und der Temperatur ist in Tabelle 3-1 zu sehen. In die Analyse der Beziehung zwischen IL-6 und CRP gingen 877 Messungen ein, die von 63 Patienten stammten. Der Spearman Rank Korrelationskoeffizient (r) betrug 0,44. Für IL-6 / Temperatur war r ebenfalls 0,44, basierend auf 862 Messungen, für IL-6 / Bilirubin war r = 0,18 ; hier gingen 920 Einzelwerte ein.

Tabelle 3-1
Spearman Rank Korrelation zwischen IL-6 im Serum und CRP, Körpertemperatur und Bilirubin.

	IL-6 / CRP	*IL-6 / Temperatur*	*IL-6 / Bilirubin*
Anzahl der untersuchten Patienten	63	66	66
Anzahl der Messungen pro Patient			
Maximum	27	24	27
Median	14	13	14
Minimum	4	2	4
Anzahl der Messungen (gesamt)	877	862	920
Verteilung der Spearman Rank-Korrelationskoeffizienten (rs)			
Maximum	0,95	1,00	0,87
3. Quartil	0,72	0,73	0,50
Median	0,49	0,47	0,27
1. Quartil	0,26	0,26	-0,09
Minimum	-0,31	-0,23	-0,65
p für Median	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Gewichteter intraindividueller rs	0,44	0,44	0,18

Zwischen der Höhe des IL-6 im Serum und des CRP als Entzündungsparameter, bzw. der Körpertemperatur ist, wie erwartet eine positive Korrelation zu sehen (Abbildung 3-2).
Da bei der großen Mehrheit der Patienten in den Phasen, wo Fieber auftrat, keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, war es nicht möglich, die IL-6-Spiegel mit spezifischen Infektionen zu korrelieren, sondern lediglich einen Zusammenhang zwischen IL-6 und Infektion im Allgemeinen aufzuzeigen.
Der Nachweis eines Zusammenhangs von erhöhten Bilirubin-Werten als Zeichen einer Leberdysfunktion im Rahmen z.B. einer VOD gelang in dieser Studie nicht.

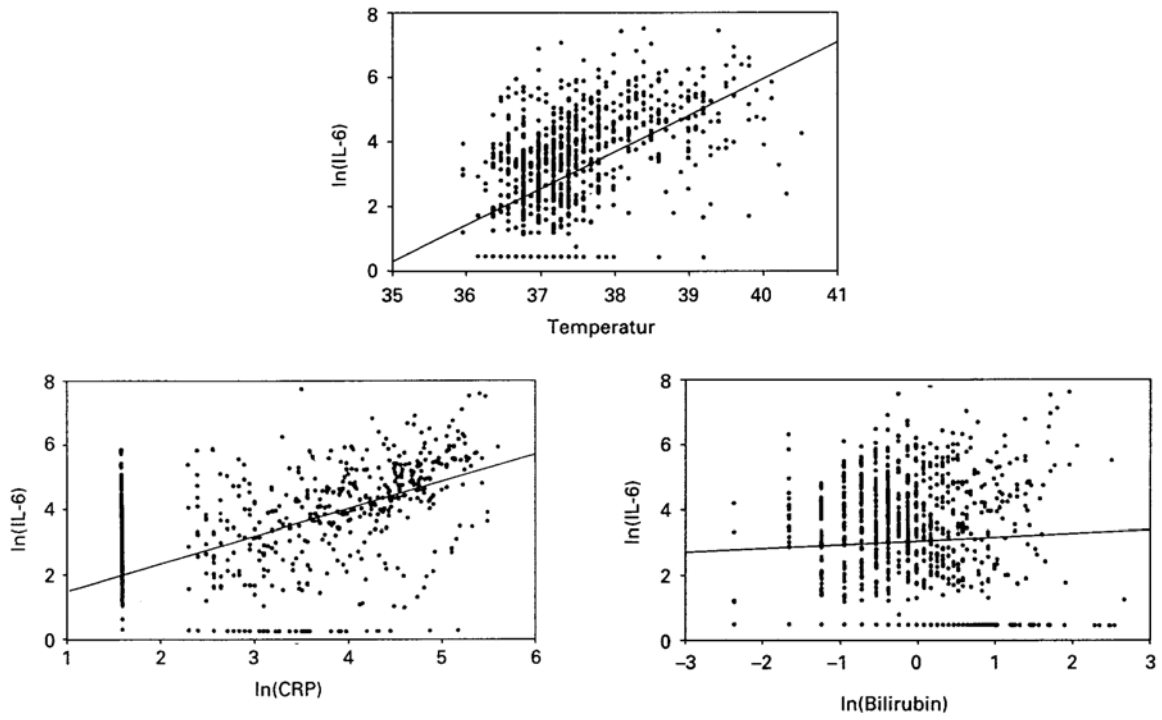

Abbildung 3-2
In dieser Abbildung ist der Serum-IL-6-Spiegel (in ng/ml) als „Scatterplot“ jeweils logarithmiert gegen die Körper-Temperatur in °C aufgetragen, sowie gegen den Logarithmus (ln) von CRP im Serum (in mg/l) und ln von Bilirubin im Serum (in mg/dl). Es sind die individuellen Werte aller 66 Patienten gezeigt. Zur Verdeutlichung der Korrelation sind Regressionsgeraden gezogen.

Darüber hinaus wurden aus der Population von 66 Patienten Untergruppen untersucht. In diese Untergruppen teilten wir Patienten mit gleicher Diagnose, gleicher Konditionierung und gleicher Transplantationsart ein:

1.) 10 Patienten mit AML, die als Konditionierung Busulfan, Cyclophosphamid und VP16 erhalten hatten und alle allogen transplantiert wurden,
2.) 9 Patienten, mit CML, die Busulfan und Cyclophosphamid, entweder mit oder ohne VP16 bekamen, gefolgt von einer allogene KMT,
3.) 6 Patienten, die unter einem M. Hodgkin litten, als Konditionierungsregimen BCNU, Cyclophosphamid und VP16 erhielten und mit autologem Knochenmark oder peripheren Stammzellen transplantiert wurden,
4.) 7 Mamma-Carcinom-Patientinnen die alle Cyclophosphamid, Thiotepa und Mitoxantrone bekamen und anschließend eine Transplantation peripherer Stammzellen.

Es wurden alle Parameter, die in der Gesamtpopulation untersucht wurden, in den vier Untergruppen getrennt analysiert. Dabei zeigten sich in fast allen Punkten gleiche Korrelationen in den einzelnen Untergruppen wie in der Gesamtgruppe. Die einzige Ausnahme bildete der Spearman Rank Korrelationskoeffizient r bei IL-6 / CRP. Er war in der CML-Untergruppe niedriger als in den übrigen Gruppen (r zwischen IL-6 und CRP: CML-Gruppe 0,15, AML-Gruppe 0,59, HD-Gruppe 0,35, BC 0,53, Gesamtpopulation 0,44)

3.1.3 IL-6 in Zusammenhang mit Leukozyten- und Thrombozyten-Engraftment

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Serum-IL-6-Spiegel und Leukozyten- und Thrombozyten-Engraftment nach KMT wurde auf zwei verschiedenen Wegen untersucht.
Zunächst wurden die täglich bestimmten Thrombozyten-Werte und Leukozyten-Werte direkt mit dem den jeweiligen Serum-IL-6-Spiegel korreliert (Abbildung 3-3). Der intraindividuelle Spearman Rank Korrelationskoeffizient r betrug hier -0,24 für IL-6 / Thrombozyten, bzw. -0,39 für IL-6 / Leukozyten. Das entspricht einer schwachen negativen Korrelation, die jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Tabelle 3-2).
Desweiteren wurde bei 50 der 66 Patienten, (die alle im Beobachtungszeitraum „engraftet" hatten) eine Korrelation zwischen dem Tag des Thrombozyten-Engraftments mit dem Tag des IL-6-Peaks, also dem im beobachteten Zeitraum gemessenen IL-6-Spitzenwertes untersucht. Hier war der Korrelationskoeffizient rs 0,43 (P=0,002) was möglicherweise einen Zusammenhang zwischen IL-6 und dem Thrombozyten-Engraftment anzeigt.
Bei 59 Patienten, die im Beobachtungszeitraum „engraftet" haben, wurde außerdem der Tag des Leukozyten-Engraftments mit dem Tag des IL-6-Peaks korreliert. Der gemessene intraindividuelle Korrelationskoeffizient r war 0,27. Ein Zusammenhang ähnlich dem zwischen IL-6 und Thrombozyten-Engraftment konnte hier für das Leukozyten-Engraftment also nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3-2
Spearman Rank Korrelation zwischen IL-6-Serum-Spiegeln und Thrombozyten,- bzw. Leukozyten-Zahlen.

	IL-6 / Thrombozyten	*IL-6 / Leukozyten*
Anzahl der untersuchten Patienten	66	66
Anzahl der Messungen pro Patient		
Maximum	27	27
Median	14	14
Minimum	4	0
Anzahl der Messungen (gesamt)	920	920
Verteilung der Spearman Rank- Korrelationskoeffizienten (rs)		
Maximum	0,51	0,39
3. Quartil	-0,11	-0,21
Median	-0,28	-0,50
1. Quartil	-0,44	-0,70
Minimum	-0,86	-0,86
p für Median	<0,0001	<0,0001
Gewichteter intraindividueller rs	-0,24	-0,39

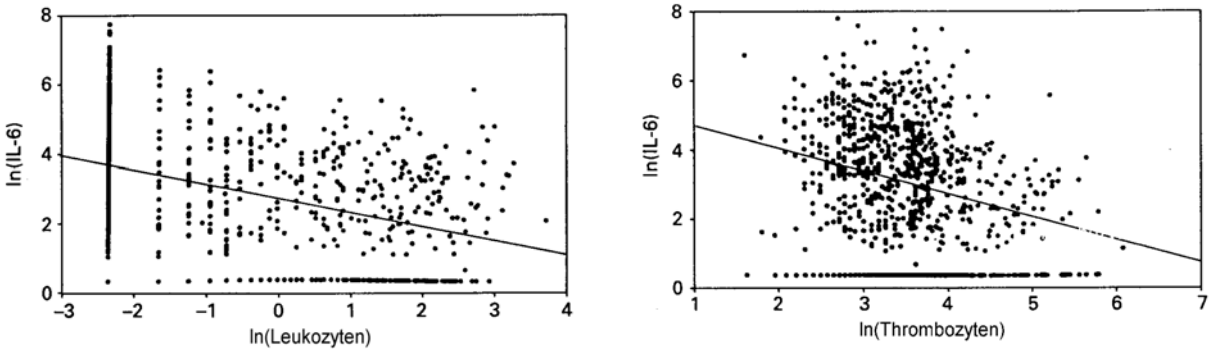

Abbildung 3-3
„Scatterplots“ des Logarithmus (ln) der Serum-IL-6-Werte (in ng / ml) gegen den Logarithmus (ln) der Thrombozyten -Zahlen (per nl) bzw. der Leukozyten -Zahlen (per nl). Es sind die Daten aller 66 Patienten dargestellt. Zur Verdeutlichung der Korrelation sind Regressionsgraden gezogen.

3.1.4 IL-6 und Graft-versus-Host-Disease

Von den 37 allogen transplantierten Patienten entwickelten 22 nach der KMT eine GvHD. Wir verglichen die Serum-IL-6-Spiegel dieser Patienten mit denen der Patienten, die nicht unter einer GvHD zu leiden hatten, bis 21 Tage nach Transplantation. Wir konnten dabei keine direkte Assoziation zwischen IL-6 und GvHD feststellen. Zur detaillierteren Analyse wurden weiterhin IL-6-Spiegel von Patienten ohne GvHD verglichen mit denen von Patienten mit einer GvHD Grad 1-2 und Grad 3-4 und mit solchen, die nur eine gastrointestinale GvHD Grad 0-1, bzw. 2-4 hatten.
Bei vier Patienten aus der Gruppe mit einer GvHD Grad 3-4 fanden sich die höchsten IL-6-Werte; im Vergleich waren sie höher als bei den anderen Patienten, und der IL-6-Peak wurde drei Tage später erreicht. Ansonsten fanden sich keine Unterschiede zwischen den Patienten der einzelnen Untergruppen, so daß es uns nicht möglich war, einen Zusammenhang zwischen dem IL-6-Spiegel im Serum und dem Auftreten einer GvHD aufzuzeigen.

3.1.5 Inverse Korrelation von IL-6 und sIL-6-Rezeptor

Es wurden von 82 Patienten, die sich einer allogenen, autologen oder syngenen Knochenmarktransplantation bzw. einer Transplantation peripherer Blutstammzellen unterzogen, die Serumwerte von IL-6 und sIL-6R in insgesamt 1481 Serumproben gemessen. Die Proben wurden täglich entnommen (mit Ausnahme des Wochenendes) beginnend am Tag -3 bis zum Tag +21 nach Transplantation.
Die durchschnittlichen IL-6 Serumwerte aller Patienten stiegen nach der Transplantation kontinuierlich an und erreichten am Tag 6 ihren Gipfel mit einem Mittelwert von 130 pg/ml. Danach fielen sie wieder auf die Höhe der Ausgangswerte ab. Im Gegensatz dazu beobachteten wir einen Abfall der durchschnittlichen sIL-6-Rezeptorwerte, die in denselben Serumproben gemessen wurden. Sie erreichten ein Minimum mit 70 pg/ml am Tag 6 und stiegen bis zum Tag 21 langsam wieder an (Abbildung 3-4).

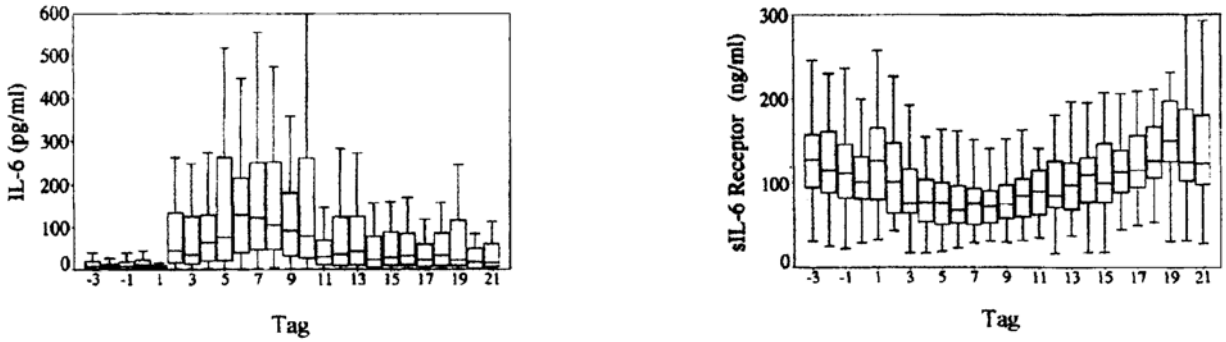

Abbildung 3-4
Mittlere IL-6,- und sIL-6R-Werte über die Zeit, von Tag -3 bis Tag +21 nach Knochenmarktransplantation bzw. Transplantation peripherer Blutstammzellen bei 82 Patienten. Minimum, Maximum, 1. und 3. Quartil sowie der Median sind graphisch durch „Boxplots“ dargestellt.

Es wurde kein Unterschied in der Höhe oder dem Anstieg bzw. Abfall der Serum IL-6- und sIL-6R-Werte beim Vergleich der verschiedenen Transplantationsarten und beim Vergleich der Patienten die G-CSF erhalten bzw. nicht erhalten hatten, festgestellt.
Die statistische Auswertung der gemessenen Werte ergab in der Berechnung des Spearman Rank Korrelationskoeffizienten eine negative Korrelation zwischen IL-6 und sIL-6R (Abbildung 3-5, Tabelle 3-3). Der gewichtete intraindividuelle Spearman Rank Korrelationskoeffizient lag bei - 0,53 ($p < 0,001$).

Tabelle 3-3
Spearman Rank Korrelation zwischen IL-6 und sIL-6R Serumwerten

	IL-6 / sIL-6R
Anzahl der untersuchten Patienten	82
Anzahl der Messungen pro Patient	
Maximum	33
3. Quartil	23
Median	18
1. Quartil	13
Minimum	8
Verteilung der Spearman Rank- Korrelationskoeffizienten (rs)	
Maximum	0,32
3. Quartil	-0,44
Median	-0,61
1. Quartil	-0,74
Minimum	-0,97
Gewichteter intraindividueller rs	-0,053 (p<0,001)

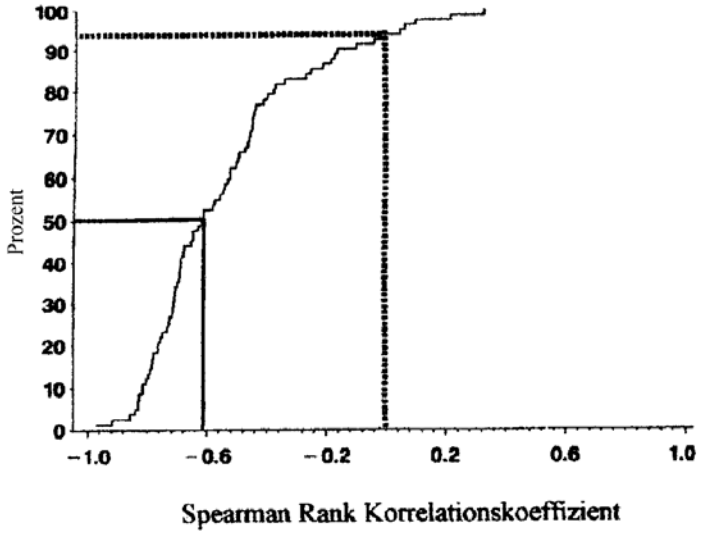

Abbildung 3-5
Kumulative Häufigkeiten der individuellen Korrelationskoeffizienten (in Prozent). Die fette Linie zeigt den Mittelwert (-0,61) an, die gezackte Linie zeigt, daß 95 % der Korrelationskoeffizienten kleiner oder gleich 0 sind.

