

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**EINE PROSPEKTIVE KLINISCHE, HISTOPATHOLOGISCHE UND
IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE ZUR DIFFERENTIALDIAGNOSTIK
VON AKUTER GRAFT VERSUS HOST DISEASE UND AKUTEM
ARZNEIMITTELEXANTHEM**

DISSERTATION

ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN

AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VON

CAROLIN WEIB

AUS EGGENFELDEN

2010

**MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

BERICHTERSTATTER: PROF. DR. MED. ANDREAS WOLLENBERG

MITBERICHTERSTATTER: PRIV. DOZ. DR. DAVID VÖHRINGER
PRIV. DOZ. DR. MICHAEL ALBERT

DEKAN: PROF. DR. DR. H.C. MAXIMILIAN REISER, FACR, FRCR

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 08. JULI 2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINFÜHRUNG	1
1.1 HINFÜHRUNG ZUM THEMA	1
1.2 HINTERGRÜNDE UND ABLAUF DER STAMMZELLTRANSPLANTATION	2
1.3 GRAFT VERSUS HOST DISEASE: KRANKHEITSBILD, IMMUNBIOLOGIE, DIAGNOSTIK UND KLASSIFIKATIONEN	4
1.3.1 <i>Klinisches Bild und Procedere</i>	4
1.3.2 <i>Klinische Klassifikationen</i>	5
1.3.3 <i>Histopathologisches Bild</i>	6
1.3.4 <i>Ätiologie, Pathogenese und Immunbiologie</i>	7
1.3.5 <i>Graft versus Host (GvH)- und Graft versus Tumor (GvT) Effekt</i>	8
1.4 ARZNEIMITTELEXANTHEM: KRANKHEITSBILD, IMMUNBIOLOGIE, DIAGNOSTIK UND KLASSIFIKATIONEN	8
1.5 IMMUNBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN: DENDRITISCHE ZELLEN, DC-SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER, DC-TC-INTERAKTION	9
1.5.1 <i>Immunsystem</i>	9
1.5.2 <i>Dendritische Zellen</i>	10
1.6 ENTWICKLUNG DER FORSCHUNGSFRAGESTELLUNGEN	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 GRUNDDATEN UND PATIENTENDISPOSITION	13
2.2 ERSTELLUNG DES KLINISCHEN STATUSERHEBUNGSBOGENS „GvHSCO“	16
2.2.1 <i>Körperoberfläche</i>	16
2.2.2 <i>Erythem</i>	17
2.2.3 <i>Papeln</i>	18
2.2.4 <i>Bläschen / Epidermolyse</i>	18
2.2.5 <i>Materialgewinnung und -verarbeitung</i>	19
2.2.6 <i>Dermatohistopathologische Begutachtung</i>	21
2.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE	24
2.3.1 <i>Grundlagen</i>	24
2.3.2 <i>Antikörperprotokoll</i>	24
2.3.3 <i>APAAP-Technik</i>	27
2.3.4 <i>Protokoll der immunhistochemischen Färbungen</i>	27
2.3.5 <i>Antikörper</i>	31
2.3.6 <i>Semiquantitative Bewertung des zellulären Infiltrats</i>	31
2.4 DERMATOHISTOPATHOLOGISCHE EXPERTENANALYSE	32
2.5 STATISTISCHE DATENANALYSE	32
2.5.1 <i>Allgemeines Studiendesign</i>	32
2.5.2 <i>Ein- und Ausschlusskriterien</i>	34
2.5.3 <i>Statistische Verfahren und Software</i>	34
3 ERGEBNISSE	37
3.1 HISTOPATHOLOGIE UND ZELLULÄRES PROFIL VON AKUTER KUTANER GVHD	37

3.1.1	<i>Histologisches Bild der akuten kutanen GvHD</i>	37
3.1.2	<i>Klinischer und histologischer Schweregrad der aGvHD</i>	37
3.1.3	<i>Korrelationen histopathologischer Kriterien</i>	42
3.1.4	<i>Expressionsprofil zellulärer Oberflächenmarker bei aGvHD</i>	42
3.1.5	<i>Korrelationen zwischen Zellzahlen bei akuter GvHD</i>	53
3.1.6	<i>Hohe Lymphozyten- und IDEC-Zellzahlen korrelieren mit histopathologisch schwerer akuter GvHD</i>	53
3.1.7	<i>Komplement, Fibrinogen und Immunglobuline</i>	55
3.2	LUPUSBAND TYPISCH FÜR SPÄTE AGVHD	56
3.3	RELEVANZ VON PRÄDISPOSITIONSFAKTOREN UND HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN FÜR SCHWEREGRAD UND EIN-JAHRES-ÜBERLEBEN BEI AGVHD	61
3.4	ENTWICKLUNG DES MODIFIZIERTEN HISTOLOGISCHEN SCORES ZUR ABSCHÄTZUNG DES SCHWEREGRADES AKUTER GVHD (GvHiScore)	62
3.5	ENTWICKLUNG EINES ALGORITHMUS ZUR DIFFERENTIALDIAGNOSTIK VON AGVHD UND ARZNEIEXANTHEMEN	65
3.5.1	<i>Histopathologische Kriterien zur Differentialdiagnostik von aGvHD und Arzneiexanthem</i>	65
3.5.2	<i>Komplementablagerungen häufiger bei aGvHD</i>	69
3.5.3	<i>Immunhistochemische Unterscheidungskriterien</i>	69
3.5.4	<i>Differentialdiagnose von aGvHD und AR mittels histopathologischen und immunhistochemischen Kriterien: der DSHIG Score</i>	78
4	DISKUSSION	81
4.1	CHARAKTERISTISCHE HISTOLOGISCHE BEFUNDE DER AKUTEN GVHD	82
4.2	FÜR AKUTE GVHD KLINISCH BEDEUTSAME ZELLARTEN	84
4.3	LUPUSBAND-POSITIVE AKUTE GVHD – EINE FÜR DEN SCHWEREGRAD BEDEUTSAME SUBGRUPPE	86
4.4	KRITISCHE WERTUNG DER ANGEWANDTEN METHODIK	87
4.5	KLINISCHE UND DIFFERENTIALDIAGNOSTISCHE BEWERTUNGSSYSTEME – VOR- UND NACHTEILE	89
4.5.1	<i>Kritische Wertung des klinischen klinischen GvHScs als Messinstrument für den Schweregrad kutaner aGvHD</i>	89
4.5.2	<i>Kritische Wertung der immunhistochemischen Differentialdiagnostik von akuter GvHD und Arzneiexanthemen</i>	91
4.5.3	<i>Histologischer Schweregrad der akuten GvHD: Kritische Wertung der bestehenden Scores und des GvHiScore</i>	92
4.5.4	<i>Kritische Wertung des differentialdiagnostischen DSHIG Scores für die histopathologische Beurteilung des Schweregrads akuter kutaner GvHD</i>	94
4.6	AUSBLICK	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
	REFERENZEN	97
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
	TABELLENVERZEICHNIS	105
6	APPENDIX	107
	DANKSAGUNG	123

Abkürzungsverzeichnis

AGvHD	Akute Graft versus Host Disease
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
BLC	B-Lymphozyten; B steht für “Bone marrow derived”
C	Komplement
C3	Komplement 3
C4	Komplement 4
CBSCT	Nabelschnurblut-Stammzelltransplantation
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation; Nomenklatur für monoklonale Antikörper
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalievirus
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zelle
DC-LAMP	DC-lysosome-associated membrane protein
DC-SIGN	DC-specific, ICAM-3-grabbing non-integrin
DIF	Direkte Immunfluoreszenz (-Mikroskopie)
DSHIG	Im Rahmen der Arbeit vorgestellter „<u>D</u>ifferentialdiagnostischer <u>S</u>core mittels <u>H</u>istopathologie und <u>I</u>mmunhistochemie für akute <u>G</u>raft versus <u>H</u>ost Disease“
ECP	Extrakorporale Phototherapie
EEM	Erythema exudativum multiforme
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor
GvH	Graft versus Host
GvHD	Graft versus Host Disease
GvHR	Graft versus Host Reaktion
GvHSco	Klinischer Score zur Evaluation des klinischen Schweregrads kutaner GvHD (im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt)
GvHScoGrade	Klinisches Klassifikationssystem auf der Basis des klinischen GvHSco (im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt)
GvT	Graft versus Tumor
GvTE	Graft versus Tumor Effect
GvL	Graft versus Leucaemia
GvLE	Graft versus Leucaemia Effect
HA	Histokompatibilitätsantigen; mHA: minor HA; MHA: Major HA

HE	Haematoxylin-Eosin, histologische Färbung
HP	Mit Bezug auf den histopathologischen Erhebungsbogen (vgl. S. 22)
HSP	Hitzeschockproteine
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HvG	Host versus Graft
HvGR	Host versus Graft Reaction
IDEc	Inflammatorische dendritische epidermale Zellen
IFN	Interferon
IFR	Interferon Regulationsfaktor
IL	Interleukin
IPC	Interferonproduzierende Zellen
Kk	Korrelationskoeffizient
KMT	Knochenmarkstransplantation
LC	Langerhans Zelle
LE	Lupus Erythematoses
LFA	Lymphozytäres Funktionsantigen
LT	Leukotrien
MC	Monte Carlo Signifikanz, modifizierter Mann-Witney-U-Test
MC95	Monte Carlo Signifikanz auf dem 95%-Signifikanzniveau
MDC	Myeloide Dendritische Zelle
MMF	Mycophenolatmofetil (Cellcept®), Immunsuppressivum
MPh	Makrophagen
NF	Nuclear factor, z.B. NF-kB; Transkriptionsfaktor
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bezogen auf die Testhypothese
PAS	Perjodschiffsäure
PDC	plasmazytoide dendritische Zellen
pre-DC	Dendritische Vorläuferzellen
PBSCT	Transplantation peripherer Blutstammzellen
Sg	Signifikanz, angegeben in Irrtumswahrscheinlichkeit p
SJS	Steven Johnson Syndrom
TEN	Toxische epidermale Nekrolyse
TLC	T-Lymphozyten; T steht für "Thymus derived"
TLR	Toll Like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

1 EINFÜHRUNG

1.1 Hinführung zum Thema

Die Differentialdiagnostik von akuter Graft versus Host Disease (aGvHD) in Abgrenzung zum akuten Arzneiexanthem bei Patienten nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation stellt in der klinischen Praxis des Dermatologen nach wie vor eine große Schwierigkeit dar. Häufig ist weder aufgrund des klinischen Bildes noch mit Hilfe einer histopathologischen Untersuchung eine eindeutige Diagnose möglich [78].

Da beide Diagnosen unterschiedliche therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen und die akute Graft versus Host Disease noch immer die Haupttodesursache bei knochenmarks- und stammzelltransplantierten Patienten darstellt, ist eine klare Diagnosefindung von großer klinischer Bedeutung.

Zur Beurteilung des allgemein-klinischen sowie des dermatopathologischen Schweregrads der akuten Graft versus Host Disease steht bislang vor allem das Scoringssystem nach Glucksberg zur Verfügung, auf das in Absatz 1.3 näher eingegangen wird. Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass die große Mehrheit der Patienten in die beiden mittleren Kategorien fällt, was sowohl die interindividuelle als auch die intraindividuelle Vergleichbarkeit erschwert.

Die immunbiologischen Grundlagen der akuten Graft versus Host Disease sind bislang nur teilweise aufgeklärt. Das der allgemeinen Lehrmeinung entsprechende Modell nach Ferrara (1998) postuliert einen dreischrittigen pathogenetischen Prozess, in dem antigenpräsentierende Zellen des Empfängers die Immunreaktion vermitteln. Die genaue Zuordnung dieser Zellen ist anhand der bisherigeren Datenlage nicht umfassend geklärt worden.



Abbildung 1: Klinisches Bild von akuter Graft versus Host Disease (links) im Vergleich zu Arzneireaktion (rechts) am Beispiel zweier Patienten mit Befall der Rückenpartie

Ziel dieser Arbeit ist es daher sowohl zellbiologische Marker für die Differentialdiagnostik von aGvHD und Arzneiexanthem zu etablieren als auch einen Beitrag zur Aufklärung der Immunbiologie der aGvHD zu leisten. Aufgrund der Literatur liegt hierbei der Fokus auf T-Zellen und Dendritischen Zellen.

1.2 Hintergründe und Ablauf der Stammzelltransplantation

Geschichte und Epidemiologie

In der jungen Geschichte der Knochenmarks- und Stammzelltransplantation setzte Dr. E. Donnall Thomas am Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle mit der Durchführung der ersten Stammzellübertragung 1969 einen Meilenstein, der 1990 mit dem Nobelpreis für Medizin honoriert wurde. Damit revolutionierte Donnall die Therapie vieler bis dahin kaum kurativ behandelbarer hämatonkologischer Erkrankungen. Seither wurden weltweit ca. 50000 Knochenmarks- und Stammzelltransplantationen durchgeführt, jährlich kommen ca. 5000 hinzu. Im Zentrum für Knochenmarkstransplantation der Ludwig-Maximilians-Universität im Klinikum Großhadern (Med III) sind bisher ca. 2000 derartige Eingriffe durchgeführt worden. Aus diesem Patientenkollektel ergeben sich die Teilnehmer der vorliegenden Studie, im Zeitraum von 2005 und 2006.

Indikationen

Für die Knochenmarks- oder Stammzellübertragung gibt es mehrere Indikationen, wobei im Vordergrund nach wie vor die akuten Leukämien stehen (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Indikationen für Knochenmarks- und Stammzelltransplantation

Benigne Grunderkrankungen:	Schwere aplastische Anämie
	Seltene hereditäre Erkrankungen des Immun- und metabolischen Systems (z.B. Adrenoleukodystrophie, SCID)
Maligne Grunderkrankungen:	Akute Leukämien
	Lymphome
	Plasmozytom
	Philadelphia-Chromosom negative Myelodysplastische Syndrome

In jüngster Vergangenheit haben neue immunmodulatorische Konzepte wie beispielsweise die Tyrosinkinaseinhibition durch Imatinib® bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) die KMT / PBSCT etwas in den Hintergrund gerückt.

Ablauf

Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurde die Knochenmarkstransplantation (KMT) zunehmend von der Transplantation hämatopoietischer Stammzellen (PBSCT) abgelöst, die durch Leukapherese aus peripherem Blut oder aus Nabelschnurblut (CBSCT) gewonnen werden.

Neben dem geringeren methodischen Aufwand und der Risikominderung für den Spender haben diese Methoden verschiedene Vorteile gegenüber der KMT. So tritt beispielsweise bei CBSCT seltener eine Graft versus Host Disease als Komplikation auf [2].

Um das Risiko einer Abstoßungsreaktion, d.i. einer Host versus Graft Reaktion (HvGR) zu minimieren, wird bei der Auswahl des Spenders auf eine möglichst genaue Antigenkompatibilität, insbesondere einiger HLA-Subtypen, geachtet. Daher gehören eine genaue Analyse der Empfängerzellen und der anschließende Abgleich mit dem fraglichen Spender zum therapeutischen Standard. Um die Suche nach einem geeigneten Fremdspender zu erleichtern, sind heute in vielen Ländern entsprechende Datenbanken verfügbar, sodass sich die Wartezeiten für eine Fremdspende in Deutschland im Augenblick bei ca. vier bis acht Wochen bewegen. Eine absolute Konkordanz aller relevanten Oberflächenantigene, insbesondere von Major (MHC) und minor Histokompatibilitätskomplexen (mHC) zu erreichen, ist bei genetisch nicht identischen Spendern allerdings aufgrund höchster genetischer Variabilität statistisch kaum möglich. Bei Stammzell- und Knochenmarkstransplantationen unterscheidet man grundsätzlich:

- Autologe Spende: patienteneigene Stammzellen. Anwendung insbesondere bei soliden Tumoren als Isolation und Kryokonservierung peripherer Blutstammzellen im Vorfeld hochdosierter Chemotherapien
- Syngene Spender: genetisch identische Zwillinge
- Allogene Spender: nicht genetisch identischer Spender
 - HLA-identische (aktuell Testung von 10 Allelen) vs. haploidentische (z.B. Elternteil)
 - verwandt vs. unverwandt

Zur Vermeidung einer akuten HvGR ist im Vorfeld der Transplantation eine radio- und / oder chemotherapeutische Immunsuppression angezeigt. Dies wird im Rahmen der präinterventionellen Konditionierungstherapie erreicht, die neben der Immunsuppression vor allem auch auf eine maximale Reduktion der Empfänger-malignomzellen abzielt.

Dabei kommt es zu einer iatrogenen Immundefizienz, die eine radikale Infektionsprävention im Sinne einer Umkehr-Isolierung des Patienten, verbunden mit strengen hygienischen Allgemeinmaßnahmen und antiinfektiver Chemoprophylaxe nötig macht.

Die technische Methode der Spenderzellgewinnung unterscheidet sich nach der Art der Stammzellspende: Während bei der KMT das Spenderknochenmark in der Regel aus dem Beckenkamm entnommen wird, werden Patienten vor der Spende von peripheren Stammzellen mit Zytokinen, vorzugsweise mit G-CSF, behandelt um die Zellen aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Insbesondere für pädiatrische Patienten ohne Familienspender eignet sich die Spende von Nabelschnurblut.

Komplikationen

Neben einer ausbleibenden Remission und späterem Rezidiv sind die wichtigsten Komplikationen der Transplantation hämatopoietischer Stammzellen infektiöse und opportunistische Erkrankung, die im Rahmen der Immunsuppression exazerbieren, sowie die akute und chronische Graft versus Host Disease. Nach wie vor stellt die akute GvHD mit einer Letalität von ca. 30% einen Hauptfaktor transplantationsassoziiertes Mortalität dar. Ein Modell zur Graft versus Host Disease wurde erstmals 1966 durch Billingham [8] publiziert.

1.3 Graft versus Host Disease: Krankheitsbild, Immunbiologie, Diagnostik und Klassifikationen

1.3.1 Klinisches Bild und Procedere

Während die akute Graft versus Host Disease in der Regel als lokalisiert oder disseminiert auftretendes makulo-papulöses Exanthem imponiert, das bei fortgeschrittenem Schweregrad zusätzlich Blasenbildung und Epidermolyse aufweisen kann, ist die chronische Form durch ein lichenoides oder sklerodermiformes Bild geprägt (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 3).



Abbildung 2: Chronische lichenoides GvHD, 9 Monate nach KMT



Abbildung 3: Sklerodermiforme GvHD, Verlaufskontrolle 1 Jahr nach Abbildung 2

Aufgrund der hohen prognostischen Relevanz und der Schwere des Krankheitsbildes wird heute standardmäßig eine periinterventionelle GvHD-Prophylaxe durch Immuntherapeutika wie Methotrexat durchgeführt, die in der Regel am Tag vor der Transplantation (d -1) beginnt. Leider kommt es dennoch in vielen Fällen zu einer meist leicht- bis mittelgradigen GvHD.

Im zeitlichen Verlauf der GvHD entwickelt sich eine zunehmende dermale Fibrosierung, häufig mit einer vorübergehenden Melanose. In der Folge stehen die Elastizitätsminderung mit damit einhergehender Einschränkung der Bewegungsfreiheit sowie Hypohidrose im Mittelpunkt der Symptomatik. Man spricht dann in der Regel von einer chronischen GvHD. Die Diagnosesicherung der GvHD erfolgt anhand des klinischen Verlaufs und des histopathologischen Befundes unter Ausschluss von Differentialdiagnosen. Therapeutisch kommen neben symptomatischen Ansätzen wie Rückfettung und Rehydrierung durch topisch applizierte Präparate heute auch die extrakorporale Photopherese in Frage, basierend auf der Vorstellung, den Krankheitsprozess durch Modulation der Funktion regulatorischer T-Zellen zu beeinflussen. Da sich die vorliegende Arbeit nur auf Fälle akuter GvHD bezieht, wird im Folgenden ausschließlich diese Unterform behandelt.

Von einer akuten Graft versus Host Disease (aGvHD) spricht man in der Regel, wenn die Erkrankung innerhalb von 100 Tagen nach Transplantation auftritt. Die aGvHD betrifft initial vorrangig die Haut, in Abhängigkeit vom Schweregrad auch andere Organsysteme, insbesondere den Gastrointestinaltrakt und die Leber. Typischerweise entwickelt sich ein akutes makulopapulöses Exantham, entweder umschrieben oder auch disseminiert. Häufig ist es mit Pruritus und brennenden Dysästhesien verbunden. Im weiteren Verlauf können Blasenbildung und im Extremfall Epidermolyse hinzutreten, sodass sich ein Toxische epidermale Nekrolyse (TEN) -artiges, akut lebensbedrohliches Krankheitsbild entwickeln kann. Zur Diagnosesicherung eignen sich neben der Beobachtung des klinischen Verlaufs und insbesondere des Ansprechens auf spezifische Therapie die Beurteilung des histopathologischen Befundes (ggf. auch mehrfach im Verlauf) in der Regel anhand von Stanzbiopsien sowie Ausschlussdiagnostik der wesentlichen Differentialdiagnosen. Wie eingangs erwähnt ist insbesondere die Abgrenzung zum Arzneimittel-exanthem oft schwierig oder unmöglich, obwohl von therapeutischer Relevanz.

Als Standardbehandlung der akuten GvHD sind Steroide gebräuchlich, allerdings gewinnt die spezifische Immuntherapie immer mehr an Relevanz. Zu den neueren Therapieansätzen zählt auch die Extrakorporale Photopherese (ECP), insbesondere bei Patienten mit Erythrodermie [28]. Aufgrund der hohen Rezidivgefahr muss die Behandlung der aGvHD in aller Regel längerfristig erfolgen und langsam reduziert werden. Dabei ist bei resultierender Immunsuppression auf eine ausreichende antiinfektiöse Prophylaxe zu achten.

1.3.2 Klinische Klassifikationen

Die aGvHD wird im klinischen Alltag üblicherweise anhand der Klassifikation nach Glucksberg hinsichtlich des Schweregrades eingestuft. Das Grading umfasst kutane Effloreszenzen sowie Befall von Leber und Gastrointestinaltrakt (vgl. Tabelle 2 und [31]). Ein wesentlicher Nachteil der Klassifikation ist die hohe Untersucherabhängigkeit; Studien zeigten, dass lediglich ca. 40% der Untersucher im kutanen Schweregrad übereinstimmten, die Modifikationen des Scores zielten jedoch häufig auf eine große Vereinfachung ab, die den Fokus von kutanen Effloreszenzen ablenkte [53]. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass gastrointestinaler und Leberbefall deutlich mit der transplantationsassoziierten Mortalität korrelieren [9]. Das kutane Grading-System weist keine überzeugende prognostische Aussagekraft auf. Daher wurden immer wieder Versuche angestellt, den Score zu optimieren bzw. zu ersetzen, beispielsweise durch den IBMTR Score [54].

Bislang hat sich keiner dieser Scores durchgesetzt, sodass der Glucksberg Score nach wie vor den klinischen Standard darstellt [9]. Als weiterer Kritikpunkt kann aus dermatologischer Sicht angeführt werden, dass sich der Glucksberg Score aufgrund der groben Einteilung für die dermatologisch-klinische Verlaufsdokumentation wenig eignet.

Tabelle 2: Klinische Klassifikation nach Glucksberg [31]

<i>Grad des Organbefalls als Grundlage für die Gluckbergklassifikation</i>			
Stadium	Haut	Leber: Bilirubin (mg/dl)	Intestinum (ml Diarrhoe/d)
1	Makulopapulöses Exanthem <25% KOF	2-3	>500
2	Makulopapulöses Exanthem 25-50% KOF	3-6	>1000
3	Erythrodermie (Exanthem >50% KOF) ohne Blasenbildung o. Epidermolyse	6-15	>1500
4	Erythrodermie (Exanthem >50% KOF) mit Blasenbildung u./o. Epidermolyse	>15	Akutes Abdomen mit oder ohne Ileus
<i>Glucksberg-Klassifikation zum klinischen Schweregrad akuter GvHD</i>			
Grad	Haut	Leber	Intestinum
I	Stadium 1-2	0	0
II	Stadium 1-3	Stadium 1	Stadium 1
III	Stadium 2-3	Stadium 2-3	Stadium 2-3
IV	Stadium 2-4	Stadium 2-4	Stadium 2-4

1.3.3 Histopathologisches Bild

Der Stellenwert der Histopathologie für die Differentialdiagnostik der akuten Graft versus Host Disease wird in der Literatur vielfach gestützt, teils verneint [37].

Das histologische Bild der akuten Graft versus Host Disease ist geprägt durch eine Interface Dermatitis mit lichenoidem Infiltrat. Folgende wichtige Indikatoren für akute kutane Graft versus Host Disease sind allgemein anerkannt: Ballonierung der Basalzellen, Einzelzellapoptose bzw. Dyskeratose epidermaler Zellen v.a. der basalen Schicht, sogenannte Satellitenzellnekrose (Einzelzellapoptose / -nekrose mit umgebenden lymphozytären Zellen), Lymphozytär geprägtes lichenoides Infiltrat. Oft bestehen auch ohne klinisch erkennbare Effloreszenzen signifikante histologische Veränderungen: So wiesen Vasallo et al. bei klinisch unauffälligen Patienten nach allogener Transplantation in 31% histopathologische Veränderungen typisch für Graft versus Host Disease I°/II° nach, während 45% postinflammatorische Veränderungen zeigten und lediglich 24% eine normale Histologie aufwiesen [89]. Nach Lerner et al. [49] unterscheidet man vier histologische Schweregrade, die von Basalzellvakuolisierung (Grad I) über Basalzellapoptose und Satellitenzellnekrose bis zu totaler Epidermolyse (Grad IV) reichen. 1994 erfuhr die Klassifikation eine Modifikation durch Horn [40], wobei das lymphozytäre Infiltrat als Kriterium für Grad 2 aufgenommen wurde (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Histologische Klassifikation, modifiziert nach Horn (1994) [40]

Histological grading scheme for acute cutaneous GVHD	
Grade 0	Normal skin or cutaneous disease unrelated to GVHD
Grade 1	Vacuolar alteration of the epidermal–dermal junction
Grade 2	Dyskeratotic cells in the epidermis and/or follicle, dermal lymphocytic infiltrate
Grade 3	Fusion of basilar vacuoles to form clefts and microvesicles
Grade 4	Separation of epidermis from dermis

Leider ist die aGvHD anhand des histologischen Befundes von anderen Dermatitiden, etwa bedingt durch die Konditionierungstherapie, nur schwer abzugrenzen; eine spezifische Befundkonstellation ist bisher nicht bekannt. Das Bild der chronischen Graft versus Host Disease hingegen wird von dermalen Fibrose und epidermaler Atrophie bestimmt.

