Medizinische Klinik
Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf
Abteilung Hämatologie - Onkologie
Einrichtung für Knochenmarktransplantation
Leiter: Prof. Dr. A. R. Zander

Transfusionsbedingte Lebersiderose bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Falk Neubauer
aus Hamburg

Hamburg 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Korreferent:

Diese Arbeit ist meinen Eltern
Elke und Ernst Neubauer,
sowie meiner Großmutter
Ruth Schulz
gewidmet

I n h a l t s v e r z e i c h n i s Seite

1.	**Einleitung**	**1**
1.1	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	1
1.2	Problemstellung und Darstellung des wissenschaftlichen Umfeldes	2
1.3	Physiologie des Eisenstoffwechsels	3
1.4	Pathogenese der Eisenüberladung	4
1.5	Ziel der Arbeit	5
2.	**Patienten, Material und Methoden**	**6**
2.1	Auswahl der Patienten und Patientenmerkmale	6
2.2	Charakteristika der hämatopoetischen Stammzelltransplantation	7
2.3	Material	8
2.4	Methoden	10
2.4.1	Lebereisenbestimmung: Biomagnetische Suszeptometrie	10
2.4.2	Genanalyse zur Bestimmung der Punktmutationen C282Y und H63D auf dem Hämochromatose-Gen (HFE-Gen)	12
2.4.3	Serum-Ferritin und andere Parameter des Eisenstatus	17
2.4.4	Leberfunktionsparameter	18
2.5	Erhebung klinischer Daten	18
2.6	Statistik	19
3.	**Ergebnisse**	**20**
4.	**Diskussion**	**27**
5.	**Zusammenfassung**	**33**
6.	**Literaturverzeichnis**	**34**
7.	**Anhang**	**41**
7.1	Patientenanschreiben zur Einladung für die Teilnahme an der Studie	41
7.2	Vordruck zur Erklärung und Dokumentation des Einverständnisses der Patienten bzw. der Eltern nach dem Aufklärungsgespräch	42
7.3	Rohdatentabellen	43

7.4 Danksagung 47
7.5 Lebenslauf 48

1. Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Für Patienten mit hämatologischen Neoplasien stellt die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HST) eine häufig durchgeführte Methode der Behandlung dar. Bei der HST regeneriert sich die Hämatopoese des Patienten aus Zellen des Transplantates, und das Immunsystem baut sich teilweise oder ganz wieder aus dem Transplantat auf. Daher ist die HST grundsätzlich bei allen Krankheiten indiziert, bei denen hämatopoetische Stammzellen befallen sind oder als Folge der Behandlung geschädigt werden.

Grundsätzlich kann eine HST syngen, autolog oder allogen durchgeführt werden. Bei der syngenen HST ist der Spender ein eineiiges Zwillingsgeschwister. Unter der autologen HST versteht man die Reinfusion des eigenen Knochenmarkes oder zuvor separierter, eigener hämatopoetischer Stammzellen aus dem Blut nach intensiver Vorbehandlung mit Chemo- oder/und Strahlentherapie. Dies setzt voraus, dass eigene gesunde hämatopoetische Stammzellen zur Entnahme vorhanden sind. Die Übertragung hämatopoetischer Stammzellen eines gesunden, immungenetisch fremden Spenders wird als allogene HST bezeichnet. Hierbei wird zusätzlich unterschieden in Familien- und Fremdspender (matched unrelated donor, MUD)-Transplantationen. Als Familienspender eignet sich derjenige am besten, dessen HLA-Antigene (human leucocyte antigens) mit denen des Transplantat-Empfängers identisch sind. Diese Antigene stellen genetisch determinierte Merkmale an Oberflächen verschiedener kernhaltiger Zellen dar, und erlauben dem Immunsystem die Unterscheidung zwischen körpereigen und körperfremd. Sie werden auf dem Chromosom Nummer 6 im Bereich des sogenannten Histokompatibilitätskomplex major kodiert. Mit der Übertragung des Transplantates werden auch T-Lymphozyten des Spenders übertragen, welche mit den genetisch verschiedenen Histokompatibilitätsantigenen des Empfängers reagieren können. Diese als Graft-versus-Host (GvH) bezeichnete Reaktion, ist bei Fremdspender-Transplantationen somit am größten. Zielorgane der GvH-Reaktion sind Haut, Leber und Darm.

Die häufigsten Indikationen zur allogenen HST sind akute und chronische Leukämien, Aplastische Anämien, sowie Maligne Lymphome (Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphome). Die Komplikationen nach HST lassen sich in frühe und späte (≤ 3 Monate bzw. > 3 Monate nach HST) Komplikationen einteilen. Die Hauptursache für die hohe Toxizität in der frühen Posttransplantationsphase wird in der Konditionierungstherapie gesehen (Bearman et al. 1988). Zu den frühen Komplikationen zählen Abstossung des

Transplantates, akute GvH-Reaktion, gastrointestinale Toxizität, Infektionen, hämorrhagische Zystitis, Venenverschluss-Erkrankung, interstitielle Pneumonie und orale Mukositis (Deeg 1990). Die späten Komplikationen sind multifaktoriell bedingt. Zu den Ursachen zählen ebenfalls die Konditionierungstherapie mit der Folge einer Immundefizienz, die Bestrahlung vor HST und das Transplantat selbst (Deeg et al. 1984). Die späten Komplikationen umfassen chronische GvH-Reaktion, chronische interstitielle Pneumonie, Entwicklung sekundärer Malignome, Infektionen, Infertilität und Kataraktbildung, sowie seltener Hämolyse, endokrine Funktionsstörungen und Leukoenzephalopathie (Deeg 1990). Die Ergebnisse der HST haben sich in den letzten zwei Jahrzehnten verbessert. Die Arbeitsgruppe für Akute Leukämie der Europäischen Geselleschaft für Blut- und Knochenmarktransplantation (EBMT) analysierte die Ergebnisse der allogenen Knochenmarktransplantation von 2195 Patienten mit Akuter Leukämie, welche zwischen 1979 und 1991 im Zustand der 1. kompletten Remission mit Knochenmark eines HLA-identischen Geschwisterteils transplantiert worden sind und konnte zeigen, dass die 5-Jahres Rezidiv-freie Überlebensrate kontinuierlich angestiegen ist. Sie stieg für Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie von 45% auf 57%, und für Patienten mit Akuter Lymphatischer Leukämie von 45% auf 57% in dem genannten Zeitraum (Frassoni et al. 1996). Damit gewinnt auch die Frage nach Spätkomplikationen in Langzeit-Überlebenden nach HST an Bedeutung.

1.2 Problemstellung und Darstellung des wissenschaftliches Umfeldes

Patienten mit hämatologischen Neoplasien brauchen viele Transfusionen. Sowohl während ihrer regulären Behandlung vor HST als auch in der Phase der Aplasie nach HST erhalten sie große Mengen Erythrozytenkonzentrate (red cell concentrates, RCC) (Kohlo et al. 1993; McKay et al. 1996). Damit sind diese Patienten neben den oben genannten Komplikationen auch dem Risiko einer sekundären Hämosiderose ausgesetzt. Nicht-Transferrin-gebundenes-Eisen (non-transferrin bound iron, NTBI), welches während konventioneller Chemotherapie im Serum der Patienten auftritt (Halliwell et al. 1988; Gordeuk u. Brittenham 1992), ist ebenso in der Folge der myeloablativen Konditionierung im Rahmen der HST vorhanden (Dürken et al. 1997; Dürken et al. 1998) und trägt eventuell zur Eisenüberladung der Leber (Brissot et al. 1997; Barisani et al. 1995) und anderer parenchymatöser Organe (Craven et al. 1987) bei. Auch das Vorliegen eines heterozygoten Genträgerstatus für die C282Y Hämochromatose-Mutation, welche 10% der Nordeuropäischen Bevölkerung aufweisen (Nielsen et al. 1998), kann seinerseits zu einem erhöhten Speichereisen

führen (Cazzola et al. 1988; Cartwright et al. 1979). Auch die H63D Hämochromatose-Mutation in homozygotem Genträgerstatus kann zu einer Eisenüberladung führen. In der Literatur finden sich zwei Abstracts mit 4 bzw. 6 H63D-homozygoten Patienten, die mittelgradig eisenüberladen waren (Messerschmitt et al. 1998; Sham et al. 1998). Ebenso beeinflussen das Körperwachstum, das Geschlecht, Hepatitis (Di Bisceglie et al. 1992) und der Alkoholkonsum (Ford et al. 1995) den Eisenstoffwechsel.
In der wissenschaftlichen Literatur wurden Patienten nach HST beschrieben, bei denen sich erhöhte Serum Ferritin-Werte (Or et al. 1987), bzw. erhöhte Serum Ferritin-Werte mit gleichzeitigem Auftreten von NTBI im Serum (Dürken et al. 1997; Harrison et al. 1996) fanden. MacKay et al. haben in einer Studie Patienten nach HST beschrieben, bei denen sich erhöhte Serum Ferritin-Werte verbunden mit pathologischen Leberfunktionsparametern fanden, welche sich nach Phlebotomien normalisierten oder zumindest verbesserten (McKay et al. 1996). Nur wenige Studien haben bisher versucht, den Körpereisengehalt von Nicht-Thalassämikern nach HST zu quantifizieren. Kornreich et al. erfasste die Eisenüberladung von 13 Kindern nach HST mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (Kornreich et al. 1997). In einer Autopsie-Studie an 10 Patienten, welche innerhalb von 100 Tagen nach autologer Knochenmarktransplantation verstorben waren, haben Strasser et al. einen erheblich erhöhten Eisengehalt des Knochenmarkes sowie in Leberbiopsaten gefunden (Strasser et al. 1998).

1.3 Physiologie des Eisenstoffwechsels

Täglich werden von einem Erwachsenen 1-2 mg Eisen im Duodenum und oberen Jejunum absorbiert, etwa die gleiche Menge geht durch Verlust von intestinalen Zellen verloren. Nicht für die Erythropoese und den Zellstoffwechsel benötigtes Eisen wird in Ferritin-Molekülen in den Hepatozyten gespeichert. Der Lebereisengehalt spiegelt deshalb den Speichereisenstatus wieder und beträgt bei einem gesunden Erwachsenen zwischen 90-370 µg Eisen/g Leber (Brittenham et al. 1982). Durch Transfusionen extra zugeführtes Eisen wird zum größten Teil in der Leber abgelagert und bedeutet, wegen des Fehlens eines spezifischen Ausscheidungsmechanismus, eine bleibende Eisenüberladung, die entsprechend der langen biologischen Halbwertszeit des Eisens von ca. 2000 Tagen (Heinrich 1973) nur langsam abgebaut wird. Die Transfusion eines einzigen Erythrozytenkonzentrates mit einem Volumen von 200 ml und einem durchschnittlichen Hämoglobingehalt von 24,5 g/dl und einem Eisengehalt von 3,47 mg/g Hämoglobin, bedeutet eine Eisenzufuhr von 170 mg.

1.4 Pathogenese der Eisenüberladung

Eisenstoffwechselstörungen beim Menschen mit Eisenmangel und Eisenüberladung als resultierende Symptomkomplexe sind seit langem bekannt. Während ein Eisenmangel in der Regel durch einen erhöhten Eisenverlust, z.B. im Rahmen von Blutverlusten oder durch mangelnde Zufuhr bedingt ist, gibt es zahlreiche Faktoren, die zu einer Eisenüberladung des Körpers führen können, die sich in primäre und sekundäre Ursachen unterteilen lassen. Zu den primären Eisenüberladungen zählt im wesentlichen die genetische Hämochromatose. Als Beispiel für sekundäre Eisenüberladung soll im folgenden auf die transfusionsbedingte Hämosiderose näher eingegangen werden.

Beispiele für einen häufigen Transfusionsbedarf von Erythrozytenkonzentraten sind Patienten mit Thalassämie und solche mit hämatologischen Neoplasien. Die Thalassämie ist eine Erkrankung, bei der es in Folge einer genetisch fixierten, quantitativen Synthesestörung einzelner Polypeptidketten des Hämoglobins zu einer ineffektiven Erythropoese und Hämolyse kommt. Dies führt einerseits zu einer vermehrten intestinalen Eisenabsorption und andererseits zu der hohen Transfusionsbedürftigkeit dieser Patienten. Da es keinen Ausscheidemechanismus für überschüssiges Eisen beim Menschen gibt, muß eine signifikante Erhöhung der intestinalen Eisenabsorption und die häufige Applikation von Hämoglobin-Eisen aus den Bluttransfusionen mittel- und langfristig zu einer Erhöhung des Gesamtkörpereisens führen. Bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose ist die Eisenüberladung das Ergebnis einer genetisch bedingten, inadäquaten Hochregulation der intestinalen Eisenabsorption aus einer normalen Nahrungszufuhr. Der wahrscheinlich ursächliche Gendefekt wird im wesentlichen einer Mutation auf dem Hämochromatose-Gen (HFE-Gen) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 zugeschrieben (Feder et al. 1996). Die Cys282tyr bzw. C282Y-Punktmutation führt im korrespondierenden Polypeptid zu einem Aminosäureaustausch Cystein 282 nach Tyrosin. Eine zweite Mutation im HFE-Gen, H63D, führt im korrespondierenden Polypeptid zu einem Aminosäureaustausch Histidin 63 nach Asparaginsäure. Die pathophysiologische Rolle von H63D ist noch nicht ganz klar. Bei homozygotem H63D-Genträgerstatus oder bei "compound"-Heterozygotie (gleichzeitiges Vorliegen der H63D- und C282Y-Mutation) kommt es in einigen Fällen ebenfalls zu einer Eisenüberladung.

Überschüssiges Eisen wird in verschiedenen Geweben gespeichert, vor allem aber in der Leber. Insbesondere bei Vorliegen einer schweren Eisenüberladung, bei der

signifikante Mengen an nicht-Transferrin-gebundenem Eisen im Blut und in Organzellen vorhanden sind, kann Eisen toxisch wirken.

1.5 Ziel der Arbeit

1) Das Hauptanliegen dieser Studie ist die Bestimmung der Häufigkeit und des Ausmaßes der Transfusionshämosiderose bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien oder Aplastischer Anämie nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

2) Daneben soll eine Einschätzung der klinischen Relevanz der Organhämosiderosen dieser Patienten versucht werden.

3) Die Organhämosiderose beeinflussenden Faktoren sollen ermittelt werden.

In dieser Arbeit wird auch versucht die Frage zu beantworten, ob erhöhte Lebereisenkonzentrationen bei HST-Patienten zu Leberfunktionsstörungen führen und ob die Bestimmung von Serum Ferritin-Werten und die Erfassung der Menge des transfundierten Hämoglobins bei Patienten nach HST geeignete Parameter für die Quantifizierung der Körpereisen-Speicher darstellen. Es ist zu erwarten, dass durch diese Studie einige Patienten identifiziert werden, bei denen eine Behandlung der Organhämosiderose durch wiederholte Phlebotomien indiziert ist.

2. Material und Methoden

2.1 Auswahl der Patienten und Patientenmerkmale

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigt (Schreiben vom 2.6.1998).