3.2 Stammzellfaktor

3.2.1 SCF-Serum-Spiegel bei Patienten nach Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen

Bei 82 Patienten, die allogen (n=38), autolog (n=6) oder syngen (n=1) transplantiert wurden, bzw. eine Transplantation autologer peripherer Blutstammzellen (n=37) bekamen, wurde an 5 Tagen pro Woche täglich SCF im Serum gemessen und in insgesamt 1073 Proben analysiert (Tabelle 3-4).
Bei insgesamt 44 Patienten war bis zum Tag 14 nach KMT mindestens ein SCF-Wert in einem Zeitabschnitt von drei aufeinanderfolgenden Tagen vorhanden (Abbildung 3-6).

Tabelle 3-4
Anzahl der Patienten und Messungen

Anzahl der untersuchten Patienten	82
Anzahl der Messungen pro Patient	
Maximum	26
Median	13
Minimum	4
Anzahl der Messungen (gesamt)	1073

In der Gruppe der Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation stiegen die mittleren SCF-Werte bis zum Tag 14 an. Dieser von uns beobachtete Anstieg war allerdings nicht statistisch signifikant. In den beiden anderen Gruppen (nach autologer KMT und nach PBSCT) zeigten sich keine Änderungen der SCF-Serum-Konzentrationen in der beobachteten Zeit.
Wie schon bei IL-6 konnten wir auch hier keinen Unterschied zwischen Patienten, die G-CSF bekommen hatten und solchen, die kein G-CSF bekommen hatten feststellen.

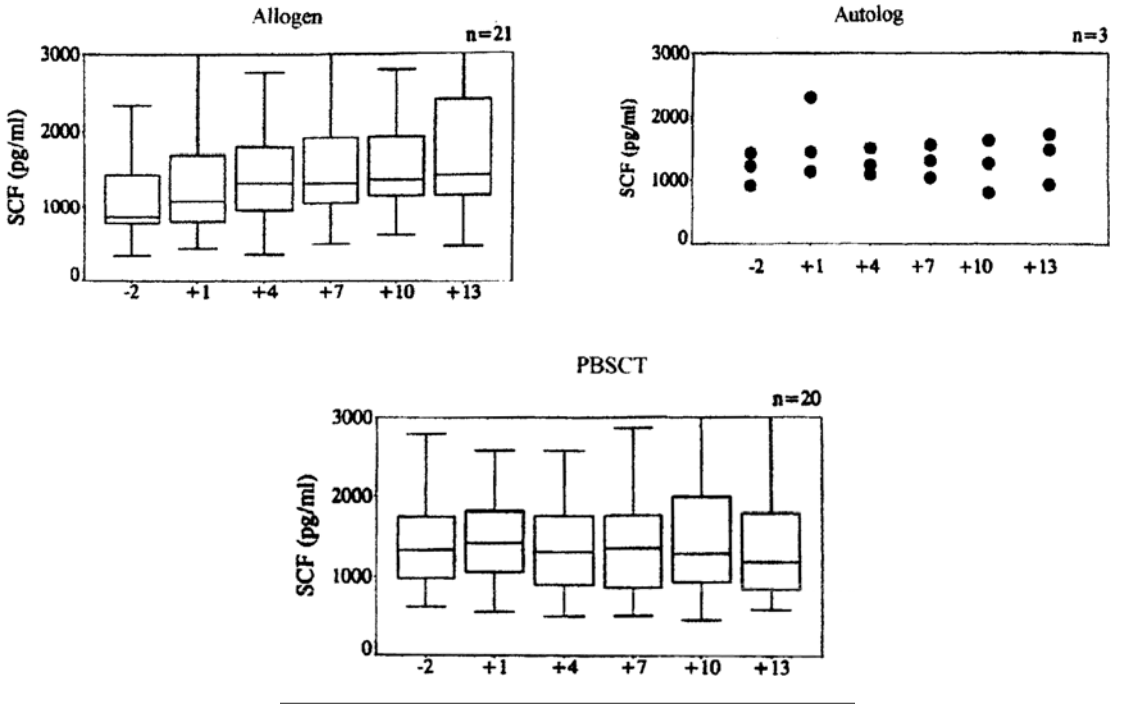

Abbildung 3-6
Die mittleren SCF Serum-Konzentrationen (in pg / ml) von 3-Tages-Intervallen wurden zur Berechnung von Minimum, Maximum, 1. und 3. Quartil und Median benutzt. Graphisch dargestellt in Form von „Boxplots“ für die Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation bzw. Transplantation peripherer Blutstammzellen (PBSCT). Wegen der geringen Anzahl von Proben wurden für die Patienten nach autologer Knochenmarktransplantation die individuellen SCF Serum-Werte aufgezeigt.

Zur genaueren Aufschlüsselung der Daten wurden vier Untergruppen gebildet, in denen Patienten zusammengefaßt wurden, die alle identische Diagnosen, Konditionierungsregimen und Transplantationsmodus hatten (Abbildung 3-7).

Gruppe 1): 5 Patienten mit AML. Konditionierung: Busulfan, Cyclophosphamid, VP16. Transplantationsmodus: allogen.
Gruppe 2): 6 Patienten mit CML. Konditionierung: Busulfan, Cyclophosphamid. Transplantationsmodus: allogen.
Gruppe 3): 8 Patientinnen mit Mamma-Carcinom. Konditionierung: Thiotepa, Mitoxantrone, Cyclophosphamid. Transplantationsmodus: PBSCT.
Gruppe 4): 8 Patienten mit NHL. Konditionierung: Cyclophosphamid, VP16 und entweder Busulfan oder TBI. Transplantationsmodus: PBSCT.

Die mittlere SCF-Serum-Konzentration stieg in der Gruppe 1 (AML) signifikant an, von 945 pg/ml auf 2394 pg/ml ($p<0,05$). Ebenfalls signifikant stieg die mittlere Serum-Konzentration in der Gruppe 2 (CML) von 829 pg/ml bis auf 1326 pg/ml. ($p< 0,05$). Im Gegensatz dazu war ein signifikanter Abfall der mittlere SCF-Serum-Werte in der Gruppe 3 (Mamma-Carcinom) zu erheben. Sie sanken von 1475 pg/ml auf 845 pg/ml ($p< 0,05$). In der Gruppe 4 (NHL) gab es zunächst einen Anstieg von 1273 pg/ml auf bis zu 1756 pg/ml und dann wieder einen Abfall auf 1225 pg/ml.

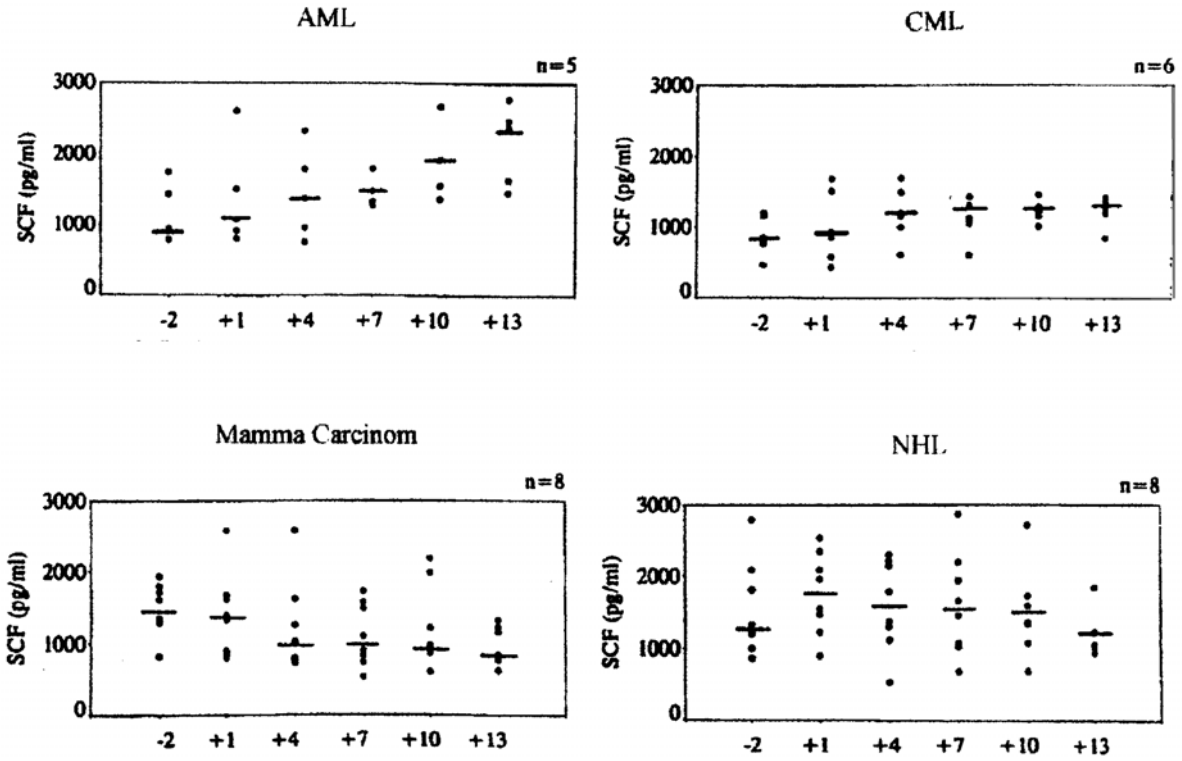

Abbildung 3-7
Verlauf der Serum-SCF-Konzentrationen über die Zeit bei Patienten mit AML bzw. CML, NHL oder Mamma-Carcinom . Dargestellt sind die individuellen SCF-Werte zusammengefaßt in 3-Tages-Intervallen vom Tag -3 bis zum Tag 14 nach der Transplantation. Der Median ist durch Querbalken angezeigt.

3.2.2 Beziehung zwischen SCF und Leukozyten- bzw. Thrombozyten-Engraftment

Von den 82 Patienten, die in diese Studie eingegangen sind, zeigte sich in dem von uns beobachteten Zeitraum bei 76 Patienten ein Engraftment der Leukozyten, bei 58 Patienten ein Engraftment der Thrombozyten.
Bei der Korrelation der gemessenen Serum-SCF-Werte mit den korrespondierenden Leukozyten- bzw Thrombozyten-Zahlen konnte keine Korrelation gefunden werden. Der intraindividuelle Korrelationskoeffizient (rs) betrug nur 0,13 bzw. 0,01 (Abbildung 3-8).
Außer diesem direkten Vergleich der SCF-Werte mit den Leukozyten- und Thrombozyten-Zahlen, wurden auch die mittleren SCF-Werte mit dem Tag des Leukozyten- bzw. Thrombozyten-Engraftment der einzelnen Patienten korreliert. Auch hier zeigte sich keine

klare Korrelation, die auf einen Zusammenhang zwischen der Höhe des SCF-Wertes im Serum und dem Engraftment der Leukozyten oder Thrombozyten hinweisen würde (Abbildung 3-9).

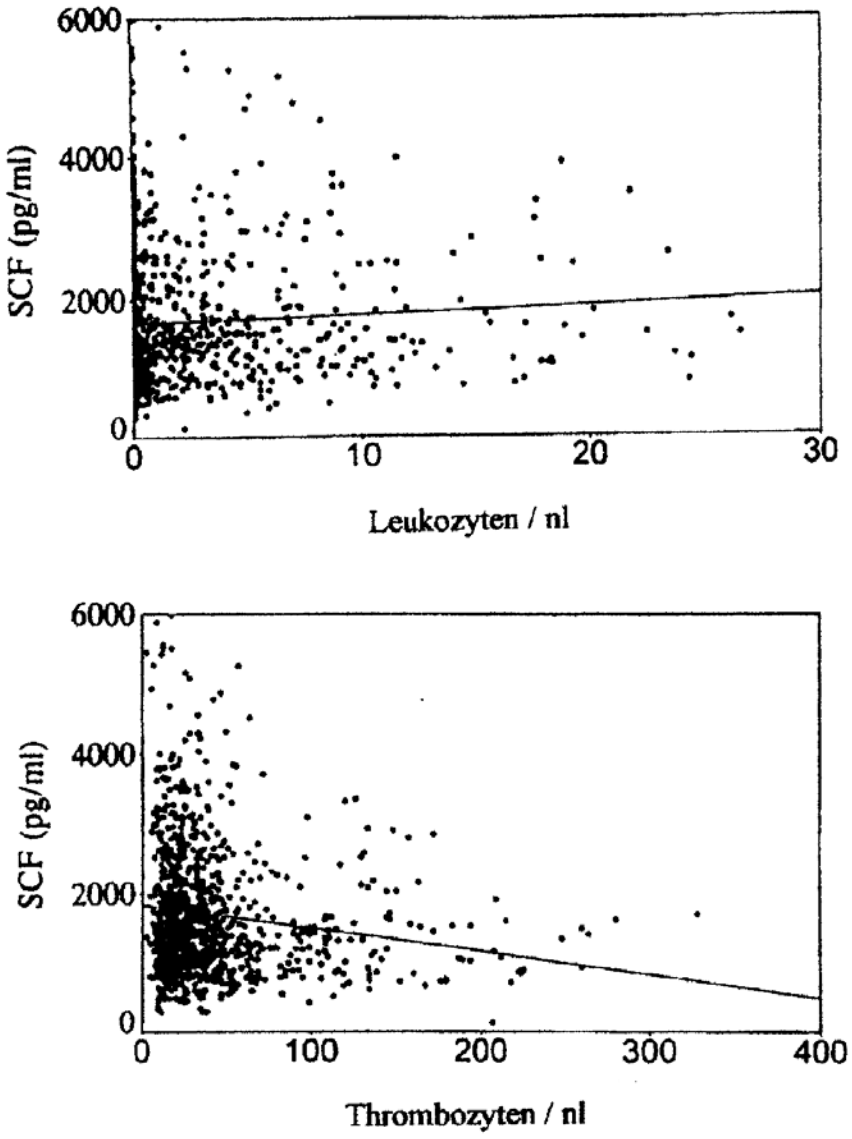

Abbildung 3-8
„Scatterplots“ von SCF (in pg / ml) und Leukozyten- bzw. Thrombozyten -Zahlen. Es sind alle 1073 korrespondierenden Werte von 82 Patienten gezeigt. Die fehlende Korrelation wird durch Regressionsgraden deutlich gemacht.

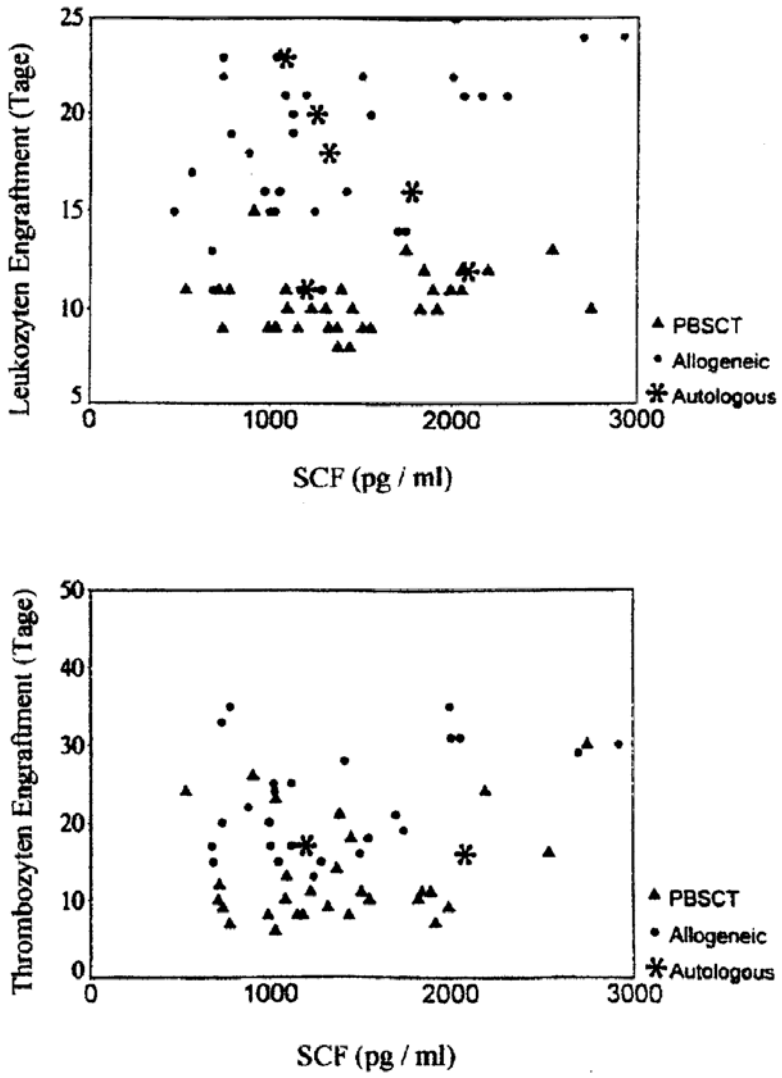

Abbildung 3-9
„Scatterplots" der mittleren SCF-Werte und dem Tag des Leukozyten- bzw. Thrombozyten -Engraftment. Dargestellt sind die individuellen Werte aller Patienten die nach allogener oder autologer Knochenmarktransplantation bzw. nach Transplantation peripherer Blutstammzellen engraftet haben.

3.2.3 SCF und Graft-versus-Host-Disease

Von den 38 allogen transplantierten Patienten entwickelten 28 im Verlauf nach der Transplantation eine GvHD. Dies wurde anhand klinischer Befunde diagnostiziert und dokumentiert.
Die Serum-SCF-Werte der ersten 14 Tage nach Transplantation der Patienten mit einer GvHD wurden mit den Werten der Patienten, die keine GvHD entwickelt haben verglichen. Dabei konnte keine Assoziation festgestellt werden. Ebenfalls kein Unterschied in den einzelnen Gruppen zeigte sich bei dem Vergleich der SCF-Werte der Patienten ohne GvHD gegenüber den Patienten mit einer GvHD Grad 0-1 (10 Patienten) bzw. den Patienten mit einer GvHD Grad 2-4 (18 Patienten).

Es war demnach in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Stammzellfaktors im Serum und dem Vorhandensein einer GvHD, gleich welchen Grades nachweisbar.