1.3.4 Ätiologie, Pathogenese und Immunbiologie

Aus klinischer Sicht sind verschiedene Risikofaktoren für das Auftreten einer GvHD identifiziert worden. Hierzu zählen erhöhtes Alter des Empfängers, HLA(Humanes Leukozytenantigen)- und ABO-Inkompatibilität [14] sowie Zytomegalievirus (CMV)-Status von Spender und Empfänger [45].

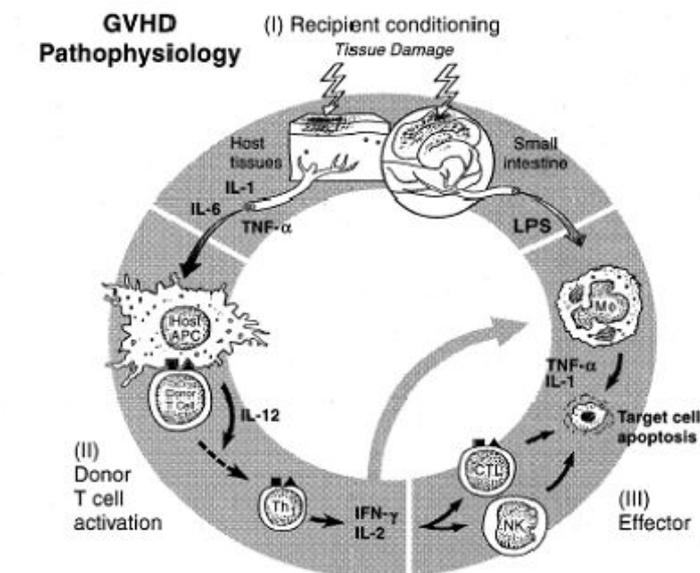


Abbildung 4: Hypothese zur Pathophysiologie der akuten Graft versus Host Disease. Ferrara et al. (1998)

In einer ersten Phase kommt es durch den Einfluss der immunsuppressiven Konditionierungstherapie zu einer übermäßigen Aktivierung der Dendritischen Zellen des Empfängers. Im Anschluss an die allogene Transplantation (Phase 2) dominiert die vorzeitige Apoptose von Keratinozyten. Ferrara erklärt dies durch eine Schädigung Keratin k-15-positiver Stammzellen im Rahmen der Therapie. In der dritten Phase kommt es dann durch Immunorekonstitution auf dem Hintergrund inadäquater DC-Aktivierung und eines immunbiologischen Ungleichgewichts zu einer exzessiven Zytokinausschüttung, auch als Zytokinsturm bezeichnet.

Die genauen Mechanismen, die zu dieser Assoziation beitragen, sind noch nicht abschließend geklärt. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Interaktion von CMV mit Fibroblasten die Antwort auf Interferon (IFN) inhibiert.

Im Rahmen der frühen Erholungsphase, die sich in der Regel von Tag 0 bis 100 nach Transplantation vollzieht und durch eine Immunrekonstitution gekennzeichnet ist, kommt es bei etwa 30 – 60 % der Knochenmarks-/stammzelltransplantierten Patienten zu einer unterschiedlich schwer ausgeprägten akuten Graft versus Host Disease [132].

Bis heute sind die immunbiologischen Mechanismen, die zu dieser Komplikation führen, nicht bis ins letzte Detail geklärt. Als pathophysiologische Hypothese ist die Theorie von Ferrara et al. (1994) [26] bis heute anerkannt. Dieser schlägt ein 3-Phasen-Modell vor (vgl. Abbildung 4).

1.3.5 Graft versus Host (GvH)- und Graft versus Tumor (GvT) Effekt

In der Stammzelltransplantation spielen zwei Effekte eine entscheidende Rolle: Zum einen lösen Konditionierung, Unterschiede zwischen mHC bzw. MHC-Molekülen von Spender und Empfänger und andere in 1.3.4 erwähnte Mechanismen eine Entzündungsreaktion aus, die man als Graft-versus-Host Disease (GvHD) bezeichnet. Zum anderen macht man sich den Graft-versus-Tumor bzw. –Leukaemia Effekt (GvTE / GvLE) zu Nutze, der auf einer inversen Abstoßungsreaktion, d.h. einer Schädigung der Empfängertumorzellen durch die Entzündungszellen des Spenders beruht. Auf diese Weise lässt sich die Intensität der für den Patienten sehr belastende Konditionierungstherapie reduzieren [11, 30].

Studien belegen, dass sowohl die Übertragung HLA (Humanes Leukozyten-Antigen)-identischen als auch T-Zell-depletierten Spendermaterials die Rezidivrate bei Leukaemie signifikant erhöht [41]. Es gibt Hinweise darauf, dass minor Histokompatibilitätskomplexe (mHC) eine hohe Expressionsrate auf Empfängerzellen aufweisen und somit einen wichtigen Angriffspunkt für die GvL-Therapie darstellen [90]. Als Aggressoren fungieren dabei $CD8^+$ T-Lymphozyten des Spenders. Neue Perspektiven hinsichtlich der selektiven Nutzung des GvL-Effekts eröffnen sich, da mH-Antigene der Typen Histokompatibilitätsantigen (HA) 1 und HA-2 nur auf hämatopoietischen Zellen exprimiert werden [14]: mHA-spezifische T-Zell-Klone könnten als Therapeutikum dienen.

Da Graft versus Leukaemia Effect (GvLE) und Graft versus Host Effect (GvHE) stark assoziiert sind, stellt die Trennung beider Mechanismen eine große Herausforderung und Chance für Therapieerfolg und Komplikationskontrolle dar.

1.4 Arzneimittelexanthem: Krankheitsbild, Immunbiologie, Diagnostik und Klassifikationen

Kutane Arzneireaktionen sind häufig durch Dysästhesien und Pruritus geprägt und weisen ein variables Bild an Effloreszenzen und klinischen Schweregraden auf: Am häufigsten sind makulopapulöse Exantheme (in ca. 40 % der Fälle, besonders durch Antibiotika wie Penizilline, Chinolone, aber auch Allopurinol und Carbamazepin), urtikarielle Exantheme und Angioödem (ca. 25 %, besonders durch nichtsteroidale Antiphlogistika und ACE-Hemmer) wie auch verschiedene Formen der fixen Arzneireaktion (ca. 7-10 %, besonders durch Sulfonamide und nichtsteroidale Antiphlogistika). Seltener treten Purpura bzw. Vaskulitiden, Erythema exsudativum

multiforme (EEM), Stevens-Johnson-Syndrom (SJS), Toxische epidermale Nekrolyse (TEN) und alle Grade eines anaphylaktischen Schocks auf. Bemerkenswert ist, dass die Symptomatik bei den verschiedenen Medikamenten weder spezifisch noch stetig ist, was Diagnose und Identifikation des Auslösers erschwert.

Besonders die makulopapulösen Exantheme, SJS und TEN können die verschiedenen Schweregrade der akuten GvHD imitieren. Die bullösen Formen stellen in der Regel klinisch charakteristische, schwere Affektionen von Haut und Schleimhäuten dar, die durch spezifische Medikamente mit einer Latenz von 5 –14 Tagen ausgelöst werden.

Therapie der Wahl ist die Vermeidung weiterer Exposition mit dem auslösenden Medikament und die systemische Gabe von Glukokortikoiden. Immunologische Ursache ist vermutlich die Aktivierung epidermaler, zytotoxischer CD8+-T-Zellen. Diese erkennen chemisch modifizierte Metabolite von Arzneimitteln als nominelle T-Zell-Antigene. Diese Metabolite entstehen spontan oder werden durch fremdstoffmetabolisierende Zytochrom-P450-abhängige Enzyme verstoffwechselt.

Die Diagnostik der Arzneiexantheme beinhaltet Hauttests, Histopathologie und In-vitro-Diagnostik. Bei den Hauttests haben sich sowohl Prick- als auch Epikutantest bewährt. Der Epikutantest spielt eine besondere Rolle; beim fixen bullösen Exanthem kann er auch in loco durchgeführt werden. Die In-vitro-Diagnostik beinhaltet neben der Bestimmung des arzneispezifischen IgE auch zelluläre Tests mit Patientenlymphozyten [38].

1.5 Immunbiologische Grundlagen: Dendritische Zellen, DC-spezifische Antikörper, DC-TC-Interaktion

1.5.1 Immunsystem

Das kutane Immunsystem wird häufig in ein angeborenes (innates) und erworbenes (adaptives) Immunsystem unterteilt. Zum angeborenen Immunsystem zählen zelluläre Komponenten wie Natürliche Killerzellen und neutrophile Granulozyten sowie lösliche Faktoren wie Lysozym, Defensine und das Komplementsystem. Insofern vermittelt das angeborene Immunsystem in erster Linie eine unspezifische Immunantwort, während das adaptive antigenspezifisch reagiert und von B- und T-Lymphozyten dominiert wird.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen über einen komplexen Fundus an „pattern recognition receptors“ wie CD14, CD 205 und Toll Like Rezeptoren (TLR). Das angeborene Immunsystem setzt eine unspezifische Abwehrkaskade in Gang und initiiert gleichzeitig die spezifische Abwehr durch das erworbene Immunsystem. An der Schnittstelle zwischen den beiden Systemen sind vor allem zwei Zelltypen von Bedeutung: Makrophagen (MPh) und Dendritische Zellen (DC). Dendritische Zellen scheinen weit effizienter als Makrophagen an der Stimulation naiver T-Zellen und damit an der Aktivierung einer primären Immunantwort mitzuwirken [5]. Sie spielen offenbar eine tragende Rolle in der Immunpathologie der GvHD (vgl. [47] und [59]).

1.5.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind wesentlich für das Priming naiver T-Lymphozyten verantwortlich [17]. Plasmazytoide (PDC) und andere Dendritische Zellen wandern unter bestimmten Bedingungen in die Haut ein.

Im Zuge der Reifung entwickeln sich Dendritische Zellen von Antigen-aufnehmenden hin zu Antigen-präsentierenden Zellen. Hierbei kommt es durch die Aufnahme und die Prozessierung antigenen Materials zur vermehrten Expression bzw. zur Neoexpression von MHCII und von kostimulatorischen Molekülen [83].

Eine etablierte Klassifikation unterscheidet zwischen myeloiden und lymphozytären Dendritischen Zellen.

Myeloide / monozytäre DC exprimieren CD11c und triggern abhängig von ihrem Reifegrad und vom Stimulationsfaktor GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor) entweder eine Th1- oder Th2-Antwort [7].

DC lymphoiden Ursprungs sind CD11c⁻/CD3⁻ und exprimieren HLA-DR, CD123 und CD4. Sie triggern in aller Regel eine Th2-Antwort. Während DC im Thymus etwa zu gleichen Teilen beiden Vorläuferzelllinien entspringen, entstammen periphere DC hauptsächlich der myeloischen Linie [51]. Letztere wurden zunächst als CD11c⁻ beschrieben, die nur im reifen Zustand nach monozytärer Stimulation relevante Mengen an MHCII exprimieren [97]. Monocyten können sich im peripheren Gewebe z.B. durch Entzündung bedingt zu DC's ausdifferenzieren [65]. Plasmazytoide Dendritische Zellen (PDC) produzieren u.a. TypI-Interferon (IFN-I), einen starken Stimulator der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität, als Antwort auf virales Material.

Bei myeloiden / monozytären DC unterscheidet man in der Haut Langerhans Zellen und Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen (IDEC). Langerhans Zellen finden sich hauptsächlich epidermal und exprimieren unter anderem die Oberflächenantigene HLA-DR, CD1a, CD1c, CD11c, FCεRI und FCγRII[79]. Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen (IDEC) haben sich insbesondere für die Immunbiologie entzündlicher Hauterkrankungen als wesentlich erwiesen. Es handelt sich dabei um eine CD1a⁺/CD11c⁺/CD206⁺ Zellpopulation [93].

PDC und IDEC verhalten sich bei klinisch bedeutsamen entzündlichen Hauterkrankungen gegensinnig: Während bei Lupus erythematoses (LE) hohe Zahlen an PDC, aber nur wenige IDEC gefunden wurden, konnten bei Atopischer Dermatitis zahlreiche IDEC, jedoch nur wenige PDC nachgewiesen werden [94]. Der Mangel an für die virale Abwehr wichtigen PDC bei Atopischem Ekzem dürfte wesentlich für die Anfälligkeit der Atopiker für virale Infektionen wie beim Ekzema herpeticatum sein [94].

Diese Daten zeigten, dass verschiedene dermatologische Erkrankungen durch spezifische Verteilungsmuster von Subtypen Dendritischer Zellen charakterisiert sind. Hierauf gründete die Intention dieser Forschungsarbeit, das DC-Muster bei GvHD im Vergleich zu wichtigen Differentialdiagnosen zu beschreiben und möglicherweise in der Folge diagnostisch zu nutzen.

1.6 Entwicklung der Forschungsfragestellungen

Konkret sind die wesentlichen Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit folgende:

- Verbesserung und Erweiterung der differentialdiagnostischen Instrumente: Graft versus Host Disease in Abgrenzung zum akuten Arzneiexanthem auf immunhistochemischer und histopathologischer Basis (GvHiScore)
- Etablierung eines modifizierten klinisch-dermatologischen Scores zur Verbesserung des Follow-up Monitorings bei akuter Graft versus Host Disease (GvHSCO, GvHSCOGrade)
- Aufklärung der zellulären Immunbiologie der akuten Graft versus Host Disease; Schwerpunkt: Identifikation wesentlich beteiligter Subtypen von Dendritischen Zellen

Hieraus ergibt sich folgende Fragestellung:

- 1 In welchen histologischen und immunhistochemischen Kriterien unterscheiden sich GVHD und Arzneireaktion signifikant? Ist auf Basis dessen ein aussagekräftiger diagnostischer Test möglich?
- 2 Besitzt der GvHSCO im Vergleich zum Glucksberg Score eine höhere prognostische Aussagekraft hinsichtlich des Ein-Jahres-Überlebens?
- 3 Welche Subklassen Dendritischer Zellen bestimmen das zelluläre Bild bei akuter Graft versus Host Disease und welche Aktivitäts- und Reifemarker werden exprimiert?
- 4 Lassen sich Korrelationen zwischen der Anzahl Dendritischer Zellen und Effektorzellen nachweisen und hieraus womöglich Rückschlüsse auf immunbiologische Mechanismen in der GVHD ziehen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Grunddaten und Patientendisposition

Prospektiv wurden 20 volljährige Patienten mit akuter Graft versus Host Disease und 13 Patienten mit akutem Arzneimittelexanthem unabhängig vom Geschlecht in die Studie einbezogen, wobei der jeweils größere Anteil an Patienten männlich und das mittlere Alter beider Patientengruppen vergleichbar war (vgl. Tabelle 4). Zwei der initial 22 GvHD-Patienten wurden aufgrund der späten Erstmanifestation über 100 Tage nach Transplantation (vgl. Definition akute GvHD und Abbildung 6) nicht in die Auswertung eingeschlossen.

Die Mehrzahl der Patienten mit aGvHD war aufgrund akuter Leukämien knochenmarks- bzw. stammzelltransplantiert worden (70%). Einen weiteren größeren Anteil stellten Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (20%) (vgl. Abbildung 5).

Alle an aGvHD erkrankten Studienpatienten hatten im Vorfeld eine zytoreduktive und Konditionierungstherapie sowie eine GvH-Prophylaxe erhalten:

Die Konditionierungstherapie ist mit Antithymozytenglobulin (ATG) und Cyclophosphamid (Endoxan®, dosisadaptiert nach Körperoberfläche) durchgeführt worden, drei Patienten hatten ATG in Kombination mit Etoposid erhalten.

Zur zytoreduktiven Therapie wurden Flucytosin, Cytarabin und Amsacrin verabreicht. Als periinterventionelle Prophylaxe gegen GvHD erhielten die Patienten in aller Regel Ciclosporin A in Kombination mit Methotrexat (10 Fälle) oder Mycophenolatmofetil (Cellcept®, MMF; 5 Fälle). In einzelnen Fällen wurde Ciclosporin A mit stattdessen mit den Rituximab oder Sirolimus kombiniert.

16 Patienten hatten mindestens einen Zyklus Hochdosis-Chemo- bzw. Immuntherapie erhalten, wobei die Therapieschemata entsprechend der Grunderkrankungen und Therapieempfehlungen zum Diagnosezeitpunkt variierten: GMALL-Protokoll [35] oder aktuelles Studienprotokoll (Cytarabinosid/AraC und Mitoxantron/S-HAM) in etwa der Hälfte der Fälle (12/22) ergänzt durch mindestens einen Zyklus Strahlentherapie.

Bei allen aGvHD-Patienten wurden die Transplantatcharakteristika als mögliche Einflussfaktoren erfasst (vgl. Tabelle 5).

Die kutane Graft versus Host Disease manifestierte sich bei den Studienpatienten im Median nach 23 Tagen (vgl. Abbildung 6). Patienten, bei denen der Zeitpunkt der Erstmanifestation den Tag 100 nach Transplantation überstieg, wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit (Begründung vgl. Kapitel 2.5.2 Seite 34) von der Analyse ausgeschlossen.

Alle Biopsien wurden aus läsionaler Haut entnommen. Naturgemäß konnte dadurch keine absolute Konstanz hinsichtlich der Biopsieregion gewährleistet werden. 16 der 22 Biopsien von GvHD-Patienten stammen von der Oberen Körperhälfte, Gesicht und Hals ausgenommen. Demgegenüber stehen sechs Patienten mit Arzneireaktion, die übrigen Biopsien stammen von anderen Körperregionen (vgl. Abbildung 7). Im Vergleich der Patientengruppen mit GvHD und Arzneireaktion ließ sich sowohl im Gesamtvergleich als auch differenziert nach Biopsieregionen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Epidermisdicke bzw. Atrophie feststellen.

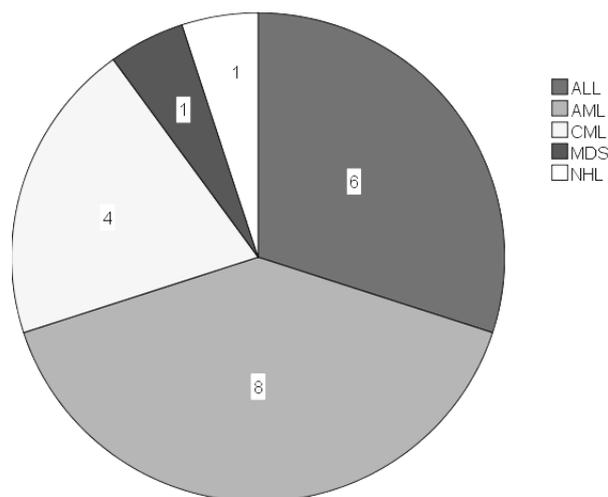


Abbildung 5: Verteilung der Grunderkrankungen unter Patienten mit akuter GvHD

Bei akuter GvHD lag in 70% der Fälle (N=14/20) eine akute lymphatische (blau) oder myeloische (grün) Leukämie als Grunderkrankung vor. Bei 20% der Patienten war eine chronisch myeloische Leukämie diagnostiziert worden (grau), andere Grunderkrankungen waren seltener.

Tabelle 4: Alters- und Geschlechterverteilung der Patientengruppen

Grunddaten / Variable	Klinisch bestätigte Diagnose	
	aGvHD	Akutes Arzneiexanthem
Anzahl der Patienten	20	13
Geschlecht (maskulin / feminin)	11 / 9	10 / 3
Mittleres Lebensalter (Jahre)	47,8	46,2
Z.n. Chemotherapie	15	1

Tabelle 5: Transplantatassoziierte Grunddaten

Die Tabelle zeigt die quantitative Verteilung der Einzelfälle hinsichtlich der untersuchten transplantatassoziierten Einflussparameter.

Kriterium	Definition	Fallzahl	Kriterium	Definition	Fallzahl
Allogene Transplantation	Knochenmark	8	CMV-Status (Empfänger=E, Spender=S)	E- / S+	3
	PBSCT	14		E+ / S+	3
Verwandtschaft	Verwandt	14		E+ / S-	4
	Unverwandt	8		E- / S-	12
Rhesusfaktor	Identisch	18	Geschlecht	Identisch	10
	Mismatch	4		Mismatch	12
HLA	Identisch	17			
	Haplo-ident.	5			

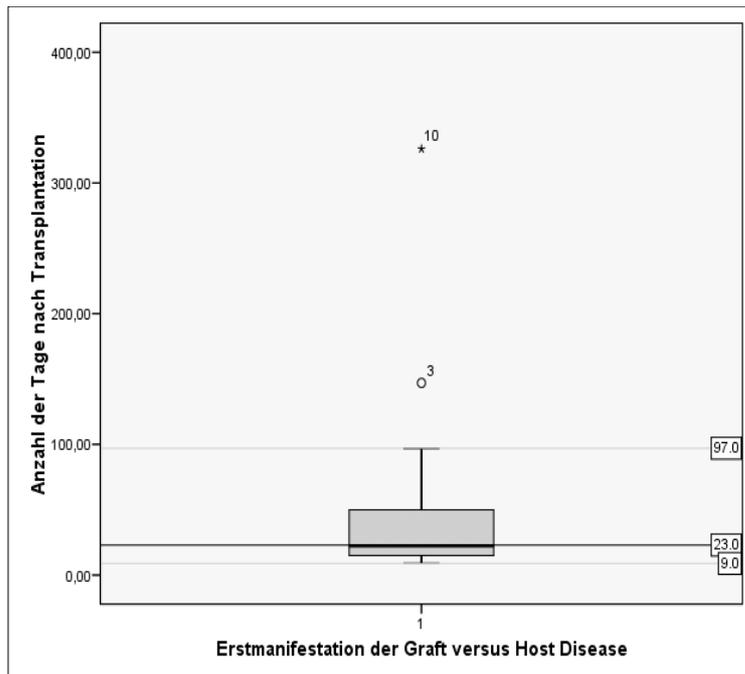


Abbildung 6: Zeitpunkt der Erstmanifestation von GvHD nach allogener Transplantation

Boxplotdarstellung: Der Median der Erstmanifestation lag bei 23 Tagen, in 95% trat die GvHD zwischen dem 9. und 97. Tag auf. Die beiden Patienten mit Erstmanifestation später als 100 Tage nach Transplantation wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da sie das Kriterium „akute GvHD“ definitionsgemäß nicht erfüllen.

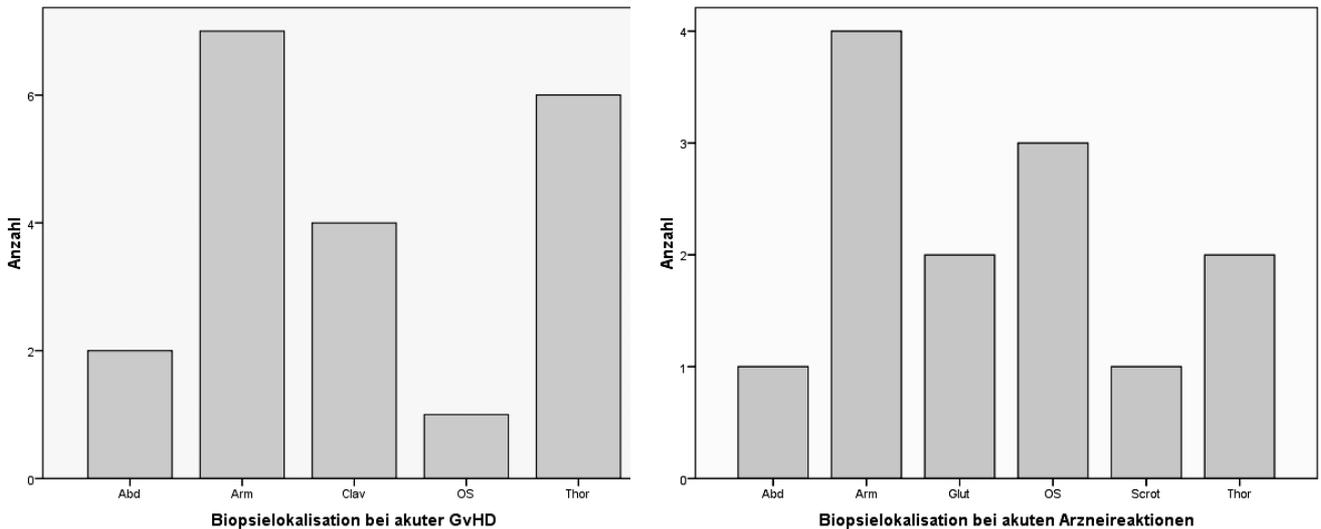


Abbildung 7: Gegenüberstellung der Biopsieregionen in beiden Patientengruppen

Die Abb. stellt die Lokalisation der Stanzbiopsien bei akuter GvHD (links) und akutem Arzneiexanthem (rechts) gegenüber. Da die Biopsien aus den jeweils betroffenen Arealen und dabei aus ästhetischen Gründen möglichst aus wenig lichtexponierten Arealen entnommen wurden, war die Verteilung zufällig und letztlich inhomogen. Die Patienten wurden anhand der Biopsieregionen in Gruppen aufgeteilt. Anschließend wurde ein statistischer Vergleich zwischen diese Gruppen hinsichtlich des am vermutlich stärksten abhängigen Kriteriums, Epidermisdicke/Atrophie, durchgeführt.