Die in dieser prospektiven Studie untersuchten Patienten stammen aus der Gruppe von Patienten, welche im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf seit Bestehen der Knochenmarktransplantationsabteilung (Februar 1990) eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HST) erhalten haben (Stand: Studienbeginn: 01.03.1998, n=498). Von diesen Patienten wurden anhand der Datenbank der Knochenmarktransplantationsabteilung diejenigen Überlebende identifiziert, deren hämatopoetische Stammzelltransplantation mindestens 1 Jahr zurückliegt (n=199). Aus diesem Patientengut wurden folgende 5 Kategorien hämatologischer Erkrankungen definiert: Akute Myeloische Leukämie (AML, n=40), Akute Lymphatische Leukämie (ALL, n=19), Chronische Myeloische Leukämie (CML, n=33), Hodgkin oder Non-Hodgkin Lymphome (HL/NHL, n=41) sowie Schwere Aplastische Anämie, Myelodysplastisches Syndrom oder Hämatophagozytische Lymphohistiozytose (SAA/MDS/HLH, n=18). Alle Patienten mit einem Alter von < 6 Jahren und solche, welche einen größeren Anfahrtsweg als 150 km von ihrem Wohnort bis zum Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf haben würden, wurden von der Studie ausgeschlossen, um sowohl die Compliance, als auch die Durchführbarkeit der Studie ohne einen Übernachtungsbedarf zu ermöglichen. Von den diese Einschlußkriterien erfüllenden Patienten wurden alle nachfolgend genannten Patienten (n=101) angeschrieben und um die Teilnahme an der Studie ersucht (s. Anhang 7.1: Patientenanschreiben): Alle Patienten, welche unter 18 Jahre alt waren, alle über 18 jährige aus der ALL und SAA/MDS-Gruppe, sowie bis zu einem Maximum von 20 aus den restlichen 3 Diagnosekategorien zufällig ausgewählte über 18 jährige Patienten. Stellte sich heraus, dass Patienten verzogen waren, wurde mit Hilfe der behandelnden Ärzte oder der lokalen Einwohnermeldeämter versucht, ihren neuen Wohnort zu erfahren. 13/101 antworteten auf das Anschreiben nicht. Von weiteren 6 Patienten konnte die aktuelle Adresse nicht in Erfahrung gebracht werden. 4 Patienten wollten nicht teilnehmen. 1 Patient verstarb während der Patientenrekrutierung. 6 Patienten befanden sich in einer gesundheitlichen Verfassung, welche die Teilnahme an der Studie nicht erlaubte.

71/101 der kontaktierten Patienten gaben ihre schriftlich dokumentierte Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie nach entsprechendem

Aufklärungsgespräch ab (s. Anhang 7.2: Vordruck zur Erklärung und Dokumentation des Einverständnisses der Patienten bzw. der Eltern nach dem Aufklärungsgespräch). 49 Patienten waren männlich, 22 Patienten waren weiblich. Zum Zeitpunkt der 1. HST waren 18 Patienten ≤ 18 Jahre alt, und 53 von Ihnen waren älter als 18 Jahre. Der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der ersten HST betrug 27.9 Jahre (Bereich von 1.8 bis 57.9 Jahre). Der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Lebereisenbestimmung betrug 33.2 Jahre (Bereich von 6.0 bis 61.3 Jahre). Der zeitliche Abstand zwischen der 1. HST und dem Zeitpunkt der Lebereisenbestimmung betrug 17 bis 97 Monate (s. Tabelle 1).

2.2 Charakteristika der hämatopoetischen Stammzelltransplantation

50 Patienten erhielten ein allogenes Transplantat, 21 erfuhren eine autologe Transplantation. Die verwendeten Konditionierungsschemata beinhalteten Busulfan/VP-16/Cyclophosphamid (CY), n=16, Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI)/VP-16/CY, n=13, Busulfan/CY, n=9, TBI/CY/Antithymozyten Globulin (ATG), n=9, CY/ATG, n=6, Busulfan/VP-16/CY/ATG, n=4, Cytarabin/BCNU/VP-16/Melphalan, n=4, CY/VP-16/BCNU, n=3, TBI/VP-16/CY/ATG, n=3, verschiedene, n=4. Sechs Patienten erhielten ein zweites Transplantat. 37/50 der Patienten mit einer allogenen HST erhielten Knochenmark (n=35) oder periphere Stammzellen (n=2) von einem HLA-identischen Verwandtenspender, 13 erhielten Knochenmark (n=11) oder periphere Stammzellen (n=2) von einem unverwandten Spender. 7/21 autolog Transplantierten haben Knochenmark erhalten und 14 periphere Stammzellen. Allen Patienten mit allogener Transplantation wurde zur Prophylaxe gegen eine GvH-Reaktion Cyclosporin und Methotrexat verabreicht. Empfänger einer unverwandten HST erhielten zusätzlich ATG, IgM-angereicherte Immunglobuline und Metronidazol wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Zander et al. 1999). Zur Stellung der Diagnose einer akuten oder chronischen GvH-Reaktion wurden die Kriterien von Glucksberg et al. (Glucksberg et al. 1974), zur Diagnosestellung einer hepatischen Venenverschluß-Erkrankung (veno-occlusive disease, VOD) wurden die Kriterien von McDonald et al. verwendet (McDonald et al. 1986). Patienten, die eine HST nach 1993 erhielten, wurden der Granulozyten-Kolonien-Stimulationsfaktor in einer Dosis von 10 µg/kg in Form einer kontinuierlichen Infusion, beginnend am Tag +1 nach Transplantation bis zum Tag des Engraftments, verabreicht. Darüber hinaus erhielten die Patienten sowohl eine antibiotische, eine antivirale und eine antifungale Prophylaxe, als auch eine Immunglobulin Substitution. Alle Patienten erhielten

Erythrozytenkonzentrate, wenn ihr Hämoglobinwert unter 8 g/dl abfiel. Die wichtigsten Patientenmerkmale und HST-Charakteristika sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Patientenmerkmale und HST (hämatopoetische Stammzelltransplantation)-Charakteristika.

Patientenmerkmale und HZT-Charakteristika	n	Median	Bereich
Gesamtanzahl aller untersuchten Patienten	71		
Geschlecht			
weiblich	22		
männlich	49		
Alter* (Jahre)		27.9	1.8 - 57.9
≤ 18	19		
> 18	52		
Diagnosen			
Akute Myeloische Leukämie	17		
Akute Lymphatische Leukämie	10		
Chronische Myeloische Leukämie	18		
Lymphome**	16		
Schwere Aplastische Anämie / MDS / HLH	10		
Art der HZT			
allogen	50		
autolog	21		
Zeitlicher Abstand zur 1. Transplantation*** (Monate)		52	17 - 97
≤ 36	23		
37 – 71	27		
≥ 72	21		

*zum Zeitpunkt der 1. HST
**Die Gruppe der Lymphome beinhaltet 6 Patienten mit M. Hodgkin und 10 Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen
***zum Zeitpunkt der Lebereisenbestimmung
Abkürzungen: MDS, Myelodysplastisches Syndrome; HLH, Hämophagozytische Lymphohistiozytose.

2.3 Material

Material zur Isolierung von DNA aus peripherem Blut:

- EDTA-Vollblut, mittels venöser Blutabnahme gewonnen

- QIAamp Blood-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
- 96% Ethanol
- Aqua dest. zur Injektion

Material zur Isolierung der DNA aus Zellen des Wangenschleimhautabstriches:

- Wangenschleimhautabstriche (C.E.P swabs, Gibco, Paisley, GB)
- CHELEX®100, Resin (Sodiumform) 100 g (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)
- Proteinase K, solution (14.0 mg / ml), in 10 mM Tris-HCL, pH 7.5 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

Material für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Analyse der CYS282TYR- und der H63D-Mutation:

- DynaZym DNA Polymerase Kit (Finnzymes, Espoo, Finnland)
- CYS282TYR-R Oligo Grade DNA (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- CYS282TYR-F Oligo Grade DNA (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- HIS63ASP-R Oligo Grade DNA (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- HIS63ASP-F Oligo Grade DNA (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Aqua dest. zur Injektion

Material für die Gel-Elektrophorese:

- TRIS-Borat EDTA Buffer 5X (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Reliant Gel System 8 Well (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland)
- Reliant Gel System 24 Well (Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland)
- Bromphenol blau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- DNA-Micromarker, Amresco Code E840 (Amresco, Solon, Ohio, USA)
- Glycerol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Ethidium Bromide Tablets (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Aqua dest. zur Injektion

Material für das enzymatische Schneiden der DNA der CYS282TYR-Mutation:

- Restriktionsendonuklease S*na*BI (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland)
- Restriktionsendonuklease Bc*l*I (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland)
- Aqua dest. zur Injektion

2.4 Methoden

Aufgrund von Problemen bei der Probengewinnung sowie bei deren Verarbeitung im Labor konnten nicht bei allen 71 Patienten alle Parameter untersucht werden. Eine genaue Auflistung der untersuchten Zahl von Patienten bezüglich der verschiedenen Parameter befindet sich im Anhang unter 7.3.

2.4.1 Lebereisenbestimmung: Biomagnetische Suszeptometrie

Die in vivo Lebereisen-Suszeptometrie (Fischer 1998) nutzt den Unterschied der starken paramagnetischen Antwort des in Hämosiderin und des in Ferritin gespeicherten Eisens auf ein externes Magnetfeld im Vergleich zu der schwachen diamagnetischen Antwort relevanter anderer biologischer Substanzen (Wasser, Fett, Haut, Muskel). Diese Methode erlaubt die direkte Messung des Leberspeichereisens und ist quantitativ äquivalent zur chemischen Eisenbestimmung in Leberbiopsaten (Brittenham et al. 1982; Fischer et al. 1992). Es wird die magnetische Suszeptibilität eines bestimmten Lebervolumens gemessen, welche direkt proportional zur paramagnetischen Lebereisenkonzentration ist. Dies geschieht, indem der Patient in einem externen Magnetfeld bewegt wird. Die daraus resultierenden Magnetflußänderungen induzieren Spannungsänderungen, welche von den supraleitenden Detektorspulen des SQUID-Biosuszeptometers (SQUID = Superconducting-Quantum-Interference Device) gemessen werden. Aus der so bestimmten Volumen-Suszeptibilität kann bei bekannter magnetischer Suszeptibilität des Hämosiderins bzw. des Ferritin-Eisens die Lebereisenkonzentration errechnet werden.

Ablauf der Messungen

Die Messungen werden mit einem 2-Kanal-SQUID-Biomagnetometer (Ferritometer®: BTi, San Diego, USA; s. Abbildung 1), das sich in einer speziellen, aus nicht-magnetischen Materialien bestehenden Meßhalle befindet, durchgeführt. Der Patient wird in Rückenlage mit 30 - 45° rotierter Körperachse auf einer auf- und abwärts fahrbaren Liege positioniert, so dass die Leber unter dem Detektor zu liegen kommt. Der Abstand der Hautoberfläche von der Leber wird mit einem Ultraschallgerät (Typ CS 9500, Firma Picker/Hitachi) auf weniger als 1 mm genau ausgemessen. Hierzu werden 4 Ultraschallbilder von definierten und Laser-geführten transversalen, sagittalen und diagonalen Leberschnitten erstellt, anhand derer der Abstand zwischen Schallkopf und

Leberoberfläche ausgemessen und gemittelt wird. Die Lebergeometrie wird als Ellipsoid durch transversale und sagittale Ultraschallbilder bestimmt. Der Patient wird mittels einer Vakuummatratze fixiert. Er wird mit der Liege unter die Detektorspulen des Biomagnetometers verschoben und mit Hilfe einer Positionierungsspule für die Messung zentriert. Dieselbe Positionierungsspule auf der Hautoberfläche des Patienten bestimmt während der Messung den Abstand von der Hautoberfläche des Patienten zur untersten Detektorspule des Gerätes bis auf weniger als 0.5 mm genau. Der Patient wird nun in einem definierten und konstanten Magnetfeld (B_{max} = 20 mT, erzeugt durch supraleitende Spulen als Gradiometer 1. Ordnung) abwärts bewegt. Dabei wird ein mit Wasser gefüllter Ballon kontinuierlich mitgeführt, so dass dieser zu

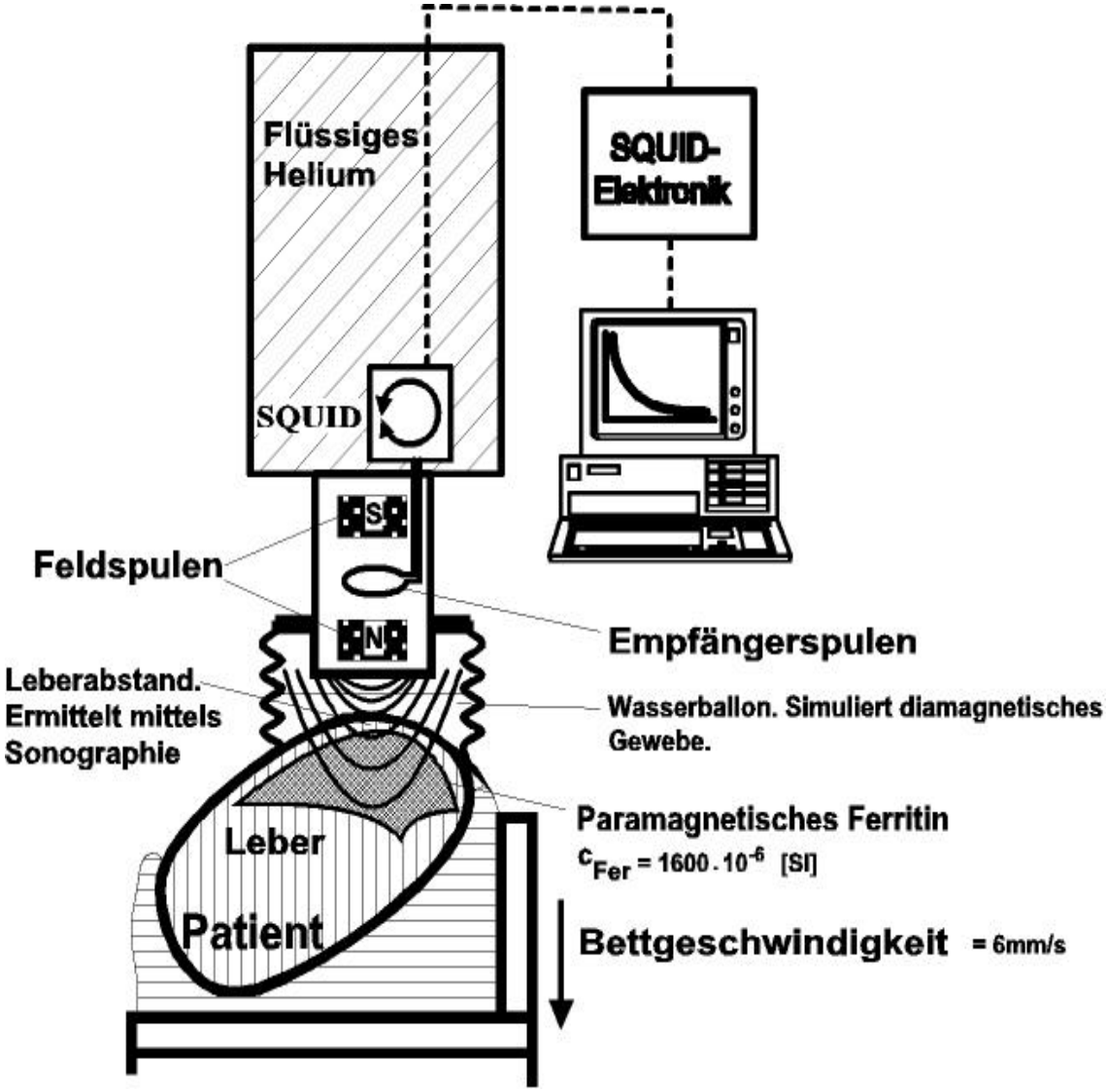


Abbildung 1: Aufbau des Hamburger Biomagnetometers

jedem Zeitpunkt der Messung den Raum zwischen der Detektorspule und der Hautoberfläche des Patienten ausfüllt (Wasserreferenz-medium). Die dabei auftretende Magnetflußänderung wird in 3 bis 4 Messungen gegen das Wasserreferenzmedium durch zwei Detektorspulen (Gradiometer 2. Ordnung) als Spannungsänderung in Abhängigkeit von der Entfernung gemessen. Die Prozeß-steuerung während der Messung, die Aufzeichnung der Meßsignale und die Analysen werden mit Hilfe eines Hewlett-Packard-Computers (HP 9000 / 320) durchgeführt.