3.3 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha

3.3.1 TNF-α-Serum-Spiegel

Es wurden in der vorliegenden Arbeit bei insgesamt 112 Patienten täglich an 5 Tagen pro Woche die Konzentration von TNF-α im Serum sowie bei insgesamt 55 Patienten die Konzentration von TNF-α im Urin bestimmt. Alle Patienten unterzogen sich einer Transplantation von Knochenmark oder peripherer Blutstammzellen. Die Verteilung der Transplantationsart war wie folgt: autolog (n=12), allogen (n=56), syngen (n=2), PBSCT (n=42).
Wie bei den anderen Zytokinen auch, begannen wir mit den Messungen drei Tage vor der Transplantation und faßten jeweils drei Tage zusammen, um Lücken durch Wochenenden zu überbrücken. Der Verlauf von TNF-α über die Zeit vom Tag -3 bis zum Tag +11 wurde von 75 Patienten, bei denen mindestens ein Wert in einem Abschnitt von drei aufeinanderfolgenden Tagen vorhanden war, ausgewertet und graphisch als Boxplot dargestellt. Es zeigte sich, daß es zu keinem Anstieg oder Abfall der TNF-α-Werte während oder nach der erfolgten Knochenmarktransplantation kam (Abbildung 3-10).

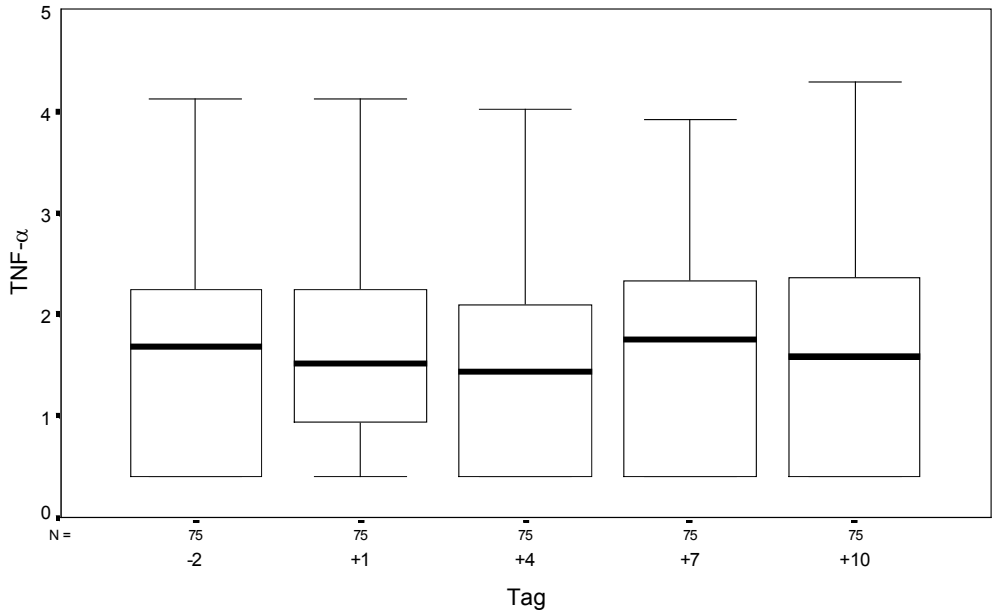

Abbildung 3-10
Mittlere TNF-α-Werte über die Zeit von Tag -3 bis 11 nach Knochenmarktransplantation, bzw. Transplantation peripherer Blutstammzellen bei 75 Patienten. Minimum, Maximum, 1. Und 3. Quartil sowie der Median sind graphisch durch „Boxplots“ dargestellt.

Desweiteren wurden die maximalen TNF-α-Konzentrationen des Gesamtkollektivs mit den Maximalkonzentrationen der einzelnen Gruppen verschiedener Transplantationsart

verglichen. Es zeigte sich, daß sich die Höhe der maximal gemessenen TNF-α-Konzentration in den einzelnen Gruppen nicht signifikant voneinander unterschied, obwohl in der Gruppe der allogen transplantierten Patienten die höchsten Einzelwerte gemessen wurden (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5
Verteilung der maximalen TNF-α- Konzentrationen gesamt und nach KMT-Art getrennt betrachtet.

	gesamt	*autolog*	*allogen*	*PBSCT*	*syngen*
Anzahl der untersuchten Patienten	112	12	56	42	2
Mittelwert	39,20	26,31	52,91	24,84	33,58
Standardabweichung	83,28	32,72	113,62	25,55	11,19
Verteilung der max. TNF--α-Konzentration					
Maximum	665,42	99,72	665,42	120,71	41,5
3. Quartil	37,29	31,13	46,47	36,39	-
Median	15,61	9,95	16,64	14,42	33,58
1. Quartil	8,46	7,77	8,76	7,53	25,66
Minimum	1,5	6,69	1,5	1,5	25,66
P für die Verteilung 0,4862					

3.3.2 Beziehung zwischen TNF-α und verschiedenen Laborparametern

Ein möglicher Zusammenhang zwischen TNF-α und Komplikationen während der Transplantation wird diskutiert. Daher wurden täglich bestimmte Laborwerte (Leukozyten, Thrombozyten, CRP, Bilirubin, Kreatinin, GOT, GPT, γGT) sowie die ebenfalls täglich gemessene Körpertemperatur mit der Höhe der TNF-α-Konzentration im Serum verglichen.
Hierbei wurde eine geringe Korrelation zwischen der Höhe der Leukozyten und TNF-α festgestellt, nicht jedoch zwischen Thrombozyten-Zahlen und TNF-α (Tabelle 3-6). Auch die Korrelation von TNF-α und CRP im Serum, bzw. Körpertemperatur ergab keinen statistisch erfassbaren Zusammenhang (Tabelle 3-6). Im Hinblick auf weitere mögliche transplantationsbedingte Komplikationen, verglichen wir außerdem die Höhe der täglich bestimmten Laborparameter GOT und GPT, sowie γGT, Bilirubin und Kreatinin mit der TNF-α-Serum-Konzentration (Tabelle 3-7). Eine durch erhöhte Transaminasen gekennzeichnete Leberschädigung ging in dem hier ausgewerteten Kollektiv nicht mit einer statistisch signifikanten Erhöhung der Konzentration von TNF-α einher; es konnte aber eine geringe Korrelation von TNF-α und γGT sowie von TNF-α und Bilirubin festgestellt werden. Statistisch signifikant korrelierte die Höhe des Serum-Kreatinins mit der Höhe der TNF-α-Konzentration mit einem Spearman Rank Korrelationskoeffizienten (rs) von 0,222 (p = 0,0000) (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-6
Spearman Rank Korrelation zwischen TNF-α i.S. und Leukozyten, Thrombozyten, CRP und Temperatur

	TNF-α / Leuk	*TNF-α / Thro*	*TNF-α / CRP*	*TNF-α / Temp*
Anzahl der untersuchten Patienten	108	109	106	109
Anzahl der Messungen pro Patient				
Maximum	34	34	25	34
Median	17	17	15	17
Minimum	8	8	6	8
Anzahl der Messungen (gesamt)	1861	1874	1517	1888
Verteilung der Spearman Rank-Korrelationskoeffizienten (rs)				
Maximum	0,955	0,780	0,952	0,857
3. Quartil	0,482	0,274	0,268	0,128
Median	0,252	-0,002	-0,029	-0,109
1. Quartil	0,023	-0,202	-0,235	-0,261
Minimum	-0,399	-0,782	-0,558	-0,716
p für Median	0,0000	1,000	0,382	0,102
Gewichteter intraindividueller rs	0,251	-0,007	-0,199	-0,102

Tabelle 3-7
Spearman Rank Korrelation zwischen TNF-α i.S. und GOT, GPT, γGT, Bilirubin und Kreatinin

	TNF-α / GOT	*TNF-α / GPT*	*TNF-α / γGT*	*TNF-α / Bili*	*TNF-α / Krea*
Anzahl der untersuchten Patienten	109	109	89	109	109
Anzahl der Messungen pro Patient					
Maximum	25	26	19	32	26
Median	15	17	5	17	17
Minimum	6	8	2	8	8
Anzahl der Messungen (gesamt)	1696	1812	572	1899	1818
Verteilung der Spearman Rank-Korrelationskoeffizienten (rs)					
Maximum	0,896	0,827	0,999	0,925	0,874
3. Quartil	0,384	0,251	0,324	0,149	0,429
Median	-0,016	-0,064	-0,263	-0,104	0,222
1. Quartil	-0,206	-0,257	-0,593	-0,282	0,007
Minimum	-0,718	-0,738	-0,999	-0,629	-0,502
p für Median		0,566	0,056	0,0847	0,0000
Gewichteter intraindividueller rs	0,007	-0,072	-0,228	-0,099	0,222

3.3.3 TNF-α-Spiegel in Serum und Urin

Außer den im Serum bestimmten TNF-α-Werten, wurde bei insgesamt 55 Patienten zusätzlich die Konzentration von TNF-α im Urin bestimmt. Im Hinblick auf die im Vergleich zu Serumproben einfacher zu gewinnenden Urinproben, untersuchten wir den Zusammenhang zwischen der Höhe der gemessenen TNF-α-Spiegel im Serum und im Urin derselben Patienten. Es zeigte sich eine schwache Korrelation, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Der Spearman Rank Korrelationskoeffizient betrug hier 0,1515 ($p = 0,055$).

Die Konzentration von TNF-α im Serum einerseits und im Urin andererseits, korreliert nach unseren Daten nicht derartig, daß Rückschlüsse von der Höhe des einen auf den anderen gemessenen Parameter gezogen werden können (Tabelle 3-8, Abbildung 3-11).

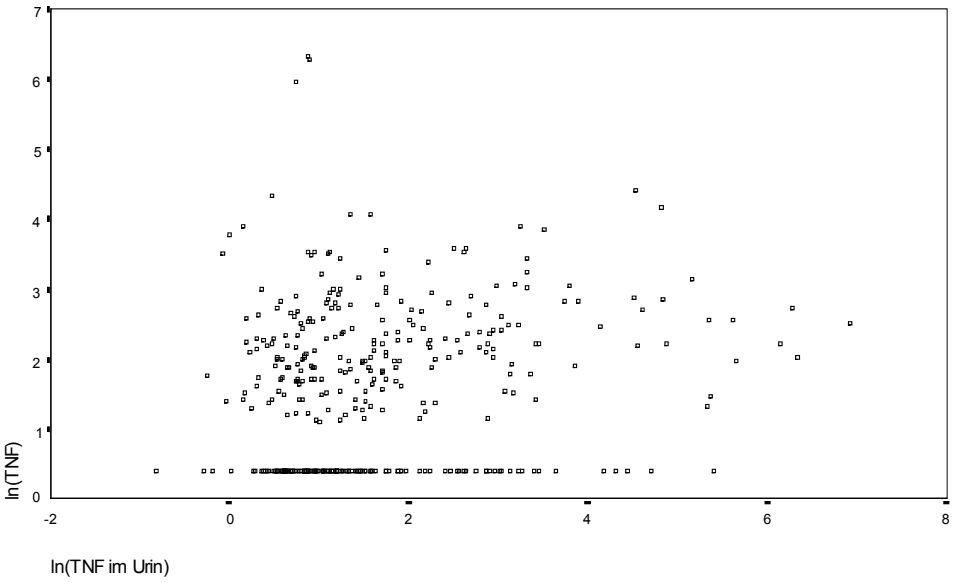

Abbildung 3-11
„Scatterplot“ des Logarithmus (ln) der TNF-α-Spiegel (in pg / ml) in Serum und Urin. Es sind mit 528 Messungen die individuellen Werte aller 55 Patienten gezeigt.

3.3.4 TNF-α und seine Rezeptoren

Außer TNF-α sind bei insgesamt 52 bzw. 50 Patienten 5 Mal pro Woche die TNF-Rezeptoren TNF-R1 (55 kDa) und TNF-R2 (75 kDa) bestimmt worden.
Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen der Höhe des TNF-α-Spiegels im Serum und der Höhe der Konzentration seiner Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 untersucht. Hierbei, wie in Tabelle 3-8 zu sehen ist, zeigte sich eine positive Korrelation (Tabelle 3-8, Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13). Der Spearman Rank Korrelationskoeffizient (rs), betrug 0,523 ($p = 0,0000$), basierend auf 778 Messungen für TNF-α / TNF-R1 und 0,648 ($p = 0,0000$) für TNF-α / TNF-R2; hier gingen 719 Einzelmessungen ein.

Tabelle 3-8

Spearman Rank Korrelation zwischen TNF-α im Serum und TNF-α im Urin, sowie den Rezeptoren TNF-R1 (55 kDa) und TNF-R2 (75 kDa)

	TNF-α i.S / TNF i.U	*TNF-α i.S / TN-R1*	*TNF-α i.S / TNF-R2*
Anzahl der untersuchten Patienten	55	48	46
Anzahl der Messungen pro Patient			
Maximum	25	27	27
Median	9	15	15
Minimum	4	7	7
Anzahl der Messungen (gesamt)	528	778	719
Verteilung der Spearman Rank- Korrelationskoeffizienten (rs)			
Maximum	0,9747	0,86	0,893
3. Quartil	0,3810	0,616	0,783
Median	0,1118	0,504	0,628
1. Quartil	-0,2277	0,122	0,383
Minimum	-0,8268	-0,306	-0,342
p für Median	0,055	0,0000	0,0000
Gewichteter intraindividueller rs	0,1515	0,523	0,648

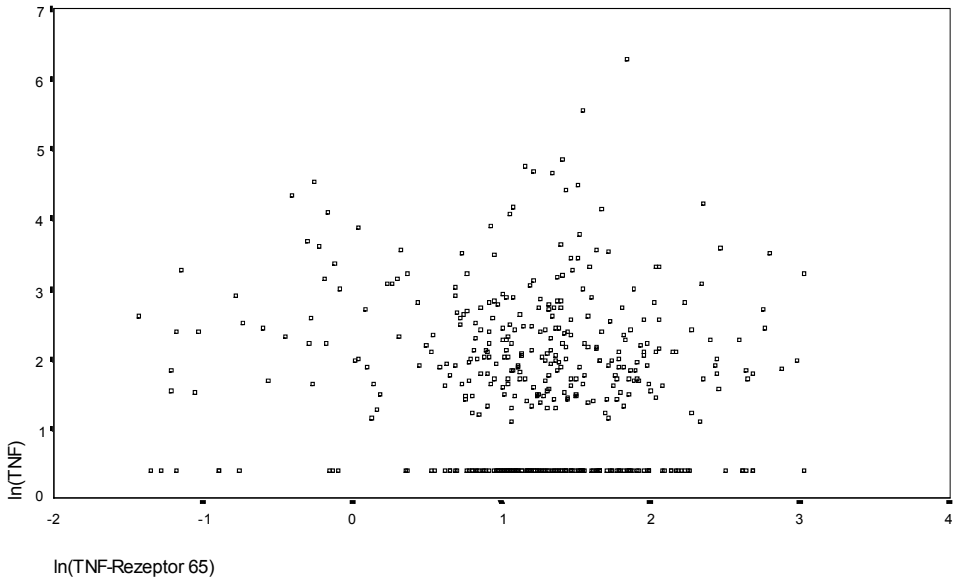

Abbildung 3-12

„Scatterplot“ mit dem Logarithmus (ln) der Serum-TNF-α-Spiegel (in pg/ml) aufgetragen gegen den Logarithmus (ln) der Konzentration des TNF-Rezeptors TNF-R1 im Serum. Es sind in 778 Messungen die individuellen Werte aller 48 Patienten gezeigt.

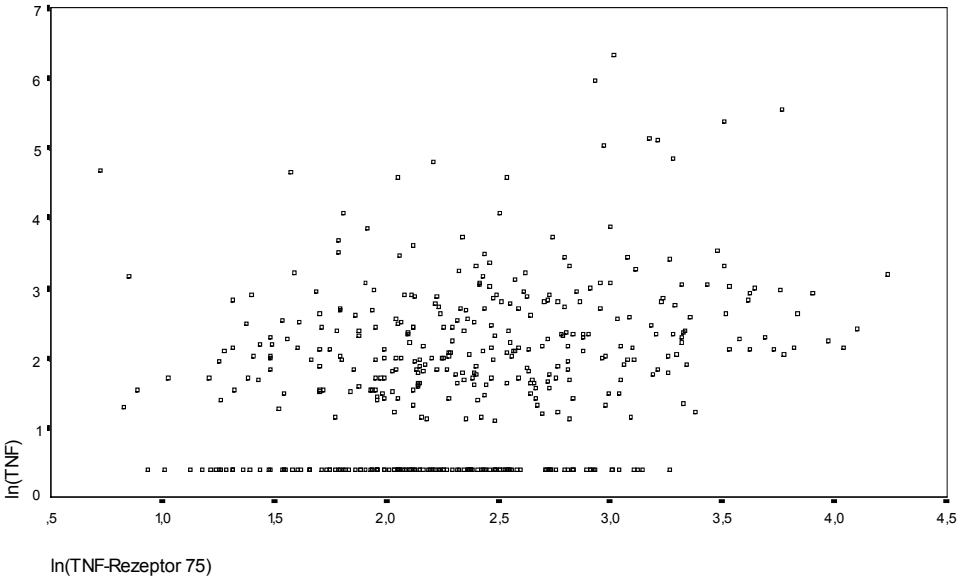

Abbildung 3-13
Serum-TNF-α-Spiegel (in pg/ml) als „Scatterplot" jeweils logarithmiert aufgetragen gegen den Logarithmus (ln) der Konzentration des TNF-Rezeptors TNF-R2 im Serum. Es sind in 719 Messungen die individuellen Werte aller 46 Patienten gezeigt.

3.3.5 Beziehung der TNF-α-Rezeptoren zu verschiedenen Laborparametern

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Serumspiegel einer der TNF-Rezeptoren und transplantationsassoziierten Komplikationen festzustellen, wurde die Korrelation zwischen den erhobenen laborchemischen Parameter, die Hinweise auf eine Infektion oder eine generelle Leberdysfunktion geben und der Konzentration der TNF-Rezeptoren im Serum untersucht.
Die Korrelation des TNF-Rezeptors R1 mit den verschiedenen Laborparametern (Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10) war positiv zwischen TNF-R1 und CRP mit einem Spearman Rank Korrelationskoeffizienten von 0,388 ($p = 0,0000$) sowie zwischen TNF-R1 und Bilirubin, $rs = 0,436$ ($p = 0,0001$).