2.2 Erstellung des klinischen Statuserhebungsbogens „GvHScO“

Die gängige klinische Klassifikation der akuten Graft versus Host Disease ist das Grading nach Glucksberg [31]. Diese beinhaltet neben einer rein dermatologischen Klassifikation auch Parameter für Leber- und gastrointestinale Beteiligung. Letztere stehen dem klinisch tätigen Dermatologen zur Beurteilung häufig nicht zur Verfügung. Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der GvHD der Haut beschäftigt, wird in der Folge zwischen dem klassischen Glucksberg Grading („gesamt“) und der lediglich die Haut betreffenden Klassifikation nach Glucksberg unterschieden. Letztere wird in der Folge als „Glucksberg-Klassifikation der akuten kutanen GvHD“ bezeichnet.

Aufgrund der relativ groben Einteilung fällt die überwiegende Zahl der Patienten bei der Glucksberg-Klassifikation der akuten kutanen GvHD in die beiden mittleren Gruppen: Grad 2 und 3. Daher ist die Klassifikation aus der klinischen Erfahrung heraus weniger geeignet zur feinen Differenzierung von Schweregraden und ebenso wenig für das Follow-up Monitoring geeignet. Hieraus ergibt sich eine Zielsetzung dieser Arbeit – die Entwicklung einer neuartigen, klinisch-dermatologischen Klassifikation, die den folgenden Kriterien gerecht wird (vgl. S.5 ff):

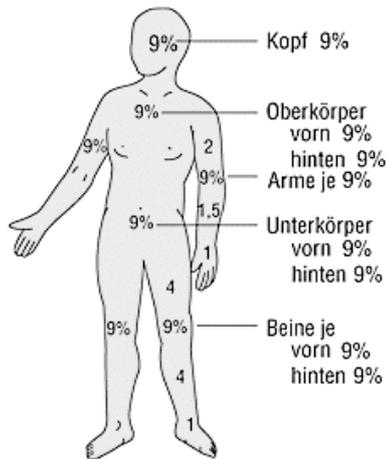
- Feinere Abstufbarkeit
- Quantitative Erfassung verschiedener Effloreszenztypen
- Ausschließliche Erfassung objektiver Kriterien
- Einfache Handhabung (Krankenbett-tauglich)

Als Grundlage für die Extraktion der Bewertungskriterien dienten vorliegende Hautbefunde von 50 randomisiert ausgewählten Patienten aus der klinischen Praxis. Unter Berücksichtigung dieses Materials, aus der Literatur bekannter klassischer Effloreszenzen der akuten Graft versus Host Disease wurde nach Einholung von Expertenmeinungen der klinische GvHScO entwickelt (vgl. Abbildung 11).

2.2.1 Körperoberfläche

Die Involvierung der Körperoberfläche in Prozent nach der „Neuner-Regel“ nach Wallace geht mit maximal 50% in den Score mit ein (vgl. Abbildung 8).

Die übrigen 50% setzen sich aus den fünf verschiedenen, semiquantitativ erfassbaren und im Folgenden aufgeführten Kriterien zusammen (vgl. 2.2.1 , 2.2.2 , 2.2.3 und 2.2.4). Diese spiegeln alle GvHD-typischen Effloreszenzen wieder. Die Bewertung aller Patienten wurde aufgrund des augenscheinlichen subjektiven Zuordnungsspielraums einiger Kriterien von der selben Person (Facharzt für Dermatologie mit langjähriger Berufserfahrung) durchgeführt.



Klinische Faustregel nach Wallace zur Abschätzung der Körperoberfläche beim Erwachsenen

(ursprünglich zur Abschätzung des Verbrennungsgrades verwendet):

- Arme und Kopf je 9%
- Brust/Bauch, Rücken und Beine je 18%

Aus: Roche, Urban & Fischer

Abbildung 8: „Neuner-Regel“ zur Abschätzung der Körperoberfläche nach Wallace

2.2.2 Erythem

Erythematöse Effloreszenzen sind bei akuter Graft versus Host Disease sehr häufig, aber erfahrungsgemäß flüchtig und hinsichtlich des Schweregrades wenig aussagekräftig. Sie wurden mit 10% Anteil am Gesamtscore bewertet.

Effloreszenz	Bewertungskriterium	Minimum - Maximum	Anteil am Gesamtscore
Erythem	Farbintensität	0 - 3	10%

Als Bewertungskriterium wurde die Farbintensität auf einer Skala von 0 bis 3 Punkten gewählt, was im Einzelnen wie folgt zu interpretieren ist:

Punkte	Farbintensität des Erythems
0	Kein Erythem
1	Leichtgradig (blass rötlich)
2	Mittelgradig (deutlich rötlich)
3	Kräftig (tiefes bis dunkles Rot)

2.2.3 Papeln

Papeln kommen bei akuter Graft versus Host Disease relativ häufig vor und sind aus der klinischen Erfahrung heraus typisch für höhergradige Erkrankung. Sie lassen sich durch Quantität und Beschaffenheit i.S. von Größe bzw. Konfluenz charakterisieren. Beide Kriterien gehen mit je 10% Anteil in den Gesamtscore ein.

Effloreszenz	Bewertungskriterium	Minimum – Maximum	Anteil am Gesamtscore
Papeln	Größe / Konfluenz	0 – 3	10%
Papeln	Menge	0 – 3	10%

Zur Bewertung wurde wieder eine Skala von 0 bis 3 Punkten gewählt, die im Einzelnen in folgender Tabelle erläutert wird:

Punkte	Größe bzw. Konfluenz der Papeln / Knötchen
0	Keine Papeln
1	Durchmesser < 1mm ohne Konfluenz
2	Durchmesser 1 – 5mm oder teilweise Konfluenz
3	Durchmesser > 5mm oder ausgeprägte Konfluenz

Punkte	Menge
0	Keine
1	Wenige: < 10% Oberflächenbefall
2	Mittelgradig: 10 – 50% Oberflächenbefall
3	Viele: > 50% Oberflächenbefall

2.2.4 Bläschen / Epidermolyse

Bläschenbildung bzw. Epidermolyse kennzeichnen das Maximalstadium der akuten GvHD. Diese Effloreszenz ist verhältnismäßig selten, jedoch schwerwiegend und wird daher mit insgesamt 20 % bewertet. Die Bläschen- bzw. Blasenbildung lässt sich analog zu Papeln einerseits durch Größe/ Konfluenz, andererseits durch ihre Anzahl beschreiben, was jeweils mit 10 % in den Gesamtscore eingeht.

Effloreszenz	Bewertungskriterium	Minimum - Maximum	Anteil am Gesamtscore
Vesiculae	Größe/Konfluenz	0 – 3	10%
Vesiculae	Menge	0 – 3	10%

Auch hier wurde eine Skala von 0 bis 3 Punkten entworfen, die im Folgenden beschrieben wird:

Punkte	Größe / Konfluenz des Vesikel
0	Keine
1	Durchmesser < 1mm ohne Konfluenz
2	Durchmesser 1 – 5mm oder teilweise Konfluenz
3	Durchmesser > 5mm oder Epidermolysen

Punkte	Menge
0	Keine
1	Wenige: < 10% Oberflächenbefall
2	Mittelgradig: 10 – 50% Oberflächenbefall
3	Viele: > 50% Oberflächenbefall

Zusammenfassend diente der vorgeschlagene GvHSCO (vgl. Abbildung 11) als Grundlage für die prospektive Datenerhebung im Zeitraum vom 2005 bis 2006.

Um die Resultate des GvHSCO für den klinischen Alltag greifbarer zu gestalten und den Vergleich mit dem etablierten Glucksberg-Klassifikation der akuten kutanen GvHD zu erleichtern, wurde das klinische „GvHSCOGrade“ (vgl. Tabelle 6) entwickelt, mit dessen Hilfe sich die Resultate des GvHSCO in ein klassisches „Format“ mit vier Schweregraden überführen lassen.

Tabelle 6: Stadieneinteilung nach GvHSCO (entspricht GvHSCOGrade)

Für die vorliegende Arbeit wurde das GvHSCOGrade in Abhängigkeit vom GvHSCO a priori entwickelt und im Rahmen der Studie u.a. auf seine prognostische Aussagekraft hinsichtlich 1-Jahres-Überleben und histologischem Befund getestet.

GvHSCOGrade:	Schweregrad	Punktwert
(I)	Leicht	0 – 15
(II)	Mittelgradig	16 – 30
(III)	Ausgeprägt	31 – 45
(IV)	Schwer	> 45

2.2.5 Materialgewinnung und -verarbeitung

Materialgewinnung und -transport

Die Proben wurden im Rahmen der klinischen Routine nach vorheriger Einverständniserklärung durch die Patienten in Form von zylindrischen Stanzen eines Durchmessers von 6mm gewonnen und anschließend in einem geeigneten Transportmedium und –behältnis binnen 24 Stunden der weiteren Verarbeitung zugeführt.

Paraffinfixierte Schnitte: Herstellung

Die Gewebeproben wurden in Formaldehyd eingelegt und entwässert (Tissue Tek® VIP von Vogel: Alkoholreihe; Xylolbehandlung; Paraffinierung). Anschließend wurden die Proben mit

Hilfe von Paraplast in Mikrotom-geeignete Gießrahmen gegossen, 5µm dick geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die angefertigten Schnitte wurden weiterhin auf einer Wärmeplatte gestreckt und ca. 30min. bei 48°C getrocknet.

Weiterverarbeitung der Schnitte für die Histologie

Die Schnittpräparate wurden für den Färbevorgang mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend gefärbt. Zwischen den einzelnen Färbegängen wurde jeweils für eine Minute mit destilliertem Wasser gespült.

Färbeprotokolle für die verwendeten Standardfärbungen

Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung:

Hämatoxylin nach Harris	10 min.
Bläuen nach Shandon	1 min.
Eosin-Gemisch	3 sec.

Giemsa-Färbung:

May-Grünwald-Lösung	35 min.
Giemsa-Lösung (1:5 mit PBS-Puffer verdünnt)	45 min.
Essigsäure (0,1%)	3 sec.
Isopropylalkohol (absolut)	30 sec.

PAS:

Perjodsäure 0,5%	5 min.
Schiff'sche Reagenz	10 – 15 min.
Sulfitwasser	5 min.
Hämalaun (n. P. Mayr)	5 min.
Wässrige Hämalaunlösung (Objektträger + Lsg. in Aqua dest.)	10 min.

Als Lösungen wurden die handelsüblichen Standardlösungen für Histochemie verwendet. Die Sulfitlösung wurde aus 300ml destilliertem Wasser, 15ml 1N HCl und 18ml Natriumdisulfid hergestellt.

Versiegelung

Die Versiegelung der Schnitte wurde durch eine aufsteigende Alkoholreihe, Xylolbehandlung und anschließende Versiegelung mit Xylol-Filmen durchgeführt.

2.2.6 Dermatohistopathologische Begutachtung

Um eine standardisierte dermatohistopathologische Analyse sowohl der Patienten mit Graft versus Host Disease als auch der Patienten mit Arzneireaktion zu ermöglichen, wurde nach folgenden Grundprinzipien vorgegangen:

- Verblindete Analyse
- Randomisierte Auswahl der beurteilten Präparatabschnitte; Beurteilungsabschnitt insgesamt 5mm Hautsektion
- Beurteilung aller vorgegebenen Kriterien
- Beurteilung anhand zuvor festgelegter, (soweit möglich) klarer Definitionen; somit Minimierung der Begutachtersubjektivität

Zur Extraktion der relevanten Kriterien wurden nach Sichtung von Fachliteratur 100 randomisiert ausgewählte histologische Befunde zu GvHD und Arzneireaktionen gesichtet. Anschließend wurde ein Katalog aller angewandten Kriterien erstellt und nach Zurateziehung von Expertenmeinungen von wenig hilfreichen bzw. mittels der vorgesehenen Methodik nicht klar beurteilten Unterpunkten befreit. Die verbleibenden Kriterien wurden bei allen Studienpatienten beurteilt:

Kriterien der histopathologischen Analyse

Allgemeine Kriterien

Gesamtbild: lichenoid / sklerodermiform / nicht beurteilbar; Akanthose; Reteleisten; Epidermolyse; Akantholyse; Interstitielles Ödem; Entzündliches Infiltrat; Stratum corneum; Hornmasse; Verhornungstyp; Struktur; Verteilungsmuster; Dys-/ Orthokeratose

Strata spinosum und granulosum

Bewertet wurden: Hypergranulose; Ballionierte Keratinozyten; Vakuolisierung; Apoptose

Stratum basale

Bewertet wurden: Ballionierte Keratinozyten; Vakuolisierung; Satellitenzellnekrose / Apoptose; Hyperpigmentierung

Basalmembran

Bewertet wurden: Breite; Fibrosegrad; Struktur

Dermis

Bewertet wurden: Erythrozytenextravasate; Melanophagen; Mastzellen; Kollagene Bindegewebsvermehrung (Fibrose / Sklerose); Vasodilatation; Mastzellinfiltration

Die exakten Beurteilungskriterien sind nebenstehender Abbildung 9 zu entnehmen. Die einzelnen Kriterien wurden nach folgenden zum Zweck dieser Studie definierten Beurteilungskonventionen bearbeitet.

Abbildung 9: Histopathologischer Beurteilungsbogen

Der histopathologische Beurteilungsbogen diente als Grundlage für die Bewertung der verschiedenen Charakteristika der entzündlichen Hauterkrankungen (Arzneiexanthem vs. GvHD). Die Bewertung erfolgte kategorisch und verblindet (in Unkenntnis der jeweiligen Diagnose).

<i>Epidermis</i>							
<i>Allgemein</i>	<i>Epidermisdicke</i>		[0] <i>Atrophie</i>	[1] <i>normal</i>	[2] <i>Akanthose</i>		
	<i>Epidermolyse subepidermal</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>Spaltbildung</i>	[2] <i>Blasenbildung</i>	[3] <i>Ablösung</i>	
	<i>Spongiose (epid. Ödem)</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus, ≤ 50%</i>	[3] <i>> 50%</i>	
	<i>Verhornung</i>		[0] <i>Orthokeratose</i>		[1] <i>Parakeratose</i>		
<i>Epidermale Differenzierungsstörung</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>			
<i>Str. granulosum/ spinosum</i>	<i>Ballonierung/</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Vakuolisierung</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Akantholyse</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Apoptose/Dyskeratose</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Satellitenzellnekrose</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Hypergranulose</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
<i>Stratum basale</i>	<i>Ballonierung/</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Vakuolisierung</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Akantholyse</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Apoptose/Dyskeratose</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Satellitenzellnekrose</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
<i>Entzündliches Infiltrat</i>	<i>Lymphozyten</i>	<i>Epidermis</i>	[0] <i>normal</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
		<i>BMZ</i>	[0] <i>normal</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
		<i>Dermis</i>	[0] <i>normal</i>	[1] <i>perivaskulär</i>	[2] <i>bandförmig</i>	[3] <i>diffus</i>	
	<i>Neutrophile</i>	<i>Dermis</i>	[0] <i>normal</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Eosinophile</i>	<i>Dermis</i>	[0] <i>normal</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Mastzellen</i>	<i>Dermis</i>	[0] <i>normal</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
	<i>Melanophagen</i>	<i>Dermis</i>	[0] <i>normal</i>	[1] <i>fokal</i>	[2] <i>diffus</i>		
<i>Basalmembran</i>							
<i>Kontinuität</i>		[0] <i>normal</i>	[1] <i>lückenhaft</i>	[2] <i>kaum vorhanden</i>			
<i>Breite</i>		[0] <i>ausgedünnt</i>	[1] <i>normal</i>	[2] <i>verbreitert</i>			
<i>Dermis</i>							
<i>Kollagenes Bindegewebe</i>		[0] <i>normal</i>	[1] <i>nur apikal</i>	[2] <i>auch tieferen Schichten vermehrt / verbreitert</i>			
<i>Erythrozytenextravasate</i>		[0] <i>keine</i>	[1] <i>wenig</i>	[2] <i>massiv</i>			
<i>Histologische Klassifikation</i>							
[0]	<i>normale Haut oder keine GvH-typischen Veränderungen</i>						
[1]	<i>Basale Vakuolisierung (fokal od. diffus)</i>				[0] <i>Nein</i>	[1] <i>Ja</i>	
[2]	<i>Basale Vakuolisierung, diffus mit Eosinophilen Körpern mit/ohne Lymphozytäre Infiltrate in Dermis und/oder Epidermis</i>				[0] <i>Nein</i>	[1] <i>Ja</i>	
[3]	<i>Veränderungen wie 2 und subepidermale Spaltbildung (mind. 3 Zellen)</i>				[0] <i>Nein</i>	[1] <i>Ja</i>	
[4]	<i>Veränderungen wie 2, zudem mind. 50% Ablösung der Epidermis von der Dermis</i>				[0] <i>Nein</i>	[1] <i>Ja</i>	

Definitionen zur Anwendung der histopathologischen Kriterien

„Ballonierte“ Keratinozyten werden aufgrund von Expertenmeinungen nicht als nekrotische Keratinozyten aufgefasst und für die weitere Auswertung mit der Kategorie „basale Vakuolisierung“ zusammengefasst.

Atrophie

- fokal: < 20% der Länge des epidermalen Beurteilungssegments
- leicht: < 4 Lagen Epidermalzellen
- schwer: teilweise < 2 Lagen Epidermalzellen

Akanthose

- diskret: 6 – 7 Lagen Epidermalzellen
- schwer: > 7 Lagen Epidermalzellen
- fokal: < 20% der Länge des epidermalen Beurteilungssegments

Akantholyse

- leicht/fokal: < 20% der Länge des epidermalen Beurteilungssegments
- ausgedehnt: 20 – 50% der Länge des epidermalen Beurteilungssegments
- massiv: > 50%

Epidermolyse

Aufgrund unsere Prämisse, dass es sich um ein wesentliches Kriterium zur Beurteilung des klinischen Schweregrades handle, erfolgte eine klare und feine Abstufung:

- Spaltbildung: > 2 Zellen in Reihe pro mm beurteilter Epidermis
- Blasenbildung: > 10 Zellen in Reihe pro mm beurteilter Epidermis
- Ablösung: maximal, Kontinuitätsverlust

Verhornung

Kommen im selben Schnitt unterschiedliche Verhornungstypen vor, wird die pathologische notiert und in die Auswertung einbezogen, sofern sie mehr als 20% der beurteilten Epidermislänge ausmacht.

Dyskeratose

meint das Vorkommen von mehr als einem eosinophilen Körperchen pro Beurteilungsfeld.

Epidermale Differenzierungsstörung

Meint Aufhebung der epidermalen Stratifizierung

Basalmembran

- fokal ausgedünnt: dünn, ohne/mit Kontinuitätsunterbrechung max.20%

- stark lückenhaft: 20% bis 50%
- kaum mehr vorh.: über 50%

Infiltrat: Lymphozyten, Granulozyten, Melanophagen und Mastzellen

- normal: maximal 19 Zellen pro Beurteilungseinheit ohne fokale Ansammlung
- fokal: stellenweises Infiltrat von mehr als 5 Zellen, nicht in allen Abschnitten
- bandförmig (bei dermaler Lymphozyteninf.): lichenoides, bandförmiges Infiltrat im gesamten Beurteilungsgebiet, jedoch nicht in allen Schichten der Dermis
- diffus: Infiltrat durch mindestens 20 Zellen pro Beobachtungseinheit, auf dem gesamten Epidermisabschnitt und in allen einsehbaren dermalen Schichten, mit oder ohne Epidermotropie

2.3 Immunhistochemische Analyse

2.3.1 Grundlagen

Die Immunhistochemie ist eine etablierte Methode, um Aussagen über die Expression bestimmter Antigene in vivo zu erlauben. Dazu eignen sich vor allem membranständige Moleküle wie Transmembranrezeptoren, die im Idealfall möglichst spezifisch für einen bestimmten Zelltyp oder eine Zellfunktion sind. Der besondere Vorteil der Methode beispielsweise im Vergleich zur Durchflusszytometrie liegt darin, dass die Lokalisation der betreffenden Zellen im Gewebe und somit z.B. die Zuordnung zu einer Hautschicht sowie die Beurteilung der Zellmorphologie möglich sind.

Immunhistochemische Färbungen beruhen auf folgendem Prinzip: Das Gewebe wird mit monoklonalen Antikörpern einer anderen Spezies (Maus, Ratte etc.) inkubiert, die an die gesuchten, idealerweise oberflächlich situierten gesuchten Antigene binden. Das freie Ende des Antikörpers dient als Bindungsstelle für eventuelle Verstärker (z.B. Link-Antikörper, methodenabhängig) und die Kopplung an eine Farbreaktion.

Nach dem selben Prinzip kann ein Antigen mit Antikörpern gelabelt werden, die an fluoreszierende Farbstoffe gebunden sind. Somit ist keine sekundäre Färbung nötig und das Gewebe kann direkt mikroskopisch beurteilt werden. Der Nachteil dieser Variante besteht in der geringen Haltbarkeit und Temperaturtoleranz der Präparate.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf permanent fixierte immunhistochemische Präparate abgezielt und daher zu Gunsten der APAAP-Technik (vgl. 2.3.3) auf Immunfluoreszenz verzichtet.