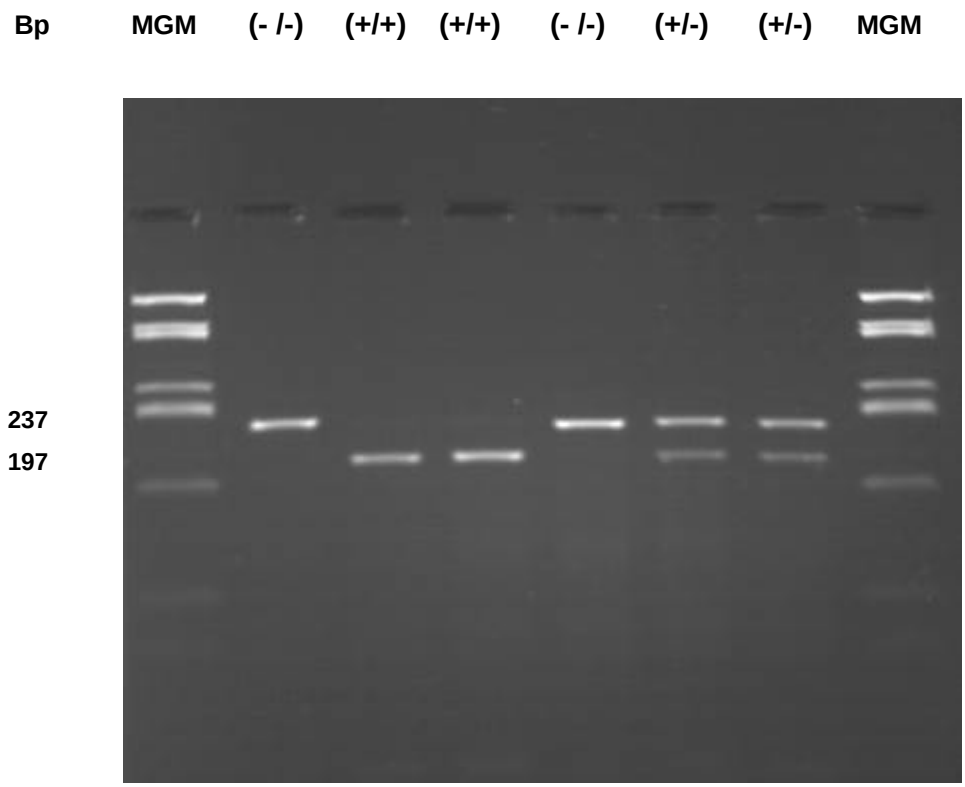
2.4.2 Genanalyse zur Bestimmung der Punktmutationen C282Y und H63D auf dem Hämochromatose-Gen (HFE-Gen)

Bei 69/71 Patienten wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und nachfolgender Restriktionsanalyse die mit genetischer Hämochromatose assoziierten HFE-Genmutationen C282Y und H63D aus Vollblut untersucht (Nielsen et al. 1998). Von einem Patienten konnte kein Blut gewonnen werden. Bei 47/50 Patienten, welche eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten haben, und deren zellulären Blutelemente somit die genetischen Merkmale ihrer Spender/Innen tragen, wurden zusätzlich Zellen aus Wangenschleimhautabstrichen nach einer von Walsh et al. modifizierten Methode von Singer-Sam et al. auf die HFE-Genmutation C282Y hin untersucht (Walsh et al. 1991). Das Material der Schleimhautabstriche von 11 Patienten reichte nicht aus. Somit wurde die HFE-Genmutation H63D nur bei 39 der 50 allogen transplantierten Patienten in Zellen aus Wangenschleimhautabstrichen untersucht.

<u>Prinzip der Genanalyse aus dem Blut am Beispiel der C282Y-Mutation</u>

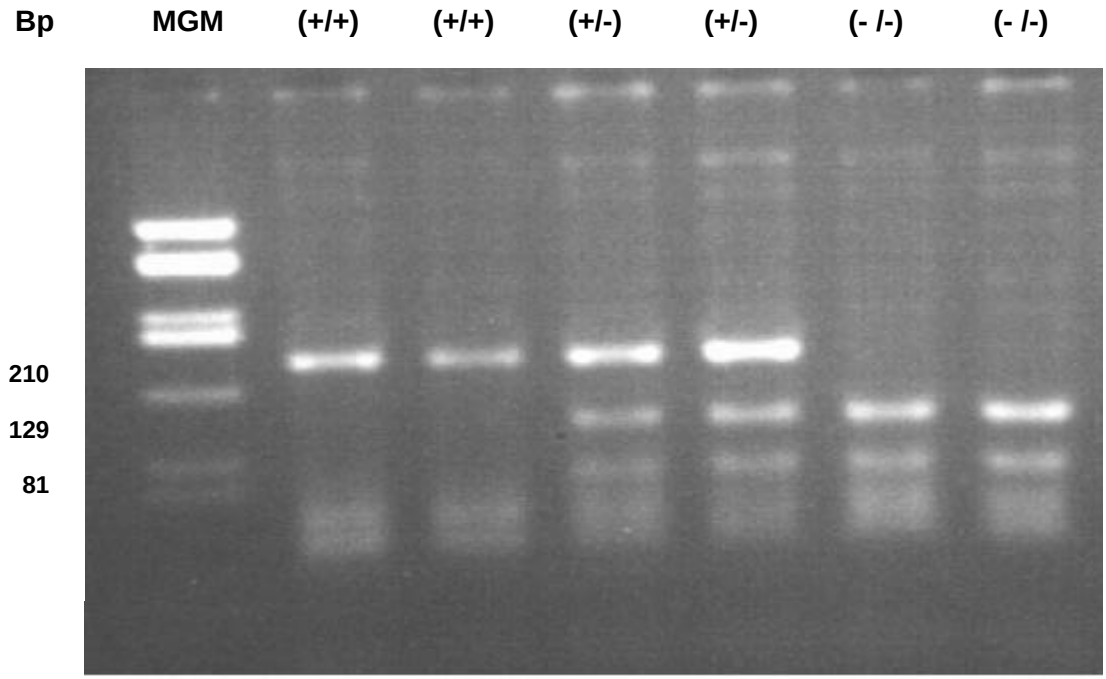
Zum Nachweis der Punktmutation C282Y im HFE-Gen auf einem Allel bei heterozygotem- oder auf beiden Allelen bei homozygotem Trägerstatus für die genetische Hämochromatose wird DNA aus EDTA-Vollblut des Patienten isoliert. Mittels PCR wird ein spezifisches DNA-Segment von dem HFE-Gen auf Chromosom 6 amplifiziert. Die C282Y-Mutation in diesem Gen wurde 1996 als die wahrscheinliche Ursache der hereditären Hämochromatose identifiziert (Feder et al. 1996). Mit den in unserem Labor verwendeten Primern (vorwärts: 5'-GTGACCTCTTCAGTGACC-3', rückwärts: 5'-AATGAGGGGCTGATCCAG-3') wird im Falle der C282Y-Mutation ein DNA-Fragment von 237 Basenpaaren (Bp) amplifiziert, das diese Mutation trägt. Durch die Punktmutation wurde an Position 282 die Base Guanin gegen Adenin ausgetauscht. Dadurch wird bei Trägern des Gendefektes eine neue Schnittstelle für

die Restriktionsendonuklease S*na*BI geschaffen. Man erhält nach Einwirkung dieses Enzymes im Falle der mutierten DNA zwei kleinere DNA-Bruchstücke (197 Bp bzw. 40 Bp), die elektrophoretisch getrennt und von denen die größere anschließend leicht detektiert werden kann. DNA von heterozygoten Trägern liefert zu 50% diese beiden Fragmente, zusätzlich aber auch den betreffenden unveränderten DNA-Abschnitt (237 Bp, s. Abbildung 2). Die Analyse der H63D-Mutation wurde analog durchgeführt. Es wurde lediglich ein anderes Restriktionsenzym wie unter "Material" angegeben benutzt. Die verwendeten Primer wiesen folgende Basensequenzen auf: vorwärts: 5'-AGTCCAGAAGTCAACAGT-3', rückwärts: 5'- ATGGGTGCCTCAGAGCAG-3'. Die H63D-Mutation entfernt eine Schnittstelle für den Bc*l*I Verdau im 210 Bp PCR Produkt der mutierten DNA, wohingegen normale DNA in zwei kleinere Fragmente (129 Bp und 81 Bp) geschnitten wird (s. Abbildung 3).



Abkürzungen: Bp, Fragment-Größe in Basenpaaren; (-/-), normale Allele; (+/+), Homozygotie für die C282Y-Mutation; (+/-), Heterozygotie für die C282Y-Mutation; MGM, Molekülgrößen-Marker.

Abbildung 2: Identifizierung der C282Y-Mutation durch S*na*BI-Digestion der PCR-Produkte.



Abkürzungen: Bp, Fragment-Größe in Basenpaaren; (-/-), normale Allele; (+/+), Homozygotie für die H63D-Mutation; (+/-), Heterozygotie für die H63D-Mutation; MGM, Molekülgrößen-Marker.

Abbildung 3: Identifizierung der H63D-Mutation durch Bc*l*I-Digestion der PCR-Produkte.

Arbeitsprotokoll zur Bestimmung der C282Y-Mutation

- DNA-Extraktion:

1. 200 µl Vollblut (gut gemischt) in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren
2. 25 µl Qiagen-Protease + 200 µl Puffer AL dazu pipettieren, Deckel schließen und sofort 15 Sek. vortexen
3. 10 Min. bei 70°C im Thermoblock inkubieren
4. 210 µl 96 % Ethanol zufügen, vortexen
5. eine Qiagen-Säule in ein Qiagen-Auffanggefäß plazieren; Ansatz aus Reaktionsgefäß in die Säule überführen
6. 2 Min. bei 3600 UPM (~ 600xg) bei Raumtemperatur zentrifugieren; die Säule in ein Auffanggefäß plazieren, Filtrat verwerfen
7. 500 µl Puffer AW auf die Säule geben
8. 2 Min. bei 3600 UPM (~ 600xg) bei Raumtemperatur zentrifugieren; die Säule in ein Auffanggefäß plazieren, Filtrat verwerfen
9. 6 Min. bei 3600 UPM (~ 600xg) bei Raumtemperatur zentrifugieren, die

Säule in ein Reaktionsgefäß plazieren, Filtrat verwerfen

10. 200 µl 70°C steriles Aqua dest. auf die Säule geben, 1 Min. bei Raumtemperatur inkubieren, 2 Min. bei 3600 Umdrehungen/min. bei Raumtemperatur zentrifugieren
11. Säule aus Reaktionsgefäß entfernen und verwerfen, Deckel des Reaktionsgefäßes fest schließen; DNA im Reaktionsgefäß weiter verarbeiten oder bei -20°C einfrieren; mindestens 6 Monate haltbar

DNA-Ausbeute aus 200 µl Vollblut: ca. 4 – 12 µg (ca. 30 ng/µl)

- PCR+Gel-Analyse

1. DNA-Proben vortexen, kurz zentrifugieren
2. PCR-Ansatz in 1,5 ml Reaktionsgefäß ansetzen (s.u.), kurz vortexen, kurz zentrifugieren
3. 90 µl des PCR-Ansatzes in jedes PCR-Reaktionsgefäße pipettieren
4. 10 µl DNA-Probe in die entsprechenden PCR-Reaktionsgefäße pipettieren
5. 10 µl steriles Aqua dest. in das Kontoll-PCR-Reaktionsgefäß pipettieren; kurz vortexen, kurz zentrifugieren
6. PCR-Reaktionsgefäße in den Thermo Cycler stellen
7. Start folgenden Programmes:

   <u>6 Schritte, Dauer ca. 2 Stunden:</u>

   Schritt 1: 94°C 5 min.

   Schritt 2*: 94°C 30 sek.

   Schritt 3*: 50°C 30 sek.

   Schritt 4*: 72°C 30 sek.

   Schritt 5: 72°C 10 min.

   *Die Schritte 2-4 laufen 35 mal hintereinander

   PCR-Produkte gleich weiterverarbeiten oder bei –20°C einfrieren

- PCR-Ansatz (Angaben für 1 Probe):

Puffer10X:	10.0 µl
H_20:	74,8 µl
dNTPI:	2,0 µl
Primer F:	1,0 µl
Primer R:	1,0 µl

Polymerase : 1,2 µl

- Schnitt und Gel-Analyse:
  1. Schnitt-Ansatz (s.u.) in 1,5 ml Reaktionsgefäß ansetzen, kurz vortexen, kurz zentrifugieren
  2. 40 µl Schnitt-Ansatz in jedes PCR-Reaktionsgefäß pipettieren
  3. 10 µl PCR-Produkt in das entsprechende PCR-Reaktionsgefäß pipettieren, kurz zentrifugieren
  4. Reaktionsgefäße in den Thermo Cycler stellen
  5. Start folgenden Programmes:

     2 Schritte, Dauer ca. 10 Stunden, 11 Minuten

     Schritt 1: 37°C 10 sek.

     Schritt 2: 37°C 10 std. 10 min.

     Gerät ausschalten, Proben entnehmen

     Schnitt-Produkte gleich weiterverarbeiten oder bei –20°C einfrieren

- Schnitt-Ansatz (Angaben für 1 Probe):

  H_20: 34,2 µl

  PufferB: 5,5 µl

  S*na*BI: 0,6 µl

- Einstellungen zur Gel-Elektrophorese:

  -10 µl DNA mit 2,5 µl Loading-Buffer vermischen

  -Taschen des Gels befüllen

  -bei einer Stromzufuhr für die Elektrophorese-Kammer von 120 Volt ca. 60 Minuten laufen lassen

Genanalyse aus dem Wangenschleimhautabstrich

Singer-Sam et al. postulierten, daß Metallionen als Katalysatoren für die DNA-Denaturation bei hohen Temperaturen fungieren (Singer-Sam et al. 1989). Chelex 100® ist ein Chelat-bildendes Harz mit einer hohen Affinität für polyvalente Metallionen, z.B. Fe^{3+}. Es bildet mit diesen Chelatkomplexe und verhindert so die DNA-Denaturation während des Kochens der Schleimhautzellen. Die Exposition der Schleimhautzellen mit dem alkalischen Milieu der Chelex 100®-Suspension (PH=10-11) und den 100°C während des Kochvorganges führt zu einer Zerstörung der Zellmembranen und setzt die DNA frei.

Arbeitsprotokoll

DNA-Extraktion: Zwei Zacken des Wangenschleimhautabstriches werden steril abgeschnitten und in einen Eppendorf-Tube gegeben. Dazu gibt man 200 µl einer 10 % -tigen Chelex 100®-Suspension (1g Chelex 100®+ 9 ml destilliertes Wasser), sowie 5 µl Proteinase K. Nach mindestens einhalbstündiger Inkubation in einem 56° warmen Wasserbad wird das Gefäß mit dem Abstrich-Chelex-Gemisch für 8 Minuten gekocht. Anschließend wird es für 10 Sekunden gevortext und dann für 2 Minuten bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. In dem Überstand befindet sich nun die aus den Schleimhautzellen extrahierte DNA und kann für die weitere Gendiagnostik verwendet werden. 10 µl werden für den nun folgenden PCR- Ansatz dafür entnommen.
Das weitere Prozedere entspricht dem Vorgehen bei der Gendiagnostik aus dem Blut, siehe oben.