Tabelle 3-9
Spearman Rank Korrelation zwischen TNF-R1 (55 kDa) i.S. und Leukozyten, Thrombozyten, CRP und Temperatur

	TNF-R1 / Leuk	*TNF-R1 / Thro*	*TNF-R1 / CRP*	*TNF-R1 / Temp*
Anzahl der untersuchten Patienten	51	52	52	52
Anzahl der Messungen pro Patient				
Maximum	29	29	25	29
Median	17	17	16	17
Minimum	7	7	6	7
Anzahl der Messungen (gesamt)	861	895	781	895
Verteilung der Spearman Rank-Korrelationskoeffizienten (rs)				
Maximum	0,708	0,819	0,964	0,019
3. Quartil	0,272	0,424	0,617	0,424
Median	0,083	0,109	0,420	0,109
1. Quartil	-0,251	-0,098	0,112	-0,098
Minimum	-0,704	-0,658	-0,470	-0,658
p für Median	0,4008	0,1614	0,0000	0,1614
Gewichteter intraindividueller rs	0,077	0,098	0,388	0,098

Desweiteren zeigte sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der Höhe des TNF-Rezeptors R2 und der Höhe der Leukozyten mit einem Spearman Rank Korrelationskoeffizient (rs) von 0,390 (p=0,0009) sowie eine negative Korrelation zur Anzahl der Thrombozyten. Der Spearman Rank Korrelationskoeffizient (rs) betrug hier -0,340 (p=0,0000). Ein statistisch allerdings keine Signifikanz erreichender Zusammenhang zwischen TNF-R2 und der Höhe des Serum-CRPs und des Bilirubins war erkennbar (Tabelle 3-11 und Tabelle 3-12).

Tabelle 3-10
Spearman Rank Korrelation zwischen TNF-R1 (55 kDa) i.S. und GOT, GPT, γGT, Bilirubin und Kreatinin

	TNF-R1 / GOT	*TNF-R1 / GPT*	*TNF-R1 / γGT*	*TNF-R1 / Bili*	*TNF-R1 / Krea*
Anzahl der untersuchten Patienten	52	52	45	52	52
Anzahl der Messungen pro Patient					
Maximum	25	25	14	29	25
Median	16	17	6	17	17
Minimum	6	8	2	8	8
Anzahl der Messungen (gesamt)	789	832	295	898	832
Verteilung der Spearman Rank-Korrelationskoeffizienten (rs)					
Maximum	0,865	0,809	1,000	0,900	0,845
3. Quartil	0,335	0,376	0,656	0,679	0,680
Median	-0,036	0,058	0,200	0,370	0,096
1. Quartil	-0,340	-0,249	-0,446	0,120	-0,222
Minimum	-0,774	-0,863	-1,000	-0,410	-0,784
p für Median	0,6774	0,4881	0,1748	0,0001	0,6714
Gewichteter intraindividueller rs	-0,031	0,077	0,227	0,436	0,234

Tabelle 3-11
Spearmen Rank Korrelation zwischen TNF-R2 (75 kDa) i. S. und Leukozyten, Thrombozyten, CRP und Temperatur

	TNF-R2 / Leuk	*TNF-R2 / Thro*	*TNF-R2 / CRP*	*TNF-R2 / Temp*
Anzahl der untersuchten Patienten	48	49	49	49
Anzahl der Messungen pro Patient				
Maximum	30	30	23	30
Median	16	17	15	17
Minimum	7	7	6	7
Anzahl der Messungen (gesamt)	793	809	722	827
Verteilung der Spearman Rank-Korrelationskoeffizienten (rs)				
Maximum	0,905	0,762	0,757	0,823
3. Quartil	0,587	-0,105	0,514	0,295
Median	0,365	-0,340	0,207	-0,080
1. Quartil	0,006	-0,517	-0,223	-0,268
Minimum	-0,573	-0,856	-0,701	-0,793
p für Median	0,0009	0,0000	0,0223	0,2531
Gewichteter intraindividueller rs	0,390	-0,340	0,206	-0,082

Tabelle 3-12
Spearman Rank Korrelation zwischen TNF-R2 (75 kDa) i. S. und GOT, GPT, γGT, Bilirubin und Kreatinin.

	TNF-R2 / GOT	*TNF-R2 / GPT*	*TNF-R2 / γGT*	*TNF-R2 / Bili*	*TNF-R2 / Krea*
Anzahl der untersuchten Patienten	49	49	42	49	49
Anzahl der Messungen pro Patient					
Maximum	23	25	14	30	25
Median	15	16	6	17	16
Minimum	6	8	2	8	8
Anzahl der Messungen (gesamt)	730	767	277	829	768
Verteilung der Spearman Rank-Korrelationskoeffizienten (rs)					
Maximum	0,857	0,832	1,000	0,861	0,807
3. Quartil	0,372	0,375	0,400	0,429	0,576
Median	0,095	0,143	-0,079	0,186	0,266
1. Quartil	-0,127	0,212	-0,550	-0,198	-0,109
Minimum	-0,687	-0,951	-1,000	-0,813	-0,561
p für Median	0,3914	0,2531	0,8744	0,0223	0,0606
Gewichteter intraindividueller rs	0,088	0,143	0,007	0,210	0,416

3.3.6 TNF-α und Graft-versus-Host-Disease

Von den 112 Patienten bei denen TNF-α im Serum bestimmt wurde, bekamen 56 Patienten allogenes Knochenmark transplantiert. Insgesamt 37 dieser Patienten entwickelten nach der Transplantation eine GvHD, 10 Patienten eine leichte (Grad 0-1), 27 Patienten eine mittlere bis schwere (Grad 2-4) GvHD.

Die Serum-TNF-α-Werte in den unterschiedlichen Gruppen wurden miteinander verglichen (Tabelle 3-13). Es zeigte sich beim Vergleich der Höhe der TNF-α-Werte im Serum, daß kein Unterschied in den einzelnen Gruppen festzustellen war. Die maximalen TNF-α-Konzentrationen waren zwar in der Gruppe der Patienten mit GvHD Grad 2-4 deutlich höher als in den anderen beiden Gruppen, der Median unterschied sich jedoch nicht (p für die Verteilung: 0,3070). Es war demnach bei dem ausgewerteten Probenmaterial einen Zusammenhang zwischen der Höhe des TNF-α-Serum-Spiegels und dem Auftreten einer GvHD nicht aufzuzeigen.

Tabelle 3-13
Verteilung der maximalen TNF-α-Konzentrationen bei Patienten ohne GvHD gegenüber Patienten mit GvHD Grad 0-1 bzw. Grad 2-4

	keine GvHD	*GvHD Grad 0-1*	*GvHD Grad 2-4*
Anzahl der untersuchten Patienten	75	10	27
Mittelwert	26,33	46,98	72,03
Standardabweichung	28,56	50,77	157,42
Verteilung der max. TNF--α-Konzentration			
Maximum	149,04	164,89	665,42
3. Quartil	36,20	74,03	62,60
Median	15,04	19,30	12,42
1. Quartil	8,60	14,34	6,78
Minimum	1,5	7,43	1,5
P für die Verteilung 0,3070			

3.3.7 TNF-α und Venocclusive Disease of the liver

14 der untersuchten Patienten entwickelten nach der Knochenmarktransplantation eine VOD, was anhand der von Jones festgelegten klinischen Kriterien (s. Seite 4, Einleitung) diagnostiziert wurde.
Die Höhe des TNF-α-Spiegels im Serum in den beiden Gruppen wurde verglichen. Es konnten jedoch auch hier, wie schon bei den Patienten mit oder ohne GvHD, keine Unterschiede in der Verteilung der TNF-α-Werte im Serum bei Patienten mit und ohne VOD festgestellt werden (Tabelle 3-14).

Tabelle 3-14
Verteilung der maximalen TNF-α-Konzentrationen bei Patienten ohne VOD gegenüber Patienten mit VOD

	keine VOD	*VOD*
Anzahl der untersuchten Patienten	98	14
Mittelwert	39,77	35,17
Standardabweichung	88,07	36,41
Verteilung der max. TNF--α-Konzentration		
Maximum	665,42	99,01
3. Quartil	36,69	71,40
Median	15,08	17,27
1. Quartil	8,43	8,11
Minimum	1,5	1,5
P für die Verteilung 0,7682		

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zytokin-Spiegel in Serum- und Urinproben von Patienten nach einer Knochenmarktransplantation bzw. einer Transplantation peripher Blutstammzellen gemessen. Da Zytokine als Mediatoren entzündlicher Prozesse und immunologischer Pathomechanismen gelten, wird ihnen auch in Zusammenhang mit transplantationsassoziierten Komplikationen, wie z.B. Infektionen, Graft-versus-Host-Disease oder Venoocclusive Disease der Leber eine entscheidende Rolle unterstellt. Die Hoffnung, die man an die Zytokinmessungen bei knochenmarktransplantierten Patienten knüpft, geht dahin, daß man in Zukunft aus der Höhe der Serumspiegel einzelner Zytokine ableiten kann, wie gut oder schlecht ein Patient die Knochenmarktransplantation vertragen hat und ob mit Komplikationen was das Anwachsen des Knochenmarks oder immunologische Reaktionen des Körpers betrifft, zu rechnen ist.

4.1 Interleukin-6

Wir untersuchten bei 66 Patienten, die eine Knochenmarktransplantation oder eine Transplantation peripherer Blutstammzellen bekommen hatten, die Beziehung zwischen IL-6 und CRP, Körpertemperatur und Bilirubin sowie die Beziehung des Zytokins zum Engraftment der Leukozyten und Thrombozyten und der Entwicklung einer GvHD. Bei 82 Patienten wurde desweiteren die Beziehung von IL-6 zu seinem Rezeptor untersucht. CRP und Körpertemperatur dienten uns als meßbare Parameter einer möglichen Infektion der Patienten, das Bilirubin wurde zur Beurteilung der Leberfunktion herangezogen.
Unsere Daten zeigen, daß die täglich erhobenen Serum-IL-6-Werte mit erhöhten CRP-Werten sowie mit erhöhter Körpertemperatur positiv korrelieren. IL-6 gilt als starker Induktor von Akut-Phase Proteinen wie z.B. CRP, Fibrinogen, Haptoglobin und Alpha-1-Antitrypsin in Hepatozyten (Castell et al., 1988). Die Akut-Phase-Reaktion ist eine systemische Antwort auf Entzündung oder Verletzung von Gewebe, die durch Leukozytose, Fieber, erhöhte Gefäßpermeabilität, Veränderung der Plasma-Konzentration z.B. von Steroiden und einem erhöhten Spiegel an Akut-Phase-Proteinen charakterisiert ist. Einen Hinweis auf die wichtige Rolle des IL-6 in der Akut-Phase-Reaktion gibt die Untersuchung von Nijstein et al., 1987, die eine gute Korrelation von IL-6 im Serum und CRP und Fieber bei Patienten nach schweren Verbrennungen ergab. Eine CRP-Erhöhung als Zeichen einer bestehenden (bakteriellen) Infektion bei Patienten nach Knochenmarktransplantation wurde von Walker et al., 1984 beschrieben. Im Einklang mit den von uns erhobenen Daten, wurde eine gleichzeitige Erhöhung von CRP (während Phasen von Fieber und Infektion) und IL-6 mehrfach in der Literatur beschrieben (Chasty et al., 1993; Schwaighofer et al., 1994). Sie ist vermutlich auf eine bakterielle Septikämie während der aplastischen Phase zurückzuführen. Obwohl der Nachweis von infektiösen Organismen nur in <50 % der Fälle gelingt, sind intermittierende Phasen einer Endotoxinämie wahrscheinlich der Auslöser für die Zytokin-Ausschüttung. Eine CRP-Erhöhung konnte desweiteren auch nach intravenöser oder subkutaner Injektion von IL-6 bei Primaten sowie auch bei Tumor-Patienten gesehen werden (Asano et al., 1990; Weber et al., 1993; D'HDondt et al., 1995), was den auch von uns beobachteten Zusammenhang der beiden Parameter unterstreicht.

Eine schwere Komplikation der Knochenmarktransplantation ist die Venooclusive Disease der Leber, wobei es durch eine nichtthrombotische Obliteration der kleinen intrahepatischen Venen zur hepatozellulären Nekrose kommen kann. Die Erkrankung, die bei ca. 20 % der knochenmarktransplantierten Patienten auftritt (McDonald et al., 1984) ist klinisch durch Hyperbilirubinämie (>2mg / dl), Gewichtszunahme > 5 %, Aszites und Hepatomegalie charakterisiert (Jones et al., 1987). Wir korrelierten in dieser Studie von 66 Patienten die Serum-Bilirubin-Werte mit den Serum-IL-6-Werten. Die errechneten Spearman Rank Korrelationskoeffizienten zeigten aber keinen Hinweis auf einen Zusammenhang von IL-6 und den Zeichen einer Leberdysfunktion. In einer anderen Studie, in der bei 22 Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation der IL-6-Serum-Peak gegen Zeichen hepatischer und renaler Dysfunktion aufgetragen wurde, konnte ebenfalls keine klare zeitliche Korrelation gefunden werden, obwohl die Patienten mit einem hohen IL-6-Peak, sowie die meisten Patienten mit mittelerem IL-6-Peak eine hepatorenale Dysfunktion entwickelten (Symington et al., 1992). Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtungen wäre, daß die IL-6-Produktion von einem Faktor, der mit dem Auftreten einer Leberdysfunktion assoziiert ist (z.B. Infektion), getriggert wird.
Eine weitere typische Komplikation der Knochenmarktransplantation ist das Auftreten einer Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD), bei der immunkompetente Spender-T-Lymphozyten gegen Alloantigene auf den Zellen des Empfängers reagieren. Durch die, im Zuge dieser Erkrankung auftretende Zerstörung der Mukosa des Intestinaltraktes, können Endotoxine sehr leicht die Darmwand durchdringen und so in die Zirkulation gelangen (Fegan et al., 1990). Dies führt u.a. zur Induktion von Akut-Phase-Proteinen. Symington et al., 1992 beschreibt dazu passend, daß in dem von ihm untersuchten Patienten-Kollektiv ausnahmslos hohe IL-6-Werte bei den Patienten gefunden wurden, die eine GvHD Grad 3 oder 4 hatten. Der IL-6-Peak ging in dieser Studie jeweils dem Auftreten der GvHD voraus. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse keine Assoziation von der Höhe des IL-6-Spiegels im Serum und dem Auftreten einer GvHD. Auch andere Studien, die diesen Zusammenhang untersucht haben, kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Es wurde einmal bei 13 (Chasty et al., 1993) und einmal bei 24 (Schwaighofer et al., 1994) Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation IL-6 und GvHD analysiert und keine Assoziation gefunden. Auch Rowbottom et al., 1993, kommen in einer Studie mit 10 Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation zu dem Ergebnis, daß sich IL-6 nicht als prognostischer Marker für eine GvHD eignet, da nur eine geringe Korrelation der beiden Parameter gefunden wurde. Dies läßt vermuten, daß IL-6 nicht direkt als Mediator für die Entwicklung einer GvHD dient, wenngleich ein indirekter Einfluß über den Weg der Aktivierung immunkompetenter Zellen durch das Zytokin denkbar ist. Es zeigt sich weiterhin, daß sich IL-6 nicht als Parameter zum Erkennen einer GvHD eignet.
Neben dem oben Genannten untersuchten wir auch einen möglichen Einfluß von IL-6 auf das Leukozyten- und Thrombozyten-Engraftment, also das Anwachsen der Spenderleukozyten- und Thrombozyten nach der Knochenmarktransplantation. In vitro konnte eine Beteiligung von IL-6 an der Proliferation und Differenzierung von Megakaryozyten, sowie ein positiver Einfluß auf die Anzahl der Thrombozyten nachgewiesen werden (Ishibashi et al., 1989). Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit von IL-3 noch verstärkt (Imai et al., 1991). Auch in vivo konnte durch IL-6-Gabe eine Zunahme der Thrombozytenzahlen und der Größe und Zahl der Megakaryozyten bei Mäusen (Hill et al., 1991) und bei Primaten (Stahl et al., 1991) beobachtet werden. In einer Studie von Takatsuki et al., 1990, wurde 5-Fluoruracil-behandelten Mäusen Interleukin-6 infundiert und damit eine schnellere Erholung der Thrombozyten-Zahlen im peripheren Blut sowie eine Stimulation der Erholung des hämatopoetischen- und Immunsystems erreicht. Ähnliche Ergebnisse erzielten Winton et al.,