2.3.2 Antikörperprotokoll

Für die immunhistochemische Analyse galt das Hauptaugenmerk der Identifikation von Subtypen dendritischer Zellen sowie der Erfassung von Funktionsmarkern. Gleichzeitig sollten die wichtigsten Gruppen anderer beteiligter Entzündungszellen erfasst werden, beispielsweise Lymphozyten und Makrophagen. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Dermatohistopathologie wurde auf Basis dieser Zielsetzung folgendes Antikörperprotokoll erstellt (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Erläuterungen zum Antikörperprotokoll

*: Färbung an kryofixierten Gewebsschnitten; ohne Markierung: Färbung an paraffin-eingebetteten Schnitten

CD1a	CD1a dient der Differenzierung von Langerhans Zellen gegenüber monozytären Zellen, findet sich aber auch auf T-Lymphozyten im Thymus [29] und in geringem Maß auf IDEC (CD1a ⁺)[93]. Langerhans Zellen zeichnen sich durch die zusätzliche Expression von CD207 (Langerin) und elektronenmikroskopisch durch Birbeck-Granula aus und finden sich im Allgemeinen in der suprabasalen Epidermis [87]. Beide Rezeptoren scheinen eine wichtige Rolle bei der Präsentation nicht-peptidischer Antigene gegenüber T-Lymphozyten einzunehmen [42]. CD1a dient neben CD207 der Identifikation von Langerhans Zellen.
CD1b *	CD1b ist ein membranständiges Glykoprotein, das eine wesentliche Rolle in der T-Zell-Interaktion einnimmt [71]. CD1b wird in moderatem Maß auf inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) exprimiert und fehlt auf Langerhans Zellen [95]. CD1b ⁺ Dendritische Zellen besitzen ein hohes allostimulatorisches Potential [50]. CD1b wurde zur Analyse des Funktionsprofils von Subklassen Dendritischer Zellen eingesetzt.
CD2	Das Oberflächenantigen CD2, auch bekannt als Lymphozytenfunktionsantigen (LFA)-2 wurde als Pan-T-Zell-Marker mitgeführt. Der Rezeptor spielt eine Rolle in der Adhäsion und Aktivierung von T-Zellen [75, 1].
CD11c *	CD11c ist ein Transmembranprotein der Leukozyten-Integrin-Familie [43], wird im peripheren Blut hauptsächlich auf myeloiden Dendritischen Zellen exprimiert und fehlt auf PDC's [57]. In der Haut wird CD11c konstitutiv auf IDEC exprimiert (CD11c ⁺⁺⁺) [94], während es auf Langerhans Zellen in geringem Maß vorzufinden ist (CD11c ⁺) [94]. CD1b ⁺ /CD11c ⁺ Dendritische Zellen scheinen hoch aktiviert zu sein [50].
CD20	CD20 ist ein nicht glykosyliertes Phosphoprotein und wird auf der Oberfläche maturaer B-Zellen exprimiert [46]. Der Antikörper wurde zur Identifikation von B-Zellen verwendet.
CD25	Anti-CD25 ist ein gegen die Alpha-Kette des T-zellulären IL-2-Rezeptors gerichtetes Transmembranprotein und wird als Marker für Regulatorische T-Lymphozyten verwendet, welche für Immuntoleranz und Autoimmunität bedeutend sind [25]. Neueren Studien zufolge ist die Anzahl CD25 ⁺ T-Zellen bei akuter Graft versus Host Disease erniedrigt [73], so dass bereits im Rahmen erster klinischer Studien mit variablen Erfolgen versucht wird, spezifische immunmodulatorische Effekte zur GvHD-Prävention zu nutzen (University of Minnesota, Science Daily 09/2007. Wawer, Burdach et al, Halle).
CD 34	CD34 ist glykosylierter Transmembranrezeptor, der konstitutiv auf hämatopoietischen Stammzellen und Endothelzellen exprimiert wird [64].
CD45RA	CD45RA (humanes Leukozytenantigen / hLCA) wurde zur Identifikation naiver T-Lymphozyten verwendet. Das Antigen wird auf naiven T-Lymphozyten (TLC) vor Antigenkontakt exprimiert und fehlt auf Memory- und Effektor-TCL [55]. Die transmembranöse Tyrosinphosphatase wird auf allen Zellen hämatopoietischen Ursprungs außer Erythrozyten exprimiert (Pan-Leukozytenantigen / Pan-LCA) [96].
CD45RO	CD45RO dient der Differenzierung reifer gegenüber naiver T-Lymphozyten. Das Antigen gehört zur Familie der LCA und wird von reifen T-Lymphozyten exprimiert, die bereits Antigenkontakt hatten. Diese reifen T-Lymphozyten können durch spezifische Interaktion mit Dendritischen Zellen stimuliert werden [88].
CD68	CD68 (KPI) ist ein lysosomales Glykoprotein und gilt als etablierter Marker für Makrophagen, findet sich jedoch auch auf Fibroblasten und Endothelzellen sowie in geringer

	Menge auf Monozyten, Neutrophilen und myeloischen Stammzellen [32].
CD197 (CCR-7) *	Der Chemokinrezeptor CCR7 wurde zur näheren Charakterisierung des Funktionsstatus von Dendritischen Zellen eingesetzt. Er bindet das Makrophage Inflammatory Protein (MIP)-3 β und spielt eine bedeutende Rolle in der Migration Dendritischer Zellen, da er die Wanderung CCR7-exprimierende Zellen aus peripheren Geweben zu lymphatischen Organen vermittelt und einen wichtigen Reifeindikator [19] für MoDCs darstellt. Seine Liganden SLC und ELC werden von Endothelzellen produziert [34]. Er findet sich auf der Mehrzahl der reifen CD208 ⁺ DCs [76]. Unreife DC unter Allostimulation durch gemischt leukozytäre Zytokine im GvHD-Modell differenzierten unter Neoexpression von CCR7, CD208 und CD83 zu maturaen DC mit hoher allostimulatorischer Aktivität und migratorischem Potential (bei Interaktion mit MIP-3 β) [47].
CD206 (Mannose-Rezeptor) *	Der Mannoserezeptor CD206 dient der rezeptorvermittelten Endozytose und damit effektiveren Präsentation von mannosylierten Antigenen, wie sie etwa in Pilz- oder Bakterienmaterial häufig sind. Seit Längerem gilt er als Differenzierungsmarker für unreife Dendritische Zellen, insbesondere MoDCs. CD206 wird in entzündeter Haut nicht auf CD1a ⁺⁺⁺ Langerhans-Zellen, wohl aber auf CD1a ⁺ Inflammatorischen Epidermalen Dendritischen Zellen (IDEC) exprimiert wird [93].
CD207 (Langerin) *	CD207 (Langerin; C-Typ Lektin) ist neben CD1a ein etablierter Marker der Langerhans Zellen. Im Gegensatz zu normaler Haut finden sich in akuter GvH I-II Grades kaum CD207-positive epidermale Zellen [47]. Langerhans Zellen zeichnen sich zusätzliche durch Birbeck-Granula und die Expression von CD1a [29] aus und finden sich im Allgemeinen in der suprabasalen Epidermis [87].
CD208 (DC-LAMP)	CD208 (DC-LAMP, DC-lysosome-associated membrane protein) wurde eingesetzt um Dendritischen Zellen hinsichtlich ihres Reifezustands zu charakterisieren. Das Antigen wird auf ausgereiften myeloiden Dendritischen Zellen exprimiert und spiegelt die Reifung der Dendritischen Zellen wieder [84]. In normaler Haut findet man nur geringe Mengen an CD208 ⁺ DCs. In GvHD I ^o -II ^o -Hautproben zeigen Dendritische Zellen unter Alloantigen-Exposition Neoexpression von CCR7, CD208 und CD83, wobei CD208 kaum epidermal, sondern hauptsächlich dermal und perivaskulär exprimiert wird [47].
CD209 (DC-SIGN)	CD209 (DC-SIGN; DC-specific, ICAM-3-grabbing non-integrin) dient der ICAM-2/-3 –vermittelten Adhäsion naiver T-Lymphozyten auf dendritischen Zellen und wird auf CD207 ⁻ /Birbeck-Granula ⁻ interstitiellen Dendritischen Zellen exprimiert. Reife DCs sind sämtlich negativ für CD209, ein Teil der CD11c ⁺ Dendritische Zellen (IDEC und LC) zeigen eine Doppelexpression. CD209 ⁺ Dendritischen Zellen liegen bevorzugt intraepithelial [76]. CD209 ist ein klassischer Marker für unreife Dendritische Zellen.
CD303 (BDCA-2) *	BDCA-2 ist ein etablierter und sehr spezifischer Marker für plasmazytoide Dendritische Zellen (PDC). In normaler Haut findet sich ein relativ geringer Anteil an BDCA-2 ⁺ plasmazytoiden Dendritischen Zellen [20]. PDC spielen eine besondere Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen. Mangel an PDC begünstigt virale Superinfektionen, beispielsweise beim Ekzema herpeticatum [94]. PDC's exprimieren CD68, CLA, CD123 (IL-3R α) und BDCA-2, sind aber CD11c-negativ und kommen in der Regel im peripheren Blut sowie in entzündetem und lymphatischem Gewebe vor [24].
S-100 (B)	S-100 ist ein Calcium-bindendes Protein, das unter anderem an Phosphorylierungsprozessen beteiligt ist. S-100B wird auf verschiedenen Zellen wie Gliazellen und Melanozyten, aber auch auf Dendritischen Zellen, insbesondere interdigitierenden (IDC) exprimiert [81]. Es konnte gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende S-100 ⁺ Dendritische Zellen eine zentrale

Rolle für die Entzündungsreaktion spielen und ihre Zahl mit der regulatorischer T-Zellen korreliert [62]. Weiterhin wurde über S-100⁺ Dendritische Zellen in Schweinehaut berichtet, die hohe Aktivität in der primären Immunantwort aufwiesen [6]. S100 wurde im Hinblick auf funktionelle Fragestellungen ins Protokoll aufgenommen.

2.3.3 APAAP-Technik

Die APAAP-Technik für Immunhistochemie ist sehr verbreitet und zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität für Antigene aus [63]. Diese beruht auf einem Verstärkersystem, das im Wesentlichen im APAAP-Komplex besteht (vgl. Abbildung 10).

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (z.B. mouse anti human IgG) wird ein Sekundär-/ Link-Antikörper hinzugegeben, an den wiederum der Enzymimmunkomplex binden kann. Die Alkalische Phosphatase wird beispielsweise – wie in diesem Fall – mittels Fast Red entwickelt.

Auf diese Weise ist eine Verstärkung der Reaktion durch Bindung mehrerer Sekundärantikörper (verminderte sterische Inhibition) zu erreichen.

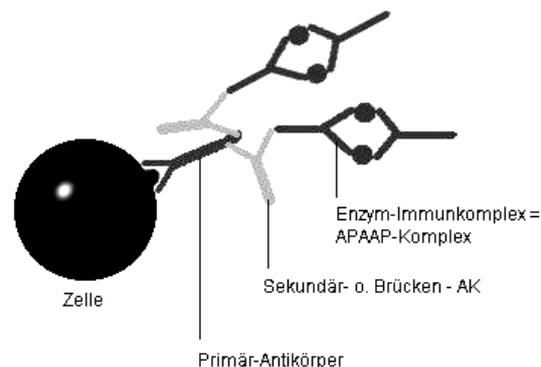


Abbildung 10: Schema zur APAAP-Methode

Die APAAP-Methode ist ein gängiges Verfahren in der Immunhistochemie. Ein Primärantikörper wird nach Antigen-Retrieval mit dem Material inkubiert und anschließend schrittweise über einen Sekundär-/Link-Antikörper mit dem Enzym-Immunkomplex verbunden, der für die Farbreaktion genutzt wird. Durch die Möglichkeit mehrerer Bindungen an den Primärantikörper (über Link-Antikörper) wird eine Verstärkungsreaktion erreicht. (Abbildung: www.mta-labor.info)

2.3.4 Protokoll der immunhistochemischen Färbungen

Alle Färbungen wurden in einer Verdünnungsreihe titriert und unter Mitführung einer IgG-Kontrolle auf Spezifität getestet. Die Verdünnung der einzelnen Antikörper ist dort angegeben. Alle Einfachfärbungen wurden in APAAP-Technik mit Hilfe des ChemMateTM Detection Kit, die Doppelfärbungen mittels EnVisionTM Doublestaining Kit durchgeführt.

Reagenzien und Materialien für die immunhistochemische Färbung

- EZ-DeWax conc.[®] (BioGenex, Cat. No. HK584-5KE) zur Entparaffinierung
- Citrat (Sigma, Cat. No. C-0759) für Antigen Retrieval
- EDTA (Sigma, Cat. No. E-5134) für Antigen Retrieval

- TRIS-Puffer: Als Stammlösung diente 60.55 g Trizma Base[®] (Sigma, Cat. No. T-1503), die mit 87,66 g NaCl versetzt und mit destilliertem Wasser auf 900 ml aufgefüllt wurde. Anschließend wurde mit 25% Salzsäure auf pH 7,40 titriert und auf 1000 ml aufgefüllt. Falls nötig, erfolgte eine Gegentitration mit NaOH auf pH 7,40. Vor Gebrauch wurde diese Lösung 1:10 (50ml auf 500ml) mit destilliertem Wasser und 0,5 ml Tween 20 (Merck-Schuchardt, Cat. No. 822184) angesetzt. Die fertige Lösung (TRIS-Puffer-Gebrauchslösung) wurde nach Herstellung und vor Gebrauch kräftig geschüttelt.
- Lactoselösung zur Vorbehandlung : 0,1g Milchpulver (Alpha-Lactose) wurde in je 100ml TRIS-Puffer gelöst und anschließend ausgiebig vermischt (Vortex)
- ICH Select[®] Antibody Diluent zur Herstellung gebrauchsfertiger Antikörperlösungen : Verdünnung der unkonjugierten Antikörper mittels ICH Select[®] Antibody Diluent (Chemicon International, Cat. No. 21544) auf die antikörperspezifische Konzentration
- Aceton, gebrauchsfertig
- Saures Hämalaun (n. P. Mayer; Apotheke Klinikum Inn, Pettenkofer-8a), gebrauchsfertig
- ChemMate[™] Detection Kit (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, DakoCytomation, DAKO, Code Nr. K 5005)
- EnVision Doublestaining Kit (DAKO, Code Nr. K5361)
- Objektträger (Superfrost[®]) und Deckgläschen (Glas) der Firma DAKO (MM: Aufzählung unübersichtlich)

Immunhistochemische Färbungen mittels APAAP

Herstellung der Kryostatschnitte

Aus den bei – 20°C gefrorenen Gewebeproben wurden mit einem Mikrotoms etwa 8 – 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf geeignete Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Schnitte ggf. unter Zuhilfenahme eines Ventilators luftgetrocknet (und somit fixiert). Sie wurden danach entweder sofort bearbeitet oder bis zur Verarbeitung bei – 20°C tiefgefroren. Es wurde darauf geachtet, dass kein zwischenzeitliches Auftauen bis zur endgültigen Verarbeitung eintrat.

Während des Vorbehandlungs- und Färbevorgangs wurde sicher gestellt, dass die Schnitte nicht austrockneten.

Färbung der kryokonservierten Gewebsschnitte

1. Auftauen von Objektträgern mit Gewebsschnitten in geeigneter feuchter Kammer
2. Fixation der aufgetauten Schnitte in Acetonlösung für 10 Minuten; anschließend kurze Lufttrocknung
3. Inkubation in reichlich Lactose-TRIS-Puffer-Lösung für 10 Minuten
4. Entfernung überschüssiger Milchlösung, wobei das Gewebe bedeckt bleibt
5. Inkubation mit ca. 100 ml Primärantikörperlösung pro 6mm-Schnitt für 45 Minuten

6. Vorsichtiges Abspülung der Lösung mit ca. 5 ml TRIS-Puffer aus der Spritzflasche
7. Inkubation mit je 100 ml biotinyliertem Sekundärantikörper für 5 Minuten
8. Spülung mit ca. 5 ml TRIS-Puffer, anschließend Abtupfen von überschüssigem Puffer
9. Inkubation mit 100 µl APAAP-Reagenz (Streptavidin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase) für 5 Minuten
10. Vorbereitung der Chromogenlösung: im Verhältnis je 4 µl der Chromogenlösungen ChemMate™ Chromogen Red in der Reihenfolge 1 – 3 auf 100 µl Substrat (1 Tropfen Levamisol in 900µl Substratpuffer zur Blockade von endogener alkalischer Phosphatase). Es wurde auf ausreichende Durchmischung der Chromogenlösung 3 sowie der fertigen Lösung unmittelbar vor Gebrauch geachtet. Diese wurde binnen 10 Minuten weiter verarbeitet.
11. Abspülung der APAAP-Reagenz mittels 5 ml TRIS-Puffer, anschließendes Abtupfen von Pufferüberstand
12. Inkubation mit je 100 µl der zuvor angesetzten Chromogenlösung für 10 Minuten. Bei materialabhängig überschießender Färbereaktion wurde dieser Arbeitsschritt in Einzelfällen nach minimal 4 Minuten vorzeitig abgebrochen um eine übermäßige Hintergrundfärbung zu vermeiden.
13. Abspülung der Lösung mit etwa 2 ml TRIS-Puffer, Belassen vom überschüssigem Puffer
14. Gegenfärbung: Inkubation mit je 1-2 Tropfen saurem Hämalaun für 30 Sekunden, anschließendes Bläuen für weitere 5 Minuten im vorbereiteten Wasserbad (destilliertes Wasser); anschließende Zwischenlagerung in destilliertem Wasser für mindestens 5 Minuten
15. Konservierung mittels auf 50-70°C temperierter Glyceringelatine und Deckgläschen. Hierzu wurden die Deckgläschen an einer Längsseite sowie orthogonal dazu mit Gelatine bedeckt; anschließend wurde das Gläschen mit der benetzten Seite aufgesetzt, langsam abgekippt und unter leichtem Andrücken vorsichtig aufgelegt um Lufteinschlüsse zu vermeiden.

APAAP-Färbung paraffinfixierter Schnitte

1. Vorbereitung der Dewax-Lösung : Ansetzen von 100 ml EZ-DeWax® Concentrate (BioGenex) mit 90 ml destilliertem Wasser
2. Vorbereitung der Citratlösung für Antigen-Retrieval : 2,1g Citrat wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 3.0 bzw. 6.0 titriert
3. Paraffinschnitte stehend in Objektträgerbehälter (zB aus Glas) zunächst 5min. in DewaxI, dann 5min. in Dewax 2 wechsel-baden. Beim Wechseln gut abtropfen lassen.
4. 5 – 6mal im Wasserbad (destilliertes Wasser) gut spülen
5. Antikörperabhängig: Antigen Retrieval Vorbehandlung

6. Protease: 5mg Protease auf 10ml TRIS-Puffer, 10min. stehen lassen; (max.) 10min inkubieren
7. EDTA: Zweimaliges Kochen der reichlich mit EDTA-Lösung pH 8,0 bedeckten Schnitte in einer mikrowelleneigneten feuchten Kammer für jeweils 6 Minuten bei 360W („med“) im ersten Durchgang und 90W („low“) im zweiten Durchgang in der Mikrowelle mit einer Unterbrechung von 5 Minuten. Anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur vor Bearbeitung)
8. Citrat: Zweimaliges Kochen der reichlich mit Citrat-Lösung pH 3,0 bedeckten Schnitte in einer mikrowelleneigneten feuchten Kammer für jeweils 6 Minuten bei 360W („med“) im ersten Durchgang und 90W („low“) im zweiten Durchgang in der Mikrowelle mit einer Unterbrechung von 5 Minuten. Anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur vor Bearbeitung)

weiter ab oben (Kryokonservierte Schnitte), Arbeitsschritt 3

Doppelfärbung DAB+/Permanent Red (DAKO K5361 EnVision Kit G/2)

1. Vorbehandlung der paraffinfixierten Schnitte wie oben beschrieben; Acetonfixierung von kryofixierten Präparaten
2. Enzymblockade: Inkubation mit Endogenous Enzyme Block Reagent[®] für 5 Minuten, anschließend ausgiebiges Waschen mit TRIS-Puffer
3. Inkubation mit Laktoselösung für 5 – 10 Minuten, anschließende Entfernung von Überstand
4. Inkubation mit dem unkonjugierten Primärantikörper (mouse IgG) für 10 – 15 Minuten, anschließend ausgiebiges Waschen mit TRIS-Puffer
5. Inkubation mit Sekundär-Antikörper I (Polymer/HRP) für 10 Minuten; anschließend ausgiebiges Waschen mit TRIS-Puffer. In der Zwischenzeit wurde die DAB+ -Arbeitslösung angesetzt (Substrat/Peroxid : Chromogen/DAB+ = 40 : 1). Aufgrund ihrer mäßigen Stabilität wurde auf das Verwerfen der Lösung nach maximal 5 Tagen geachtet.
6. Inkubation der Schnitte für 10 Minuten nach Durchmischung der DAB+ - Arbeitslösung mittels Vortex. Anschließendes Spülen mit destilliertem Wasser
7. Baden für 1 Minute im zwischenzeitlich vorbereiteten Wasserbad (destilliertes Wasser)
8. Inkubation mit Doublestain Block[®] für 3 Minuten, anschließend ausgiebiges Waschen mit TRIS-Puffer
9. Inkubation mit Laktoselösung für 5 – 10 Minuten ohne anschließendes Abwaschen
10. Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (mouse IgG) für mindestens 10 Minuten, anschließend ausgiebiges Waschen mit TRIS-Puffer
11. Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper (LINK) für 10 Minuten, anschließend ausgiebiges Waschen mit TRIS-Puffer

12. Inkubation mit Polymer, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase für 10 Minuten anschließend ausgiebiges Waschen mit TRIS-Puffer
13. In der Zwischenzeit die Permanent Red Arbeitslösung ansetzen (Substrat : Chromogen / Permanent Red = 100 : 1). Die Lösung wurde aufgrund der geringen Stabilität von 30 Minuten für jeden Durchgang neu angesetzt.
14. Inkubation mit Permanent Red -Arbeitslösung für 5 – 10 Minuten unter inspektorischer Kontrolle der Farbintensität; abhängig davon Abbruch der Reaktion durch Waschen mit TRIS-Puffer nach mindestens 5 Minuten um übermäßige Hintergrundfärbung zu vermeiden. Anschließend kurzes Spülen.
15. Gegenfärbung: Inkubation mit je 1 – 2 Tropfen saurem Hämalaun für 30 Sekunden, anschließendes Bläuen für weitere 5 Minuten im vorbereiteten Wasserbad (destilliertes Wasser); anschließende Zwischenlagerung in destilliertem Wasser für mindestens 5 Minuten
16. Konservierung mittels auf 50 – 70°C temperierter Glyceringelatine und Deckgläschen. Hierzu wurden die Deckgläschen an einer Längsseite sowie orthogonal dazu mit Gelatine bedeckt; anschließend wurde das Gläschen mit der benetzten Seite aufgesetzt, langsam abgekippt und unter leichtem Andrücken vorsichtig aufgelegt um Lufteinschlüsse zu vermeiden.

Immunhistochemische Färbungen an kryokonserviertem Gewebe mittels direkter Immunfluoreszenz (DIF)

Im Anschluss an die Vorbehandlung (vgl. Färbung kryokonservierter Schnitte, Arbeitsschritte 1 – 4) wurden die Gewebeproben in der feuchten Kammer für 3 Minuten mit dem jeweiligen Fluorescein(FITC)-konjugierten Antikörper inkubiert. Als Pufferlösung wurde TRIS-Puffer (pH 7,4) verwendet. Die Versiegelung erfolgte mit Glycerol (85%), versetzt mit 12,5g Diazobizykloktan (98%; Hersteller: Sigma, Produktnummer: D27802), 50ml PBS-Puffer und 0,5g Na-Azid pro 450ml Glycerin.

2.3.5 Antikörper

Im Folgenden werden Material und Färbemethoden bezüglich der einzelnen Antikörper tabellarisch dargestellt (vgl. Tabelle 7 und Tabelle 9). Als Antikörper gegen Immunglobuline, Komplement-Faktoren und Fibrinogen wurden FITC-konjugierte, ansonsten ausschließlich unkonjugierte Antikörper verwendet.

2.3.6 Semiquantitative Bewertung des zellulären Infiltrats

Die Methodik und daraus entstehende Probleme der Zählweise bei immunhistochemischen Färbungen wurde in der Literatur mehrfach diskutiert. Die relevanten Aspekte der Arbeit von Bieber et al. [7] werden in der Diskussion dargelegt und mit den übrigen Problemstellungen bezüglich der Quantifizierung erörtert.

Für die vorliegende Arbeit wurde der Bewertung folgende a priori empirisch festgelegte, semiquantitative Ordinalskala zu Grunde gelegt (vgl. Tabelle 8).

2.4 Dermatohistopathologische Expertenanalyse

Für die dermatohistopathologische Analyse wurden die routinemäßig angewandten Färbungen Haematoxylin-Eosin (HE), Perjodschißsäure (PAS) und van Gieson in die Bewertung einbezogen und anschließend auf Basis der in 2.2.6 erläuterten Kriterien ausgewertet.

Im Folgenden wird dargestellt, wie die Hautbiopsien gewonnen und verarbeitet wurden, bevor näher auf die Beurteilung eingegangen wird.

2.5 Statistische Datenanalyse

2.5.1 Allgemeines Studiendesign

Es wurde eine prospektive Datenerhebung durchgeführt. Von Beginn der Studie 2005 an wurden alle Verdachtsfälle von akuter Graft versus Host Disease im Klinikum Großhadern zusätzlich zur Routinediagnostik einem erweiterten immunhistochemischen Färbeprotokoll unterzogen und standardisiert untersucht. Der dermatologische Status wurde jeweils anhand des GvHSCO dokumentiert.

Im Hinblick auf Fragestellung und Vergleichbarkeit wurden für die Analyse von akuter GvHD versus akutem Arzneiexanthem nur Patienten mit akuter, das heißt nach gängiger Definition mit Symptomauftritt erstmals höchstens 100 Tage nach Transplantation, nach retrospektiver Validierung der Diagnose anhand des klinischen Verlaufs (vgl. unten) in die statistische Auswertung einbezogen (N=20).

Als Kontrolle wurden 13 Patienten mit makroskopisch ähnlich gearteten Arzneiexanthenen in die Studie eingeschlossen. Aufgrund teilweise vorhandenen Materialmangels kann die Anzahl der analysierten Patienten hinsichtlich verschiedener Kriterien wie der Expression einzelner immunhistochemischer Marker variieren. Dies ist in den jeweiligen Abschnitten der Statistik zu entnehmen oder gesondert vermerkt. Bei allen Patienten wurde verblindet das oben beschriebene Studienprotokoll durchgeführt.

Tabelle 8: Semiquantitative Bewertung des zellulären Infiltrats

Das zelluläre Infiltrat in den Hautschnitten wurde bei akuter GvHD und Arzneireaktionen gleichermaßen mit Hilfe der empirisch gewählten, hier dargestellten semiquantitativen Skala bewertet. Der Grad der Zellinfiltration (0-5) diente als Grundlage für die statistische Auswertung.

Grad der Zellinfiltration		Zellzahl/mm ²
0	Keine	0
1	Leicht	1 – 4
2	Mäßig	5 – 19
3	Stark	20 – 49
4	Sehr stark	50 – 149
5	Massiv	Über 150

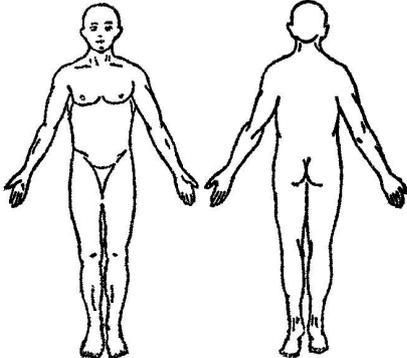
GvHScO			
		Neunerregel nach Wallace zur Ermittlung der Körperoberfläche (KOF)	
		Kopf	9%
		Brust / Bauch	18%
		(davon Genitalbereich)	(1%)
		Rücken	18%
		Beine	Je 18%
		Arme	Je 9%
		(davon Handinnenflächen)	(je 1%)
KOF Exanthem	in %	$\Sigma = \dots\dots\dots / 2 = (1)$	$\dots\dots$ [max. 50]
Erythem	Farbintensität	- / blass / rot / tief rot	[0] [1] [2] [3] +
Papeln	Größe/Konfluenz	0 / <1 / 1-5 / >5mm	[0] [1] [2] [3] +
	Menge	0 / <10 / 10-50 / >50%	[0] [1] [2] [3] +
Bläschen	Größe/Konfluenz	0 / <1 / 1-5 / >5mm	[0] [1] [2] [3] +
	Menge	0 / <10 / 10-50 / >50%	[0] [1] [2] [3] +
		Summe Effloreszenzen	$\Sigma = \dots\dots\dots * 2/3 = (2)$ $\dots\dots$ [max. 50]
		Gesamtscore GvHScO	$\Sigma = (1) + (2) = \dots\dots$ [max.100]

Abbildung 11 : Klinischer Erhebungsbogen zur Evaluation des GvHScO

Der GvHScO wurde zur Abschätzung des klinischen Schweregrads, ausschließlich anhand kutaner Effloreszenzen, a priori entwickelt und im Rahmen der vorliegenden Studie u.a. auf seine prognostische Aussagekraft hinsichtlich 1-Jahres-Überleben und maximalem klinischen Schweregrad (n. Glucksberg) im Verlauf sowie auf Korrelationen mit Immunhistochemischen und histopathologischen Kriterien getestet.