2.4.3 Serum-Ferritin und andere Parameter des Eisenstatus

Allen Patienten wurde zum Untersuchungszeitpunkt der Lebereisenbestimmung mit sterilen Monovetten (Sarstedt) Blut entnommen. Für die Serumgewinnung zum Zwecke der Bestimmung der Eisenstatus-Parameter enthalten die Monovetten gerinnungsförderndes Granulat. Nachdem das Serum durch Zentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen getrennt worden ist, wurde es in 10 ml Röhrchen ohne Granulat bei -70 C° bis zum Zeitpunkt der Analyse eingefroren. Das Blut für die Hepatitis-Bestimmung und für die Parameter der Leberfunktion wurde noch am selben Tag untersucht.

Serum-Ferritin

Das Serum-Ferritin wurde mit Hilfe eines kommerziellen automatisierten Enzymimmunoassays (Access-Ferritin immuno assay, Beckmann-Coulter, Krefeld, Deutschland) bestimmt.

Serumeisen

Das Serumeisen wurde kolorimetrisch gemäß den Empfehlungen des „International Committee for Standarization in Haematology gemessen (International Committee for Standardization in Haematology, 1978).

Ungesättigte Eisenbindungskapazität und totale Eisenbindungskapazität

Die Bestimmung der ungesättigten Eisenbindungskapazität erfolgte ebenfalls kolorimetrisch, und zwar nach Eisen-Sättigung ohne Proteinfällung (Gabbe et al. 1982). Die totale Eisenbindungskapazität ergibt sich aus der Summe von Serumeisen und ungesättigter Eisenbindungskapazität.

Transferrinsättigung

Die Transferrinsättigung wurde aus dem Verhältnis von Serumeisen zur totalen Eisenbindungskapazität berechnet.

Normwerte

Die Normwerte für die Lebereisenkonzentration von Erwachsenen sind der Literatur entnommen: 90-370 μg/g Leber (Brittenham et al. 1982). Für die Gruppe der < 18 Jährigen wurden 18 gesunde, nicht-anämische Kinder, mit einem durchschnittlichen Alter von 12.8 Jahren (Mittelwert: 12.8 Jahre ± 2.9) mit dem SQUID gemessen. Der hierbei ermittelte Wertebereich wurde als Normalbereich für diese Studie definiert: Median-Wert: 180 μg/g Leber (95%: 80/370 μg/g Leber, Engelhardt et. al. 2000). Als Normalbereich des Serum Ferritins wurden die normalen Laborreferenzwerte übernommen: 35-235 μg/L.

2.4.4 Leberfunktionsparameter

Die Leberfunktionsparameter Aspartataminotransferase, ASAT, Alaninaminotransferase, ALAT, gesamt-Bilirubin, alkalische Phosphatase, AP, und Gamma-Glutamyl-Transferase, γ-GT, wurden nach Standardverfahren bestimmt.

2.5 Erhebung klinischer Daten

Aus den Patientenakten wurde ein Basisdatensatz mit Geschlecht, Diagnose, Remissionsstatus, HST-Modus, Konditionierungsbehandlung, Komplikationen und Überlebenszeit nach HST ermittelt.

Transfusionsanamnese

Die Anzahl der verabreichten Erythrozytenkonzentrate wurden aus den Datenbanken der jeweiligen Transfusionsmedizinischen Abteilungen erhoben. Zur Berechnung des

transfundierten Hämoglobins wurden die Angaben bezüglich der Produktinformationen zu den verschiedenen Erythrozytenkonzentraten der verschiedenen Blutbanken, in denen die Patienten Bluttransfusionen erhalten haben, zugrunde gelegt. In der Menge des transfundierten Hämoglobins ist die Menge Hämoglobin, welche im Rahmen der allogenen Knochenmarktransplantation transfundiert wurde, enthalten. Dabei wurden pro 500 ml transfundierten Knochenmarks 52g Hämoglobin berechnet.

Vorbestehende Lebererkrankungen, Lebervenenverschluß-Erkrankung, akute und chronische GvH-Reaktion

Entsprechende Informationen wurden retrospektiv aus den Arztbriefen entnommen. Hierzu zählen auch die Serologien für Hepatitis-B und C. Wo aktuelle Informationen nicht vorhanden waren, wurde im Rahmen der Blutabnahme auch Blut für die Hepatitis-Serologien entnommen. Die Antigene wurden mittels eines Mikropartikel-Enzymimmunoassays der 3. Generation bestimmt (Abott AxSYM, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland).

Alkoholkonsum

Bei allen Patienten wurde durch einen Fragebogen der Umfang des Alkoholkonsumes erhoben. Entsprechend der Literatur wurde für Frauen ein täglicher Konsum von $\geqq$ 20g, für Männer ein täglicher Konsum von $\geqq$ 60g als Abusus definiert (Herold et al. 2000).

2.6 Statistik

Gruppenvergleiche, d.h. Vergleiche zwischen Patienten und normalen Kontrollgruppen, sowie Vergleiche zwischen Patientenuntergruppen, wurden mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei $P < 0.05$. Nicht normalverteilte Parameter wie LIC-Werte und Serum-Ferritin, wurden erst nach logarithmischer Transformation miteinander korreliert.

3. Ergebnisse

In dieser Studie haben 71 von 101 der angeschriebenen Patienten teilgenommen. Bei 70 dieser Patienten wurde die Lebereisenkonzentration (LIC) mit dem Biomagnetometer bestimmt. Von einem Patienten konnte mit der biomagnetischen Lebersuszeptometrie keine LIC ermittelt werden, da es zu einer die Messung störenden Interferenz mit Metallimplantaten kam, welche der Patient als Folge einer orthopädischen Operation in seiner Lendenwirbelsäule trägt, so dass dieser Patient nicht in den Auswertungen der Daten dieser Studie aufgeführt ist.

Es fand sich ein Median-Wert von 798 µg/g Leber (Bereich von 1-4426, n=70, s. Tabelle 2 auf Seite 24 und Abbildung 4).

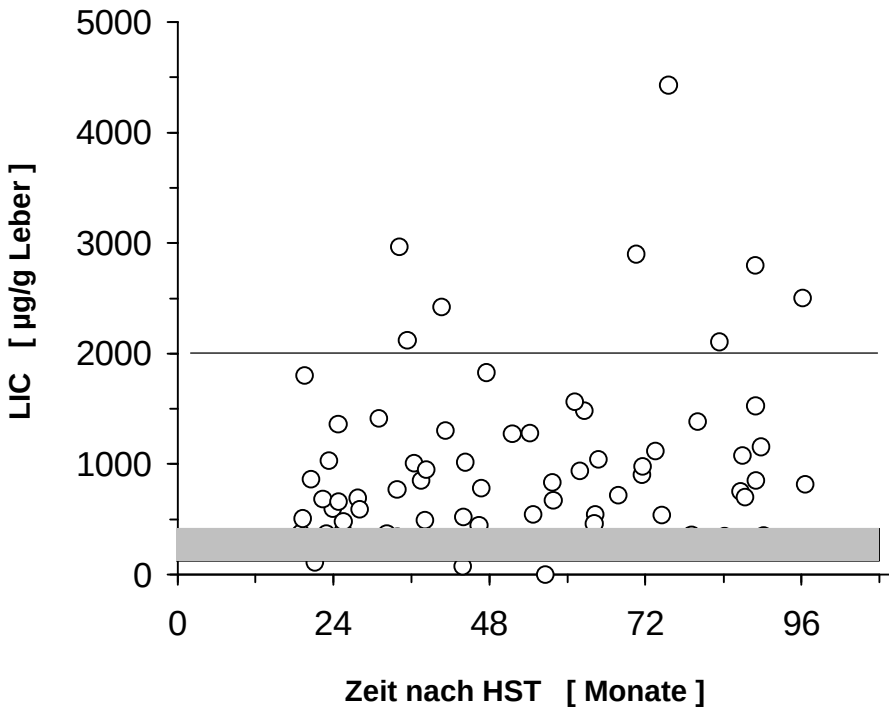


Abbildung 4: LIC (Lebereisenkonzentration) von Langzeit-Überlebenden im Verhältnis zum zeitlichen Abstand zur ersten HST (hämatopoetische Stammzelltransplantation, n=70). Der grau unterlegte Bereich hebt den Normalbereich für die LIC von gesunden Erwachsenen hervor. Die durchgezogene Linie markiert die LIC, ab der bei Patienten mit Thalassämie Organschäden auftreten.

Der Median-Wert der LIC-Werte für die Patientengruppe mit einem Alter ≤ 18 Jahre zum Zeitpunkt der 1. Transplantation betrug 900 µg/g Leber (Bereich von 370-2794,

n=18). Für die Gruppe der Patienten > 18 Jahre ergab sich ein Median-Wert der LIC-Werte von 760 µg/g Leber (Bereich von 1-4426, n=52, Normalbereich für Erwachsene: 80-370 µg/g Leber; für Kinder (< 18 Jahre): 180 µg/g (95%: 80/370 µg/g). 26 von 70 Patienten (37%) hatten LIC-Werte > 1000 µg/g Leber. Bei 8/70 (11%) fanden sich LIC-Werte > 2000 µg/g Leber. Davon war 1 Patient < 18 Jahre alt und eine Patientin hatte eine LIC über 4000 µg/g Leber (s. Abbildung 4).

Die Serum-Ferritin-Werte waren ebenfalls erhöht. Der Median-Wert betrug 340 µg/L (Bereich von 23-5414, n=69, Normalbereich: 35-235 µg/L). Die Korrelationsanalyse zwischen den LIC-Werten und den Serum Ferritin-Werten ergab eine hoch signifikante Korrelation (P < 0.001) (s. Abbildung 5). Der Vorhersage-Bereich, in dem bei einem Serum-Ferritin-Wert von 1000 µg/L 95% der LIC-Werte lagen, reichte ca. von 0-3.500 µg/g Leber (s. Abbildung 6).

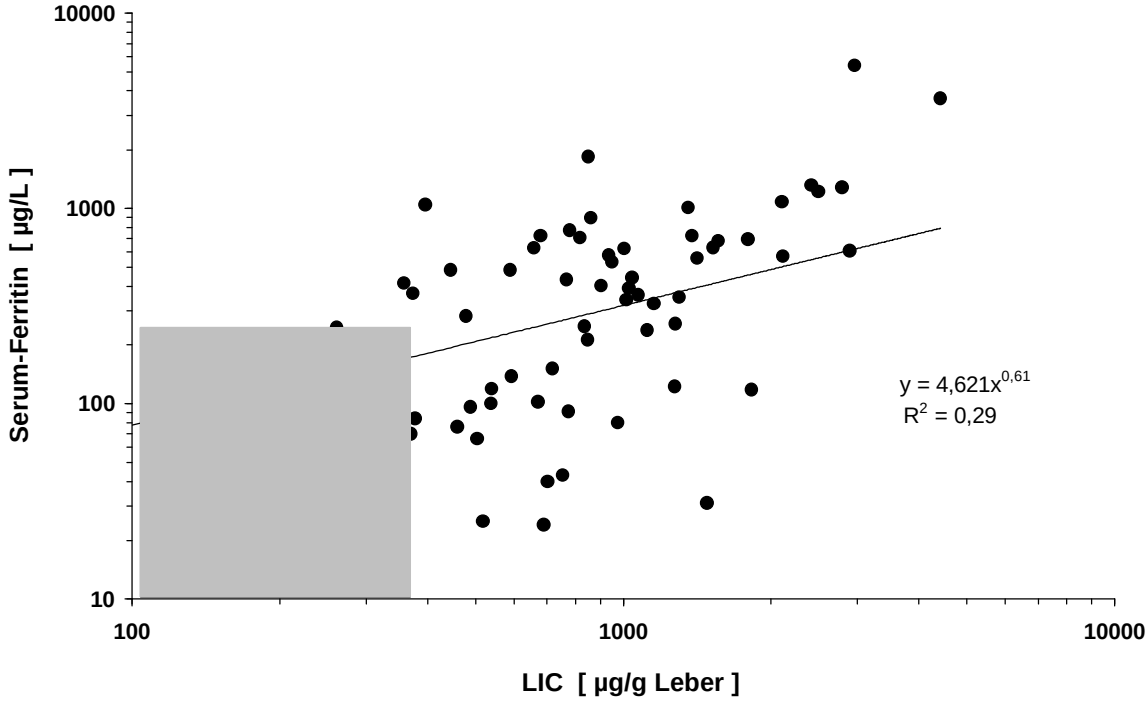


Abbildung 5: Doppelt-logarithmische Darstellung der LIC (Lebereisenkonzentration) gegen Serum-Ferritin in Langzeit-Überlebenden nach HST (hämatopoetische Stammzelltransplantation, n=69). Das graue Rechteck unterlegt die normalen LIC- und Serum-Ferritin-Werte.

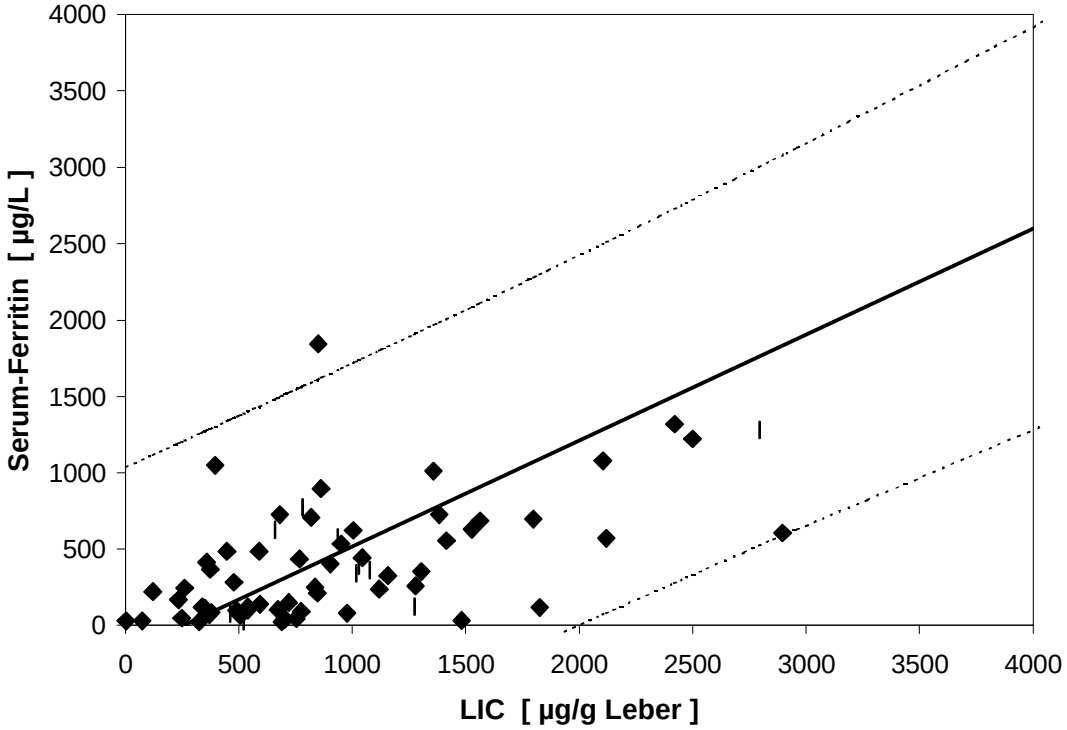


Abbildung 6: LIC (Lebereisenkonzentration) von Langzeit-Überlebenden nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HST) gegen Serum-Ferritin (n=69). Die gestrichelten Linien zeigen den 95%-Vorhersage-Bereich für die Serum-Ferritin-Werte bei gegebenen LIC-Werten an (R^2 = 0,47).