1994 durch die Gabe von rekombinantem menschlichem Interleukin-6 (rhIL-6) und Interleukin-3 (rhIL-3) bei Primaten, die eine Hepsulfamin-induzierte Panzytopenie hatten. Auch bei einer durch Bestrahlung hervorgerufenen Knochenmarkdepression konnte sowohl in Studien mit bestrahlten Mäusen (Givon et al., 1994) wie auch mit Hunden (Burstein et al., 1992) und Pavianen (Herodin et al., 1992) durch Gabe von IL-6 eine Beschleunigung der Erholung der Thrombozytenzahlen gesehen werden. In Phase I-II Studien sind Patienten mit Ovarial- Mamma- oder nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen mit rekombinantem humanem IL-6 (rhIL-6) behandelt worden, mit dem Ergebnis, daß sich die durch die Chemotherapie stark reduzierten Thrombozyten schneller als in der Kontrollgruppe wieder erholten (Van Gameren et al., 1994; D'HDondt et al., 1995). Bei Patienten, die an einem Myelodysplastischen Syndrom und damit unter einer Thrombozytopenie litten, konnte in einer Phase-I-Studie durch rhIL-6 bei einigen von ihnen die Thrombopoese wieder angekurbelt werden, was die o.g. Effekte des Zytokins unterstreicht. Desweiteren sind erhöhte IL-6-Werte bei Patienten mit reaktiven Thrombozytosen (Hollen et al., 1991) und auch bei Patienten, die nach einer Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan und anschließender autologer Knochenmarktransplantation eine besonders schnelle Erholung der Thrombozyten boten (Beck et al., 1992), gefunden worden. Rabinowitz et al., 1993, berichten in einer Studie von 68 Patienten, die nach Hochdosis-Chemotherapie eine autologe Knochenmarktransplantation bekommen hatten und bei denen u.a. IL-6 gemessen wurde. Die Patienten mit hohen IL-6-Spiegeln (gemessen am Tag 12) hatten einen erhöhten Bedarf an Thrombozyten-Konzentraten, was darauf hinweisen könnte, daß IL-6 als Marker für eine Thrombozytopenie im Gefolge klinischer Probleme nach der Knochenmarktransplantation dienen kann. Man kann annehmen, daß diese thrombozytopenischen Patienten als Antwort auf die verminderten Thrombozyten-Zahlen eine vermehrte IL-6-Produktion aufweisen.
All diese Untersuchungen zeigen deutlich, daß IL-6 eine Rolle in der Kinetik der Thrombozyten spielt und in der Lage ist, auf Thrombopoese und Megakaryozyten-Differenzierung Einfluß zu nehmen. In Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten konnten wir in der vorliegenden Studie einen Zusammenhang zwischen IL-6 und dem Engraftment der Thrombozyten zeigen. Wir fanden eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Tag des IL-6-Spitzenwertes im Serum und dem Tag des Thrombozyten-Engraftments. Obwohl IL-6 in vitro zusammen mit GM-CSF nachweislich die Differenzierung der Granulozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen unterstützt (Caracciolo et al., 1989), konnten wir hier keinen Zusammenhang zwischen IL-6 und Leukozyten-Zahlen bzw. Leukozyten-Engraftment nachweisen. Zu diesem Ergebnis kommen auch die oben erwähnten Studien an 5-Fluoruracil-behandelten Mäusen (Takatsuki et al., 1990) und subletal bestrahlten Hunden (Burstein et al., 1992), bei denen die Gabe von rhIL-6 keine Veränderung der Leukozyten-Zahlen brachte. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Givon et al., 1994, bei denen ganzkörperbestrahlte Mäuse durch rhIL-6 eine schnellere Erholung der weißen Blutzellen boten und von Winton et al., 1994, die durch IL-6 eine Verkürzung der neutropenischen Phase während einer chemotherapieinduzierten Panzytopenie bei Primaten zeigen konnten.
Neben IL-6 wurde in den täglich abgenommenen Serumproben vom Tag -3 bis zum Tag 21 bei 82 Patienten auch der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6-R) bestimmt und die Beziehung des Zytokins zu seinem Rezeptor untersucht.
Das IL-6-Rezeptor-System besteht aus zwei Polypeptid-Ketten, d.h. einem membrangebundenen, ligandenspezifischen Anteil (gp 80) und einem für die Signalübertragung zuständigen Anteil (gp 130) (Kishimoto et al., 1995). gp 130 wird ubiquitär von Zellen nahezu aller Organe exprimiert (Saito et al., 1992), auch von solchen, die IL-6-R (gp 80) nicht exprimieren. Dies deutet darauf hin, daß gp 130 auch von verschiedenen

anderen Zytokinen und Zytokin-Rezeptoren als Signalüberträger genutzt wird. Von LIF (leukemia inhibitory factor), OM (oncostatin-M), IL-11 (interleukin-11), CT-1 (cardiotrophin-1) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) z.B. ist bekannt, daß sie gp 130 als Teil ihres Rezeptor-Systems benutzen (Kishimoto et al., 1995). IL-6-R wird von den verschiedensten Zellen und Geweben exprimiert, u.a. von Hepatozyten, Monozyten, Granulozyten, B- und T-Zellen und sogar von CD 34+ Vorläuferzellen des Knochenmarks (Kishimoto et al 1989; Sonne et al., 1990; Bauer et al., 1989; Wognum et al., 1993; Hirata et al., 1989).
Sowohl in Urin, wie auch in Serum konnte eine lösliche Form des IL-6-R nachgewiesen werden (Novick et al., 1989; Honda et al., 1992; Frieling et al., 1994). Diese lösliche Form (sIL-6-R) entsteht entweder abhängig von der Aktivität der Proteinkinase C, durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen IL-6-R (Müllberg et al., 1992; 1993; 1994) oder über „alternative splicing“ von RNA und anschließender Translation (Lust et al., 1992; Horiuchi et al., 1994). Auch sIL-6-R ist in der Lage mit gp 130, welches ebenfalls als lösliches Protein vorkommt, zu interagieren und die Funktionen des membrangebundenen Rezeptors zu erfüllen (Taga et al.,1989; Yasukawa et al., 1990).
Über die biologische Funktion und die klinische Relevanz des sIL-6-R ist bisher relativ wenig bekannt. Es ist anzunehmen, daß er eine Rolle in der Regulation der IL-6-Antwort spielt, evtl. verhindert der Komplex aus IL-6 und sIL-6-R den Abbau des Zytokins durch Proteasen, wie dies für IL-4 beschrieben ist (Fernandez-Botran et al., 1991), oder die Bioaktivität von IL-6 wird auf diese Weise konserviert, ähnlich wie bei TNF und seinem löslichen Rezeptor (Aderka et al., 1992). Denkbar wäre auch, daß der Komplex IL-6 / sIL-6-R zusammen mit gp 130 an der Oberfläche von Zellen bindet und so deren Sensibilität für IL-6 verstärkt.
IL-6 / sIL-6-R-Komplexe sind in hoher Konzentration im Serum von Patienten mit systemischer juveniler rheumatoider Arthritis (De Benedetti et al., 1994), sowie bei Patienten mit fortgeschrittenen, soliden Tumoren nach Immuntherapie mit rhIL-6 gefunden worden (May et al., 1994). In einer Studie mit 17 Patienten nach allogener und 7 Patienten nach autologer Knochenmarktransplantation konnte eine signifikante Erhöhung von sIL-6-R im Serum bei Patienten, die eine GvHD entwickelt hatten, gezeigt werden (Toren et al., 1996). Da auch erhöhte IL-6-Werte bei Patienten mit GvHD beschrieben wurden (Barak et al., 1995) unterstreicht die Beobachtung von Novick et al.,1992, die positive Interaktion zwischen Il-6 und seinem Rezeptor, wobei als auslösender Faktor der Zytokin-/ Rezeptor-Ausschüttung vermutlich die entzündliche Reaktion im Gefolge der GvHD wirksam ist. Ebenfalls erhöhte sIL-6-R-Werte zeigten in der selben Studie 3 Patienten mit einem frühen Rückfall. Dies könnte sIL-6R zu einem klinisch wichtigen Parameter zur frühzeitigen Entdeckung eines Rückfalls machen.
Einen Hinweis darauf, daß sIL-6-R eine Zunahme der IL-6-Wirkung hervorruft, gibt die Beobachtung, daß sIL-6-R die wachstumshemmenden, zytostatischen Effekte von IL-6 auf Mamma-Carcinom-Zellen verstärkt (Novick et al., 1992) und die IL-6- induzierte Bildung von Akut-Phase-Proteinen, wie α1-Antitrypsin und Haptoglobin in Hep-G2-Zellen erhöht (Mackiewicz et al., 1992). Untersuchungen an Patienten mit Monoklonaler Gammopathie geben Hinweise darauf, daß sIL-6-R als Agonist zu IL-6 auf Plasmazellen wirkt. IL-6 ist als wichtiger Wachstumsfaktor für maligne Zellen des Multiplen Myeloms in vitro bekannt und seine Überproduktion im Knochenmark von Patienten, die an dieser Krankheit litten in vivo nachgewiesen (Portier et al., 1991). Gaillard et al., 1993 zeigten, daß auch sIL-6-R bei Patienten mit Multiplem Myelom signifikant erhöht ist und damit verbunden eine bis zu 10fach verstärkte Sensibilität der Myelomzellen für IL-6 zu beobachten war. Die erhöhten sIL-6-R Werte zeigten keine Korrelation mit der Aktivität der Erkrankung und der Tumorzellmasse. Dies konnte in der eben genannten Studie an vier Patienten mit großer

Tumorzellmasse gezeigt werden, deren sIL-6-R-Serum-Werte von 135-235 ng /ml keine Veränderung im Verlauf der Erkrankung aufwiesen, unabhängig davon ob die Patienten nach der Knochenmarktransplantation eine komplette Remission erreichten oder einen Rückfall erlitten. Zwischen sIL-6-R, CRP und β2-Mikroglobulin, die als Prognosefaktoren beim Multiplem Myelom gelten, konnte in verschiedenen Studien ebenfalls keine Korrelation gefunden werden (Gaillard et al., 1993; Smith et al., 1996; Ohtani et al., 1995), so daß man annehmen muß, daß sich sIL-6-R nicht als Prognosefaktor eignet. Demgegenüber steht die Aussage einer Studie von Pulkki et al., 1996, in der bei 207 Patienten mit Multiplem Myelom IL-6 und sIL-6-R gemessen wurde und in der bei den Patienten, die binnen drei Jahren verstarben, signifikant höhere IL-6 und sIL-6-R-Werte gemessen wurden als bei den Patienten, die nach drei Jahren noch lebten. Der prognostische Wert von sIL-6-R bleibt demnach umstritten.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigen wir anhand von täglich im Serum bestimmtem IL-6 und sIL-6-R, daß IL-6 während der aplastischen Phase nach der Knochenmarktransplantation, bzw. der Transplantation peripherer Blutstammzellen ansteigt, mit einem Gipfel am Tag 6, gefolgt von einem langsamen Rückgang zu den Ausgangswerten. Die erhöhten IL-6-Werte korrelierten positiv mit CRP und Anstieg der Körpertemperatur und der Tag des höchsten IL-6-Wertes korrelierte mit dem Tag des Thrombozyten-Engraftments. Außerdem beobachteten wir eine negative Korrelation von IL-6 und sIL-6-R im Serum. IL-6 wurde mit einem ELISA gemessen, der alle IL-6-Moleküle unabhängig davon, ob sie frei oder an sIL-6-R gebunden waren erkannt hat und der ELISA zum Messen von sIL-6-R war gleichermaßen unbeeinflußt von IL-6. Die von uns beschriebene Abnahme von sIL-6-R im Serum bei Patienten nach einer Knochenmarktransplantation stimmt überein mit Daten von 4 Patienten nach autologer Knochenmarktransplantation bei Multiplem Myelom, bei denen ein ähnlicher Verlauf der gemessenen sIL-6-R-Werte beobachtet wurde (Gaillard et al., 1993). Dort hat allerdings kein Vergleich mit IL-6 stattgefunden.

Die von uns gezeigte negative Korrelation von IL-6 und sIL-6-R wurde in dieser Form bei Patienten nach Knochenmarktransplantation bisher nicht beschrieben. Lehrnbecher et al., 1995, berichten von signifikant erhöhten Werten für IL-6 und gleichzeitig signifikant erniedrigten sIL-6-R-Werten im Nabelschnurblut von 13 Neugeborenen, die an einer Sepsis litten. Sowohl IL-6 wie sIL-6-R wurden als frühe Marker für den Beginn einer Sepsis bei Neugeborenen gewertet. In einer anderen Studie wurde die Beziehung von IL-6 zu seinem Rezeptor bei 29 Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht und ebenfalls eine inverse Korrelation ($r = -0{,}618$) zwischen IL-6 und sIL-6-R gefunden (De Benedetti et al., 1994). Außerdem wurden bei zwei Patienten dieser Studie während eines Fieberschubes erhöhte IL-6-Werte, assoziiert mit erniedrigten sIL-6-R-Werten gemessen. Der Autor postuliert zwei Möglichkeiten zur Erklärung dieses Phänomens, die vielleicht auch eine Erklärung für unsere Beobachtung bei Patienten nach Knochenmarktransplantation oder Transplantation peripherer Blutstammzellen sind: 1.) IL-6 hat einen direkt inhibitorischen Effekt auf die Expression des sIL-6-R- Gens, 2.) zirkulierender sIL-6-R wird in Anwesenheit von IL-6 zur Bildung von IL-6 / sIL-6-R-Komplexen verbraucht, die später an Zellen, die das Signalübertragungsprotein gp 130 besitzen, gebunden werden können. Für 1. spricht die Tatsache, daß direkte Effekte von IL-6 im Sinne einer Downregulation der IL-6-R-Genexpression schon beschrieben wurden (Bauer et al., 1989). Desweiteren ist eine Upregulation der IL-6-R-Genexpression in vitro und in vivo in Myelomzellen denen IL-6 entzogen wurde, beobachtet worden (Portier et al.,1992), was annehmen läßt, daß das IL-6-R-Gen in Anwesenheit von IL-6 ständig unterdrückt wird. Ob eine derartige Genregulation auch für sIL-6-R existiert, ist bislang noch unklar.

Die von uns erhobenen Daten zeigen eine inverse Korrelation zwischen IL-6 und sIL-6-R bei Patienten nach Knochenmark- bzw. peripherer Stammzelltransplantation. Es muß in weiteren

Studien der genaue Mechanismus der Bildung und Regulation des sIL-6-R beleuchtet sowie seine physiologische und pathophysiologische Rolle im Organismus auch in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen erforscht werden.

4.2 Stammzellfaktor

Der Stammzellfaktor oder c-kit-Ligand , gehört so wie IL-6 zu den Zytokinen, die v.a. in der frühen Hämatopoese agieren. Auf der Ebene der hämatopoetischen Vorläuferzelle stimuliert SCF synergistisch mit G-CSF, GM-CSF und IL-3 die Proliferation und Differenzierung von Zellen der myeloischen, erythropoetischen und megakaryopoetischen Reihe (McNiece et al., 1991; Bernstein et al., 1991; Briddell et al., 1991). Für das Verständnis des komplexen Netzwerks von Interaktionen zwischen Vorläuferzellen und Knochenmarkstroma auf der einen Seite und verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf der anderen Seite, v.a. im Zusammenhang mit dem Engraftment nach der Knochenmarktransplantation bzw. der Transplantation peripherer Blutstammzellen, ist es wichtig, möglichst viel über die Regulation von Überleben, Proliferation und Reifung der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu wissen. Fraser et al., 1996, beschreibt das Engraftment als den kumulativen Effekt von sich überlappenden Wellen der Hämatopoese. In Kulturen von CD 34+ Zellen mit verschiedenen Zytokinen in Kombination, konnte gezeigt werden, daß ein optimales Wachstum der sog. „frühen“ Zellpopulationen nach der Posttransplantations-Neutropenie durch gleichzeitige Gabe von rhSCF, rhIL-3 und rhG-CSF erreicht werden konnte, während das Wachstum der „späteren“ Populationen optimal mit rhSCF, rhIL-3 und rhIL-6 gefördert wurde (Fraser et al., 1996). In einer ähnlichen Studie konnte in vitro mit einer Kombination aus sechs Faktoren (rhIL-1, rhIL-3, rhIL-6, rhG-CSF, rhGM-CSF und rhSCF) eine Zunahme der CD 34+ Vorläuferzellen um das 66fache in 14 Tagen erreicht werden. Die Zahl der reifen, kernhaltigen Zellen stieg sogar um das 1300fache (Haylock et al., 1992). In einer Studie von Brugger et al., 1993, wurden 36 verschiedene Kombinationen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verglichen. Am effektivsten zur Vermehrung der peripheren Blut- CD 34+ Vorläuferzellen beschreibt dieser Autor die Kombination aus rhIL-1, rhIL-3, rhIL-6, rhSCF und rhEPO.
Seitdem SCF kloniert wurde ist es als essentieller Bestandteil in allen Zytokin- / Wachstumsfaktor-Kombinationen, die zur Förderung der Vermehrung und Reifung unreifer Knochenmark- und peripherer Blutzellen eingesetzt werden, enthalten.
Eins der entscheidenden Probleme nach der Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen ist die Neutropenie und Thrombozytopenie, die als Ursache für häufig auftretende klinische Probleme, wie Infektionen, Blutungsneigung etc. anzusehen ist. Durch die Gabe von rhG-CSF und rhGM-CSF post transplantationem, konnte die Dauer der Neutropenie und Thrombozytopenie entscheidend verkürzt werden (Neumunaitis et al., 1991). Von SCF ist bekannt, daß es in vivo zusammen mit G-CSF Knochenmark,-und periphere Blutprogenitorzellen mobilisieren kann. Dies wurde in einer Studie mit Mäusen gezeigt, die 14 Tage mit G-CSF alleine oder in Kombination mit SCF behandelt wurden und deren dann entnommenes Knochenmark eine um den Faktor 10 erhöhte Fähigkeit zur Koloniebildung hatte, verglichen mit unbehandeltem Knochenmark (Bodine et al., 1996). In einer anderen Studie konnte durch 10tägige Behandlung mit G-CSF alleine bzw. mit G-CSF plus SCF eine 93fache, bzw. 169fache Steigerung der koloniebildenden Milzzellen im peripheren Blut von Mäusen gesehen werden (Drize et al., 1996). Desweiteren ist in klinischen Phase I / II Studien an Patienten mit fortgeschrittenen Mammacarcinomen, die eine