Zur Berechnung: Die gesamte Oberfläche des Exanthems wurde mit Hilfe der Neunerregel nach Wallace überschlagen, durch zwei dividiert und geht somit mit max. 50 Punkten in den Score ein. Die übrigen 50 Punkte werden anhand der detaillierten Effloreszenzen (mit jeweils 0-3 Schweregraden) vergeben. Die entsprechenden Werte werden addiert und mit 10/3 multipliziert, sodass sich insgesamt ein Punktescore von 0-100 ergibt.

2.5.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Letztlich wurden nur diejenigen Patienten mit akuter Graft versus Host Disease in die statistische Auswertung einbezogen, bei denen der weitere klinische Verlauf eine Arzneireaktion klar ausschloss. Diese Entscheidung wurde im interdisziplinären Team fallbezogen gefällt und gründete unter anderem auf dem protrahierten zeitlichen Verlauf, der Mitbeteiligung typischerweise betroffener Organsysteme, dem fehlenden Ansprechen auf Absetzen von Medikamenten sowie Arzneiexanthem-spezifische Therapie. Aus der Literatur sind zwar durchaus Fälle mit späterer Erstmanifestation bekannt [86 , 16], dennoch wurde zu Gunsten der Reproduzierbarkeit auf den Einschluss dieser beiden fraglichen Patienten in die Studie verzichtet. Aus organisatorischen Gründen (Materialverlust) gingen in die histologische Analyse nur 11 der 13 Patienten mit Arzneireaktion ein. Alle histologischen Kriterien wurden hinsichtlich eines Unterschieds zwischen beiden Patientengruppen analysiert.

2.5.3 Statistische Verfahren und Software

Die statistische Datenanalyse wurde mit SPSS (15.0 und 16.0 für Windows) durchgeführt. Aufgrund der geringen Stichprobengröße ohne gesicherte Normalverteilung wurde ausschließlich mit nicht-parametrischen Verfahren gearbeitet.

Für den Vergleich zwischen Patienten mit akuter Graft versus Host Disease und solchen mit Arzneiexanthem wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Bei insgesamt kleiner Stichprobe wurde zusätzlich die approximierte Monte Carlo-Signifikanz, ein Verfahren, das besser als der Mann-Whitney-U-Test für kleine Stichproben geeignet ist, für das 95%-Konfidenzintervall (MC95) berechnet. Dies ist im Einzelfall bei den Resultaten vermerkt.

Alle Korrelationen zwischen ordinalskalierten Daten wurden nach Kendall's tau-b Test (bivariat) berechnet (das Kriterium der Linearität, für Test nach Pearson erforderlich, war aufgrund der ordinal skalierten, semiquantitativen Zellzahlanalyse nicht gegeben).

Die Regressionsanalysen wurden für lineare Regression dargestellt und mittels ANOVA-Test auf Signifikanz geprüft.

Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ auf Basis der Monte Carlo-Approximation angegeben und in einigen Grafiken mit einem Stern gekennzeichnet. Als statistisch hoch signifikant werden Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ bezeichnet und in einigen Grafiken mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Tabelle 9: Technische Daten und Bezugsquellen zu den verwendeten Antikörper

Antikörper (anti)	Ig-Klasse	Art	Klon	Hersteller	Katalognr.	Fixierung	Dilution	Vorbehandlung (Antigen Retrieval)
CD1a	IgG 1k	Mouse	BL6	A Coulter Company, BP. Marseille, France	0130	Paraffin	1:50	Protease (Trypsin), 15 Min.
CD1b	IgG 1	Mouse	M-T101	Abcam, Cambridge, UK	Ab23992	Kryo, Aceton	1:250	-
CD2 (LFA-2)	IgG 1k	Mouse	AB75	Novocastra Laboratories, Newcastle, UK	NCL-CD2-271	Paraffin	1:50	Hitzebehandlung; EDTA-Lösung, 10 Min.
CD11c	IgG 1	Mouse	3.9	Abcam, Cambridge, UK	Ab22267	Kryo, Aceton	1:100	-
CD20	IgG 2ak	Mouse	L26(2,3)	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark	M 0755	Paraffin	1:300	Hitzebehandlung; Citratlösung, 20 Min.
CD25 (IL-2-Rez.)	IgG 2b	Mouse	4C9	Novocastra Laboratories, Newcastle, UK	NCL-CD25-305	Paraffin	1:100	Hitzebehandlung; Citratlösung, 20 Min.
CD34	IgG 1k	Mouse	BIRMA-K3	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark	M 7080	Paraffin	1:200	Kalilauge (KOH), 30 Min.
CD45 RA	IgG	Mouse	ALB 11	Abcam, Cambridge, UK	Ab19764	Paraffin	1:20	-
CD45 RO	IgG 1k	Mouse	A6	Zymed, Laboratories, San Francisco, US	40619863	Paraffin	1:2000	-
CD68 (KP1)	IgG 1k	Mouse	KP1	DAKO Cytomation A/S, Glostrup, Dänemark	M 0814	Paraffin	1:75	Protease (Trypsin), 15 Min.
CD197 (CCR7)	IgM k	Mouse	2H4	BD Biosciences Pharmingen	550937	Paraffin	1:50	Hitzebehandlung; Citratlösung, 20 Min.
CD206 (MR)	IgG1	Mouse	Monokl.	freundlicherweise zu Forschungszwecken überlassen von A. Lanzavecchia, Basel, Schweiz	-	Kryo, Aceton	1:100	-
CD207 (Langerin)	IgG1	Mouse	Monokl.	IBL, UK	10101; Lot. 9B-909	Paraffin	1:50	Hitzebehandlung; Citratlösung, 20 Min.
CD208 (DC-LAMP)	IgG1	Mouse	104.G4	Immunotech, A Coulter Comp., BP. Marseille, France	PN IM 3448	Paraffin	1:50	-
CD209 (DC-SIGN)	IgG2b	Mouse	DCN46	BD Biosciences Pharmingen	551249	Paraffin	1:20	-
CD303 (BDCA-2)	IgG	Mouse	AC144	MACS Mitenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach	-	Kryo, Aceton	1:75	-
S 100	polyklonal	rabbit anti-cow		DAKO A/S, Glostrup, Dänemark	Z 0311; Lot 017	Paraffin	1:9000	Protease (Trypsin), 15 Min.
IgA	polyklonal	sheep anti-human		The Binding Site, Birmingham, UK	PF010	Kryo, Aceton	1:100	-
IgE	polyklonal	rabbit anti-human		DAKO A/S, Glostrup, Dänemark	F0352	Kryo, Aceton	1:50	-
IgM	polyklonal	sheep anti-human		The Binding Site, Birmingham, UK	PF012	Kryo, Aceton	1:100	-
IgG	polyklonal	sheep anti-human		The Binding Site, Birmingham, UK	AF003	Kryo, Aceton	1:80	-
C3	polyklonal	sheep anti-human		The Binding Site, Birmingham, UK	PF023	Kryo, Aceton	1:100	-
C4	polyklonal	rabbit anti-human		DAKO A/S, Glostrup, Dänemark	F0169	Kryo, Aceton	1:100	-
Fibrinogen	polyklonal	sheep anti-human		The Binding Site, Birmingham, UK	PF056	Kryo, Aceton	1:200	-

3 ERGEBNISSE

3.1 Histopathologie und zelluläres Profil von akuter kutaner GvHD

3.1.1 Histologisches Bild der akuten kutanen GvHD

Patienten mit akuter kutaner GvHD (aGvHD) zeigten folgendes typische Bild einer vorwiegend lichenoiden Interface Dermatitis, jeweils bezogen auf den Median (Analyse basierend auf den festgelegten histologischen Kriterien; vgl. Tabelle 24):

Eine lückenhafte Basalmembran normaler Breite bildet die Trennlinie zwischen Epidermis und Dermis. Diese Zone ist gekennzeichnet durch eine diffuse lymphozytäre Infiltration, die fokal auch subepidermal und epidermal zu finden ist (vgl. Paraffinschnitt 1). Im Stratum basale dominieren darüber hinaus ballonierte Keratinozyten das Bild (vgl. Paraffinschnitt 2), zusätzlich zeigen sich fokal apoptotische bzw. dyskeratotische Zellen und Satellitenzellnekrosen (vgl. Paraffinschnitt 3). All diese zellmorphologischen Veränderungen sind in der Regel auch in höheren Zelllagen präsent. Damit einhergehend besteht in der Regel eine diffus ausgebildete epidermale Differenzierungsstörung, begleitet von fokaler Spongiose (d.i. intraepidermalem Ödem; vgl. Paraffinschnitt 4) und subepidermalen Spaltbildungen (vgl. Paraffinschnitt 5) bei normaler Epidermisdicke.

Bei schwerer aGvHD ist die epidermale Struktur praktisch aufgehoben, das subepidermale und epidermale Infiltrat sind hier im Allgemeinen stark ausgeprägt (vgl. Paraffinschnitt 6).

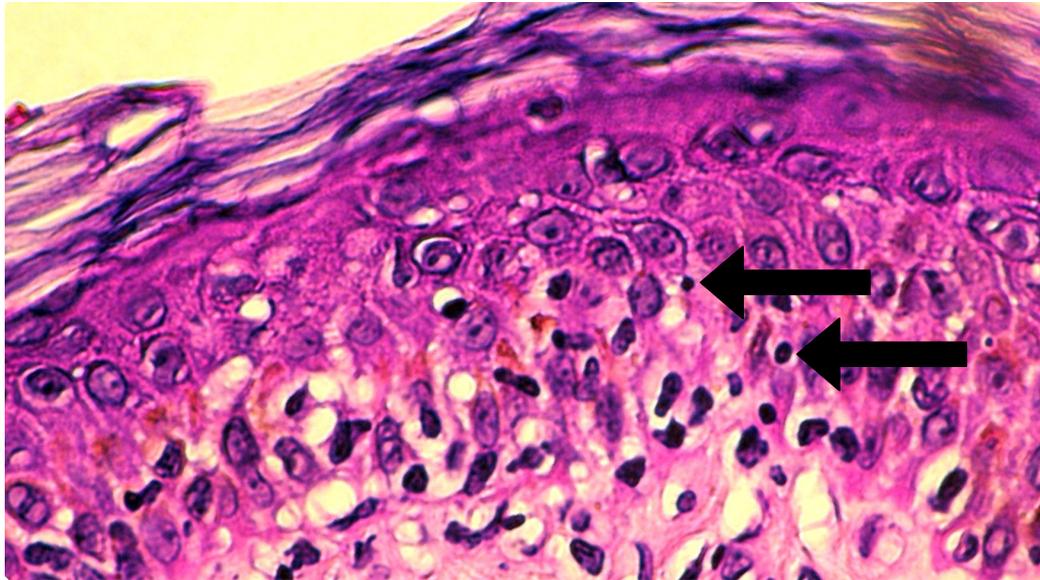
3.1.2 Klinischer und histologischer Schweregrad der aGvHD

Für die Patienten mit kutaner Graft versus Host Disease ergab sich hinsichtlich des klinischen GvHScO ein Medianwert von 35 Punkten (Minimum 12, Maximum 62,5). Mit Bezug auf bereits etablierte Bewertungskriterien (Glucksberg, Histolog. Klassifikation nach Lerner) und den klinischen GvHScOGrade zeigte sich, dass der Schweregrad anhand des GvHScOGrade in der Regel höher bemessen wurde als durch die entsprechende Hautbeurteilung nach Glucksberg (vgl. Tabelle 10). Auch histologisch ergaben sich tendentiell höhere Schweregradzuordnungen als beim Glucksberg Score (in etwa entsprechend GvHScOGrade), wenn auch Grad IV histologisch nie diagnostiziert wurde. Zusammenfassend kommt der klinische GvHScOGrade in der Schweregradbewertung dem histopathologischen Ergebnis näher als der entsprechende Wert nach Glucksberg.

Die Verteilung der histopathologischen Schweregrade aus der verblindeten Analyse bei Patienten mit akutem Arzneiexanthem sind im Einzelnen unten angegeben (vgl. Tabelle 11). Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Histologie nicht signifikant von Patienten der GvHD-Gruppe.

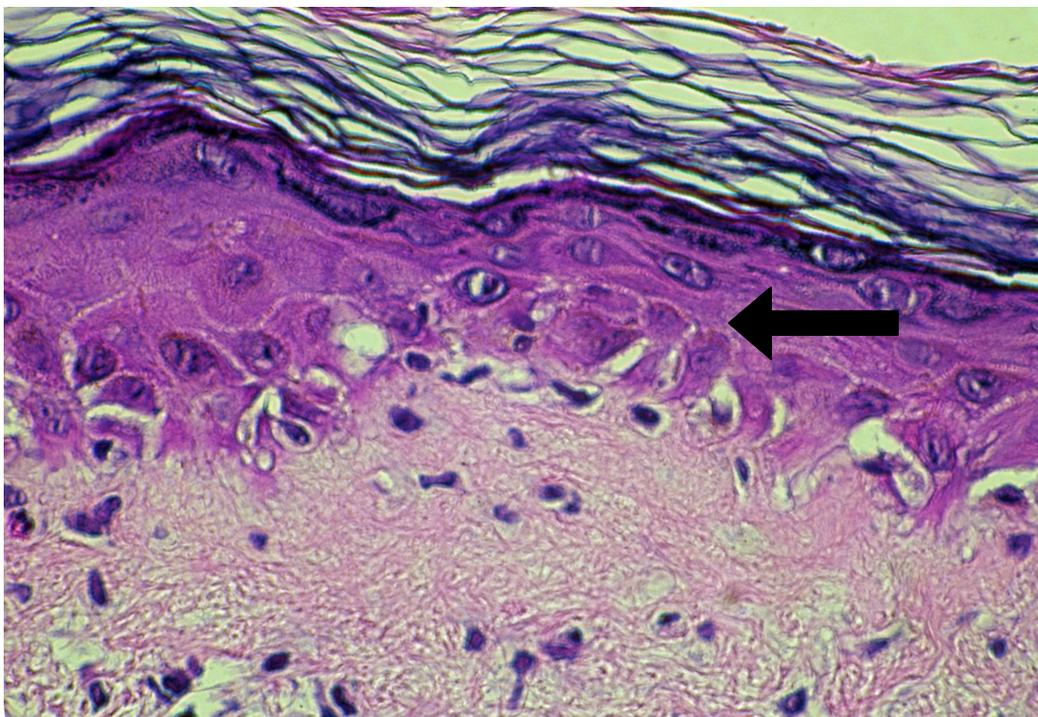
Die histopathologische Klassifikation nach Lerner hat folglich nicht differentialdiagnostischen Charakter. Leber- und intestinaler Befall bei akuter GvHD zeigte eine deutliche Korrelation mit der Ein-Jahres-Überlebensrate (vgl. Tabelle 26). An der vorliegenden Patientenstichprobe lässt sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad kutaner GvHD und dem Ein-Jahres-Überleben der Patienten belegen.

Der klinische GvHScGrade und hundertteilige GvHSc zeigen eine nicht signifikante Korrelation mit der Bewertung der kutanen Effloreszenzen nach Glucksberg (vgl. Abbildung 12 u. Tabelle 27).



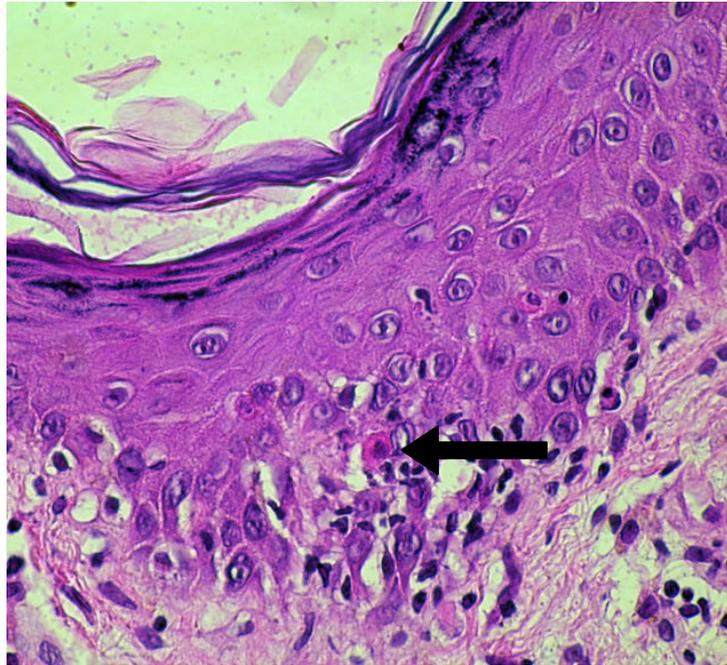
Paraffinschnitt 1: Infiltration von Junktionszone und Epidermis durch Lymphozyten

Bei akuter GvHD findet sich lymphozytäres Infiltrat (←) regelmäßig insbesondere in der Junktionszone zwischen Epidermis und Dermis. In einzelnen Präparaten, so auch hier, zeigt sich eine Epidermotropie, d.h. ein Vorkommen der Lymphozyten auch in suprabasalen Schichten. Färbung: Hämatoxylin-Eosin (HE) am Paraffinschnitt



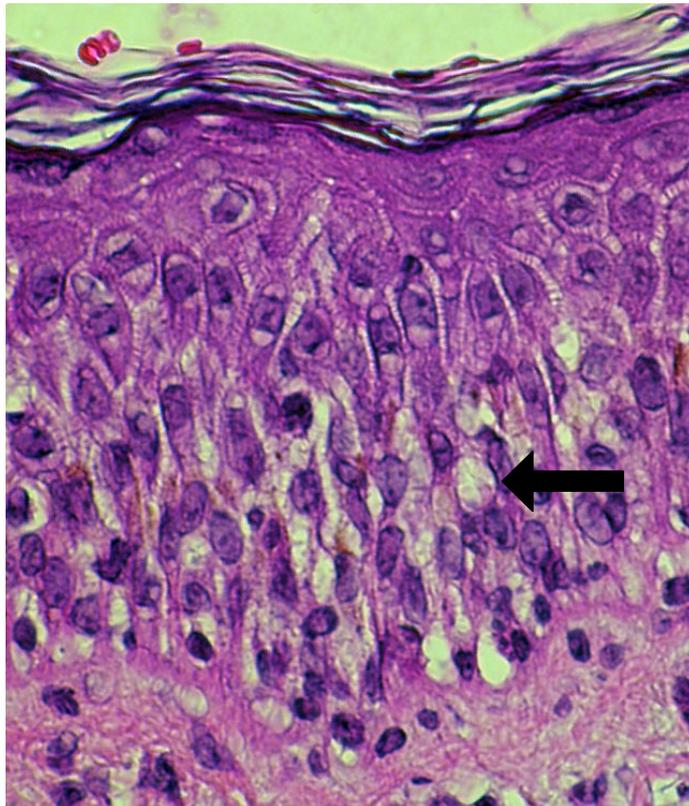
Paraffinschnitt 2: Ballonierung basaler Zellen bei epidermaler Differenzierungsstörung

Ballonierung von Keratinozyten (←) ist ein Hinweis auf beginnenden Zelluntergang und findet sich bei akuter GvHD regelmäßig v.a. in den basalen Schichten. Der Untergang basaler Keratinozyten führt zu einer epidermalen Differenzierungsstörung. Färbung: Hämatoxylin-Eosin (HE) am Paraffinschnitt



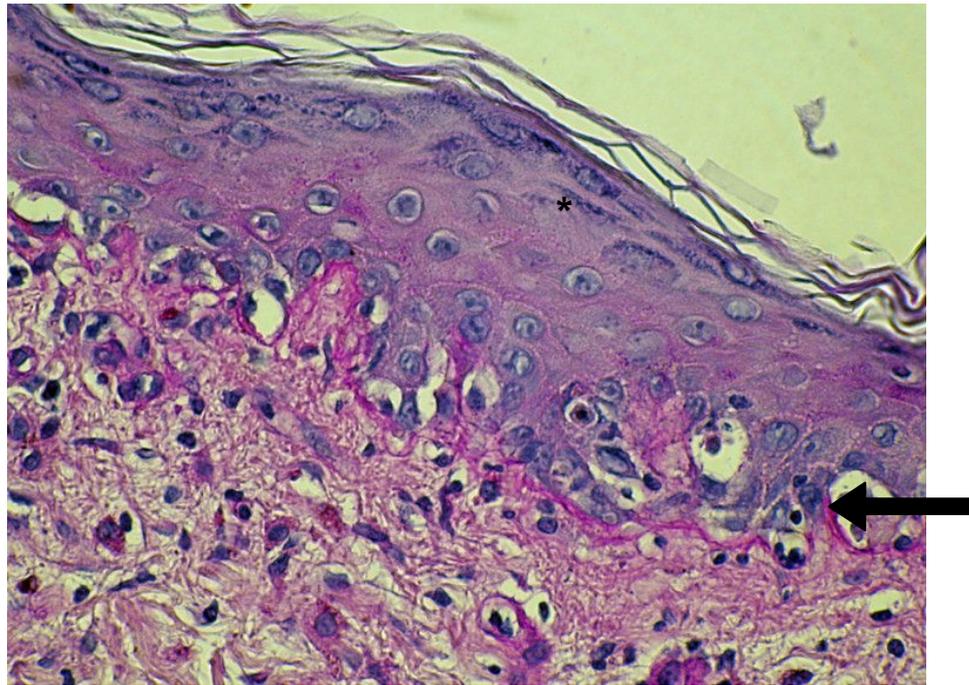
Paraffinschnitt 3: Epidermale Dyskeratose mit eosinophilen Körperchen

Als Zeichen der epidermalen Dyskeratose finden sich bei schwereren Fällen akuter GvHD eosinophile Körperchen (←) v.a. in basalen, aber auch in suprabasalen Schichten der Epidermis. Färbung: Hämatoxylin-Eosin (HE) am Paraffinschnitt



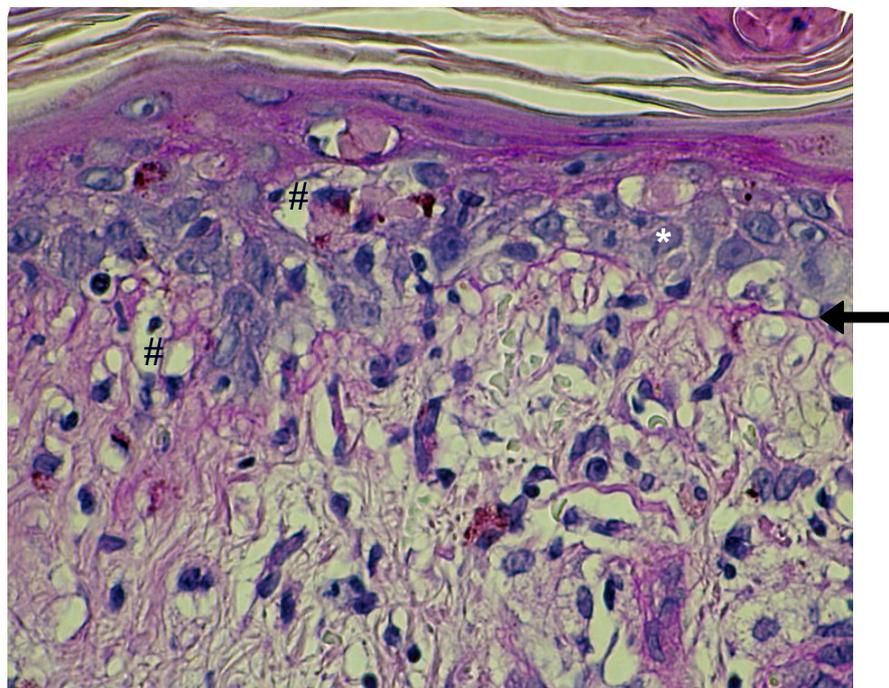
Paraffinschnitt 4: Ausgeprägte Spongiose bei aGvHD

Bei akuter GvHD findet sich häufig Spongiose (= extrazelluläres, epidermales Ödem), insbesondere in den basalen Schichten (←). Färbung: Hämatoxylin-Eosin (HE) am Paraffinschnitt



Paraffinschnitt 5: Lückenhafte Basalmembran bei aGvHD

Bei akuter GvHD zeigte sich häufig eine lückenhafte Basalmembran (←). In schwereren Fällen war diese oft kaum mehr vorhanden (Paraffinschnitt 6). Die Dicke der Basalmembran war dagegen in der Regel normal. Nebenbefundlich zeigen sich eine ausgeprägte epidermale Differenzierungsstörung sowie eine auffällige Hypergranulose (*). Färbung: PAS (Perjodschißsäure) am Paraffinschnitt



Paraffinschnitt 6: Histologisches Vollbild einer schweren initialen GvHD

In schweren Fällen akuter GvHD zeigen sich wie hier eine ausgeprägte epidermale Differenzierungsstörung mit u.a. Ballonierung basaler Keratinozyten (*), Spongiose (#) sowie ein ausgeprägter Kontinuitätsverlust der Basalmembran (←). Die Schichtung der Epidermis ist hier praktisch aufgehoben. Färbung: Perjodschißsäure (PAS) am Paraffinschnitt

Tabelle 10 : Klinische und histologische Schweregrade der Patienten mit GvHD

In der absolut quantitativen Aufstellung sind für die einzelnen klinischen und histologischen Scores (Zeilen) die jeweils zutreffenden Patientenzahlen (bezogen auf akute GvHD) für die jeweiligen Ausprägungsgrade (Spalten 1-4) gezeigt. Die Maximalausprägung des Hautbefalls (n. Glucksberg) sowie der Glucksberg-Gesamtscore (beinhaltet hepatische und intestinale Beteiligung) wurde nach Aktenlage retrospektiv ergänzt (beide grau unterlegt). Es zeigt sich, dass die Bewertung anhand des klinischen GvHSco (Zeile 4) ebenso wie die histologische Klassifikation nach Lerner (wenn auch Grad 4 ausgespart) deutlich höhere Graduierungen ergibt als die Bewertung der Hauteffloreszenzen nach Glucksberg (Zeile 1).