Von 41 Patienten konnte eine komplette Transfusionsanamnese erhoben werden. Die Patienten erhielten durchschnittlich 25 Erythrozytenkonzentrate (Mittelwert: 25 ± 21, Bereich von 3-88). Für die Korrelation der LIC-Werte mit der Menge des transfundierten Hämoglobins wurde die gemessene LIC mit Hilfe der normalen Eliminationsrate (ER) für Eisen von 0.05%/d (Heinrich 1973) auf den Zeitpunkt der 1. HST zurückgerechnet (LIC(t_0)). Dies ist darin begründet, dass für die Patienten bis zu diesem Zeitpunkt die grösste Transfusionsbedürftigkeit bestanden hat. Die LIC(t_0)-Werte korrelierten signifikant ($P < 0.01$, s. Abbildung 7) mit der Menge des transfundierten Hämoglobins.

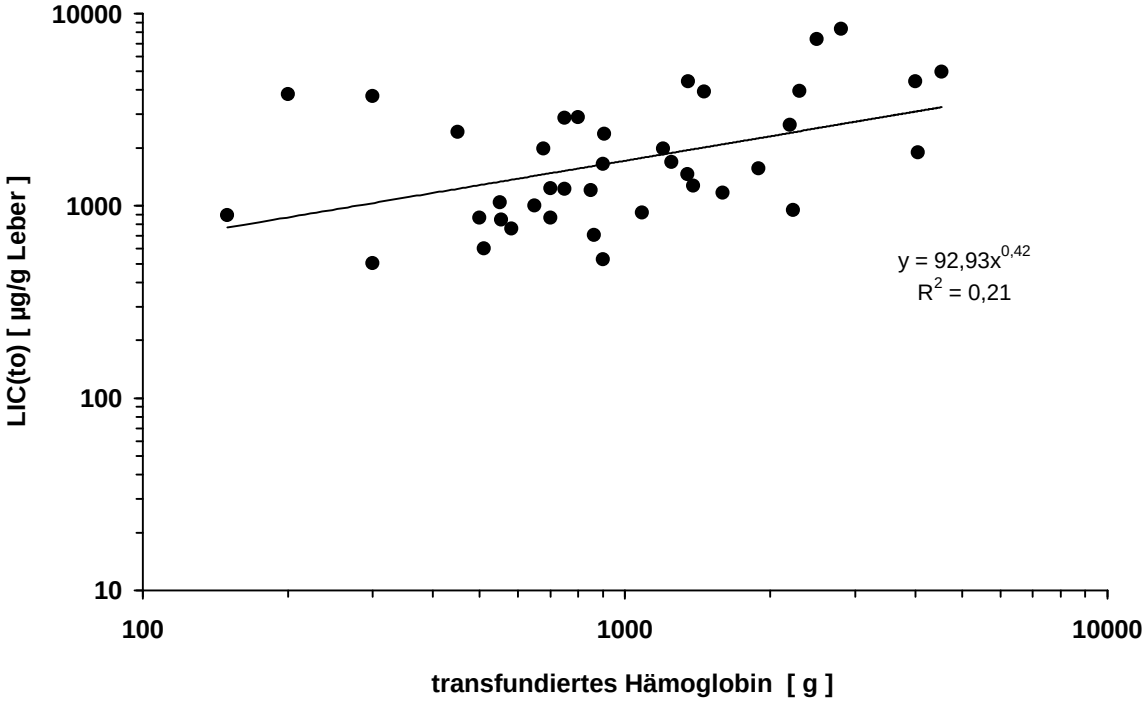


Abbildung 7: Doppelt-logarithmische Darstellung der LIC(t_0) (Lebereisenkonzentration zum Zeitpunkt der 1. hämatopoetischen Stammzelltransplantation, HST) im Verhältnis zum transfundierten Hämoglobin in Langzeit-Überlebenden nach HST.

Daneben wurden andere Faktoren daraufhin untersucht, ob sie einen Einfluß auf die Lebereisenüberladung haben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt. Das Geschlecht, das Lebensalter zum Zeitpunkt der ersten Transplantation, sowie die Art der Transplantation (allogen oder autolog) hatten keinen Einfluß auf die Lebereisenkonzentration. Patienten, die aufgrund einer Akuten Myeloischen Leukämie, Akuten Lymphozytischen Leukämie oder einer Chronischen Myeloischen Leukämie transplantiert worden sind, hatten höhere LIC-Werte als Patienten mit M. Hodgkin oder Non-Hodgkin Lymphomen. Patienten, deren Transplantation länger als 6 Jahre zurücklag, wiesen keine signifikant höheren LIC-Werte auf als Patienten, welche weniger als 3 Jahre vor der Messung mit dem SQUID-Biosuszeptometer eine HST erhalten haben. 20/21 der autolog transplantierten Patienten wurden auf die HFE-Genmutationen C282Y und H63D in aus Vollblut isolierten Leukozyten hin untersucht. 46/49 der allogen transplantierten Patienten wurden auf die C282-Mutation, und 38/49 wurden auf die H63D-Mutation in Wangenschleimhautzellen hin untersucht. 7 Patienten (10%) waren heterozygote Genträger für die C282Y-Mutation (ein Patient von diesen 7 war kombiniert-heterozygot für beide Mutationen), doch dies war nicht mit

Tabelle 2: Lebereisenkonzentration in Untergruppen von Langzeit-Überlebenden nach HST.

	n	LIC Median-Wert	U-Test P
Gesamt	70	798	
Geschlecht			
Weiblich	22	882	n.s.
Männlich	48	773	
Alter[#] (in Jahren)			
≤ 18	18	900	n.s.
> 18	52	760	
Diagnosen			gegen Lymphome
Akute Myeloische Leukämie	17	1028	< 0,001
Akute Lymphatische Leukämie	10	1147	< 0,01
Chronische Myeloische Leukämie	17	690	< 0,05
Lymphome[##]	16	421	
Aplastische Anämie / MDS / HLH	10	977	n.s.
Art der HST			
Allogen	49	861	n.s.
Autolog	21	544	
Zeitlicher Abstand zur ersten Transplantation (in Monaten)			
≤ 36	22	669	n.s.
≥ 72	21	939	
C282Y-Mutation			
+ / -	7*	519	< 0,05**
- / -	59	850	
H63D-Mutation			
+ / +	3	1481	n.s.***
- / -	43	658	
+ / -	12*	1059	

[#]zum Zeitpunkt der 1. Transplantation
[##]Die Gruppe der Lymphome beinhaltet 6 Patienten mit M. Hodgkin und 10 Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen
*beinhaltet 1 Patienten, der für beide Mutationen heterozygot war
**hier wurden heterozygote Patienten, n=7, gegen für *beide* Mutationen negative Patienten, n=37, verglichen
***hier wurden homozygote Patienten, n=3, gegen für *beide* Mutationen negative Patienten, n=37, verglichen
Abkürzungen: MDS, Myelodysplastisches Syndrom; HLH, Hämophagozytische Lymphohistiozytose; C282Y, Mutation für die genetische Hämochromatose; H63D, Mutation für die genetische Hämochromatose.

erhöhten LIC-Werten assoziiert. 3 Patienten (5%) waren homozygote Träger der H63D-Mutation. Dies war mit erhöhten LIC-Werten assoziiert, aber statistisch nicht signifikant. Eine dezidierte Darstellung aller Ergebnisse der C282Y- und H63D-Mutationen befindet sich in den Tabellen 4 und 5 im Anhang unter 7.3. Idealerweise hätten die LIC-Werte für diesen Vergleich um die Menge des transfundierten Hämoglobins korrigiert werden müssen. Da die Transfusionsanamnese aber nicht für alle Patienten erhoben werden konnte, wurde darauf verzichtet.

Pathologische Leberfunktionsparameter wurden in 25/64 Patienten (39%) gefunden. Die Blutproben für die Analyse der Leberfunktionsparameter wurden am Tag der Messung der LIC-Werte entnommen. Diese Daten, zusammen mit klinischen Daten und den Ergebnissen der Parameter des Eisenstatus, sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Langzeit-Überlebende nach HST (hämatopoetische Stammzelltransplantation) mit pathologischen Leberfunktionsparametern (n=25).

Nr.	γ-GT > 1.25 x N	ALAT > 1.25 x N	ASAT > 1.25 x N	AP > 1.25 x N	Bilirubin > 1.25 x N	Ferritin µg/L	LIC µg/g	Klinische Daten
1	+	+	+	+	-	119	540	Chronische Hepatitis C
2	+	+	+	+	-	1220	2499	Chronische GvH-Reaktion
3	+	+	-	+	-	142	2960	Chronische GvH-Reaktion
4	+	+	-	+	-	389	1028	Chronische GvH-Reaktion
5	+	+	+	-	-	249	835	systemische CMV Infektion, EBV Infektion
6	+	+	-	-	-	725	1382	Hepatopathie unklarer Genese; BMI: 30,8
7	+	-	-	+	-	119	338	- BMI 29.4
8	+	-	-	+	-	1047	396	> 50g/d Alkoholkonsum
9	+	-	-	-	-	118	1825	Cholezystolithiasis
10	+	-	-	-	-	1842	850	-
11	+	-	-	-	-	151	719	-
12	+	-	-	-	-	100	539	-
13	+	-	-	-	-	Nu	349	- BMI: 36.5
14	+	-	-	-	-	896	861	-
15	-	+	-	-	-	433	767	-
16	-	+	+	-	-	23	324	> 60g/d Alkohol; Chronische Hepatitis C
17	-	-	-	+	-	3667	4426	
18	-	-	-	+	-	443	1043	
19	-	-	-	+	-	24	690	
20	-	-	-	+	-	724	679	
21	-	-	-	+	-	708	817	
22	-	-	-	+	-	281	479	
23	-	-	-	+	-	70	370	
24	-	-	-	+	-	483	446	
25	-	-	-	-	+	483	589	

>1.25 x N, 1.25 x oberer Grenzwert des Normalbereiches; γ-GT, γ-Glutamyltransferase; ALAT, Alanin-Aminotransferase; ASAT, Aspartat-Aminotransferase; AP, Alkalische Phospatase; LIC, Lebereisenkonzentration: liver iron concentration; BMI, body mass index; Nu, nicht untersucht

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Lebereisenkonzentrationen (LIC) bei Langzeit-Überlebenden nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HST) erhöht sind. 83% der von uns untersuchten Patienten hatten LIC-Werte oberhalb des Normalbereiches.

Erfassung des Speichereisens

Für die Bestimmung des Körpereisengehaltes stellt die Leber ein geeignetes Organ dar, weil der größte Teil des Speichereisens dort gespeichert wird. Die biochemische Bestimmung des Eisengehaltes in Leberbiopsien gilt als Goldstandard. Darauf wurde in dieser Studie verzichtet, da diese als invasive Methode mögliche Nebenwirkungen wie Blutungen und Infektionen zur Folge haben kann. Die Werte der biomagnetischen Lebereisenbestimmung korrelieren gut mit den aus Leberbiopsien gewonnenen Lebereisenkonzentrationen (Brittenham et al. 1982; Fischer et al. 1992). Damit ist das Verfahren ähnlich gut und hat den Vorteil, nicht invasiv zu sein. Ein Nachteil dieser Methode besteht in der Verfügbarkeit des Biomagnetometers, da zur Zeit jeweils nur eines in Deutschland, Italien und in den USA vorhanden ist.
In der Klinik wird zur Orientierung über den Körpereisengehalt der Serum-Ferritin-Wert benutzt. Liegt eine Eisenüberladung des Körpers vor, besteht zwar eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Serum-Ferritin-Werten und den LIC-Werten, aber der 95% Vorhersage-Bereich ist zu groß, um bei gegebenem Serum-Ferritin-Wert Voraussagen über individuelle LIC-Werte treffen zu können (Brittenham et al. 1993). Der Serum-Ferritin-Wert zeigte auch in dieser Studie eine hoch signifikante Korrelation mit den LIC-Werten ($P < 0.001$, Abbildung 5) bei einem 95% Vorhersage-Bereich, der zu gross war, um auf die tatsächliche LIC schließen zu können. Einige Patienten mit normalem Serum-Ferritin-Wert hatten erheblich erhöhte LIC-Werte (s. Abbildung 5 und 6). Andererseits ist eine Erhöhung des Serum-Ferritin-Wertes möglich, ohne dass auch die LIC erhöht sein muß, zB. im Rahmen von Entzündungen (Lipschitz et al. 1974).

Eisentoxische Wirkungen

Eine Eisenüberladung des Körpers kann erhebliche Organschäden zur Folge haben. Das Schwermetall Eisen kann im Organismus prinzipiell toxisch wirken. Die katalytische Rolle von Eisen bei der Bildung von freien Sauerstoffradikalen ist lange

bekannt und gut untersucht (Halliwell u. Gutteridge 1984). Diese eiseninduzierten Radikale können z.B. mit DNA, Lipiden und Proteinen reagieren (Imlay et al. 1988; Minotti u. Aust 1989; Stadtman 1992). Bei einer Reihe von Krankheitsbildern wird die ursächliche Beteiligung von freien Sauerstoffradikalen vermutet (Halliwell 1994). Das Ausmaß der Organtoxizität durch Eisen scheint dabei eine Funktion des Schweregrades (Barry et al. 1974; Modell u. Berdoukas 1984) und der Zeitdauer der Exposition zu sein. Wenn ein erhöhter Körpereisengehalt längere Zeit besteht, führt dies zu einer Schädigung endokriner Gewebe. Krankmachende Effekte exzessiv erhöhten Körpereisens auf das Wachstum, die Pubertätsentwicklung, die Schilddrüsenfunktion und auf die endokrine Pankreasfunktion wurden bei Kindern und jungen Erwachsenen mit Thalassämie gesehen (Zurlo et al. 1989). Die häufigsten endokrinen Funktionsstörungen durch Eisenüberladung in jungen Patienten mit Thalassämia major sind: Hypogonadotroper Hypogonadismus, Wachstumshormonmangel und Diabetes mellitus (Grundy et al. 1994; Kwan et al. 1995). Eine Therapie mit Desferrioxamin kann Wachstumsstörungen, gonadale Dysfunktionen (Bronspeigel-Weintrob et al. 1990) und das Risiko der Entwicklung eines Diabetes mellitus (Brittenham et al. 1994) mindern. Ein Diabetes mellitus und Gynäkomastie tritt auch bei Patienten mit genetischer Hämochromatose auf und kann ebenfalls mittels einer frühen Diagnosestellung und Phlebotomiebehandlung verhindert werden (Niederau et al. 1996). Bei Patienten mit genetischer Hämochromatose stellt die durch Eisenüberladung des Körpers bedingte Kardiomyopathie eine mögliche Todesursache dar. Niederau et al. beschrieben in einer Studie die Todesursachen bei 69 von 251 Patienten mit genetischer Hämochromatose. 7% dieser Patienten verstarben aufrund einer Kardiomyopathie, 14 mal häufiger als die Mortalitätsrate für Kardiomyopathie in Deutschland erwarten ließ (Niederau et al. 1996). Überlebende einer HST können durch eine vorherige mediastinale Bestrahlung, Ganzkörperbestrahlung oder durch die Gabe von Anthrazyklinen vorgeschädigt sein. Die myokardial schädigende Wirkung des Eisens könnte in dieser Patientengruppe eine zusätzliche schädigende Funktion haben. Darüber hinaus könnte eine Eisenüberladung bei Patienten nach HST möglicherweise zu der Pathogenese fungaler Infektionen beitragen (Maertens et al. 1999).