Hochdosischemotherapie, gefolgt von einer Transplantation peripherer Blutstammzellen bekommen hatten, durch die Gabe von G-CSF und SCF gegenüber G-CSF alleine, eine 2 - 4fache Zunahme der CD 34+ Zellen zu verzeichnen gewesen (McNiece et al., 1993), was die Bedeutung des Stammzellfaktors nochmals unterstreicht.
Da die absoluten Zellzahlen der ex vivo angereicherten Zellkulturen, nur relativ gering ist (ca. doppelt so hoch wie in der Kontrolle), ist zu vermuten, daß die, verschiedenen Zytokinen ausgesetzten Progenitorzellen, das Engraftment noch über andere Mechanismen verbessern: Erstens könnte eine größere Zahl von Progenitorzellen entstehen, die mit einem hohen, flüchtigen Potential für ein Engraftment ausgestattet sind, desweiteren vermutet man, daß die Stamm-und Vorläuferzellen durch die Zytokine ein besseres „homing“ im Knochenmark und dadurch ein schnelleres Engraftment erreichen (Holyoake et al., 1996). Dies könnte mit einer erhöhten Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle zu tun haben (Tavassoli et al., 1990 ; Levesque et al., 1995; Hardy et al., 1995). Einer weiteren Frage in Hinsicht auf die Effektivität von Zytokinen im Rahmen der Knochenmarktransplantation gingen Holoyake et al., 1996, nach, indem sie die Langzeit-Erholung des Knochenmarks nach ex vivo Behandlung mit SCF und IL-11 untersuchten. Das Potential zum kurzfristigen Engraftment wird durch die genannten Zytokine extensiv gesteigert (Neben et al., 1994; Quesniaux et al., 1992). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Hämatopoese auch nach Mehrfachtransplantationen aufrecht erhalten wurde. Da durch Mehrfachtransplantationen die Kapazität von Knochenmarkzellen zur langfristigen Repopulation normalerweise verloren geht, weist diese Untersuchung auf eine Wirkung von SCF und IL-11 auf die Fähigkeit zum langfristigen Wiederanwachsen des transplantierten Knochenmarks hin (Holoyake et al., 1996).
In der vorliegenden Arbeit wurden die Serum-SCF-Werte von insgesamt 82 Patienten vor und nach Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen analysiert. Während in der Gruppe der Patienten nach autologer Knochenmarktransplantation keine besondere Fluktuation der SCF-Konzentrationen zu sehen war, sind die Serum-SCF-Werte bei den allogen transplantierten Patienten bis zum Tag +14 kontinuierlich angestiegen. Der Anstieg erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Wir analysierten desweiteren verschiedene Untergruppen, in denen Patienten mit gleicher Diagnose und gleichem Konditionierungsregimen zusammengefaßt wurden. Wir stellten einen signifikanten Anstieg der SCF-Konzentrationen im Serum von 5 Patienten, die an einer AML litten und von 6 Patienten mit einer CML fest. Sie alle hatten Busulfan, Cyclophosphamid und VP-16 zur Konditionierung und anschließend eine allogene Knochenmarktransplantation bekommen. Demgegenüber beobachteten wir einen Abfall der SCF-Serum-Werte in der Gruppe der Mamma-Carcinom-Patientinnen, die vor ihrer Transplantation peripherer Stammzellen mit Thiotepa, Mitoxantrone und Cyclophosphamid behandelt worden waren. Bei den NHL-Patienten stieg SCF zunächst an und fiel im weiteren Verlauf wieder ab. Die Gründe für die von uns beobachteten Unterschiede in der Höhe und im Verlauf von SCF im Serum über die Zeit sind bisher unklar. Sowohl der Transplantationsmodus, wie auch das Konditionierungsregimen bzw. eine Kombination aus beidem könnte eine Rolle spielen.
In einer anderen Untersuchung wurde SCF im Serum von 15 Lymphom- bzw. Leukämie-Patienten und 6 Ovarial-Carcinom-Patientinnen gemessen, die eine periphere Stammzelltransplantation oder eine autologe Knochenmarktransplantation bekommen hatten. Vergleichbar mit unseren Ergebnissen, konnte auch in dieser Studie keine signifikante Fluktuation von SCF gezeigt werden (Testa et al., 1994). In einer Studie mit Frühgeborenen, die häufig unter einer Dysregulation der Hämatopoese im Sinne einer peripheren Zytopenie leiden, wurde unter der Annahme, daß sich der Mangel an hämatopoetischen Progenitorzellen in einer veränderten SCF-Konzentration niederschlägt, im Serum von Frühgeborenen im

Vergleich zu reifen Neugeborenen und Erwachsenen die SCF-Konzentration gemessen. Auch hier war kein signifikanter Unterschied in den einzelnen Gruppen zu verzeichnen (Cairo et al., 1993). Die Messung der SCF-Konzentrationen im Serum von 32 Patienten mit Aplastischer Anämie ergab zwar keine Korrelation zwischen der Höhe des SCF im Serum und peripheren Blutzellzahlen, aber es zeigte sich, daß trotz einer relativ großen Streubreite, die SCF Konzentrationen bei den Patienten mit Aplastischer Anämie verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe eher niedrig waren, woraus die Untersucher folgern, daß der Proliferationsdefekt der aplastischen Zellen u.a. mit einer unzureichenden Versorgung mit SCF zusammenhängt (Wodnar-Filipowicz et al., 1993). Daraus könnten sich in Zukunft therapeutische Konsequenzen für solche hypoproliferativen, hämatologischen Erkrankungen ergeben.
Die Frage, warum SCF auf relativ konstanter Höhe im Serum bleibt, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Die im Serum gemessenen Konzentrationen müssen nicht zwangsläufig die lokalen Konzentrationen des Zytokins im Knochenmarkstroma widerspiegeln, die von der funktionellen Bindung der einzelnen Zytokine zur extrazellulären Matrix und / oder der Stromazellen beeinflußt werden. Trotz der geringen Fluktuation, die sich in den bisherigen Untersuchungen ergeben hat, ist denkbar, daß SCF synergistisch bzw. additiv die biologische Aktivität anderer Zytokine unterstützt. Im Gegensatz zu SCF zeigen verschiedene andere Zytokine durchaus unterschiedliche Serumkonzentrationen im Verlauf nach einer Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen. Von TNF-α z.B. wird beschrieben, daß es transplantationsbedingten Komplikationen vorrausgeht und somit als Marker zur frühzeitigen Erkennung solcher Komplikationen dienen kann (Holler et al., 1990). Auch IL-6 zeigt, wie schon beschrieben, einen Anstieg der Serumkonzentration nach der Knochenmarktransplantation mit einem Maximum am Tag 6 und einer engen Korrelation zu CRP und Fieber, was die Rolle des Zytokins in der Akut-Phase-Reaktion, die oftmals im Rahmen von transplantationsassoziierten Problemen auftritt, deutlich macht. Desweiteren korreliert der Tag des höchsten IL-6-Wertes mit dem Tag des Thrombozyten-Engraftment. Ein Einfluß von IL-6 auf das Thrombozyten-Engraftment ist somit denkbar.
In der Phase nach einer Knochenmarktransplantation werden über ein koordiniertes und kompliziertes Schema Zytokine ausgeschüttet, die zur Erholung des hämatopoetischen Systems beitragen. In einer Studie von Cairo et al., 1992, konnte eine Assoziation von endogener G-CSF-Produktion und dem Engraftment der Leukozyten gefunden werden. Bei Patientinnen mit einem Ovarialcarcinom, die eine Chemotherapie, gefolgt von einer Transplantation peripherer Stammzellen bekommen hatten, konnte zunächst ein Anstieg von GM-CSF (Tag 5 bis Tag 10) und im Weiteren ein Anstieg von G-CSF und IL-8 (Tag 12 bis Tag 14) gezeigt werden, was wiederum einen Anstieg der Neutrophilen zur Folge hatte (Baiocchi et al., 1993). Ein ähnliches Zusammenspiel verschiedener Zytokine zeigt die Untersuchung von Testa et al., 1994. Untersucht wurden hier im Serum von 15 Lymphom- bzw. Leukämie-Patienten und 6 Ovarial-Carcinom-Patientinnen SCF, LIF, IL-3, IL-6, IL-8, und G-CSF vor und nach Hochdosis-Chemotheapie und Transplantation von peripheren Blutstammzellen, bzw. von autologem Knochenmark. Während LIF ab Tag -1 deutlich absank, stieg IL-3 im Serum schon vor der Transplantation an, um gleich danach wieder die Ausgangswerte zu erreichen. Ein relativ simultaner Anstieg von IL-6 (Peak am Tag 6), G-CSF und IL-8 nach der Transplantation war direkt korreliert mit dem Erreichen der höchsten Granulozyten-Zahlen in der Erholungsphase des Knochenmarks. Die Rolle des Stammzellfaktors in diesem komplizierten Zusammenspiel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird in Zukunft weiterhin intensiv erforscht werden müssen.

4.3 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha

TNF-α ist ein Zytokin mit einer großen Vielfalt an biologischer Aktivität. Es gilt insbesondere als Entzündungsmediator, als Immunmodulator für die Proliferation und Differenzierung zytotoxischer T-Zellen und als Vermittler zytotoxischer Eigenschaften auf Tumorzellen. TNF-α wurde in erhöhter Konzentration bei Patienten mit Sepsis (Michie et al. 1988), Tuberkulose (Taskashima et al. 1990), Sarkoidose (Bachwich et al. 1986), Atemnotsyndrom des Erwachsenen (Tracey et al. 1988) und auch GvHD (Holler et al. 1990) bzw. anderer transplantationsassoziierter Komplikationen wie interstitieller Pneumonie und VOD gefunden (Holler et al. 1990 ; 1991). Das Zytokin wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen gebildet, aber auch von T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Lymphozyten. Insbesondere die Untersuchungen zur Pathophysiologie der Sepsis trugen zum Verständnis der Interaktion von Zytokin und immunkompetenten Zellen bei. Die Stimulation körpereigener Makrophagen durch bakterielle Endotoxine führt zur Ausschüttung monozytärer Mediatoren wie IL-1, IL-6, und TNF-α, die die klinischen Veränderungen wie Fieber, Gerinnungsaktivierung, Akut-Phase-Reaktion etc. auslösen (Cerami et al. 1988, Tracey et al. 1989). Vorraussetzung für eine Immunantwort ist die Einwanderung immunkompetenter Zellen an den Ort der immunologischen Auseinandersetzung, die durch Adhäsionsmoleküle an diesen Zellen und Endothelien gesteuert wird (Cotran et al. 1987). Die Expression dieser Moleküle wird aber durch Zytokine, insbesondere TNF-α reguliert. Das Vorhandensein von TNF-α in höherer Konzentration bei Patienten während oder nach KMT schafft demnach die Vorraussetzung für eine verstärkte Aktivierung von Spender-T-Lymphozyten, die ihrerseits dann über eine Freisetzung von Interferon-γ die Graft-Versus-Host-Reaktion aufschaukeln und zur Verstärkung der TNF-α-vermittelten Gewebs- und Endothelschäden führen (Holler et al., 1991).
In verschiedenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten Serum-TNF-α-Spiegeln und dem Auftreten von transplantationsassoziierten Komplikationen gezeigt. Holler et al., 1995 zeigten z.B., dass eine prophylaktische Gabe von monoklonalen Anti-TNF-α-Antikörpern das Auftreten einer akuten GvHD nach KMT deutlich verzögerte. Desweiteren beobachteten sie, dass der Nachweis von systemisch erhöhtem TNF-α während der Konditionierungsphase einen hohen Vorhersagewert für das Auftreten einer akuten GvHD und anderer transplantationsassoziierter Komplikationen so wie auch der Mortalität im ersten Jahr nach der Transplantation hatte (Holler et al., 1990, 1993). In einer anderen Studie mit bestrahlten und knochenmarktransplantierten Mäusen wurde ebenfalls eine Reduktion des Schweregrades von idiopathischer Pneumonie und GvHD durch Neutralisierung von TNF-α erreicht (Cooke et al., 2000). Seeber et al., 1992 beschrieben eine Korrelation zwischen frühem TNF-α-Nachweis und schweren endothelassoziierten Komplikationen wie ELS und VOD als den klassischen mikroangiopathischen Störungen nach KMT und zeigten einen Zusammenhang zur Ausschüttung endothelialer Gerinnungsfaktoren wie t-PA, PAI und vWF.
Die Ergebnisse sind jedoch nicht einheitlich, insbesondere was den Zusammenhang von TNF-α und GvHD betrifft. Robinet et al., 1991 und 1992 konnten im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen keine Korrelation zwischen dem TNF-α-Serumspiegel und GvHD in dem von ihnen untersuchten Patientenkollektiv (24 Patienten) finden und Symington et al., 1990 fanden nur bei 50% der Patienten mit GvHD erhöhte TNF-α-Spiegel. In einer anderen Studie wird von Abdallah et al., 1997 eine Korrelation zwischen TNF-α und chronischer GvHD, nicht aber akuter GvHD oder anderen transplantatassoziierten Komplikationen beschrieben. Ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse finden sich zur Frage der Korrelation des

Schweregrades der GvHD und TNF-α im Serum. Während Remberger et al., 1995 einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Serum-TNF-α-Konzentration und dem Schweregrad der GvHD gefunden haben, indem sie TNF-α vornehmlich in hohen Konzentrationen bei GvHD Grad 2-4 fanden, konnte dies in anderen Studien (Meliconi et al., 1992) nicht gezeigt werden. In einer Studie von Huang et al., 2001, in der Serum-TNF-α-Spiegel nach Knochenmarktransplantation gemessen und mit dem klinischen Auftreten einer GvHD korreliert wurden, zeigte sich, dass Patienten mit Grad 2-4 GvHD höhere TNF-α-Werte hatten, als Patienten mit Grad 0-1. Es gab jedoch keine klare Korrelation zum Schweregrad der Erkrankung in den einzelnen Gruppen. Ebenfalls keine Korrelation wurde in diesem Kollektiv von 40 Patienten zwischen Serum-TNF-α-Spiegeln und Infektionen bzw. bei unterschiedlichen Konditionierungsregimen gefunden (Huang et al. 2001).
In der hier vorliegenden Arbeit untersuchten wir bei insgesamt 112 Patienten nach Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen den TNF-α-Spiegel im Serum und im Urin und verglichen die gemessenen Werte sowohl miteinander, wie auch mit einer Vielzahl von Laborparametern (GOT, GPT, γGT, Bilirubin, Kreatinin, CRP, Leukozyten und Thrombozyten) und klinischen Parametern (Temperatur), die täglich bei den Patienten bestimmt worden waren.
Um herauszufinden, ob sich Urin möglicherweise gleichermaßen gut eignet, um Aussagen über die Höhe des TNF-α bei Patienten zu machen, wurde bei 55 Patienten der Serum-TNF-α-Wert mit dem entsprechenden Wert im Urin verglichen. Es wurde nur eine schwache, nicht statistisch signifikante Korrelation der beiden Parameter gefunden, so dass wir anhand der von uns erhobenen Daten glauben, dass keine Rückschlüsse von der Höhe des TNF-α-Spiegels im Urin auf den Serumspiegel gezogen werden können und Urin demnach nicht anstelle von Serum als Medium bei der TNF-α-Bestimmung benutzt werden kann.
Die mittlere TNF-α-Serumkonzentration über die Zeit, angefangen 3 Tage vor der Transplantation bis zum Tag 11 nach KMT zeigte in unserer Studie im Gesamtkollektiv von 75 Patienten, ungeachtet der Transplantationsart, keinen Anstieg oder Abfall der TNF-α-Werte im Verlauf, so dass wir in dem von uns untersuchten Kollektiv keinen möglicherweise typischen Verlauf der TNF-α-Serumkonzentration nach einer Knochenmarktransplantation aufzeigen konnten. Beim Vergleich der Serum-TNF-α-Werte getrennt nach Transplantationsart fiel auf, dass in der allogen transplantierten Gruppe die höchsten Einzelwerte gemessen wurden, die Verteilung der Werte erreichte aber insgesamt keine statistische Signifikanz. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Ferra et al. 1998, die bei 53 Patienten die TNF-α-Konzentration im Plasma nach KMT gemessen haben und in der allogen transplantierten Gruppe tendenziell höhere Werte gemessen haben, jedoch ohne statistische Signifikanz. Robinet et al. 1992 konnten in einem Kollektiv von 13 allogen transplantierten Patienten bei 8 Patienten keine messbaren TNF-α-Spiegel (< 15 pg/ml) finden, während 4 von 8 autolog transplantierten Patienten nachweisbare Serum-TNF-α-Spiegel von >15 pg/ml hatten.
Da, wie oben beschrieben, ein möglicher Zusammenhang zwischen TNF-α und transplantationsassoziierten Komplikationen vor allem GvHD in mehreren Studien beschrieben wurde, verglichen wir die gemessenen Serum-TNF-α-Werte mit Laborparametern, die ein laborchemisches Korrelat für schwere transplantationsbedingte Komplikationen darstellen. Im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Daten (Huang et al. 2001), fanden wir keinen Zusammenhang zwischen TNF-α und Entzündungsparametern wie CRP und Temperatur. Demgegenüber stand allerdings eine positive Korrelation zwischen TNF-α und Leukozyten, was angesichts der Rolle des TNF-α als Entzündungsmediator erklärbar wäre, in unserer Studie aufgrund des nicht nachweisbaren Zusammenhangs des

Zytokins mit anderen Entzündungsparametern jedoch nicht eindeutig zuzuordnen ist. Es ist zu vermuten, dass TNF-α nur ein Baustein in einem sehr komplexen Zusammenspiel verschiedener Zytokine ist und nicht als Einzelparameter mit klassischen Entzündungsmerkmalen korreliert werden kann.
Bei dem Vergleich einzelner Laborparameter mit der Höhe von TNF-α im Serum zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen TNF-α und den Leberfunktionsparametern (GOT, GPT, γGT, Bilirubin). Holler et al. 1991 beschrieb demgegenüber allerdings eine zeitlich enge Korrelation von maximaler TNF-α-Freisetzung und endothelialen Komplikationen wie VOD und ELS. Dies konnten wir in dem von uns untersuchten Kollektiv nicht nachweisen, zumal wir auch keinen Zusammenhang zwischen maximaler TNF-α-Konzentration und dem Auftreten einer VOD nachweisen konnten (s. Tabelle 14). Statistisch signifikant korrelierte das Serum-Kreatinin als Parameter für eine Nierendysfunktion mit TNF-α. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Ferra et al. 1998. Es scheint nach unserer Studie an 109 Patienten demnach einen möglichen Zusammenhang zwischen TNF-α und renalen Komplikationen in der Posttransplantationsphase zu geben. Ein solcher Zusammenhang müsste allerdings durch weitere Studien belegt werden.
Aus unserem Patientenkollektiv von 112 Patienten bekamen 56 Patienten allogenes Knochenmark transplantiert. Aus dieser Gruppe entwickelten insgesamt 37 Patienten eine GvHD. 10 Patienten hatten Zeichen einer leichten GvHD (Grad 0-1), 27 Patienten zeigten eine mittlere bis schwere GvHD (Grad 2-4). Es wurde in den einzelnen Gruppen die Höhe des TNF-α-Spiegels im Serum bestimmt und miteinander verglichen. In der Gruppe der Patienten, die an einer GvHD Grad 2-4 litten, wurden die höchsten Konzentrationen gemessen, im Median konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies widerspricht den Ergebnissen von Holler et al. 1990, die erhöhte Serum-TNF-α-Spiegel mit transplantationsassoziierten Komplikationen, insbesondere GvHD, assoziiert fanden. Auch in einigen anderen oben erwähnten Studien wurde ein Zusammenhang zwischen akuter und / oder chronischer GvHD und TNF-α gezeigt. In dem von uns untersuchten Patienten-Kollektiv konnten wir einen derartigen Zusammenhang nicht nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Ferra et al. 1998, die ebenfalls keinen Zusammenhang aufzeigen konnten und aus ihren Daten schlussfolgern, dass TNF-α als Parameter nicht geeignet ist, die Entwicklung von transplantationsassoziierten Komplikationen vorherzusagen.