Bewertungssystem	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl
Glucksberg Score der Haut bei Biopsie	-	1° / n=8	2° / n=3	3° / n=9	4° / n=2
Glucksberg Score der Haut, maximal	-	1° / n=7	2° / n=3	3° / n=9	4° / n=3
Glucksberg Gesamtscore bei Biopsie	-	1° / n=7	2° / n=9	3° / n=4	4° / n=2
GvHScoGrade	-	1° / n=3	2° / n=6	3° / n=7	4° / n=4
Histologischer Schweregrad (Lerner)	0° / n=0	1° / n=2	2° / n=5	3°/n=13	4° / n=0

Tabelle 11: Histologische Klassifikation bei Patienten mit Arzneiexanthem

Analog zu obiger Tabelle ist die Patientenzahl für die jeweiligen histologischen Schweregrade bei Arzneiexanthenen dargestellt (Spalten 1-4). Auf die Ermittlung eines klinischen Schweregrads wurde verzichtet, da kein adäquater / vergleichbarer Score vorlag.

Bewertungssystem	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl	Grad/ Anzahl
Histologischer Schweregrad	0° / n=5	1° / n=3	2° / n=1	3° / n=1	4° / n=1

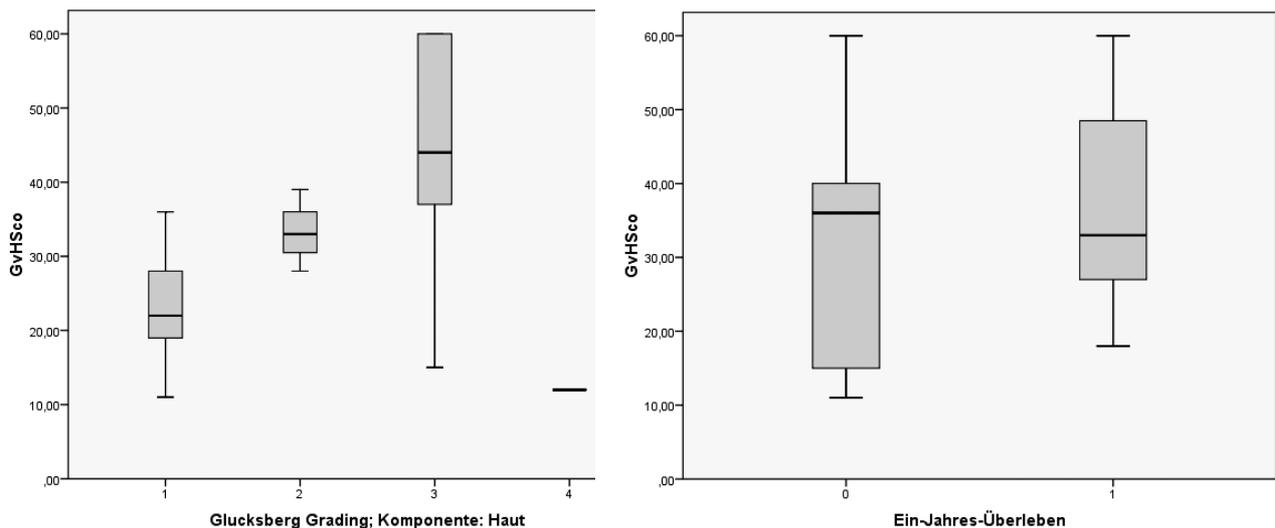


Abbildung 12: Positive Korrelation von GvHSco und Glucksberg Score, jeweils unabhängig vom Ein-Jahres-Überleben

Linke Abbildung: Punktwerte des klinischen GvHSco aller Patienten mit akuter GvHD (Y-Achse) in Abhängigkeit von verschiedenen Schweregraden nach Glucksberg unter ausschließlicher Einbeziehung der kutanen Effloreszenzen (X-Achse: Schweregrad): Die Boxplot-Darstellung zeigt eine klare Korrelation zwischen GvHSco und Glucksberg Score. Rechte Abbildung: Der klinische GvHSco (Y-Achse: Punktwert) korrelierte nicht signifikant mit dem Ein-Jahres-Überleben (X-Achse: 0 = nein, 1 = ja), der Median zeigte jedoch tendentiell ungünstigere Überlebensraten bei höheren GvHSco-Punktwerten an.

3.1.3 Korrelationen histopathologischer Kriterien

Bei akuter GvHD fielen Parakeratose, Akanthose und Epidermolyse häufig zusammen. Daneben zeigte sich ein statistischer Zusammenhang zwischen lymphozytärem Infiltrat verschiedener Hautschichten und den histopathologischen Kriterien der akuten GvHD (Schweregrad n. Lerner).

Im Hinblick auf Koinzidenzen und mögliche Zusammenhänge wurde eine Korrelationsanalyse für die verschiedenen histopathologischen Kriterien durchgeführt, die auf einem Vergleich der jeweiligen semiquantitativen Zellzahl (ordinal skalierte Daten) beruht (vgl. Tabelle 36).

Basalzellapoptose, Epidermisdicke (Akanthose), Parakeratose, Epidermolyse, Basalzellapoptose und basale Satellitenzellnekrose korrelierten signifikant. Hypergranulose korrelierte hochsignifikant mit Apoptose suprabasaler Keratinozyten und Ballonierung von Keratinozyten. Epidermisdicke und Verhorungstyp (Para- im Gegensatz zu Orthokeratose) korrelierte signifikant mit Epidermolyse, mit anderen Worten lag bei Epidermolyse häufig eine verdickte Epidermis, selten eine Atrophie vor; dies war überzufällig häufig assoziiert mit Parakeratose. Für das lymphozytäre Infiltrat zeigten sich hochsignifikante Korrelationen zwischen den Regionen: Junktionszone, Epidermis und Dermis. In der Regel lag eine Infiltration mehrerer Abschnitte gleichzeitig vor. Insbesondere epidermale lymphozytäre Infiltration war signifikant häufig mit Spongiose und Kontinuitätsverlusten der Basalmembran assoziiert. Die Anzahl an Lymphozyten in der Junktionszone korrelierte signifikant mit Epidermisdicke und Basalzellapoptose, Epidermolyse und Satellitenzellnekrose. Die subepidermale Lymphozyteninfiltration korrelierte signifikant mit der Anzahl an Eosinophilen, mit Akanthose, Spongiose, Epidermolyse, basaler Ballonierung und Apoptose, den Bewertungskriterien für Diagnose und Schweregrad akuter GvHD.

3.1.4 Expressionsprofil zellulärer Oberflächenmarker bei aGvHD

Um das zelluläre Profil der akuten GvHD durch Immunhistochemie genau zu skizzieren, wurden die einzelnen zellulären Marker deskriptiv analysiert und jeweils auf Basis der semiquantitativen (ordinal skalierten) Zellzahl Medianwert, 25. und 75. Perzentile bestimmt (vgl. Tabelle 28).

Die untersuchten Entzündungszellen fanden sich vorwiegend subepidermal und zeigten abhängig von der quantitativen Ausprägung des Infiltrats Epidermotropie. Hierbei gab es folgende Ausnahmen: Plasmazytoide Dendritische Zellen (PDC) sowie CD208⁺ reife und CD209⁺ unreife Dendritische Zellen kamen nie epidermal vor, während CD207⁺ Langerhans Zellen vorwiegend epidermal lokalisiert waren. Bei den Dendritischen Zellen dominierten IDEC. PDC waren im Allgemeinen in deutlich geringerer Zahl vorhanden, in drei Fällen zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Infiltration. Letztere Fälle zeichneten sich durch eine günstige Prognose aus. Bei den Lymphozyten dominierten TLC klar das Bild. Am häufigsten waren Memory-T-Zellen vorhanden. Naive und regulatorische TLC kamen etwa gleich häufig vor, wobei letztere fast ausschließlich subepidermal zu finden waren.

Näher betrachtet, fanden sich bei den Patienten mit akuter GvHD regelmäßig CD2⁺ T-Lymphozyten (TLC) in hoher Zahl und subepidermal betont. Dabei lagen mehr CD45RO⁺ Memory-TLC als CD45RA⁺ naive TLC und CD25⁺ Regulatorische T-Zellen (Treg) vor (vgl.

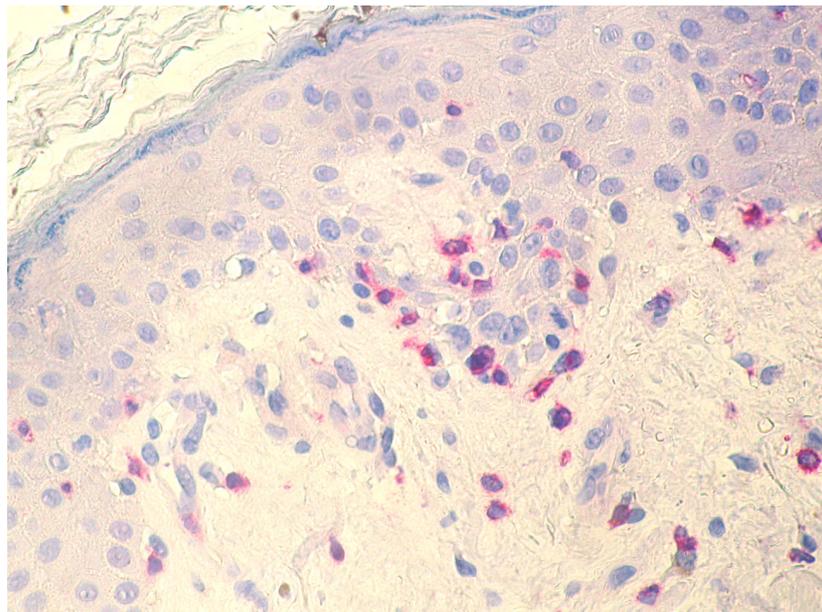
Paraffinschnitt 8, Paraffinschnitt 10, Paraffinschnitt 11, Paraffinschnitt 12 und Paraffinschnitt 9). Treg waren fast ausschließlich subepidermal lokalisiert, während TLC in den meisten Fällen deutlichen Epidermotropismus aufwiesen.

CD1a⁺ Dendritische Zellen (DC) ließen sich regelmäßig, jedoch in geringerer Zahl als CD207⁺ Langerhans Zellen (vgl. Paraffinschnitt 17) nachweisen. CD1a⁺ DC kamen etwa gleich häufig subepidermal und epidermal vor, während CD207⁺ Langerhans Zellen vorwiegend epidermal lokalisiert waren.

Dendritische Zellen fanden sich in absteigender Anzahl mit folgender Antigenexpression: CD206 (Mannorezeptor) auf aktivierten DC / IDEC, CD11c auf myeloiden DC / IDEC, CD208 (DC-LAMP) auf murenen DC, CD209 (DC-SIGN) auf unreifen DC, CD1b auf aktivierten DC / IDEC, CD197 (Chemokinrezeptor 7) und CD303 (BDCA-2) auf plasmazytoiden DC ¹.

CD68⁺ Antigen-präsentierende Zellen (APC; Hauptpopulation: Makrophagen; vgl. Paraffinschnitt 15) waren vor allem subepidermal lokalisiert. B-Lymphozyten (CD20⁺) waren in der Epidermis überhaupt nicht, subepidermal nur in geringer Anzahl nachweisbar.

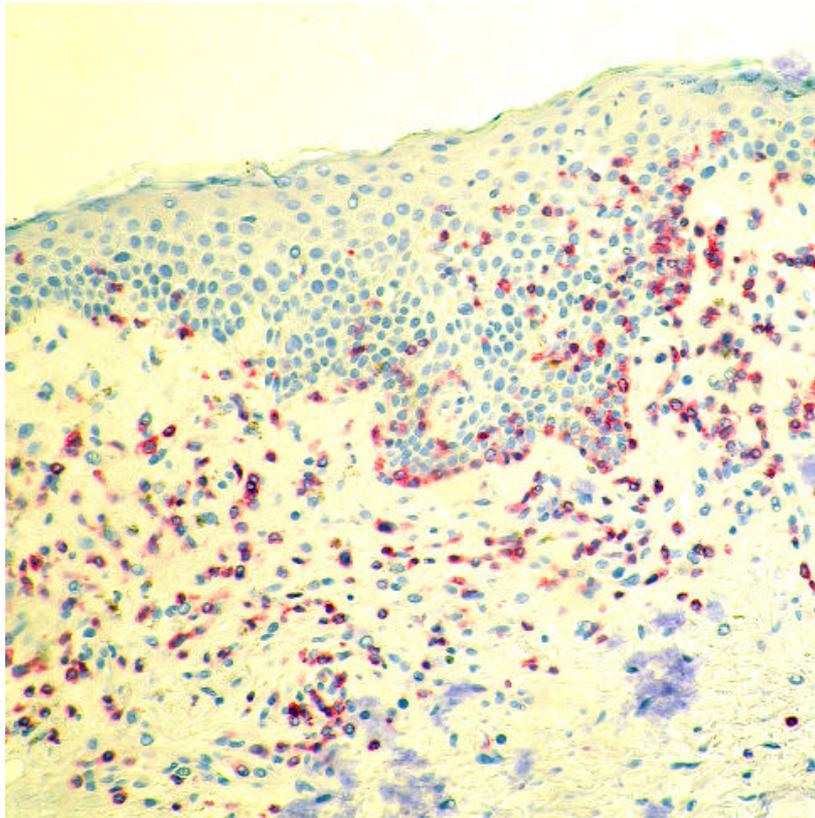
Der Stammzellmarker CD34 wurde in einigen Fällen von subepidermal gelegenen Zellen exprimiert, die teils Endothelzellen entsprechen und ansonsten morphologisch stark Fibroblasten ähnelten (vgl. Paraffinschnitt 16); die Expression des Stammzellmarkers auf subepidermalen Fibroblasten bei GvHD wurde bislang nicht beschrieben. Diese morphologisch nicht immunzelltypischen Zellen gingen nicht in die Auswertung ein.



Paraffinschnitt 7 : Epidermotrope Infiltration durch T-Lymphozyten bei GvHD (Détail)

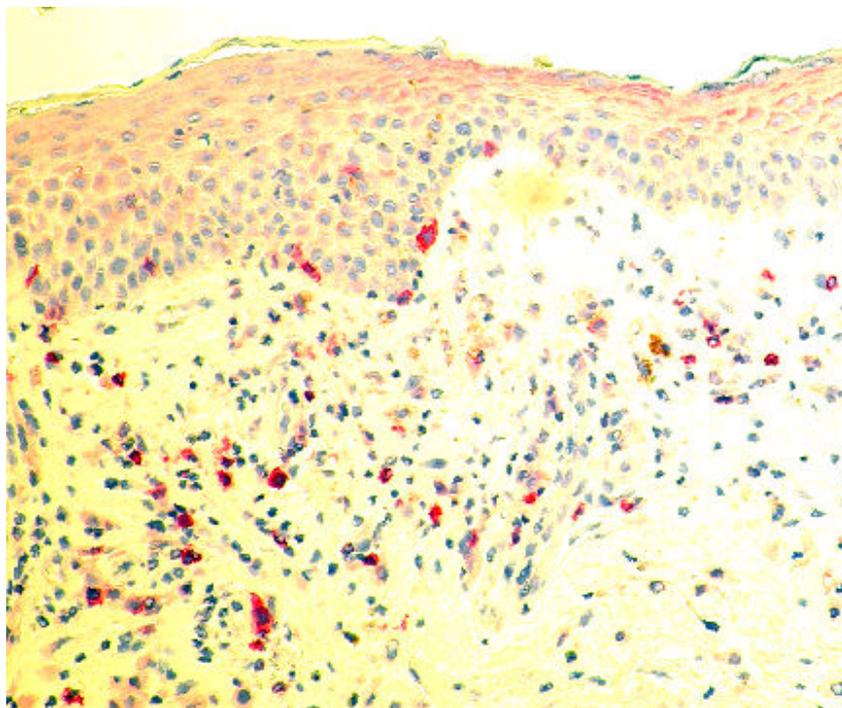
Rot angefärbt erscheinen hier T-Lymphozyten. Das Oberflächenrezeptor CD2 (syn. SRBC, T11) dient der Adhäsion und Aktivierung von T-Zellen. Letztere finden sich hier nicht ausschließlich subepidermal, sondern durchwandern auch die basalen Epidermisschichten (Epidermotropismus), was als ein Charakteristikum einer fortgeschrittenen GvHD gilt.

¹ Immunhistochemische Färbungen: vgl. Gefrierschnitt 4 (CD206), Gefrierschnitt 3 (CD11c), Paraffinschnitt 14 (CD208), Paraffinschnitt 13 (CD209), Gefrierschnitt 1 (CD1b), Gefrierschnitt 2 (CD1b), Gefrierschnitt 5 (CD197) und Gefrierschnitt 6 (CD303)



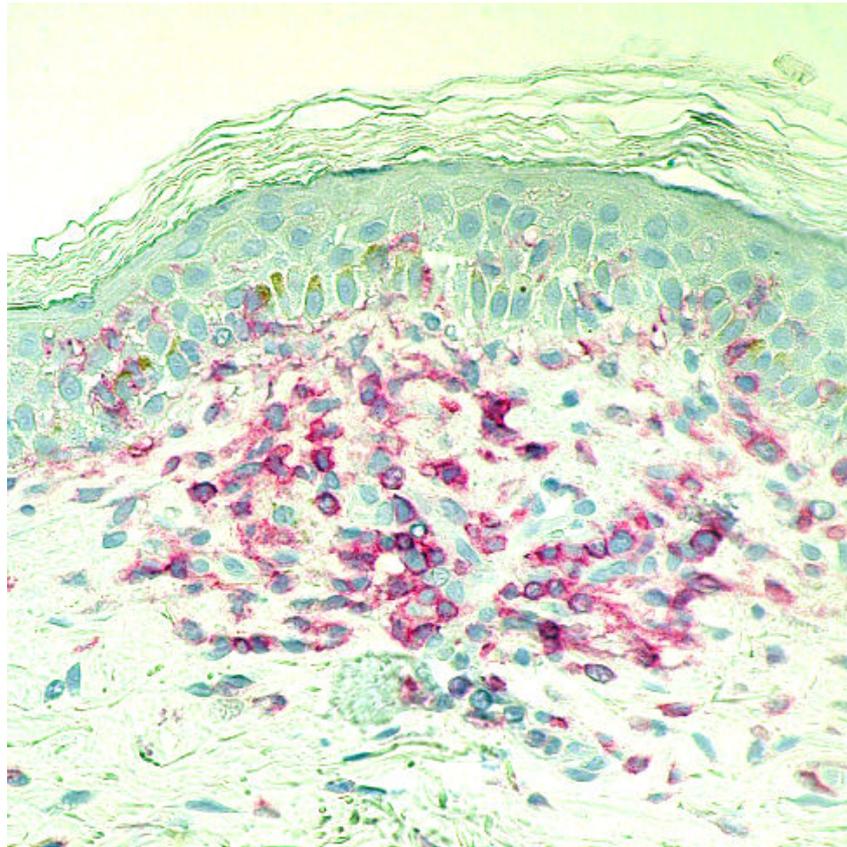
Paraffinschnitt 8: Epidermotrope Infiltration durch T-Lymphozyten bei aGvHD (Übersicht)

Rot angefärbt erscheinen hier $CD2^+$ T-Lymphozyten. Das Oberflächenrezeptor CD2 dient der Adhäsion und Aktivierung von T-Zellen. Letztere finden sich hier nicht ausschließlich subepidermal, sondern durchwandern auch die basalen Epidermisschichten (Epidermotropismus), was als ein Charakteristikum einer fortgeschrittenen GvHD gilt.



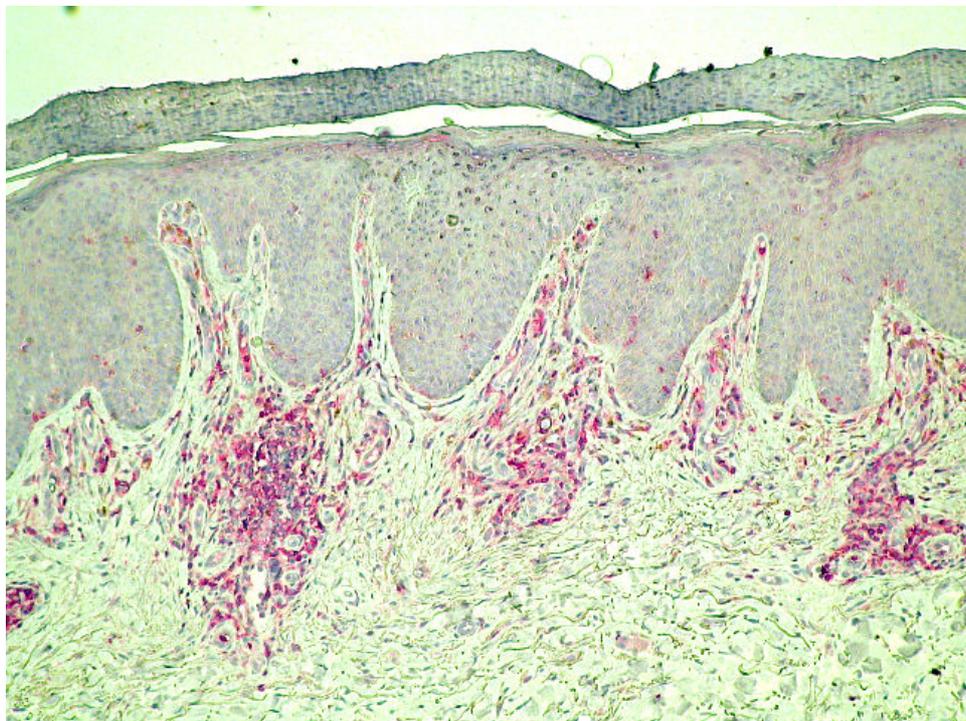
Paraffinschnitt 9: $CD25^+$ epidermotrope Regulatorische T-Zellen bei akuter GvHD

Regulatorische T-Zellen (Treg) kommen rot gefärbt zur Darstellung. Der transmembranöse Glycoproteinrezeptor CD25 bindet an Interleukin 2 und nimmt eine entscheidende Rolle in der Regulation der T-Zell-Funktionen ein. Treg finden sich hier nicht nur subepidermal, sondern wandern auch in die basalen Epidermisschichten ein (geringer Epidermotropismus).



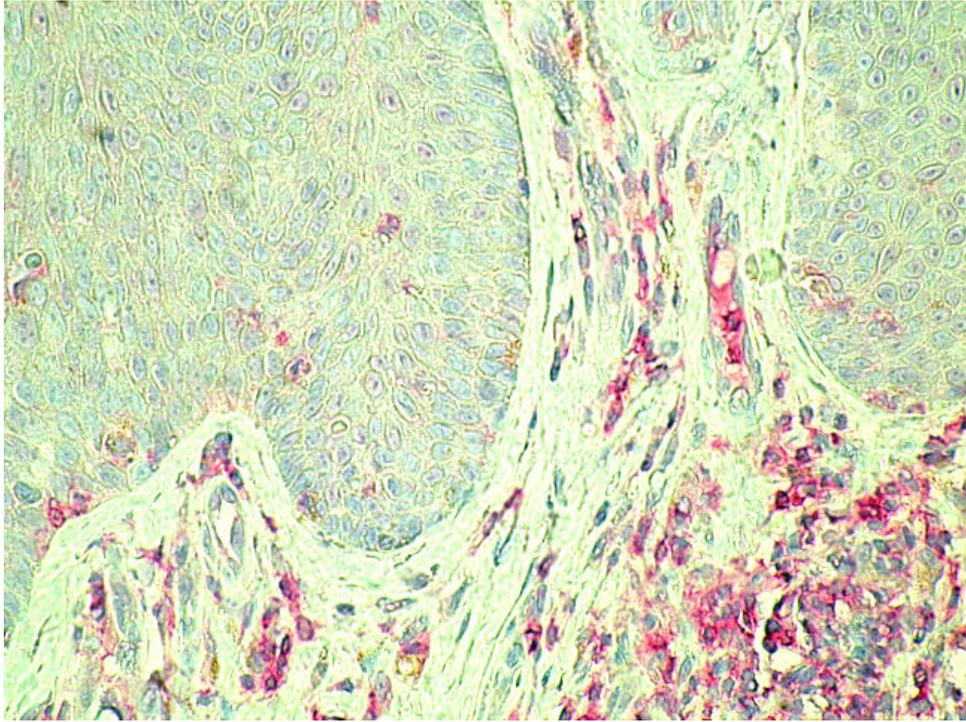
Paraffinschnitt 10: CD45RO⁺ epidermotrope mature T-Zellen bei akuter GvHD

Rot dargestellt sind reife, den spezifischen Oberflächenmarker CD45RO tragende T-Zellen. Hier zeigt sich ein geringer Epidermotropismus, die Mehrzahl der Zellen ist subepidermal angesiedelt.