Dies ist die erste Studie, in der quantitative Daten zur Lebereisenkonzentration bei Langzeit-Überlebenden nach HST erhoben worden sind. Es wurden Lebereisenkonzentrationen in einem potentiell toxischen Ausmaß in einer beachtlichen Zahl von Langzeit-Überlebenden nach HST gefunden. 37% der Patienten hatten LIC-Werte > 1000 µg/g Leber, 11% wiesen LIC-Werte > 2100 µg/g Leber auf. Letztere

Werte liegen bei Thalssämie-Patienten in einem Konzentrationsbereich, von dem angenommen wird, dass er mit erhöhtem Risiko für Organschäden verbunden ist (Olivieri u. Brittenham 1997). 1 Patientin wies eine LIC > 4400 µg/g Leber auf. Bei Patienten mit Thalassämia major und solchen mit transfusionsbedingter Eisenüberladung wurde gezeigt, dass Konzentrationen > 4480 µg/g Leber mit einem erhöhten Risiko für den plötzlichen Herztod assoziiert sind (Brittenham et al. 1994). Bei Patienten mit genetischer Hämochromatose kann eine mit dem Lebensalter zunehmende erhebliche Eisenüberladung zu einer Leberzirrhose führen, welche durch eine fühzeitige Diagnostik und Therapie verhindert werden kann (Niederau et al. 1985; Niederau et al. 1996). Risdon et al. haben in einer Studie 19 häufig transfundierte Patienten mit Thalassämie untersucht und fanden eine enge Korrelation zwischen der LIC und dem Schweregrad der Leberfibrose bei diesen Patienten (Risdon et al. 1975). Bei HST-Patienten könnte eine Eisenüberladung, den durch VOD, chronische GvH-Reaktion, exzessiven Alkoholkonsum oder durch virale Hepatitis bedíngten Leberzellschaden möglicherweise verstärken. In dieser Studie war die Prävalenz einer Hepatitis C Infektion gering (3%) wie es die lokale Spenderpopulation erwarten ließ. In anderen Patientenpopulationen ist die Hepatitis C-Prävalenz beträchtlich höher (Aricò et al. 1994). Langzeit-Überlebende nach HST mit Hepatitis C entwickeln schneller eine Leberzirrhose als Patienten mit Hepatitis C ohne HST (Strasser et al. 1999). Hierfür könnte die zusätzliche Eisenüberladung verantwortlich sein. Diese Patienten sind möglicherweise auch einem höheren Risiko für die Entwicklung eines sekundären hepatozellulären Karzinomes ausgesetzt. Zudem vermindert eine erhebliche Eisenüberladung den Erfolg einer Interferon-Therapie bei Patienten mit Thalassämie und chronischer Hepatitis C Infektion (Clemente et al. 1994).

Eisenüberladung nach HST

Harrison et al. erhob bei 38 Patienten, deren konventionelle Chemotherapie oder autologe Knochenmarktransplantation mindestens 3 Jahre zurücklag, die Parameter Serum-Ferritin, Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Bleomycin-detektierbares Eisen (Non-transferrin-bound iron, NTBI) (Harrison et al. 1996). Sie identifizierten 6 Patienten mit erhöhten ASAT-Werten, welche sich weder durch eine virale Hepatitis, noch durch eine chronische GvH-Reaktion erklären liessen. Jeder dieser 6 Patienten wies stark erhöhte Serum-Ferritin-Werte (Bereich von 980–4214 ng/ml) auf, und 4 von ihnen hatten NTBI im Serum. Die Autoren vermuteten, dass Eisenüberladung ein

möglicher Grund für Leberfunktionsstörungen bei Langzeit-Überlebenden nach Chemotherapie oder Knochenmarktransplantation sein könnte.
In der vorgelegten Studie fanden sich pathologische Leberfunktionsparameter bei 39% der Patienten (s. Tabelle 3). Die häufigsten Formen waren dabei isoliert erhöhte Alkalische Phosphatase-Werte (n=9) und erhöhte γ-Glutamyltransferase-Werte (n=6). Gründe für pathologische Leberfunktionsparameter bei unseren Patienten können sein: Chronische GvH-Reaktion (n=3); Body mass index > 30 kg/m^2 (Salvaggio et al. 1991) (n=2); Chronische Hepatitis C Infektion (n=2); Alkoholabusus, wie unter Methoden definiert (n=1); Cholezystolithiasis (n=1); Andere, die Leber mit betreffende Infektionen (systemische CMV Infektion, EBV Infektion (n=1). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Patienten in dieser Studie wieder, welche den entsprechenden Befund aufwiesen. 16 Patienten wiesen keinen klinischen Befund auf, welcher die pathologische Erhöhung der Leberfunktionsparameter erklären würde. 14 dieser 16 Patienten hatten aber über dem Normalbereich liegende LIC-Werte (Bereich von 396 - 4426 μg/g Leber, s. Tabelle 3, Nummer: 8, 10-12, 14, 15, 17-22, 24, 25). 2 von diesen 14 Patienten hatten eine LIC > 1000 μg/g Leber (s. Tabelle 3, Nummer 17 und 18).

In dieser Studie wurden die wesentlichen Faktoren untersucht, welche einen Einfluß auf den Eisenstoffwechsel und damit auf den Lebereisengehalt haben können.
Die LIC-Werte stiegen mit der Menge des transfundierten Hämoglobins (s. Abbildung 7, $P < 0.01$). Die Kenntnis der Anzahl transfundierter Erythrozytenkonzentrate vor und während der HST kann somit zumindest einen Hinweis auf eine Eisenüberladung des Körpers liefern. Das Geschlecht und das Lebensalter, sowie die Art der HST (allogen oder autolog) zeigten sich ohne Einfluß auf die LIC in der Studienpopulation. Die niedrigen LIC-Werte bei Patienten der Gruppe mit M. Hodgkin oder NHL sind sehr wahrscheinlich durch den geringeren Bedarf an Erythrozytenkonzentraten im Rahmen der konventionellen Therapie vor HST zu erklären. Bei Patienten < 3 Jahre nach HST verglichen mit denen > 6 Jahre fanden sich keine höheren LIC-Werte (s. Tabelle 2). Eine nur langsame Abnahme des Lebereisengehaltes wurde ebenfalls bei Patienten mit Thalassämie nach HST gefunden (Lucarelli et al. 1993) und wurde daher auch in dieser Studie erwartet. Aus dem Verhältnis der Eliminationsrate des Körpereisens zum zeitlichen Abstand zur 1. HST geht hervor, dass sich die Eliminationsrate dem normalen Wert von 0.05%/d (Heinrich 1973) annähert, je größer der Abstand zur 1. HST ist (s. Abbildung 8). Fischer et al. haben die Kinetik des Körpereisengehaltes (biomagnetometrisch aus Leber- und Milzeisen bestimmt) eines Thalassämie-Patienten vor, und über einen Zeitraum von 18 Monaten nach Knochenmarktransplantation verfolgt. Bei diesem Patienten haben die Körpereisenspeicher in den ersten 50 Tagen

nach Transplantation zunächst stark, und auch in den folgenden Monaten noch weiterhin kontinuierlich zugenommen (Fischer et al. 1997). Möglicherweise war in unserer Studie somit nicht die Eliminationsrate zu einem Zeitpunkt nahe der 1. HST erhöht, und hat im Laufe der Zeit abgenommen, sondern hat die Bestimmung der LIC zu einem früheren Zeitpunkt nicht den tatsächlichen Körpereisengehalt erfaßt, da das durch Transfusionen zugeführte Eisen noch nicht in der Leber gespeichert war.

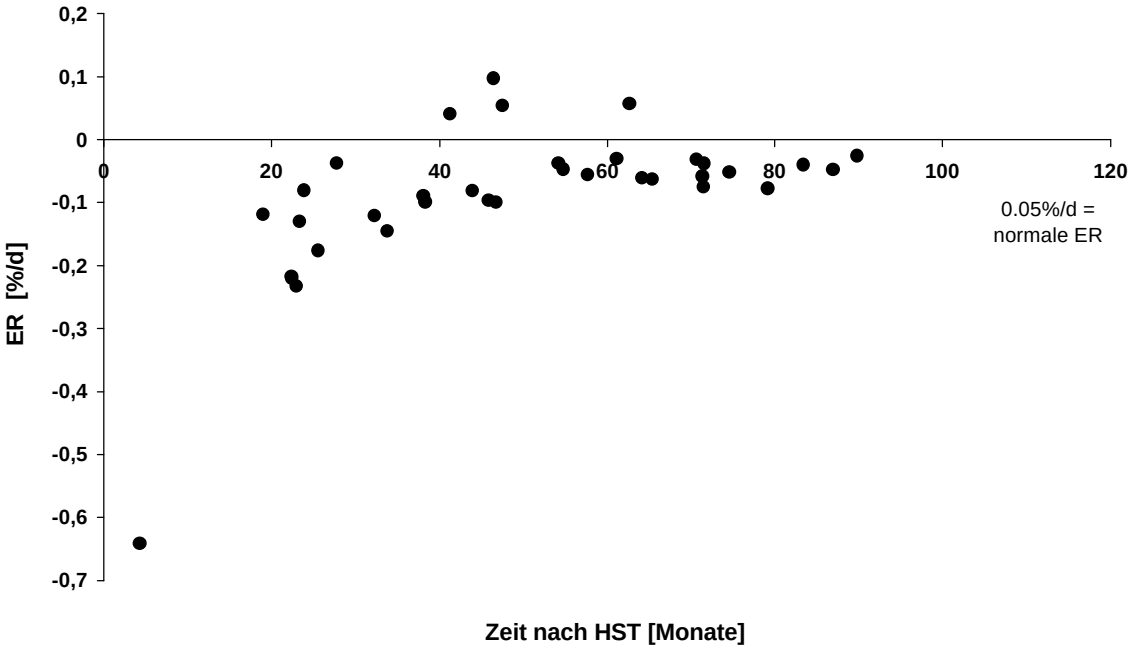


Abbildung 8: Eliminationsrate (ER) des Körpereisens von Langzeit-Überlebenden im Verhältnis zum zeitlichen Abstand zur ersten HST (hämatopoetische Stammzelltransplantation, n=35).

4 Patienten zeigten eine "positive Eliminationsrate" (s. Abbildung 8). Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass bei diesen Patienten (s. Anhang 7.3, Nr. 15, 26, 35, 45) die Transfusionsanamnese möglicherweise unvollständig war, so dass bei der Berechnung der ER die LIC-Werte zum Zeitpunkt der 1. HST zu gering waren.

Dass in dieser Studie niedrigere LIC-Werte bei Patienten, welche heterozygote Träger der C282Y-Hämochromatose Mutation sind, gefunden wurden, entspricht nicht den Erwartungen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Heterozygote verglichen mit normalen Kontrollpersonen einen höheren Körpereisengehalt aufweisen (Cartwright et al. 1979). Allerdings stand 1979 die Möglichkeit der Diagnostik der HFE-Genmutationen noch nicht zur Verfügung. Die H63D-Mutation im homozygoten Status war mit erhöhten LIC-Werten assoziiert, aber statistisch nicht signifikant (s. Tabelle 2).

Seitdem die Indikationen für eine HST an Zahl zugenommen haben, und ihre Erfolgsrate angestiegen ist, wächst auch die Zahl der Langzeit-Überlebenden, welche Langzeit-Komplikationen ausgesetzt sind. Die vorgelegte Studie zeigt, dass eine Eisenüberladung des Körpers eine häufige Folge nach HST ist. Die kritische Lebereisenkonzentration bei diesen Patienten ist noch nicht bekannt, aber mag von Patient zu Patient unterschiedlich sein, abhängig von vorangegangener Chemotherapie, Bestrahlungen und HST-spezifischen Komplikationen. Einige Patienten nach HST zeigten eine Abnahme erhöhter Leberfunktionsparameter unter Phlebotomie (McKay et al. 1996). Aber selbst wenn die parenchymatöse Überladung mit Eisen klinisch asymptomatisch bleiben sollte, sind Phlebotomien aufgrund der Toxizität von Eisen und den geringen Kosten bei einem Teil der Patienten zu empfehlen. Es bleibt offen zu beweisen, ob eine Eisenüberladung des Körpers zu Spätkomplikationen nach HST führt, in welchem Zeitraum diese Patienten akkumuliertes Eisen ohne Interventionen wieder ausscheiden und ob Phlebotomien imstande sind, die Morbidität nach HST zu reduzieren. Eine Frage ist auch, ob eine Eisenüberladung vor HST das Transplantationsrisiko erhöht, wie Lucarelli et al. dies bei Thalassämie-Patienten gesehen haben (Lucarelli et al. 1996). Dies wird besonders wichtig für Patienten, bei denen eine zweite HST erforderlich ist.

5. Zusammenfassung

Langzeit-Überlebende nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HST) haben ein erhöhtes Risiko einer Überladung des Körpers mit Eisen, aber bisher gibt es in der Literatur keine quantitativen Daten zu diesem Problem. Um die Inzidenz, das Ausmaß und mögliche Risikofaktoren für eine Körpereisenüberladung bei diesem Patientengut zu untersuchen, wurde die Lebereisenkonzentration (LIC) mittels biomagnetischer Leber-Suszeptometrie bei 70 Patienten gemessen, welche aufgrund einer malignen hämatologischen Erkrankung oder Aplastischen Anämie eine HST erhalten haben, die zum Zeitpunkt des Studienbeginns mindestens 1 Jahr zurück lag. Serum-Ferritin, die Hämochromatose-Mutationen C282Y und H63D, Hepatitis-Serologien und Leberfunktionsparameter wurden analysiert. Informationen bezüglich der Anzahl transfundierter Erythrozytenkonzentrate und klinischer Daten wurden sowohl aus Datenbanken der entsprechenden Kliniken, als auch durch Fragebögen erhoben. 18 der 70 Patienten waren ≤ 18 Jahre alt zum Zeitpunkt ihrer ersten Transplantation. Die Befunde ergaben eine erhöhte Lebereisenkonzentration im Median von 798 μg/g Leber (Bereich von 1-4426; Normalbereich für Erwachsene: 90-370 μg/g Leber, für unter 18 Jährige: 80-370 μg/g Leber). Der Median der Serum-Ferritin-Werte war mit 325 μg/L bei den Patienten ebenfalls erhöht. 8 Patienten wiesen LIC-Werte auf, welche über der Schwelle liegen, die bei Thalassämie-Patienten mit einem erhöhten Risiko für Eisen-induzierte Komplikationen einhergehen (d.h. ≥ 2100 μg/g Leber). Eine Patientin hatte eine LIC von 4426 μg/g Leber und damit einen Wert, welcher in der Nähe der Konzentration liegt, bei der Thalassämiker einem erhöhten Risiko für einen frühen Herztod ausgesetzt sind. Alter und Geschlecht hatten keinen Einfluß auf die LIC, aber die Gruppen der Patienten mit den Diagnosen Akute Myeloische Leukämie, Akute Lymphatische Leukämie oder Chronische Myeloische Leukämie waren mit höheren LIC-Werten assoziiert. 7 Patienten waren heterozygote Träger der HFE-Genmutation C282Y, und 3 Patienten waren homozygote Träger der H63D-Mutation. Letztere hatten höhere LIC-Werte verglichen mit H63D-negativen Patienten. Weder die Menge des transfundierten Hämoglobins noch die Höhe der Serum-Ferritin-Werte hatten einen ausreichend guten Vorhersagewert für die Identifizierung einer Eisenüberladung. Pathologische Leberfunktionsparameter wurden bei 25/64 untersuchten Patienten gefunden, eine eindeutige Assoziation mit erhöhter LIC ließ sich allerdings nicht nachweisen. Unsere Daten zeigen ein potentiell schädliches Ausmaß von Eisenüberladung in einer erheblichen Anzahl von Langzeit-Überlebenden nach HST. Dies deutet auf die Notwendigkeit einer gezielteren Diagnostik auf eine Eisenüberladung, und mögliche therapeutische Intervention in diesem Patientenkollektiv hin.