4.4 TNF-Rezeptoren

Es sind derzeit 2 Rezeptoren von TNF-α bekannt. TNF-R1 (55 kD) und TNF-R2 (75 kD). Der extrazelluläre Anteil ist zu ungefähr einem Drittel identisch, der intrazelluläre Anteil ist komplett verschieden, so dass anzunehmen ist, dass unterschiedliche Arten der Signalübermittlung benutzt werden (Tartaglia et al. 1992).
Wir verglichen in der hier vorliegenden Arbeit die Höhe des täglich bestimmten TNF-α mit der Höhe der ebenfalls täglich bestimmten Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 bei 52, bzw. 50 Patienten. Es zeigte sich, dass TNF-α positiv zu beiden Rezeptoren korrelierte im Sinne eines nachweisbaren Zusammenhangs zwischen der Konzentration von TNF-α und seinen beiden Rezeptoren im Serum. Wir verglichen, wie schon bei TNF-α auch beide Rezeptoren mit den verschiedenen Laborparametern. TNF-R1 und TNF-R2 korrelierten positiv mit dem Entzündungsparameter CRP sowie mit dem Serumbilirubin (im Falle von TNF-R1 mit

statistischer Signifikanz). Beide Laborparameter sind Indikatoren für transplantationsassoziierte Komplikationen in Form von Infektion oder Leberfunktionsstörung z.B. im Rahmen einer GvHD. Die positive Korrelation zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen der Höhe der TNF-Rezeptoren und klinischen bzw. laborchemischen Anzeichen transplantationsassoziierter Komplikationen. Wir konnten allerdings in unserem Kollektiv keinen Zusammenhang zwischen den TNF-Rezeptoren und anderen Leberfunktionsparametern (z.B. GOT, GPT) finden.

TNF-R1, der Rezeptor mit der höheren Affinität zu TNF-α korrelierte in unserer Untersuchung positiv zur Zahl der Leukozyten. Auch dies kann als Hinweiszeichen auf einen möglichen Zusammenhang zu infektiösen Geschehnissen gewertet werden oder aber zum Wiederanstieg der Leukozyten nach Engraftment stehen. In der Literatur wird der Zusammenhang zwischen TNF-Rezeptoren und transplantationsassoziierten Komplikationen kontrovers diskutiert. In einer, schon in anderem Zusammenhang hier erwähnten Studie aus Frankreich an 13 Patienten mit GvHD konnte keine Korrelation zwischen TNF-R1 und GvHD gefunden werden (Robinet et al., 1992). Andere Autoren konnten im Tiermodell an Mäusen zeigen, dass in der Gruppe, wo der TNF-R1 fehlte, die Mäuse später und weniger akut an GvHD erkrankten als in der Gruppe mit TNF-R1 (Speiser et al., 1997). Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass der Rezeptor die Gewebeschädigung, die im Rahmen der akuten GvHD auftritt, vermittelt.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass sich in unserem Patientenkollektiv weder TNF-α noch die beiden TNF-Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 eigneten, um transplantationsassoziierte Komplikationen wie GvHD oder VOD vorherzusagen oder zu bestätigen. Da ein derartiger Zusammenhang im Sinne einer positiven Korrelation der Konzentration von TNF-α und dem Auftreten von Komplikationen nach Knochenmarktransplantation jedoch mehrfach in der Literatur beschrieben ist, sollte dies in weiteren Studien genauer erforscht werden.

5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden an einem Gesamtkollektiv von 121 Patienten nach Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen die Zytokine IL-6 (Interleukin-6), SCF (Stammzellfaktor), TNF-α (Tumor Nekrose Faktor-alpha) und der IL-6-Rezeptor sowie die TNF-Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 im Verlauf gemessen und im Zusammenhang mit dem Engraftment der Leukozyten und Thrombozyten und mit transplantationsassoziierten Komplikationen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die täglich (bis auf die Wochenenden) aus dem Serum und Urin der Patienten bestimmten Zytokine mit verschiedenen Laborparametern bzw. klinischen Verlaufsparametern der Patienten zeitlich korreliert, um mögliche Zusammenhänge aufzuzeigen.
Die Daten zeigten, dass IL-6 positiv mit dem Entzündungsparameter CRP und mit der Temperatur korrelierte und somit möglicherweise als zusätzlicher Verlaufsparameter bei der Beurteilung von Infektionen im Zusammenhang mit der Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen herangezogen werden kann. Wir fanden außerdem eine Korrelation zwischen IL-6 und dem Thrombozytenengraftment, was auf eine Rolle von IL-6 bei der Thrombopoese hindeutet.
Beim Vergleich der gemessenen IL-6-Werte mit der Menge des IL-6-Rezeptors zeigten unsere Daten eine negative Korrelation, was auf einen inhibitorischen Effekt von IL-6 auf seinen Rezeptor hindeuten könnte.
Die Beobachtung der Serum SCF-Werte vor und nach der Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen ergab keinen statistisch signifikanten, jedoch einen messbaren Anstieg der Konzentration von SCF im Serum bis zum Tag 14 nach der Transplantation in der Gruppe der allogen transplantierten Patienten. Signifikante Anstiege der SCF-Konzentration wurden bei Patienten mit CML bzw. AML beobachtet. Ein Abfall der SCF-Konzentration war in der Gruppe der Mamma-Carcinom-Patientinnen zu beobachten, die vor der Transplantation ein anderes Konditionierungsregimen erhielten. Daraus wurde geschlossen, dass sowohl die Art der Transplantation wie auch die Konditionierung die Ausschüttung von SCF beeinflussen könnte.
Unsere Untersuchung der TNF-α-Werte im Serum und im Urin derselben Patienten zeigten, dass zwar eine schwache, jedoch nicht ausreichend signifikante Korrelation der Werte besteht. Somit ist die TNF-α-Bestimmung im Urin nicht als gleichwertig mit der im Serum anzusehen. Einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von TNF-α und transplantationsassoziierten Komplikationen, wie der Graft-versus-Host-Reaktion oder Venoocclusive Disease der Leber konnte an unserem Patientengut nicht gezeigt werden. Es wurde allerdings ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen TNF-α und einzelnen Laborparametern (Kreatinin, Leukozyten) beobachtet, was zeigt, dass das Zytokin durchaus in Zusammenhang z.B. mit Nierendysfunktion oder als Entzündungsmediator nach Knochenmarktransplantation zu sehen ist.
Die ebenfalls bei unserem Patientenkollektiv bestimmten TNF-Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 korrelierten erwartungsgemäß positiv zu TNF-α, was die Interaktion von TNF-α mit seinen Rezeptoren verdeutlicht. Wir fanden desweiteren eine positive Korrelation der TNF-Rezeptoren mit dem CRP sowie mit dem Serumbilirubin. Auch die TNF-Rezeptoren sind sicherlich in der komplizierten Kette der Reaktionen beteiligt, die bei Patienten während und nach Transplantation von Knochenmark oder peripherer Blutstammzellen ablaufen. Inwieweit ein klinisch nutzbarer Zusammenhang einzelner Zytokine mit den transplantationsbedingten

Problemen nach Transplantation von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen besteht, muss in weiteren Untersuchungen erforscht werden.

6 Literaturverzeichnis

Abdallah AN, Boiron JM, Attia Y, Cassaigne A, Reiffers J, Iron A. Hematol Cell Ther 39: 27, 1997

Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumr necrosis factor by ist soluble receptors. J Exp Med 175: 323, 1992

Andrews RG, Briddell RA, Knitter GH, Opie T, Bronsden M, Myerson D, Appelbaum FR, McNiece IK. In vivo synergy between recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in baboons: enhanced circulation of progenitor cells. Blood 84: 800, 1994

Asano S, Okano A, Ozawa K, et al. In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated productionof platelets. Blood 75: 1602, 1990

Attal M, Huguet F, Rubie H, Huynh A, Charlet JP, Payen JL, Voigt JJ, Brousset P, Selves J, Muller C. Prevention of hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation by continuous infusion of low-dose heparin : a prospective randomized trial. Blood 79: 2834, 1992

Bachwich PR, Lynch JP, Larrick J, Spengler M, Kunkel SL. Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages. Am J Pathol 125: 421, 1986

Baiocchi G, Scambia G, Benedetti P, Menichella G, Testa U, Pierelli L, Martucci R, Foddai ML, Bizzi B, Mancuso S, Peschle C. Autologous stem cell transplantation: sequential production of hematopoietic cytokines underlying granulocyte recovery. Cancer Res 53: 1297, 1993

Barak V, Levi-Schaffer F, Nisman B, Nagler A. Cytokine dysregulation in chronic graft-versus-host disease. Leuk Lymphoma 17: 169, 1995

Bauer J, Lengyel G, Bauer TM, Acs G, Gerok W. Regulation of interleukin-6 receptor expression in human monocytes and hepatocytes. FEBS Lett 249: 27, 1989

Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, Petersen FB, Fisher LD, Clift RA, Thomas ED. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. J Clin Oncol 6: 1562, 1988

Beck JT, Hayden K, Barlogie B, Jaganath S. Early elevation of serum interleukin-6 predicts rapid platelet recovery following high-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation in multiple myeloma. Proc Am Assoc Cancer Res 33: 266, 1992

Benedetti de F, Massa M, Pignatti P, AlbaniS, Novick D, Martini A. serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6 / soluble IL-6 receptor complex in systemic rheumatoid arthritis. J Clin Invest 93: 2114, 1994

Bernstein ID, Andrews RG, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD 34 + and CD 34 + lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD 34 + lin- cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 77: 2316, 1991

Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect 62: 21, 1966

Bodine DM, Seidel NE, Orlic D. Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold repopulating ability than untreated bone marrow. Blood 88: 89, 1996

Briddell RA, Bruno E, Cooper RJ, Brandt JE, Hoffmann R. Effect of c-kit ligand on in vitro human megakaryocytopoiesis. Blood 78: 2854, 1991

Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S et al. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD 34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. Blood 81: 2579, 1993

Burstein SA, Downs T, Friese P, et al. Thrombocytopoiesis in normal and sublethally irradiated dogs: response to human interleukin-6. Blood 80: 420, 1992

Cairo MS, Gillan ER, Buzby JS, van de Ven C, Suen Y. Circulating steel factor (SLF) and G-CSF levels in preterm and term newborn and adult peripheral blood. American Journal of Pediatric Hematology / Oncology 15 (3): 311, 1993

Cairo MS, Suen Y, Sender L, Gillan ER, Ho W, Plunkett M, van de Ven C. Circulating granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) levels after allogeneic and autologous bone marrow transplantation: endogenous G-CSF production correlates with myeloid engraftment. Blood 79: 1869, 1992

Caracciolo D, Clark SC, Rovera G. Human interleukin-6 supports granulocytic differentiation of hematopoietic progenitor cells and acts synergistically with GM-CSF. Blood 73: 666, 1989

Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6 / BSF-2 / HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. FEBS Lett 232: 347, 1988

Cerami A, Beutler B. The role of cachectin/ TNF in endotoxic shock and cachexia. Immunol Today 9: 28, 1988

Chasty RC, Lamb WR, Gallati H, Roberts TE, Brenchley PEC, LiuYin JA. Serum cytokine levels in patients undergoing bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 12: 331, 1993

Cooke KR, Hill GR, Gerbitz A, Kobz L, Martin TR, Crawford JM, Brewer JP, Ferra JLM. Tumor necrosis factor-α neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation. Transplantation 70 (2): 272, 2000

Cotran RS. New roles for the Endothelium in Inflammation and Immunitiy. Amer J Path 129: 407, 1987

D'HDondt V, Humblet Y, Guillaume T et al. Thrombopoieticeffects and toxicity of interleukin-6 in patients with ovarian cancer before and after chemotherapy: a multicentric placebo-controlled, randomized phase Ib study. Blood 85: 2347, 1995

Drize N, Chertkov J, Samoilina N, Zander A. Effect of cytokine treatment (granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor) on hematopoiesis and the circulating pool of hematopoietic stem cells in mice. Exp Hematol 24: 816, 1996

Fegan C, Poynton CH, Whittaker JA. The gut mucosal barrier in bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantat 5: 373, 1990

Fernandez-Botran R, Vitetta ES. Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins. J Exp Med 174: 673, 1991

Ferra C, De Sanjose S, Gallardo D, Berlanga JJ, Ruede F, Martin D, De la Banda E, Ancin I, Peris J, Garcia J, Granena A. IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. Haematologica 83 (12): 1082, 1998

Fraser JK, Lill MCC, Figlin RA.The biology of the cytokine cascade. Seminarsin Oncology 23: 2, 1996

Frieling JTM, Sauerwein RW, Wijdenes J, Hendriks T, van der Linden CJ. Soluble interleukin 6 receptor in biological fluids from human origin. Cytokine 6: 376, 1994

Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, Zuber C, Yasukawa K, Attal M, Maruo N, Taga T, Kishimoto T, Kleon B. Increased and highly stable levels of functional interleukin 6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. Eur J Immunol 23: 820, 1993

Gameren van MM, Willemse PHB, Mulder NH, et al. Effects of recombinant interleukin-6 in cancer patients: a phase I-II study. Blood 84: 1434, 1994

Givon T, Revel M, Slavin S. Potential use of interleukin-6 in bone marrow transplantation: effect of recombinant human interleukin-6 after syngeneic and semiallogeneic bone marrow transplantation in mice. Blood 83: 1690, 1994

Gluckman E, Jolivet I, Scrobohaci ML. Use of prostaglandin E for prevention of liver veno-occlusive disease in leukaemic patients treated by allogeneic bone marrow transplantation. Br J Haematol 74: 277, 1990

Grell M, Schuerich P, Meager A, Pfizenmaier K. TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF-) receptors can independently mediate cytolysis. Lymphokine Cytokine Res. 12: 143, 1993

Grell M, Zimmermann G, Hülser D, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF- Receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. J Immuol 153 :1963, 1994

Hardy CL, Minguell JJ. Modulation of the adhesion of hemopoeietic progenitor cells to the RGD site of fibronectin by interleukin 3. J Cell Physiol 164: 315, 1995

Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD 34+ cells into the myeloid lineage. Blood 80: 1405, 1992

Helle M, Boeige L, Aarden LA. IL-6 is an intermediate in IL-1 induced thymocyte proliferation. J Immunol 142: 4335, 1989

Herodin F, Mestries JC, Janodet D. Recombinant glycosylated human interleukin-6 accelerates peripheral blood platelet count recovery in radiation-induced bone marrow depression in baboons. Blood 80: 688, 1992

Hill RJ, Warren K, Stenberg P, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis in mice by human recombinant interleukin-6. Blood 77: 42, 1991

Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldman M, Kishimoto T. Excessive production of interleukin 6 / B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. Eur J Immunol 18: 1797, 1988

Hirata Y, Taga T, Hibi M, Nakano N, Hirano T, Kishimoto T. Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies. J Immunol 143: 2900, 1989

Hollen CW, Henthorn J, Koziol JA, Burstein SA. Elevated serum interleukin-6 levels in patients with reactive thrombocytosis. Br J Haematol 79: 286, 1991

Holler E, Hintermeier-Knabe R, Kolb HJ, Kempeni J, Möller A, Liesenfeld S, Daum L, Wilmanns W. Low incidence of transplant-related complications in patients with chronic relapse of tumor necrosis factor-alpha before admission to bone marrow transplantation: a clinical correlate of cytokine desensitization ? Pathobiology 59: 171, 1991

Holler E, Kolb HJ, Hintermeier-Knabe R, Mittermüller J, Thierfelder S, Kaul M, Wilmanns W. Role of tumor necrosis factor alpha in acute graft-versus-host disease and complications following allogeneic bone marrow transplantation. Transplant Proc 25: 1234, 1993

Holler E, Kolb HJ, Mittermüller J, Kaul M, Ledderose G, Duell T, Seeber B, Schleuning M, Hintermeier-Knabe R, Ertl B, Kempeni J, Wilmanns W. Blood 86 (3): 890, 1995

Holler E, Kolb HJ, Möller A, Kempeni J, Liesenfeld S, Pechumer H, Lehmacher W, Ruckdeschel G, Gleixner B, Riedner C, Ledderose G, Brehm G, Mittermüller J, Willmanns W. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation. Blood 75: 1011, 1990

Holler E. TNF-α bei allogener Knochenmarktransplantation. Bedeutung für Immunrekonstitution, akute Graft-versus-Host-Erkrankung und das Komplikationsrisiko nach Knochenmarktransplantation. Fortschr Med 109 (12), 1991

Holoyake TL, Freshney MG, McNair L, Parker AN, McKay PJ, Steward WP, Fitzsimons E, Graham GJ, Pragnell IB. Ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin-11 augments both short-term recovery posttransplant and the ability to serial transplant marrow. Blood 87: 4589, 1996

Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T. Human soluble IL-6 receptor: ist detection and enhanced release by HIV infection. J Immunol 148: 2175, 1992

Horii Y, Muraguchi A, Shematu S, Matsuda T, Yashizaki K, Hirano T, Kishimoto T. Regulation of BSF-2 / IL-6 production by human mononuclear cells: Macrophage-dependent synthesis of BSF / IL-6 by T-cells. J Immunol 141: 1529, 1988