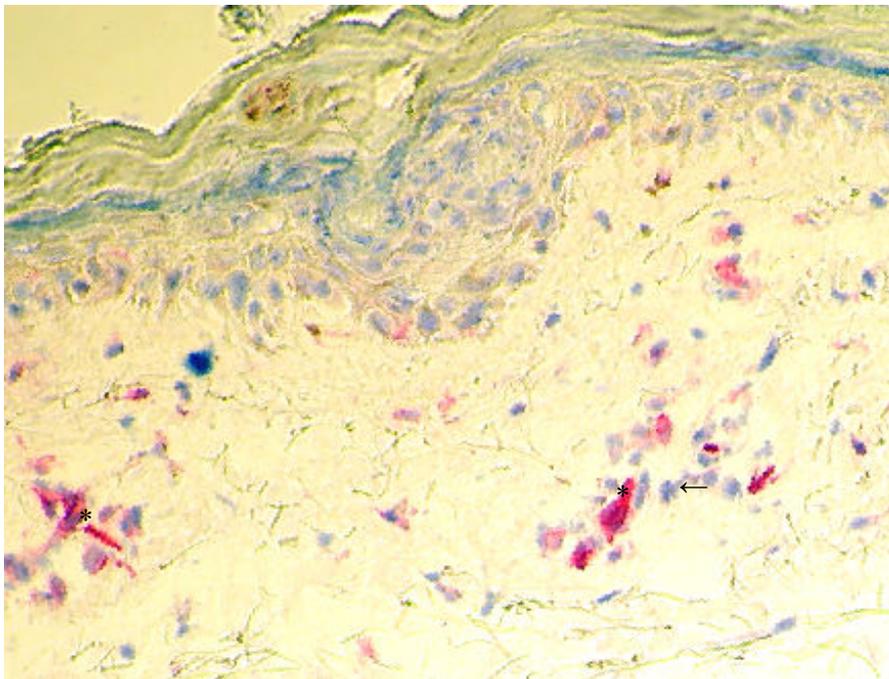
Paraffinschnitt 11: CD45RA⁺ v.a. subepidermal gelegene naive T-Zellen (Übersicht)

Rot dargestellt sind unreife/naive, mit dem spezifischen Oberflächenmarker CD45RA besetzte T-Zellen. Hier zeigt sich ein geringer Epidermotropismus, die Mehrzahl der Zellen ist subepidermal und perivaskulär akzentuiert angesiedelt (vgl. auch Détailansicht: Paraffinschnitt 12). Eine Invasion auf dem Blutweg ist zu vermuten.



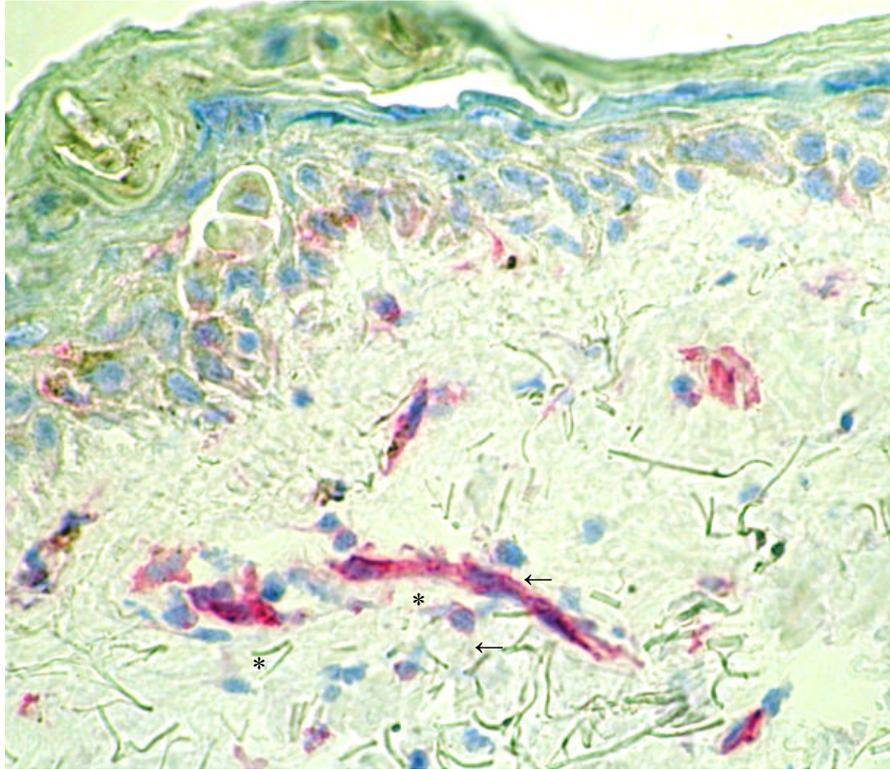
Paraffinschnitt 12: CD45RA⁺ v.a. subepidermal gelegene naive T-Zellen (Detail)

Naive, den spezifischen Oberflächenmarker CD45RA (rot dargestellt) tragende T-Zellen zeigen einen geringen Epidermotropismus. Die Mehrzahl der Zellen ist subepidermal und perivaskulär akzentuiert angesiedelt, was eine Invasion auf dem Blutweg vermuten lässt.



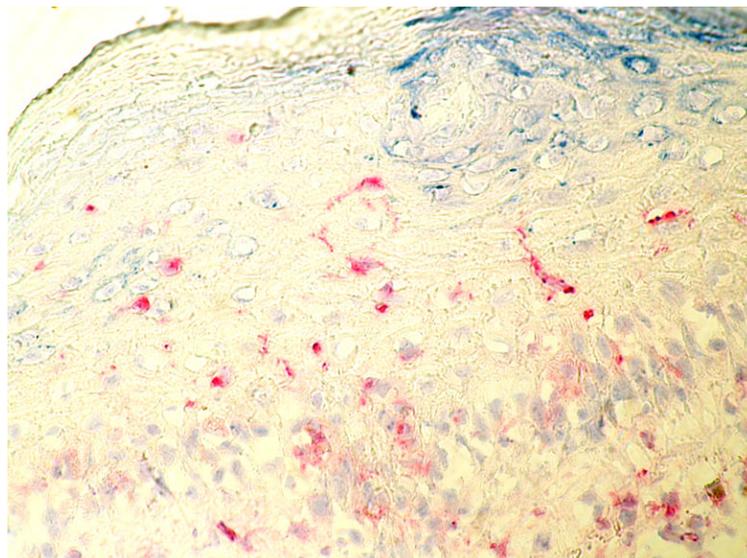
Gefrierschnitt 1: Subepidermal gelegene CD1b⁺ IDEC bei akuter GvHD (Ausschnitt 1)

CD1b (rot) ist ein membranständiges Glykoprotein mit hohem allostimulatorischen Potential, das eine wesentliche Rolle in der T-Zell-Interaktion einnimmt. Es wird vorwiegend auf IDEC (Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen) exprimiert. Letztere binden sich hier subkutan (*) und in enger Lagebeziehung zu Lymphozyten (←).



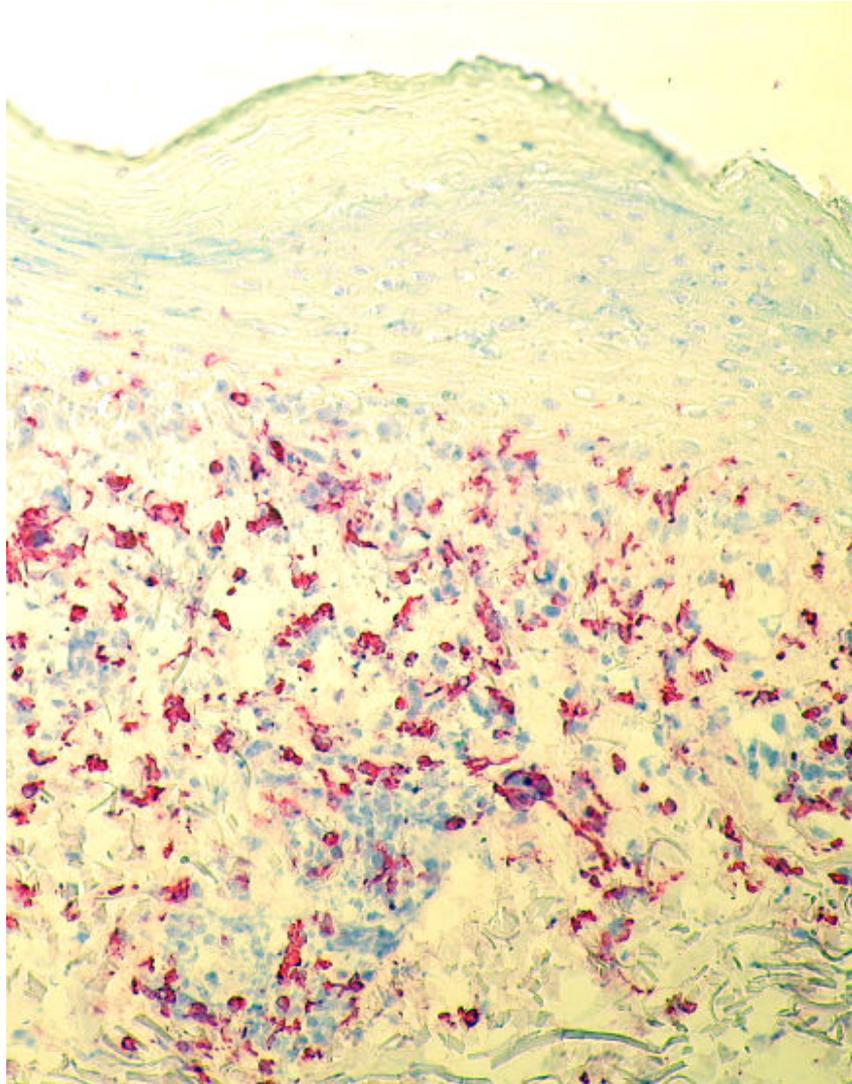
Gefrierschnitt 2: Subepidermal gelegene CD1b⁺ IDEC bei akuter GvHD (Ausschnitt 2)

CD1b (rot) ist ein membranständiges Glykoprotein mit hohem allostimulatorischen Potential, das eine wesentliche Rolle in der T-Zell-Interaktion einnimmt. Es wird vorwiegend auf IDEC (Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen) exprimiert. Letztere binden sich hier subkutan (*) und in enger Lagebeziehung zu Lymphozyten (←).



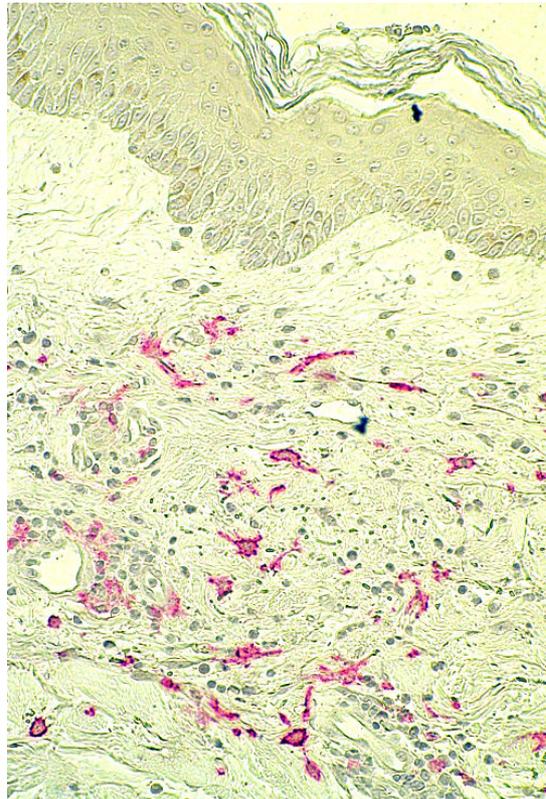
Gefrierschnitt 3: CD11c⁺ Dendritische Zellen in Epidermis und Junctionszone bei aGvHD

CD11c (rot) ist ein für myeloide DC typischer Transmembranprotein der Leukozyten-Integrin-Familie und wird in der Haut vorwiegend auf aktivierten IDEC exprimiert (CD11c⁺⁺⁺; Langerhans Zellen: CD11c⁺) [94]. Bei akuter GvHD finden sich diese Zellen vorwiegend epidermal, hier v.a. im Stratum basale und spinosum. Nebenbefundlich zeigt sich eine fokale Hypergranulose.



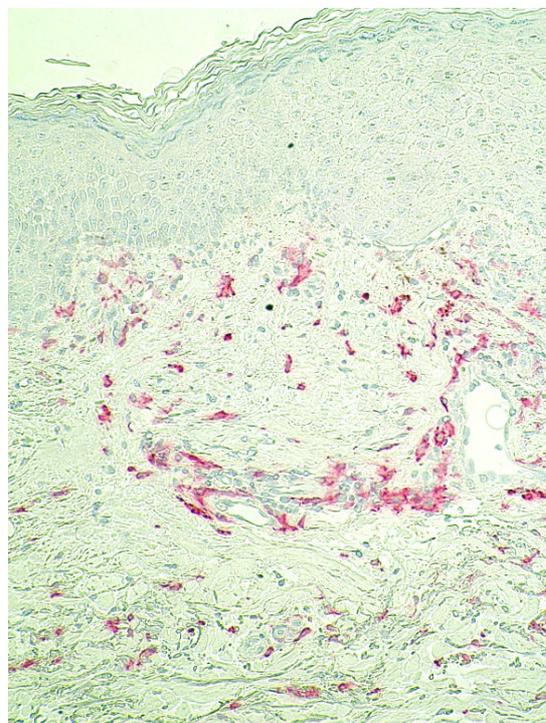
Gefrierschnitt 4: CD206⁺ Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen bei aGvHD

Neben CD1b und CD11c exprimieren Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen (IDEC) den Mannoserezeptor CD206 (rot). Dieser dient der rezeptorvermittelten Endozytose und damit effektiveren Präsentation von mannosylierten Antigenen, wie sie etwa in Pilz- oder Bakterienmaterial häufig sind und kommt auf unreifen Dendritischen Zellen (v.a. IDEC) vor. Diese finden sich in erster Linie subepidermal, teils zeigt sich ein basaler Epidermotropismus (so auch hier).



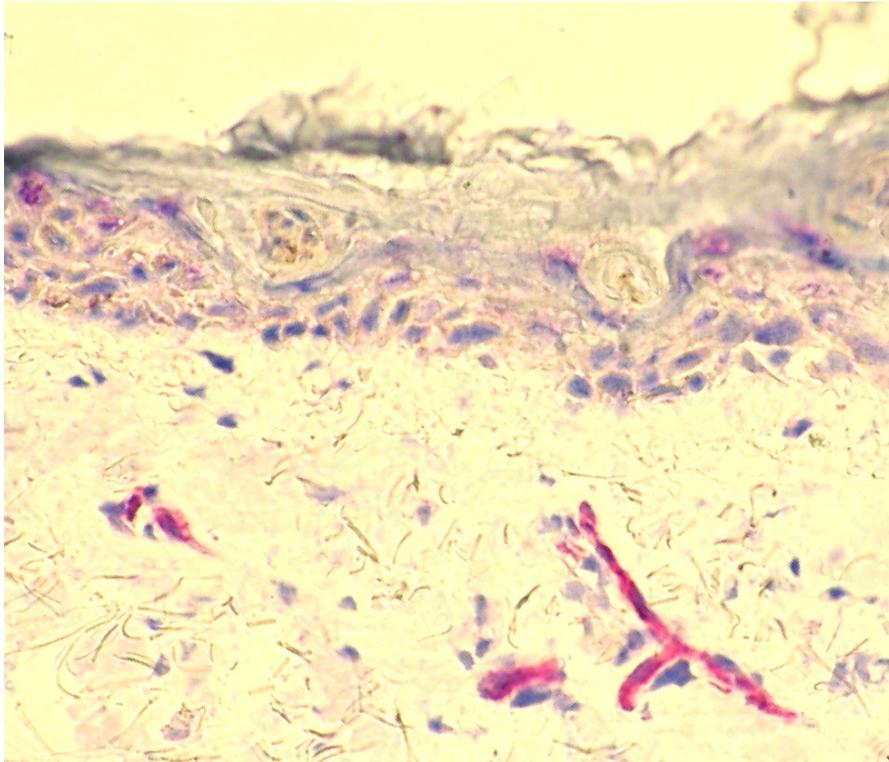
Paraffinschnitt 13: CD209 (DC-SIGN)⁺ Dendritische Zellen in der Dermis bei akuter GvHD

CD209 (DC-SIGN; rot) dient der ICAM-2/-3 –vermittelten Adhäsion naiver T-Lymphozyten auf dendritischen Zellen und wird auf unreifen DC (z.B. IDEC; nicht auf Langerhans Zellen) exprimiert. Das Verteilungsmuster der Zellen ist hier eher perivaskulär akzentuiert, die Zellen finden sich fast ausschließlich subepidermal.



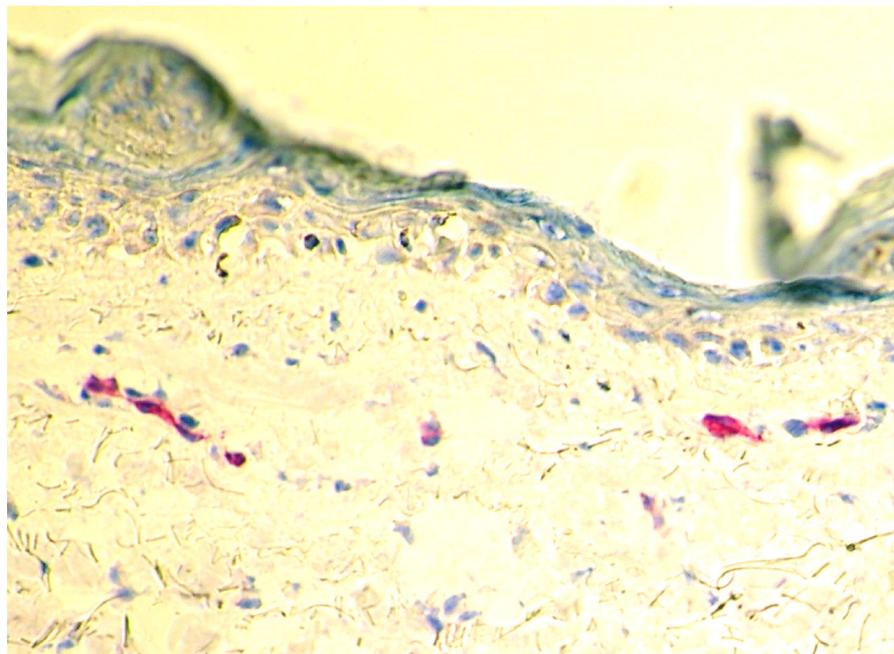
Paraffinschnitt 14: CD208 (DC-LAMP)⁺ Dendritische Zellen in der Dermis bei akuter GvHD

CD208 (DC-LAMP; rot) wird auf ausgereiften myeloiden Dendritischen Zellen exprimiert. Diese Zellen finden sich bei aGvHD subepidermal und perivaskulär betont, so dass eine Einwanderung auf dem Blutweg zu vermuten ist.



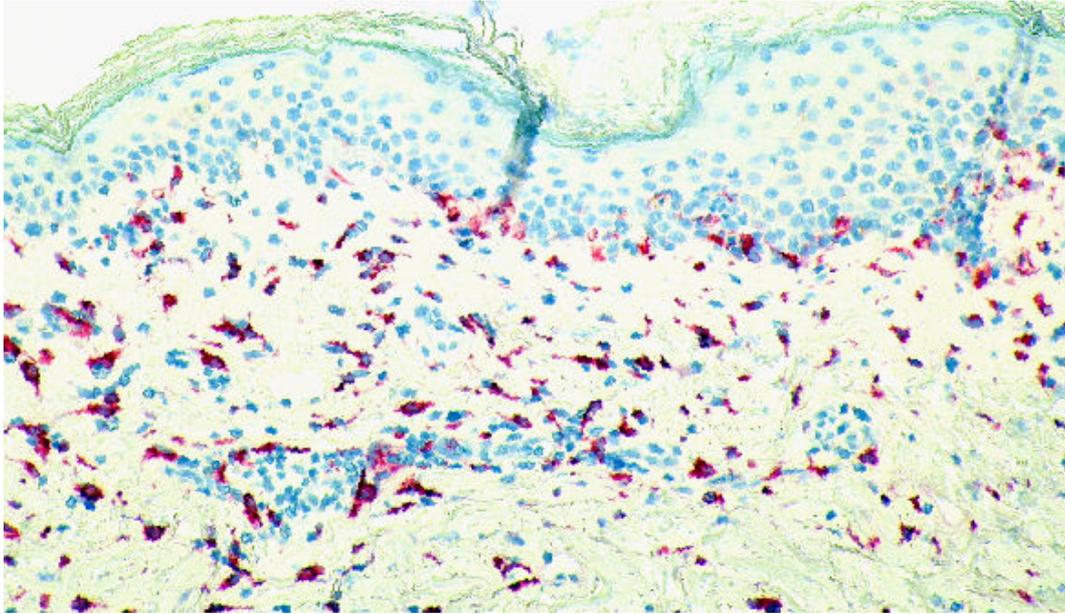
Gefrierschnitt 5: Subepidermal gelegene CD197 (CCR-7)⁺ Dendritische Zellen bei GvHD

Der Chemokinrezeptor CCR7 (MIP-3 β ; rot) ist bedeutend für die Einwanderung der DC aus peripheren Geweben und stellt einen wichtigen Reifeindikator für MoDCs dar. Seine Liganden SLC und ELC werden von Endothelzellen produziert. Er findet sich auf der Mehrzahl der reifen CD208⁺ DCs. Hier dargestellt sind subepidermal gelegene reife DC.



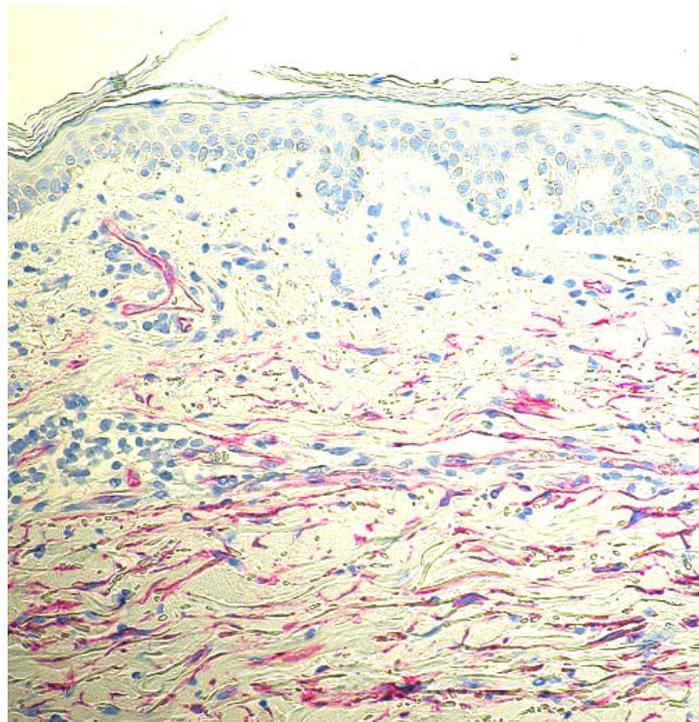
Gefrierschnitt 6: Subepidermale plasmazytoide Dendritische Zellen (CD303⁺) bei aGvHD

CD303 (BDCA-2; rot) ist ein etablierter und sehr spezifischer Marker für plasmazytoide Dendritische Zellen (PDC). Diese spielen eine besondere Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen. Mangel an PDC begünstigt virale Superinfektionen, beispielsweise beim Ekzema herpeticum und scheinen anhand der aktuellen Daten (vgl. Ergebnisse) prognoserelevant (Ein-Jahres-Überleben) bei aGvHD zu sein. Sie finden sich subepidermal.



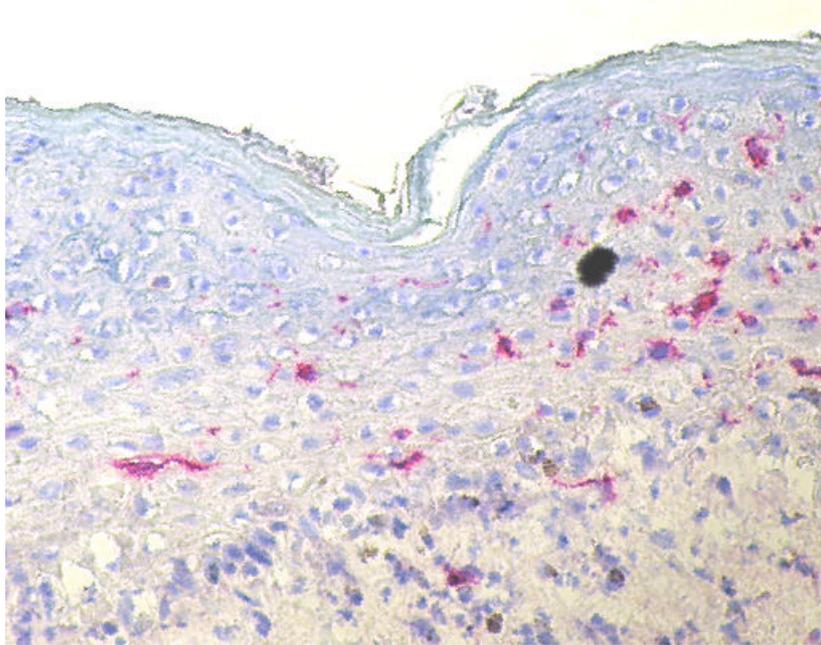
Paraffinschnitt 15: Epidermotrope CD68⁺ Zellen bei einem Patienten mit akuter GvHD

CD68 (KPI; rot) kommt als lysosomales Glykoprotein v.a. auf Makrophagen vor, findet sich jedoch auch auf Fibroblasten und Endothelzellen sowie in geringer Menge auf Monozyten, Neutrophilen und myeloischen Stammzellen. Bei aGvHD kamen die Zellen v.a. subepidermal vor, wiesen aber (wie hier) teils auch einen basalen Epidermotropismus auf.