6. Literaturverzeichnis

Aricò M, Maggiore G, Silini S, Bono F, Vigano C, Cerino A, Mondelli MU (1994) Hepatitis C infection in children treated for acute lymphoblastic leukemia. Blood 84:2919-2922

Barisani C, Berg CL, Wessling-Resnick M, Gollan JL (1995) Evidence for a low K_m transporter for non-transferrin-bound iron in isolated rat hepatocytes. Am J Physiol 269:G570-G576

Barry M, Flynn DM, Letsky EA, Risdon RA (1974) Long-term chelation therapy in thalassaemia major: effect on liver iron concentration, liver histology, and clinical progress. BMJ 2:16-20

Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, Petersen FB, Fisher LD, Clift RA, Thomas ED (1988) Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. J Clin Oncol 6: 1562-1568

Brissot P, Bolder U, Schteingart CD, Arnaud J, Hofmann A (1997) Intestinal absorption and enterohepatic cycling of biliary iron originating from plasma non-transferrin-bound iron in rats. Hepatol 25:1457-1461

Brittenham GM, Farrell DE, Harris JW, Feldman ES, Danish EH (1982) Magnetic-susceptibility measurement of human iron stores. N Engl J Med 307:1671-1675

Brittenham GM, Cohen AR, McLaren CE, Martin MB, Griffith PM, Nienhuis AW, Young NS, Allen CJ, Farrell DE, Harris JW (1993) Hepatic iron stores and plasma ferritin concentration in patients with sickle cell anemia and thalassemia major. Am J Hematol 42:81-85

Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, McLaren CE, Young NS, Tucker EE, Allen CJ, Farrell DE, Harris JW (1994) Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. N Engl J Med 331:567-573

Bronspeigel-Weintrob N, Olivieri NF, Tyler BJ, Andrews D, Freedman MH, Holland FJ (1990) Effect of age at the start of iron chelation therapy on gonadal function in ß-thalassemia major. N Engl J Med 323:713-719

Cartwright GE, Edwards CQ, Kravitz K, Skolnick M, Amos DB, Johnson A, Buskjaer L (1979) Hereditary hemochromatosis: phenotypic expression of the disease. N Engl J Med 301:175-179

Cazzola M, Barosi G, Gobbi PG, Invernizzi R, Riccardi A, Ascari E (1988) Natural history of idiopathic refractory sideroblastic anemia. Blood 71:305-312

Clemente MG, Congia M, Lai ME, Lilliu F, Lampis R, Frau F, Frau MR, Faa G, Diana G, Dessi C, Melis A, Mazzoleni AP, Cornacchia G, Cao A, De Virgiliis S (1994) Effect of iron overload on the response to recombinant interferon-alfa treatment in transfusion-dependent patients with thalassemia major and chronic hepatitis C. J Pediatr 125:123-128

Craven CM, Alexander J, Eldridge M, Kushner JP, Bernstein S, Kaplan J (1987) Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a rodent model for hemochromatosis. Proc Natl Acad Sci USA 84:3457-3461

Deeg HJ, Storb R, Thomas ED (1984) Bone marrow transplantation: a review of delayed complications. Br J Haematol 57:185-208. Review

Deeg HJ (1990) Early and late complications of bone marrow transplantation. Curr Opin Oncol 2:297-307. Review

Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR (1992) Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. Gastroenterol 102:2108-2113

Dürken M, Nielsen P, Knobel S, Finckh B, Herrnring C, Dresow B, Kohlschütter B, Stockschläder M, Krüger WH, Kohlschütter A, Zander AR (1997) Non-transferrin bound iron in serum of patients receiving bone marrow transplants. Free Radic Biol Med 22:1159-1163

Dürken M, Kohlschütter A, Nielsen P (1998) Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative therapy. British J Haematol 101:393-394

Engelhardt R, Dürken M, Nielsen P, Neubauer F, Haberhausen M, Hiller J, Renges H, Zander AR, Fischer R (2000) Biomagnetic liver susceptometry in long-term survivors

after bone marrow or stem cell transplantation. In: Book of Abstracts, 12th International Conference on Biomagnetism (Helsinki University of Technology, Espoo, Finnland, August 13-17, 2000), S 224

Feder JN, Gnirke A, thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo Jr. R, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer PM, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff R (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. Nat Genet 13:399-408

Fischer R, Engelhardt R, Nielsen P, Gabbe EE, Heinrich HC, Schmiegel WH, Wurbs D (1992) Liver iron quantification in the diagnosis and therapy control of iron overload patients. In: Hoke M, Erné SN, Okada YC, Romani GL (Hrsg) Advances in Biomagnetism '91. Amsterdam: Elsevier, S 585-588

Fischer R, Nielsen P, Dürken M, Engelhardt R, Garofalo F, Gamberini MR, Zander AR, Janka GE, Gabbe EE, Piga A (1997) The method of biomagnetic liver susceptometry in the follow-up of thalassemic patients after BMT. Bone Marrow Transplant 19:136-138

Fischer R (1998) Liver iron susceptometry. In: Andrä W, Nowak H (Hrsg) Magnetism in Medicine. Wiley-VCH Berlin, New York, S 286-301

Ford C, Wells FE, Rogers JN (1995) Assessment of iron status in association with excess alcohol consumption. Ann Clin Biochem 32:527-531

Frassoni F, Labopin M, Gluckman E, Prentice HG, Vernant JP, Zwaan F, Granena A, Gahrton G, De Witte T, Gratwohl A, Reiffers J, Gorin NC (1996) Results of allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia have improved in europe with time--a report of the acute leukemia working party of the European group for blood and marrow transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant 17:13-18

Gabbe EE, Heinrich HC, Icagic F (1982) Proposal for the standardization of the serum unsaturated iron binding capacity assay, and results in groups of subjects with normal iron stores and with prelatent, latent, and manifest iron deficiency. Clin Chem Acta 119:51-63

Glucksberg H, Storb R, Fefer A (1974) Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. Transplantation 18:295-304

Gordeuk VR, Brittenham GM (1992) Bleomycin-reactive iron in patients with acute non-lymphocytic leukemia. FEBS-Lett 308:4-6

Grundy RG, Woods RA, Savage MO, Evans JPM (1994) Relationship of endocrinopathy to iron chelation status in young patients with thalassaemia major. Arch Dis Child 71:128-132

Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 219:1-14. Review

Halliwell B, Aruoma OI, Mufti G, Bomford A (1988) Bleomycin-detectable iron in serum from leukaemic patients before and after chemotherapy. Therapeutic implications for treatment with oxidant-generating drugs. FEBS Lett 241:202-204

Halliwell B (1994) Free radical, antioxidants, and human disease: curiosity, consequence? Lancet 344:721-724

Harrison P, Neilson JR, Marwah SS, Madden L, Bareford D, Milligan DW (1996) Role of non-transferrin boundiron in iron overload and liver dysfunction in lon term survivors of acute leukemia and bone marrow transplantation. J Clin Pathol 49:853-856

Heinrich HC (1973) Optimal oral dosage in iron compensation therapy in nonbleeding patients with normal wholebody-59 Fe-elimination rate. Med Klin 68:981-985

Herold G und Mitarbeiter (2000) Alkoholkrankheit. In: Herold G (Hrsg.) Innere Medizin. Köln, S 728-731

Imlay JA, Chin SM, Linn S (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. Science 240:640-642

Kohlo E, Ruutu P, Ruutu T (1993) Hepatitis C infection in BMT patients. Bone Marrow Transplant 11:119-123

Kornreich L, Horev G, Yaniv I, Stein J, Grunebaum M, Zaizov R (1997) Iron overload following bone marrow transplantation in children: MR findings. Pediatr Radiol 27:869-872

Kwan EYW, Lee ACW, Li AMC, Tam SCF, Chan CF, Lau YL, Low LCK (1995) A cross-sectional study of growth, puberty and endocrine function in patients with thalassaemia major in Hong Kong. J Paediatr Child Health 31:83-87

Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA (1974) A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. N Engl J Med 290:1213-1216

Lucarelli G, Angelucci E, Giardini C, Baronciani D, Galimberti M, Polchi P, Bartolucci M, Muretto P, Albertini F (1993) Fate of iron stores in thalassaemia after bone-marrow transplantation. Lancet 342:1388-1391

Lucarelli G, Clift RA, Galimberti M, Polchi P, Angelucci E, Baronciani D, Giardini C, Andreani M, Manna M, Nesci S, Agostinelli F, Rapa S, Ripalti M, Albertini F (1996) Marrow transplantation for patients with thalassaemia: results in class 3 patients. Blood 87:2082-2088

Maertens J, Demuynck H, Verbeken EK, Zachée P, Verhoef GEG, Vandenberghe P, Boogaerts MA (1999) Mucomycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. Bone Marrow Transplant 24:307-312

McDonald GB, Shulman HM, Sullivan KM, Spencer GD (1986) Intestinal and hepatic complications of human bone marrow transplantation. Part I. Gastroenterology 90:460-477

McDonald GB, Shulman HM, Sullivan KM, Spencer GD (1986) Intestinal and hepatic complications of human bone marrow transplantation. Part II. Gastroenterology 90:770-784

McKay PJ, Murphy JA, Cameron S, Burnett AK, Campbell M, Tansey P, Franklin IM (1996) Iron overload and liver dysfunction after allogeneic or autologous bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 17:63-66

Messerschmitt C, Davion T, Capron JC, Brazier F, Delcenserie R, Ducroix JP, Delobel J, Bories C, Ink O, Halimi C, Cadranel JF, Vandwalle JL, Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Robson KJH, Capron D (1998) Phenotype/Genotype correlation in patients homozygous for the HFE H63D mutation. Blood 92(10) Supplement 1(2):22b

Modell B, Berdoukas V (1984) The clinical approach to thalassemia. Grune & Stratton, New York

Minotti G, Aust SD (1989) The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. Chem Biol Interact 71:1-19. Review

Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G (1985) Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. N Engl J Med 313: 1256-1262

Niederau C, Fischer R, Pürschel A, Stremmel W, Häussinger D, Strohmeyer G (1996) Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. Gastroenterol 110:1107-1119

Nielsen P, Carpinteiro S, Fischer R, Cabeda JM, Porto G, Gabbe EE (1998) Prevalence of the C282Y and H63D mutations in the HFE gene in patients with hereditary haemochromatosis and in control subjekts from Northern Germany. Brit J Haematol 103:842-845

Olivieri NF, Brittenham GM (1997): Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. Blood 89:739-761

Or R, Matzner Y, Konijn AM (1987) Serum ferritin in patients undergoing bone marrow transplantation. Cancer 60:1127-1131

Risdon RA, Barry M, Flynn DM (1975) Transfusional iron overload: the relationship between tissue iron concentration and hepatic fibrosis in thalassaemia. J Pathol 116:83-95

Salvaggio A, Periti M, Miano L, Tavanelli M, Marzorati D (1991) Body mass index and liver enzyme activity in serum. Clin Chem 37:720-723

Sham R, Ou C-Y, Braggins C, Phatak P (1998) Clinical characteristics of patients with hereditary hemochromatosis who are H63D homozygotes. Blood 92(10) Supplement 1(2):23b

Singer-Sam J, Tanguay RL, Riggs AD (1989) Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. Amplifications: A Forum for PCR Users, issue 3 (September):11

Stadtman ER (1992) Protein oxidation and aging. Science 257:1220-1224

Strasser SI, Kowdley KV, Sale GE, McDonald GB (1998) Iron overload in bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant 22:167-173

Strasser SI, Sullivan KM, Myerson D, Spurgeon CL, Storer B, Schoch HG, Murakami CS, McDonald GB (1999) Cirrhosis of the liver in long-term marrow transplant survivors. Blood 93:3259-3266

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex®100 as a Medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10:506-511

Zander AR, Zabelina T, Kröger N, Renges H, Krüger W, Löliger C, Dürken M, Stockschläder M, de Wit M, Wacker-Backhaus G, Bielack S, Jarburg N, Rüssmann B, Erttmann R, Kabisch H (1999) Use of a five-agent GVHD prevention regimen in recipients of unrelated donor marrow. Bone Marrow Transplant 23:889-893

Zurlo MG, De Stefano P, Borgna-Pignatti C, Di Palma A, Piga A, Melevendi C, Di Gregorio F, Burattini MG, Terzoli S (1989) Survival and causes of death in thalassaemia major. Lancet 2:27-30

7. Anhang

7.1 Patienten-Anschreiben

Betrifft: Nachsorgeuntersuchung zum Eisenstoffwechsel nach Knochenmark-transplantation

Sehr geehrte Frau / Sehr geehrter Herr

bei Ihnen wurde eine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Im Rahmen dieser Behandlung und gegebenenfalls auch vorher haben Sie mehrere Bluttransfusionen bekommen und damit ist Ihnen auch Eisen zugeführt worden (Blut enthält Eisen). Es gibt inzwischen Hinweise, daß bei einem Teil der Patienten nach Knochenmarktransplantation zuviel Eisen durch wiederholte Transfusionen angesammelt wurde. Allerdings ist für die Eisenanreicherung im Gewebe nicht nur die Zahl der Transfusionen, sondern auch eine Reihe anderer Faktoren wichtig. Zuviel angesammeltes Eisen kann unerwünschte Wirkungen an inneren Organen zur Folge haben, die Sie zunächst nicht unbedingt spüren müssen.

Wir möchten deshalb im Rahmen einer Nachsorge-Studie auch Sie gerne untersuchen. Die Untersuchung umfaßt eine Blutabnahme, einen Abstrich der Mundschleimhaut sowie eine Untersuchung im sogenannten Biomagnetometer. Mit dieser Untersuchung, bei der Sie bequem für ca. 30 Minuten auf einer Liege liegen, wird die magnetische Eigenschaft gemessen, die von Ihrer Leber ausgeht. So kann völlig schmerzfrei und ohne Strahlenbelastung der Eisengehalt in Ihrer Leber bestimmt werden.

Die Blutabnahme dient der Untersuchung von Parametern des Eisenstoffwechsels und Leberfunktionsparametern. Der schmerzlose Mundschleinhaut-Abstrich dient der Bestimmung einer Gen-Veränderung, die für sich keinen Krankheitswert hat und die zu etwa 10% in der norddeutschen Bevölkerung vorhanden ist. Da diese Genveränderung einen Einfluß auf die Eisenaufnahme aus der Nahrung hat, könnte Sie bei hoher Eisenbelastung ein wichtiger, zusätzlicher Faktor sein. Dies soll ebenfalls durch die Studie untersucht werden.

Ihre Daten werden gespeichert und wissenschaftlich ausgewertet. Wir werden Sie auf jeden Fall im Laufe der Studie informieren, sollten sich bei den Untersuchungen Ergebnisse mit Krankheitswert ergeben. Falls Sie zu den Patienten gehören sollten, die einen stark erhöhten Lebereisengehalt aufweisen, werden wir mit Ihnen und ihrem betreuenden Arzt diesen Befund besprechen. Ein überhöhter Lebereisengehalt ließe sich relativ einfach durch Aderlaßtherapie behandeln.

Wenn Sie zur Teilnahme an dieser Studie bereit sind, bitten wir Sie, die Erklärung zu unterschreiben. Die Teilnahme ist freiwillig und jederzeit widerrufbar. Wenn Sie die Teilnahme nicht wünschen, entstehen Ihnen keinerlei Nachteile.

7.2 Vordruck zur Erklärung und Dokumentation des Einverständnisses der Patienten bzw. der Eltern nach dem Aufklärungsgespräch

Der Sinn, die Durchführung und mögliche Konsequenzen der Studie wurden mit mir besprochen. Ich konnte dabei alle mich interessierenden Fragen stellen. Ferner hatte ich Gelegenheit, daß Merkblatt genau durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen. Ein Exemplar des Merkblattes ist mir ausgehändigt worden.

Ich möchte an der Studie teilnehmen.
Ich (Wir) möchte(n), daß mein (unser) Kind an der Studie teilnimmt

Hamburg, den.....

Unterschrift des Studienkoordinators.....

Unterschrift des Patienten (Eltern).....

7.3 Rohdatentabellen

Es folgt eine genaue Auflistung der Parameter, die bei jedem einzelnen Studienteilnehmer erhoben wurden.