Horiuchi S, Koyanagi Y, Zhou Y, Miyamoto H, Tanaka Y, Waki Matsumoto A, Yamamoto M, Yamamoto N. Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte / macrophage cell lines and human peripherеal blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. Eur J Immunol 24: 1945, 1994

Huang XJ, Wan J, Lu DP. Serum TNF-alpha-levels in patients with acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Leukemia 15 (7): 1089, 2001

Imai T, Koike K, Kubo T, et al. Interleukin-6 supports human megakaryocytic proliferation and differentiation in vitro. Blood 8: 1969, 1991

Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA. Human interleukin-6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 56: 5953, 1989

Jones RJ, Lee KSK, Beschorner WE, Vogel VG, Grochow LB, Braine HG, Vogelsang GB, Sensenbrenner LL, Santos GW, Saral W. Venoocclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. Transplantation 44: 778, 1987

Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, KuramotomA, Kishimoto T. Autocrine generation and requirement of BSF-2 / IL-6 for human multiple myelomas. Nature 332: 83, 1988

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp 130. Blood 86: 1243, 1995

Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood 74: 1, 1989

Klein B, Wildense J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, Liautard J, Merlin M, Clement C, Morel-Fournier B, Lu ZY, Mansoni P, Sany J, Bataille R. Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia. Blood 78: 1198, 1992

Kost ER, Herzog TJ, Adler LM, Williams S, Mutch DG. The role of tumor necrosis factor receptors in tumor necrosis factor-α-mediated cytolysis of ovarian cancer cell lines. Am J Obstet Gynecol 174:145, 1996

Lavabre-Bertrand T, Exbrayat C, Liautard J, Gaillard JP, Baskevitch PP, Poujol N, Duperray C, Bourquard P, Brochier J. Detection of membrane and soluble interleukin-6 receptor in lymphoid malignancies. Br J Haematol 91: 871, 1995

Lehrnbecher T, Schrod L, Kraus D, Roos T, Martius J, Von Stockhausen HB. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptorin cord blood in the diagnosis of early onset sepsis in neonates. Acta Paediatr 84: 806, 1995

Levesque JP, Leavesley DI, Niutta S, Vadas M, Simmons PJ. Cytokines increase human hemopoietic cell addhesivness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. J Exp Med 181: 1805, 1995

Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation af an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. Cytokine 4: 96, 1992

Mackiewicz A, Schooltink H, Heinrich P, Rose-John S. Complex of soluble human IL-6-receptor / IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. J Immunol 149: 2021, 1992

Manogue KR, van Deventer SJH, Cerami A. Tumor necrosis factor alpha or cachectin. The Cytokin Handbook, Acad. Press Ltd: 241, 1991

Marsa-Vila L, Gorin NC, Laporte JP, Labopin M, Dupuy-Montbrun MC, Fouillard L, Isnard F, Najman A. Prophylactic heparin does not prevent liver veno-occlusive disease following autologous bone marrow transplantation. Eur J Haematol 47: 346, 1991

May LT, Patel K, Garcia D, Ndubuisi MI, Ferrone S, Mittelman A, Mackiewicz A Sehgal PB. Sustained high levels of circulating chaproned interleukin-6 after active specific cancer immunotherapy. Blood 84: 1887, 1994

McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman MH, Thomas ED. Veno-occlusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. Hepatology 4: 116, 1984

McDonald GB, Shulman HM, Wolford HL, Spencer GD. Liver disease after bone marrow transplantation. Semin Liver Dis 7: 210, 1987

McNiece I, Glaspy I, LeMaistre F, Briddell R, Menchaca D, Shpall EJ. Effects of recombinant methionyl human stem cell factor (rhSCF) and filgastrim (rhG-CSF) on mobilization of peripheral blood progenitor cells: preliminary laboratory results from a phase I / II study. Blood 82 (Suppl): 84a, 1993

McNiece IK, Briddell RA. Stem cell factor. J Leuk Biol 57: 14, 1995

McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stemm cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineage. Exp Hematol 19: 226, 1991

McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. The role of recombinant stem cell factor in early B cell develpment. J Immunol 146: 3785, 1991

Meliconi R, Uguccioni M, Lalli E. Increased serum concentrationsof tumor necrosis factor in beta thalassaemia: effect of bone marrow transplantation. J Clin Pathol 45: 61, 1992

Michie HR, Manoque KR, Spriggs DR, Revhaug R, O'Dwyer S, Dinarello CA, Gerami A, Wolff SM, Wilmore DW. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. N Engl J Med 318: 1481, 1988

Morstyn G, Brown S, Gordon M, Crawford J, Demetri G, Rich W, McGuire B, Foote M, McNiece IK. Stem cell factor is a potent synergistic factor in hematopoiesis. Oncology 51: 205, 1994

Müllberg J, Dittrich E, Graeve L, Gerhartz C, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Heinrich PC, Rose-John S. Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. FEBS Lett 332: 174, 1993

Müllberg J, Oberthür W, Lottspeich F, Mehl E, Dittrich E, Graeve L, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. J Immunol 152: 4958, 1994

Müllberg J, Schoolting H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. Eur J Immunol 23: 473, 1993

Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Heinrich PC, Rose-John S. Protei kinase C activity is rate limiting of shedding of the interleukin-6 receptor. Biochem Biophys Res Commun 189: 794, 1992

Nagler A, Or R, Nisman B. Elevated inflammatory cytokin levels in bone marrow graft rejection. Transplantation 60 (9): 943, 1995

Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. J Exp Med 163: 740, 1985

Neben S, Donaldson D, Sieff C, Mauch P, Bodine D, Ferrara J, Yetz-Aldape J, Turner K. Synergistic effects of interleukin-11 with other growth factors on the expansion of murine hematopoietic progenitors and maintenance of stemm cells in liquid culture. Exp Hematol 22: 353, 1994

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Res. 13: 6361, 1985

Neumunaitis J, Rabinowe SN, Singer JW, Bierman PJ, Vose JM, Freedman AS, Onetto N, Gillis S, Oette D, Gold M, Bruckner D, Hansen JA, Ritz J, Appelbaum FR, Armitage JO, Nadler LM. Recombinant granulocyte-stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for lymphoid cancer. The New England Journal of Medicine 324: 1773, 1991

Nijstein M, Zilberstein A, Ruggieri R. Serum levels of interleukin-6 and acute phase response. Lancet II: 921, 1987

Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. J Exp Med 170: 1409, 1989

Novick D, Shulman LM, Chen L, Revel M. Enhancement of interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibodiy. Cytokine 4: 6, 1992

Ohtani K, Ninomiya H, Hasegawa Y, Kobayashi T, Kojima H, Nagasawa T, Abe T. Clinical significance of elevated soluble interleukin-6 receptor levels in the sera of patients with plasma cell dyscrasias. Br J Haematol 91: 116, 1995

Ostendorf PC, Seeber S. Hämatologie / Onkologie. U&S 1997.

Poll van der T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, Hack CE, Sauerwein HP, Rosenberg RD, ten Cate JW. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. N Engl J Med 322: 1622, 1990

Portier M, Lees D, Caron E, Jourdan M, Boiron JM, Bataille R, Klein B. Up-regulation of interleukin (IL)-6 receptor gene expression in vitro and in vivo in IL-6 deprived myeloma cells. FEBS Lett 302: 35, 1992

Portier M, Rajzbaum G, Zhang XG, Attal M, Rusalen C, Wijdenes J, Mannoni P, Maraninchi D, Piechaczyk M, Bataille R, Klein B. In vivo interleukin 6 gene expression in the tumoral environment in multiple myeloma. Eur J Immunol 21: 1759, 1991

Pulkki K, Pelliniemi TT, Rajamäki A, Tienhaara A, Laasko M, Lathinen R. Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in multiple myeloma. Br J Haematol 92: 370, 1996

Quesniaux VFJ, Clark SC, Turner K, Fagg B. Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. Blood 80: 1218, 1992

Rabinowitz J, Petros WP, Stuart AR, Peters WP. Characterization of endogenous cytokine concentration after high-dose chemotherapy with autologous bone marrow support. Blood 81: 2452, 1993

Remberger M, Ringden O, Markling L. TNF alpha levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GvHD. Bone Marrow Transplant 15: 99, 1995

Revel de T, Appelbaum FR, Storb R, Schuening F, Nash R, Deeg J, McNiece IK, Andrews R, Graham T. Effects of granulocyte Colony-stimulating factor and stem cell factor, alone and in combination , on the mobilization of periphereal blood cells that engraft lethally irradiated dogs. Blood 83: 3795, 1994

Robinet E, Ibrahim A, Truneh A, Ostronoff M, Mishal Z, Zambon E, Gay F, Hayat M, Pico JL, Chouaib S. Serum levels and receptor expression of Tumor Necrosis Factor-α following human allogeneic and autologous bone marrow transplantation. Transplantation 53: 574, 1992

Rowbottom AW, Riches PG, Downie C, Hobbs JR. Monitoring cytokine production in peripheral blood during acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 12: 635, 1993

Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor associated signal transducer, gp 130, and ist regulated expression in vivo. J Immunol 148: 4066, 1992

Sale GE, Shulman HM, eds.The pathology of bone marrow transplantation. Masson Monographs in Diagnostic Pathology, 1984

Schwaighofer H, Herold M, Schwarz T, Nordberg J, Ceska M, Prior C, Nachbaur D, Weyrer W, Brankova J, Eibl B, Tilg H, Bowden R, Niederwieser D. Serum levels of interleukin 6, interleukin 8, and c-reactive protein after human allogeneic bone marrow transplantation. Transplantation 58: 430, 1994

Seeber C, Hiller E, Holler E, Kolb HJ. Increased levels of tissue plasminogen activator (t-PA) and tissue plasminogen activator inhibitor (PAI) correlate with tumor necrosis factor alpha (TNF-α)-release in patients suffering from microangiopathie following allogeneic bone marrow transplantation (BMT). Thrombosis Res 66: 373, 1992

Seghal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM, May LT, Ferguson Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle F. Human Chromosome 7 carries the ß²-Interferon gene. Proc Natl Sci 83: 5219, 1986

Shulman HM, Gown HM, Nugent DJ. Hepatic venoocclusive disease after bone marrow transplantation. Immunhistochemical identification of the material within occluded central venules. Am J Pathol 127: 549, 1987

Shulman HM, Hinterberger W. Hepatic venoocclusive disease - liver toxicity syndrome after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 10: 197, 1992

Smith SR, Morgan L. Clinical significance of elevated soluble interleukin 6 receptor levels in patients with plasma cell disorders. Br J Haematol 92: 766, 1996

Sonne O, Davidsen O, Moller B, Munck-Petersen C. Cellular targets and receptors for interleukin-6 .In vivo and in vitro uptake of IL-6 in liver and hepatocytes. Eur J Clin Invest 20: 366, 1990

Speiser DE, Bachmann MF, Frick TW, McKall-Faienza K, Griffiths E, Pfeffer K, Mak TW, Ohashi PS. The Journal of Immunology 158: 5185, 1997

Stahl CP, Zucker-Franklin D, Evatt BL, Winton EF. Effects of human interleukin-6 on megacaryocyte development and thrombocytopoiesis in primates. Blood 78: 1467, 1991

Storb R, Thomas D. Graft-versus-Host disease in dog and man: the Seattle experience. Immunol Rev 88: 215, 1985

Sullivan KM, Deeg HJ, Sanders JE, Shulman HM, Witherspoon RP, Doney K, Appelbaum FR, Schubert MM, Stewart P, Springmeyer S, McDonald G, Storb R Thomas ED. Late complications after marrow transplantation. Semin Haematol 21: 53, 1984

Symington FW, Pepe MS, Chen AB, Deliganis A. Serum tumor necrosis factor alpha associated with acute graft-versus-host disease in humans. Transplantation 50: 518, 1990

Symington FW, Symington BE, Liu PY, Viguet H, Santhanam U, Sehgal PB. The relationship of serum IL-6 levels to acute Graft-Versus-Host disease and Hepatorenal disease after bone marrow transplantation. Transplantation 54: 457, 1992

Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of ist receptor with a possible signal transducer, gp 130. Cell 58: 573, 1989

Taga T, Kawanishi K, Hardy RR, Hirano T, Kishimoto T. Receptors for B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2): Quantitation, specificity, distribution and regulation of the expression. J Exp Med 166: 967, 1987

Takashima T, Ueta C, Tsuyuguchi I, Kishimuto S. Production of tumor necrosis factor α by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. Infect Immun 58: 3286, 1990

Takatsuki F, Okano A, Suzuki C et al. Interleukin-6 perfusion stimulates reconstitution of the immune and hematopoietic systems after 5-fluoruracil treatment. Cancer Res 50: 2885, 1990

Tartagli LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. Immunology Today 13 (5): 151, 1992

Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand Passing: The 75-kDa Tumor Necrosis Factor (TNF-) Receptor Recruits TNF- for Signaling by the 55-kDa TNF- Receptor. J Biol Chem 268: 18542, 1993

Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF- receptor. Cell 73: 213, 1993

Tavassoli M, Hardy C. Molecular basis of homing of intravenously transplanted cells to the marrow. Blood 15: 1140, 1990

Testa U, Martucci S, Rutella S, Scambia G, Sica S, Panici B, Pierelli L, Menichella G, Leone G, Mancuso S, Peschle C. Autologous stem cell transplantation: release of early and late acting growth factors relates with hematopoietic ablation and recovery. Blood 84: 3532, 1994

Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P. Identification of a 60-kD Tumor Necrosis Factor (TNF-) Receptor as the Major Signal Transducing Component in TNF- Responses. J Exp Med 172: 1019, 1990

Toren A, Novick D, Or R, Ackerstein A, Slavin S, Nagler A. Soluble interleukin-6 receptor in hematology patients undergoing bone marrow transplantation. Transplantation 62:138, 1996

Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A. Cachectin/ TNF-α in septic shock and in septic adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 138: 1377, 1988

Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/ Tumor Necrosis Factor. Lancet I: 1122, 1989

Uyttenhove C, Coulie PG, van Snick J. T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1 / IL-6, the murine hybridoma / plasmacytoma growth factor. J Exp Med 167: 1417, 1988

Vassal G, Deroussent A, Challine D, Hartmann O, Koscielny S, Valteau-Couanet D, Lemerle J, Goyette A. Is 600 mg / m² appropriate dosage of busulfan in children undergoing bone marrow transplantation ? Blood 79: 2475, 1992

Walker SA, Rogers TR, Riches PG, White S, Hobbs JR. Value of serum C-reactive protein measurement in the management of bone marrow transplant recipients. Part I: early transplant period. J Clin Pathol 37: 1018, 1984

Weber J, Yang JC, Topalian SL et al. Phase I trial of subcutaneous interleukin-6 in patients with advanced malignancies. J Clin Oncol 11: 499, 1993

Winton EF, Sriniivasiah J, Kim BR, et al. Effect of recombinant human interleukin-6 (rhIL-6) and rhIL-3 on hematopoietic regeneration as demonstrated in a nonhuman primate chemotherapy model. Blood 84: 65, 1994

Wodnar-Filipowicz A, Yancik S, Moser Y, dalle Carbonare V, Gratwohl A, Tichelli A, Speck B, Nissen C. Levels of soluble stem cell factor in serum of patients with aplastic anemia. Blood 81: 3259, 1993

Wognum AW, van Gilks FCJM, Wagemaker G. Flow cytometric detection of receptor for interleukin-6 on bone marrow and peripheral blood cells of humans and Rhesus monkeys. Blood 81: 2036, 1993

Yasukawa K, Saito T, Fukunaga T, Sekimori Y, Koshihara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Matsuda T, Yawata H, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells. J Biochem 108: 673, 1990

Zohlnhöfer D, Graeve L, Rose-John S, Schooltink H, Dittrich E, Heinrich PC. The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp 80) by ist ligand. FEBS Lett 306: 219, 1992

Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith K, Karkare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, Satyagal VN, Tung W, Bosselmann RA, Mendiaz EA, Langley KE. Identification, purification and biological characterisation of hematopoietic stemm cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. Cell 63: 195, 1990

7 Publikationen

Ereignisse der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Steffen M, Dürken M, Pichlmeier U, von dem Busche C, Stockschläder M, Krüger W, Budde-Steffen C, Zander A. Serum interleukin-6 levels during bone marrow transplantation: Impact for transplant related toxicity and engraftment. Bone Marrow Transplantation 18: 301, 1996

Steffen M, Pichlmeier U, Zander A. Inverse correlation of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor after transplantation of bone marrow or peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplantation 20: 715, 1997

Steffen M, Pichlmeier U, von dem Busche C, Zander A. Serum levels of stem cell factor in patients during transplantation of bone marrow or peripheral blood stem cells. Hematotherapy and Stem Cell Research 9: 55, 2000

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz besonders herzlich bei PD Dr. med. Dr. rer. nat. Martin Steffen für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit sowie für die fachliche Beratung und ausdauernde Hilfe bei der Erhebung und Verarbeitung der Daten sowie beim Erstellen der Arbeit bedanken.
Desweiteren gilt mein Dank Herrn U. Pichelmeier sowie Hernn Dr. med. A. Nienhaus für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.
Ausserdem möchte ich Herrn Dipl. Ing. Florian Schmidt für die Assistenz beim Layout danken und meiner Familie und meinem Freund für ihre anhaltende Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit.

Lebenslauf

Name:	Carolin von dem Busche
geboren:	25. Februar 1970 in Karlsruhe
Eltern:	Dr. med. Jens von dem Busche Renate von dem Busche, geb.Kopf

Ausbildung:

1976 - 1989	Freie Waldorfschule, Bremen
Juli 1989	Abitur an der Freien Waldorfschule, Bremen
1990 - 1997	Medizinstudium an der Universität Hamburg
Juni 1997	Ablegung der Ärztlichen Prüfung
Januar 1998 bis Juli 1999	Ärztin im Praktikum in der gynäkologischen Abteilung des Evang. Diakoniekrankenhauses, Bremen
Seit Juli 1999	Assistenzärztin in der gynäkologischen Abteilung des Evang. Diakoniekrankenhauses, Bremen

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....