Nr.	Geschl	Diagn	Alter* [y]	Alter** [y]	Δ–Zeit*** [mo]	BMI [kg/m²]	LIC [µg Fe/g Leber]	C282Y Blut	C282Y SH	H63D Blut	H63D SH
1	f	CML	43,0	45,0	24	25,8	593	**-/-**	nu	+/-	nu
2	m	HD	24,2	28,8	57	18,7	1	+/-	autolog	-/-	autolog
3	m	NHL	21,3	26,6	64	19,9	544	-/-	autolog	-/-	autolog
4	m	CML	29,2	35,1	71	24,3	261	-/-	-/-	-/-	-/-
5	m	ALL	18,5	22,1	44	22,5	1015	-/-	-/-	+/-	+/-
6	f	MDS	12,9	18,2	65	22,9	1043	-/-	-/-	+/-	+/-
7	m	CML	24,2	31,3	87	17,3	753	-/-	-/-	-/-	nu
8	f	CML	43,9	49,8	72	24,9	902	-/-	-/-	+/-	nu
9	m	ALL	17,9	25,2	89	21,7	2794	-/-	-/-	+/+	nu
10	m	AML	33,4	40,8	90	22,2	1156	-/-	-/-	-/-	nu
11	m	CML	24,7	29,4	58	25,2	835	nu	-/-	nu	nu
12	m	SAA	27,3	33,1	71	26,1	233	-/-	-/-	-/-	-/-
13	m	CML	44,2	47,5	41	32,1	2419	-/-	-/-	-/-	-/-
14	m	AML	33,7	37,5	47	21,6	779	-/-	-/-	-/-	-/-
15	f	CML	44,4	48,3	48	27,8	1825	-/-	-/-	-/-	-/-
16	f	AML	26,3	29,9	44	19,5	73	-/-	-/-	-/-	-/-
17	m	HD	15,1	18,2	38	18,4	850	-/-	autolog	+/+	autolog
18	m	NHL	50,0	52,8	34	29,4	338	-/-	autolog	-/-	autolog
19	f	AML	3,9	9,7	72	19,9	976	-/-	-/-	-/-	-/-
20	f	CML	47,5	49,8	28	22,8	690	-/-	-/-	-/-	-/-
21	m	ALL	25,2	32,5	89	26,5	846	-/-	-/-	+/-	+/-
22	f	NHL	46,5	52,1	68	36,1	719	-/-	autolog	-/-	autolog
23	m	CML	20,6	25,1	55	28,1	540	-/-	-/-	-/-	nu
24	f	AML	37,5	39,1	20	18,4	1798	-/-	autolog	+/-	autolog
25	f	CML	42,1	45,7	44	18,3	519	+/-	+/-	-/-	-/-
26	m	NHL	57,9	61,3	41	23,5	1303	-/-	autolog	-/-	autolog
27	m	AML	42,7	47,8	62	26,6	934	-/-	nu	-/-	nu
28	m	SAA	19,1	22,1	36	24,3	1004	-/-	-/-	+/-	+/-
29	m	NHL	33,2	39,7	79	29,4	358	-/-	-/-	-/-	-/-
30	f	NHL	44,9	50,1	64	20,4	460	-/-	autolog	-/-	autolog
31	f	ALL	1,9	6,7	58	15,4	671	+/- *	+/-	-/-	-/-
32	m	CML	35,2	37,1	22	21,1	679	-/-	-/-	-/-	-/-
33	m	ALL	27,4	34,8	89	22,3	1526	-/-	nu	-/-	nu
34	m	AML	46,8	49,3	31	22,4	1414	-/-	autolog	-/-	autolog
35	m	ALL	4,4	9,5	63	19,7	1481	-/-	-/-	+/+	+/+
36	f	MDS	30,5	36,6	75	28,3	539	-/-	-/-	+/-	+/-
37	f	MFA	1,8	6,0	52	16,9	1273	+/-	-/-	-/-	-/-
38	m	AML	27,7	29,6	23	24,9	1028	-/-	-/-	-/-	-/-
39	m	AML	11,1	18,3	87	19,8	1074	+/-	-/-	+/-	+/-
40	m	SAA	17,7	20,8	38	20,2	950	-/-	-/-	-/-	-/-
41	m	NHL	46,8	48,9	26	25,5	396	-/-	autolog	-/-	autolog
42	m	ALL	6,1	10,6	54	23,1	1279	-/-	autolog	-/-	autolog
43	m	NHL	8,5	10,0	19	16,4	377	-/-	autolog	-/-	autolog
44	f	AML	4,6	11,8	87	20,0	702	-/-	autolog	-/-	autolog
45	m	NHL	54,1	57,9	46	34,3	446	-/-	autolog	-/-	autolog
46	m	NHL	33,8	39,2	65	23,1	324	-/-	autolog	-/-	autolog
47	m	AML	32,4	35,2	34	24,4	767	-/-	-/-	-/-	-/-
48	m	MDS	11,0	13,7	32	17,1	370	-/-	-/-	-/-	-/-
49	m	CML	43,4	45,3	23	21,1	373	-/-	-/-	-/-	-/-
50	m	AML	23,7	30,3	80	30,8	1382	-/-	autolog	+/-	autolog
51	f	SAA	27,1	33,5	78	21,7	247	+/-	+/-	-/-	-/-
52	f	AML	41,4	47,6	76	23,6	4426	-/-	-/-	-/-	-/-
53	m	CML	31,4	33,1	21	24,3	109	-/-	+/-	-/-	-/-
54	f	ALL	28,2	33,2	61	22,8	1562	-/-	-/-	-/-	+/-
55	f	CML	45,4	47,1	21	23,8	861	-/-	-/-	+/-	nu
56	m	HD	30,3	37,2	84	36,5	349	-/-	autolog	-/-	autolog
57	m	HD	7,4	9,0	19	15,5	505	-/-	autolog	-/-	autolog
58	m	AML	44,5	46,8	28	22,9	589	+/-	autolog	+/-	autolog
59	f	CML	23,3	31,2	96	25,1	2499	-/-	-/-	-/-	nu

Nr.	Geschl	Diagn	Alter* [y]	Alter** [y]	Δ–Zeit*** [mo]	BMI [kg/m²]	LIC [µg Fe/g Leber]	C282Y Blut	C282Y SH	H63D Blut	H63D SH
60	m	MDS	51,2	54,0	34	24,0	2960	-/-	-/-	-/-	-/-
61	m	ALL	13,5	16,6	38	22,8	489	-/-	-/-	-/-	-/-
62	m	HD	28,2	34,3	74	22,2	1119	-/-	autolog	-/-	autolog
63	m	ALL	13,2	15,3	26	17,0	479	-/-	-/-	-/-	-/-
64	m	HD	27,9	35,3	90	24,7	350	nu	autolog	nu	autolog
65	f	AML	25,2	32,0	83	19,1	2104	-/-	-/-	+/+	+/+
66	m	AML	18,2	26,2	97	20,7	817	-/-	-/-	-/-	-/-
67	f	AML	33,1	36,0	35	20,4	2119	-/-	-/-	+/-	+/-
68	m	CML	29,2	31,3	25	23,5	658	-/-	+/-	-/-	-/-
69	m	CML	43,4	49,2	71	26,3	2896	-/-	-/-	-/-	-/-
70	m	SAA	24,7	26,7	25	23,8	1357	-/-	-/-	+/-	+/-
71	m	CML	17,3	18,6	17	17,5	nu	-/-	-/-	+/-	+/-

* Die Patientin wurde allogen transplantiert, erfuhr aber eine autologe Rekonstitution

Nr.	SI [µg/dl]	TIBC [µg/dl]	Tfs [%]	SF [µg/L]	ASAT [IU/L]	ALAT [IU/L]	γ-GT [IU/L]	AP [IU/L]	Bilirubin gesamt [mg/dl]	transfun-diertes Hb (inkl. Hb der HST) [g]
1	101	316	32	138	7	8	6	84	0,4	554
2	80	275	29	29	9	10	6	105	0,4	nu
3	197	343	57	91	8	6	9	100	0,9	nu
4	135	nu	nu	245	7	8	8	104	1	582
5	162	269	60	340	7	6	6	150	0,8	nu
6	57	297	19	443	7	5	5	139	0.7	nu
7	124	312	40	43	nu	nu	nu	nu	nu	nu
8	114	286	40	402	10	8	7	96	0,5	2200
9	107	314	34	1280	10	17	12	112	0,3	nu
10	56	272	21	325	10	9	21	132	0,8	1354
11	nu	nu	nu	249	nu	nu	nu	nu	nu	1200
12	161	320	50	167	9	13	15	85	1,1	nu
13	139	286	49	1319	9	12	27	100	0,4	3996
14	104	231	45	772	22	8	27	98	0,4	1890
15	114	283	40	118	14	17	39	120	0,8	300
16	241	407	59	28	11	9	10	90	0,5	850
17	78	124	63	1842	3	9	53	190	0,7	nu
18	91	nu	nu	119	9	14	85	nu	0,4	nu
19	57	322	18	80	11	7	7	376	0,2	750
20	58	344	17	24	10	8	24	223	0,2	550
21	129	308	42	212	nu	nu	nu	nu	nu	nu
22	103	381	27	151	19	21	38	98	0,2	678
23	76	343	22	119	49	90	92	178	0,4	750
24	131	280	47	695	14	17	8	78	1,2	nu
25	104	455	23	25	9	9	3	75	0,2	650
26	68	332	20	351	nu	nu	nu	nu	nu	450
27	128	220	58	576	17	19	19	114	0,7	906
28	156	246	63	623	12	17	11	100	0,9	nu
29	107	270	40	414	15	23	33	77	0,5	1594
30	67	425	16	76	9	7	13	80	0,2	850
31	85	314	27	102	11	7	5	268	0.3	nu
32	86	213	40	724	11	16	9	303	0,3	2229
33	87	217	40	628	nu	nu	nu	nu	nu	nu
34	61	248	25	556	9	9	12	104	0,3	nu
35	53	353	15	31	12	14	10	353	0,2	200
36	87	325	27	100	8	9	51	74	0,3	900
37	32	298	11	122	11	7	6	317	0.2	nu
38	72	277	26	389	20	51	65	201	0,2	1350
39	142	308	46	360	9	11	9	169	0.2	2300
40	138	296	47	533	7	8	9	88	0,7	1250
41	100	282	35	1047	21	24	113	291	0,5	nu
42	32	282	11	257	12	13	10	525	0.3	800
43	123	324	38	84	10	5	5	315	0,3	300
44	102	336	30	40	9	7	4	573	0,3	nu
45	127	306	42	483	12	18	24	158	0,3	150
46	118	298	40	23	27	58	18	73	0,5	500
47	67	181	37	433	17	34	29	125	0,4	1386
48	38	283	13	70	12	9	6	535	0,2	510

Nr.	SI [µg/dl]	TIBC [µg/dl]	Tfs [%]	SF [µg/L]	ASAT [IU/L]	ALAT [IU/L]	γ-GT [IU/L]	AP [IU/L]	Bilirubin gesamt [mg/dl]	transfun-diertes Hb (inkl. Hb der HST) [g]
49	110	314	35	367	8	9	10	67	0,4	900
50	86	265	32	725	12	29	69	131	0,7	nu
51	103	356	29	48	7	9	5	71	0,5	nu
52	108	199	54	3667	12	12	13	207	0,8	nu
53	61	236	26	220	8	10	7	120	0,5	1003
54	93	229	41	684	7	7	7	78	0,3	1461
55	116	259	45	896	16	19	51	88	0,4	1086
56	103	300	34	nu	19	17	68	98	0,7	700
57	108	349	31	66	13	9	5	209	0,4	nu
58	128	300	43	483	12	12	7	99	nu	nu
59	83	194	43	1220	25	28	74	483	0,5	4530
60	54	168	32	5414	13	27	304	232	0,6	nu
61	50	368	14	96	9	5	10	nu	0,5	700
62	100	358	28	238	19	34	20	103	0,5	nu
63	48	271	18	281	7	6	8	445	0,3	862
64	90	nu	nu	112	nu	nu	nu	nu	nu	nu
65	150	310	48	1078	11	17	11	117	0,6	2500
66	122	169	72	708	6	4	18	166	0,4	nu
67	111	272	41	569	8	12	36	104	0,3	nu
68	78	376	21	625	9	19	15	nu	0,4	nu
69	124	268	46	606	10	10	16	86	0,7	2811
70	75	253	30	1009	11	19	9	97	1	4050
71	102	252	40	302	11	9	18	253	0,4	2378

Tabelle 4: Ergebnisse der Genanalyse zur Bestimmung der HFE-Punktmutationen C282Y und H63D in aus Vollblut isolierten Leukozyten in der Gruppe der autolog Transplantierten (n=21); nu, nicht untersucht.

Leukozyten		
n	**C282Y**	**H63D**
1	+/-	-/-
1	-/-	+/+
1	+/-	+/-
15	-/-	-/-
1	nu	nu
2	-/-	+/-

Symbole: -/-, negativ; +/-, heterozygot, +/+, homozygot

Tabelle 5: Ergebnisse der Genanalyse zur Bestimmung der HFE-Punktmutationen C282Y und H63D aus Wangenschleimhautzellen in der Gruppe der allogen Transplantierten (n=49); nu, nicht untersucht.

	Leukozyten		**Schleimhautzellen**	
n	**C282Y**	**H63D**	**C282Y**	**H63D**
2	-/-	-/-	+/-	-/-
2	-/-	+/+	-/-	+/+
3*	+/-	-/-	+/-	-/-
21	-/-	-/-	-/-	-/-
1	-/-	-/-	-/-	-/-
1	+/-	-/-	-/-	-/-
4	-/-	-/-	-/-	nu
1	-/-	+/-	nu	nu
7	-/-	+/-	-/-	+/-
2	-/-	+/-	-/-	nu
1	-/-	+/+	-/-	nu
1	+/-	+/-	-/-	+/-
1	nu	nu	-/-	nu
2	-/-	-/-	nu	nu

* beinhaltet eine Patientin mit autologer Rekonstitution nach allogener Knochenmarktransplantation

Symbole: -/-, negativ; +/-, heterozygot, +/+, homozygot

7.4 Danksagung

Für die Hilfe bei der Durchführung dieser Studie, den wissenschaftlichen Hilfestellungen bei Fragen aller Art, sowie für die Einführung sowohl in die Methode der Lebereisenbestimmung mit dem Biomagnetometer als auch in die Verfahren zur Bestimmung der Genmutationen, möchte ich mich bei den folgenden Personen herzlich bedanken: Herr Dr. M. Dürken (Pädiatrische Hämatologie und Onkologie), Herr Dr. R. Fischer und Herr Dr. R. Engelhardt, Herr PD Dr. P. Nielsen, Frau R. Kongi und Frau S. Hoppe (Medizinische Biochemie), den Schwestern der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie, Herr Dr. H. Renges und den Schwestern der Ambulanz der Abteilung Hämatologie-Onkologie, den Transplantationskoordinatorinnen Frau N. Jarburg und Frau G. Amtsfeld, sowie Herr Prof. Dr. A. R. Zander, Leiter der Einrichtung für Knochenmarktransplantation, für die Überlassung des Themas.

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname:	Neubauer, Falk
Geburtstag:	26.03. 1970
Geburtsort:	Hamburg

Schulausbildung

1976 - 1980	Grundschule Luruper Hauptstrasse in Hamburg
1980 - 1989	Goethe Gymnasium in Hamburg
Mai 1989	Abitur

Hochschulausbildung

Oktober 1989	Beginn des Studiums der Humanmedizin in Hamburg
Oktober 1997 bis April 1999	Promotionssemester zur Anfertigung der Dissertation Förderung durch die Deutsche José Careras Leukämie-Stiftung erhalten
Juni 2000	Ärztliche Prüfung

Erklärung

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

_____

Falk Neubauer