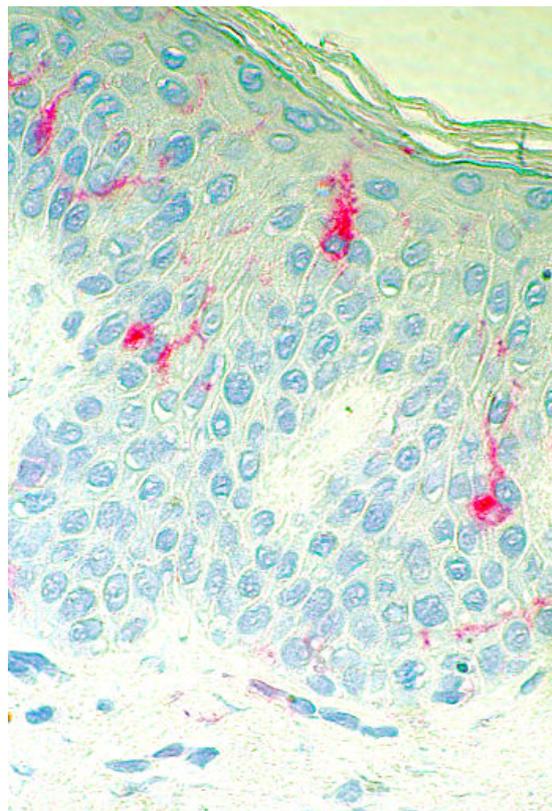
Paraffinschnitt 16: CD34-Expression auf vaskulären Endothelzellen und Fibroblasten ähnelnden subepidermal gelegenen Zellen bei einem Patienten mit akuter GvHD

CD34 (rot) ist glykosylierter Transmembranrezeptor, der konstitutiv auf hämatopoietischen Stammzellen und Endothelzellen exprimiert wird. Bei einigen Fällen akuter GvHD zeigten sich auch CD34 tragende Matrixzellen in tieferen Dermissschichten, welche am ehesten Fibroblasten entsprechen.



Paraffinschnitt 17: CD207 (Langerin)⁺ epidermale Langerhans Zellen bei Arzneiexanthem

CD207 (Langerin; rot) wird als C-Typ Lektin neben CD1a typischerweise auf Langerhans Zellen exprimiert. Diese liegen (wie hier) in aller Regel epidermal und spielen eine Rolle bei der Präsentation nicht-peptidischer Antigene gegenüber T-Lymphozyten.



Paraffinschnitt 18: Epidermale CD1a⁺ Langerhans Zellen bei Arzneiexanthem

CD1a (rot) wird auf Langerhans Zellen (CD1a⁺⁺⁺) und in geringem Maß auf IDEC (CD1a⁺) exprimiert. Diese LC spielen eine wichtige Rolle bei der Präsentation nicht-peptidischer Antigene gegenüber T-Lymphozyten. Sie kommen bei aGvHD fast ausschließlich epidermal vor.

3.1.5 Korrelationen zwischen Zellzahlen bei akuter GvHD

Um Hinweise für pathophysiologische Zusammenhänge zu gewinnen, wurde analog zur histopathologischen Analyse eine Korrelationsanalyse für die Immunhistochemie durchgeführt.

Zellzahlen von T-Lymphozyten-Subpopulationen korrelieren positiv bei GvHD

Die einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen Treg, naive und Memory-TLC kamen bei akuter GvHD meist kombiniert vor, wobei die Anzahl der Zellgruppen positiv korrelierte². Memory- und naive TLC kamen in mindestens gleicher, meist in höherer Anzahl vor als CD25⁺ Treg (vgl. Abbildung 27).

Korrelationen zwischen Anzahl Dendritischer Zellen und Langerhans Zellen

Die Zellzahlen aller TLC-Subpopulationen (Memory-, native TLC und Treg) korrelierten untereinander, wobei Memory-TLC quantitativ dominierten. Langerhans Zellen, PDC und CCR-7⁺ aktivierte DC kamen überzufällig häufig kombiniert vor. Auch die Anzahl an CD208⁺ reifen und CD209⁺ unreifen DC korrelierte positiv, wobei CD209⁺ DC in der Regel zahlreicher waren³. Zwischen CD1a⁺ und CD208⁺ reifen DC wurde eine negative Korrelation nachgewiesen (vgl. Abbildung 13). CD34⁺, fibroblastenartigen Stammzellen in tieferen Dermissschichten korrelierten negativ mit der Zahl an Langerhans Zellen³. Die Zellzahlen an CD1a⁺ und CD207⁺ DC (Langerhans Zellen und IDEC) mit CD208⁺ und CD197⁺ reifen DC korrelierten positiv. Die Anzahl an CCR-7⁺ DC korrelierte zudem positiv mit der Anzahl an PDC (BDCA-2⁺). LC kamen überzufällig häufig kombiniert mit PDC vor².

3.1.6 Hohe Lymphozyten- und IDEC-Zellzahlen korrelieren mit histopathologisch schwerer akuter GvHD

Große Zahlen an TLC, insbesondere Memory-TLC und Treg waren überzufällig häufig mit wichtigen histologischen Charakteristika schwerer akuter GvHD (Basalzellballonierung, Satellitenzellnekrose und subepidermale Spaltbildung) assoziiert.

² Statistischer Nachweis für Korrelation zwischen Zellzahlen mit AG-Expression: CD25⁺ Treg – CD45RO⁺ Memory-TLC hoch signifikant (Kk=0,673; Sg: p=0,001); CD25⁺ Treg – CD45RA⁺ naiven Tlc signifikant (Kk=0,511; Sg: p=0,013); CD207⁺ subepidermal – CCR-7⁺ hoch signifikant (Kk=0,630; Sg: p=0,002); CD303⁺ subepidermal – CCR-7⁺ hoch signifikant (Kk=0,749; Sg: p=0,000); CD207⁺ subepidermal – CD303⁺ subepidermal signifikant (Kk=0,395; Sg: p=0,046);

Keine Korrelation: CD207⁺ subepidermal – CD208⁺ (Kk=0,009; Sg: p=0,996)

³ Statistischer Nachweis für Korrelation zwischen Zellzahlen mit AG-Expression: CD1a – CD197 nicht signifikant (Kk=0,315; Sg: p=0,116); CD1a – CD208 signifikant (Kk=(-)0,425; Sg: p=0,040); CD34 – CD207 signifikant (Kk=(-)0,434; Sg: p=0,030); CD34 – CD1a nicht signifikant (subepidermal: Kk= (-)0,341; Sg: p=0,094); CD208 – CD209 hoch signifikant (Kk=0,630; Sg: p=0,006);

Für alle Korrelationen gilt: vgl. für Gesamtinfiltration Tabelle 37 sowie für epidermale Infiltration Tabelle 30 und für dermale Infiltration Tabelle 31

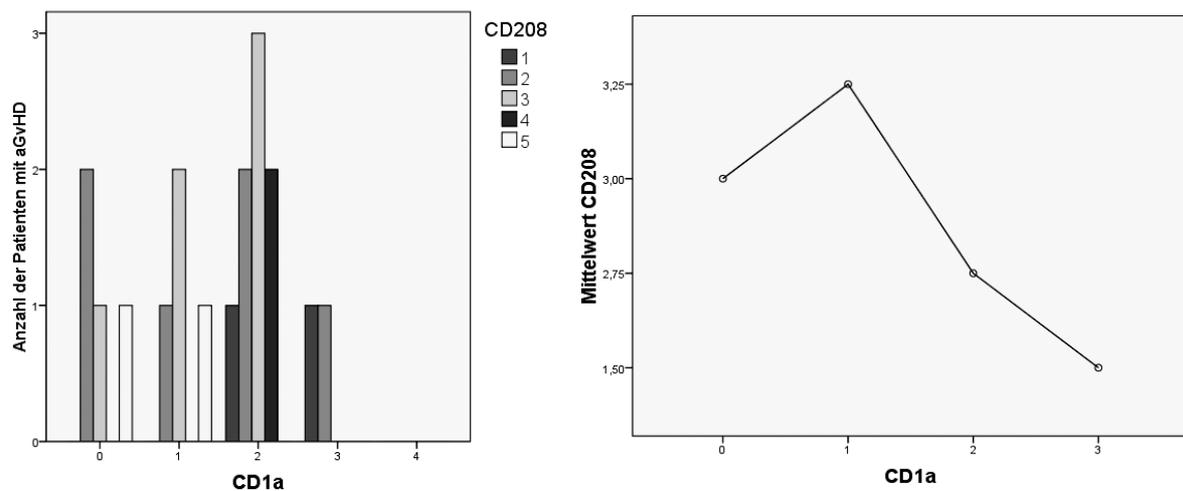


Abbildung 13: Negative Korrelation zwischen Anzahl CD1a⁺ und CD208⁺ reifer DC

Beide Abb. zeigen grafisch die negative Korrelation zwischen der Zahl an CD1a⁺ und CD208⁺ reifen DC.

Links: Das Balkendiagramm zeigt, dass hohe Zahlen an CD1a⁺ LC/DC (X-Achse; semiquantitativ) mit geringer Anzahl an CD208⁺ reifen DC (semiquantitativ, farblich kodiert) korrelieren und umgekehrt.

Rechts: Das Punktdiagramm stellt die Mittelwerte aus der Anzahl CD208⁺ reifer DC (Y-Achse; semiquantitative Daten) in Abhängigkeit von der Anzahl CD1a⁺ maturer LC/DC (X-Achse; semiquantitativ) dar. Auch hier zeigt sich, dass hohe Zahlen an CD1a⁺ maturer LC/DC mit niedrigen Zahlen an CD208⁺ reifen DC korrelieren.

Während hohe Zahlen an CD197⁺ aktivierten DC mit schwacher Ausprägung von Basalzellen-Balloonierung und geringer Zahl an Lymphozyten in der BMZ assoziiert waren und damit eher für histologisch geringen Schweregrad sprachen, korrelierte die Zahl an CD1b⁺ IDEC mit der Zahl an Satellitenzellnekrosen, einem wichtigen Zeichen schwerer GvHD. Für lymphozytäre Marker fiel auf, dass Ballonierung basaler Zellen hoch signifikant mit der Anzahl an epidermotropen TLC (CD2⁺) und Memory-TLC (CD45RO⁺) korrelierte. Letztere kamen v.a. subepidermal, vereinzelt aber auch epidermal vor (vgl. Abbildung 14). Bei hoher Anzahl an TLC (CD2⁺) und CD1b⁺ DC (v.a. IDEC) lagen vermehrt Satellitenzellnekrosen vor, ein Kriterium für die histologische Schweregradbestimmung^{4,5}.

Hohe Zahlen an Treg (CD25⁺) gingen überzufällig häufig mit histopathologisch ausgeprägter lymphozytärer Infiltration einher und positiv mit dem Grad an subepidermaler Spaltbildung / Epidermolyse korrelierten. Außerdem zeigte sich ein positiver statistischer Zusammenhang von

⁴ Statistischer Nachweis für Korrelationen Zellzahl – Histopath. Kriterium: CD197 subepidermal – Basalzellenballonierung signifikant (Kk=(-)0,426 ; Sg: p=0,046); CD197 subepidermal – Lymphozyten BMZ nicht signifikant (Kk=(-)0,354; Sg: p=0,091); CD1b – Satellitenzellnekrose signifikant (Kk=0,472; Sg: p=0,023)

⁵ Statistischer Nachweis für Korrelationen Zellzahl – Histopath. Kriterium: CD2 – Basalzellenballonierung hoch signifikant (Kk=0,511; Sg: p=0,005); CD45RO – Basalzellenballonierung hoch signifikant (Kk=0,489; Sg: p=0,002); CD2 – Satellitenzellnekrose signifikant (Kk=0,336; Sg: p=0,042)

Memory-TLC (CD45RO⁺) mit der histopathologisch bestimmten Lymphozytenzahl im Basalmembranbereich und mit dem Grad an Epidermolyse ⁶.

Bei den Dendritischen Zellen (DC) zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl an CD197 (CCR-7)⁺ aktivierten DC und wichtigen histologischen Parametern wie Ballonierung basaler Keratinozyten und lymphozytärem Infiltrat in der Basalmembranzone. Mit anderen Worten lag bei höherer Zahl CD197⁺ DC histologisch ein weniger schweres Bild der aGvHD vor. Es wird an die Korrelation zwischen der Anzahl an CD197 DC und Langerhans Zellen sowie PDC erinnert, wobei letztere eine günstige Korrelation mit Schweregrad und Überleben aufwiesen.

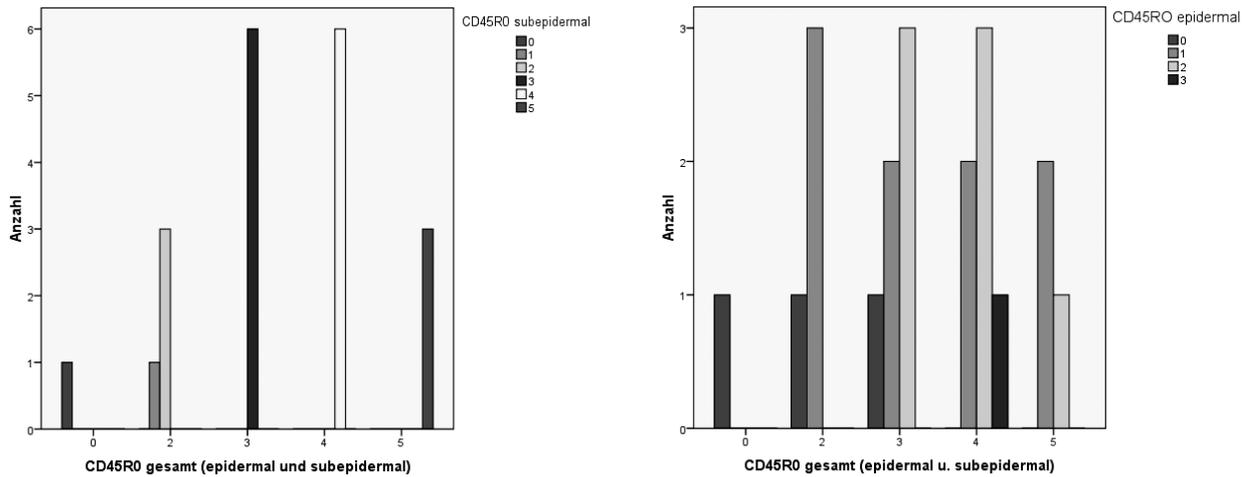


Abbildung 14: Memory-TLC bei akuter GvHD vorwiegend subepidermal nachweisbar

Die Gegenüberstellung der Balkendiagramme (X-Achse jeweils: Gesamtzahl CD45RO⁺ Memory-TLC, semiquantitativ; Y-Achse: CD45RO⁺ subepidermale (links) und epidermale (rechts) Memory-TLC) veranschaulicht, dass die Population an Memory-TLC fast ausschließlich subepidermal vorlag (links), in einigen Fällen jedoch auch Epidermotropie zeigt (rechts).

3.1.7 Komplement, Fibrinogen und Immunglobuline

Eine Betrachtung der Prävalenz von Komplement-, Immunglobulin- und Fibrinogenablagerungen bei akuter GvHD zeigte Folgendes (vgl. Tabelle 28): Am häufigsten waren Ablagerungen von Fibrinogen und Komplement C3 im perivaskulären Bereich nachweisbar, seltener kamen vor (nach absteigenden Mittelwerten geordnet): C3 im Basalmembranbereich, IgM dermal, IgE dermal, Fibrinogen dermal und im Basalmembranbereich, IgM im Basalmembranbereich, C3 dermal, IgG dermal, C4 dermal und im Basalmembranbereich. Aus dem Nachweis von perivaskulären C3- und Fibrinogenablagerungen lässt sich auf eine vaskulitische Komponente bei Varianten der akuten GvHD schließen. Ein stetiger Nachweis bei allen Biopsien war jedoch nicht möglich, sodass die

⁶ Statistischer Nachweis für Korrelationen Zellzahl – Histopath. Kriterium: CD25 gesamt – Lymphozyten signifikant (subepidermal: Kk=0,416; Sg:p=0,033; BMZ: Kk=0,415; Sg: p=0,045; epidermal: Kk=0,438; Sg: p=0,028); CD25 gesamt – Subepidermale Spaltbildung hochsignifikant (Kk=0,529; Sg: p=0,009); CD45RO – Lymphozyten BMZ signifikant (Kk=0,504; Sg: p=0,014); CD45RO – Subepidermale Spaltbildung (Kk=0,489; Sg: p=0,014)

mutmaßliche vaskulitische Komponente nur fakultatives, nicht essentielles Kriterium der aGvHD sein kann.

Eine starke perivaskuläre C3-Ablagerung lag nur in wenigen GvHD-Fällen vor (N=2/20). Eine Korrelationsanalyse für akute GvHD zeigte, dass dermale Immunglobulin- und C3/4-Ablagerungen deutlich untereinander sowie mit junktionalen und perivaskulären Fibrinogenablagerungen und mit dermalem IgM korrelierten (vgl. Tabelle 35). Zudem fand sich ein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen Ablagerungen in der Dermis (IgE) und der Basalmembranzzone (IgM).

3.2 Lupusband typisch für späte aGvHD

Die typischen Effloreszenzen akuter GvHD erinnern an Lupus Erythematodes. Zudem fiel bei der histopathologischen Untersuchung im Rahmen der Arbeit auf, dass viele Hautschnitte von GvHD-Patienten ein bandförmiges entzündliches Infiltrat in der oberen Dermis (Interface Dermatitis) aufwiesen, ähnlich dem Lupus erythematodes.

Die Patienten mit akuter GvHD wurden daher in zwei Gruppen getrennt. In der ersten Gruppe befinden sich Patienten mit positivem Lupusband (21% der Fälle, vgl. Tabelle 12)^{7,10}, die übrigen wurden der zweiten Gruppe zugeordnet. Bei den neun histologisch untersuchten Patienten mit AR ließ sich ein positives Lupusband nur einmal nachweisen, so dass sich für AR keine sinnvollen statistischen Aussagen z.B. bezüglich Korrelation mit dem 1JÜR treffen ließen.

Tabelle 12: Lupusband bei Patienten mit GvHD häufiger nachweisbar

Das typische Lupusband war nur bei einer kleinen Subgruppe nachweisbar, dabei jedoch deutlich häufiger bei aGvHD.

Diagnose	Lupusband-negativ	Lupusband-positiv	Gesamtzahl
Akute GvHD	N = 15	N = 4 (≈ 21%)	N = 19
Arzneireaktion	N = 8	N = 1 (≈ 11%)	N = 9

Subepidermale Spaltbildung (vgl. Abbildung 20) und Satellitenzellnekrosen (vgl. auch Abbildung 21) traten häufiger bei Lupusband-Nachweis auf⁸. Tendentiell (nicht signifikant) waren Basalzell-apoptose, Erythrozytenextravasat und Akanthose bei Lupusband-Nachweis ausgeprägter (vgl. Appendix, Tabelle 38 und Tabelle 39).

Bei den Lupusband-positiven Patienten fanden sich signifikant höhere Zahlen an IDEC (CD206⁺; vgl. Abbildung 16), eosinophilen Granulozyten (vgl. Abbildung 22) und TLC (CD2⁺; vgl.

⁷ Definition: bandförmige Immunglobulinablagerung von IgM und/oder IgG in der Junktionszone

⁸ Statistischer Nachweis für Unterschied Lupusband-positiv – -negativ bei aGvHD bezüglich Zellzahl / histolog. Kriterium: CD206 (epidermal hoch signifikant: Sg exakt: p=0,001; gesamt signifikant: Sg exakt: p=0,047); CD2 insgesamt hoch signifikant (Sg exakt: p=0,002); Eosinophile Granulozyten hoch signifikant (Sg exakt: p=0,009); CD25 subepidermal/insgesamt signifikant (Sg exakt: p=0,023); CD45RA subepidermal/gesamt signifikant (Sg exakt: p=0,019/0,023), Epidermolyse / subepidermale Spaltbildung signifikant (Sg exakt: p=0,036); Satellitenzellnekrose signifikant (Sg exakt: p=0,016); 1JÜR nicht signifikant (Sg exakt: p=0,553; Sg asymptot: p=0,448); GvHSc0 nicht signifikant (Sg exakt: p=0,266; Sg asymptot: p=0,237)

Abbildung 17), Treg (CD25⁺; vgl. Abbildung 18) und naiven TLC (CD45RA⁺; vgl. Abbildung 19; vgl. auch Tabelle 38 und Tabelle 39).

Bei positivem Lupusband zeigt sich histologisch ein besonders schweres Bild der aGvHD. Eine Korrelation mit dem klinischen Schweregrad fand sich für die Glucksberg-Klassifikation nicht. Gemessen am GvHScO waren die Lupusband-positiven Fälle sogar eher leichter betroffen. Lupusband-positive Fälle zeigten bezüglich des 1-Jahres-Überlebens keinen Unterschied zur Lupusband-negativen Fällen⁸.

Ein positiver Lupusbandnachweis bei aGvHD fand sich am eigenen Biopsiematerial typischerweise bei späten Biopsiezeitpunkten (vgl. Abbildung 15)⁹. Der signifikante Unterschied zu Lupusband-negativen aGvHD-Patienten ist bei geringer Fallzahl (N=4/19) und hohem Standardfehler des Mittelwerts bei den Lupusband-positiven Fällen kritisch zu werten. Das Lupusband scheint ein Charakteristikum der sich später manifestierenden aGvHD zu sein. Möglicherweise durchlaufen alle Patienten dieses Stadium. Diese Hypothese sollte anhand serieller, prospektiver Untersuchungen geprüft werden.

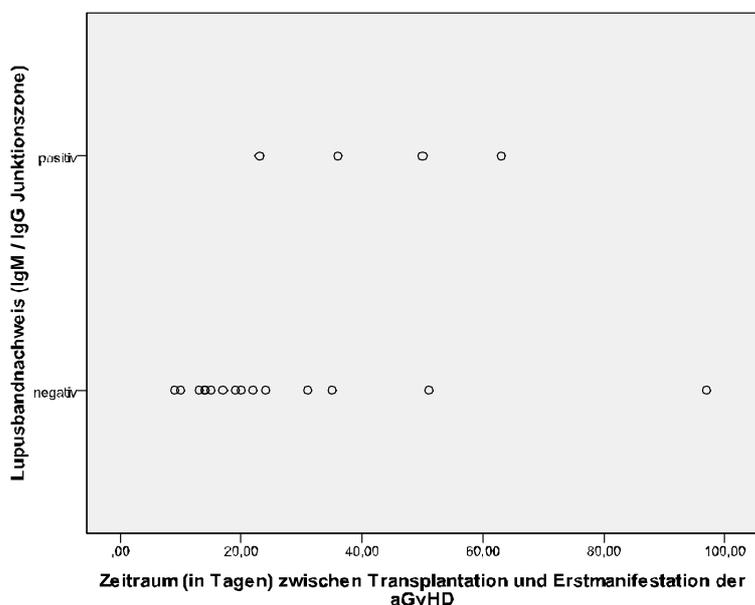


Abbildung 15: Lupusband typisch für spät-manifestierende aGvHD-Fälle

Bei allen Lupusband-positiven Fällen von akuter GvHD manifestierte sich die aGvHD nach durchschnittlich 43 Tagen statistisch gesehen später (im Mittel bei als bei Lupusband-negativen Fällen (Mittelwert: 26 Tage)^{10,9}.

⁹ Zeitraum zwischen Transplantationszeitpunkt und Erstmanifestation der aGvHD: Gesamtmittelwert: 29,6 Tage (Standardfehler des Mittelwerts $\sigma = 5,09$); Mittelwert bei Lupusband-positiven Fällen: 43,0 Tage ($\sigma=8,6$); Mittelwert bei Lupusband-negativen Fällen: 26,1 Tage ($\sigma=5,8$); Unterschied signifikant: Sg exakt: $p=0,066$; Sg asymptot: $p=0,060$

¹⁰ Der Unterschied zwischen den entsprechenden Zeiträumen (Gruppenvariable: Lupusbandnachweis) war signifikant (Sg: $p=0,049$).

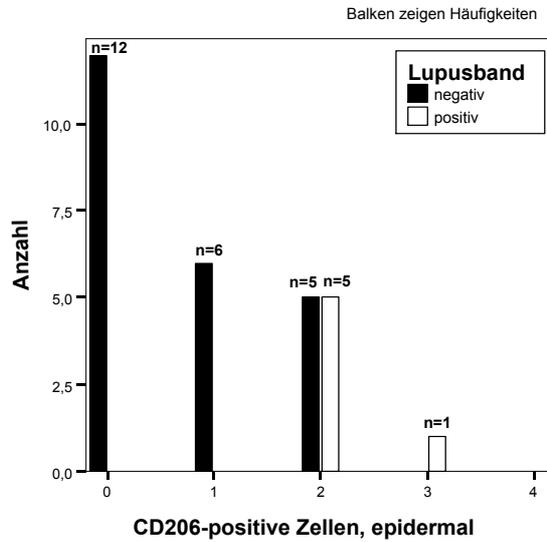


Abbildung 16: Epidermale Infiltration durch CD206⁺ IDEC bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusbandnachweis stärker

Die Darstellung zeigt die Anzahl der Patienten (Y-Achse) mit positivem (blau) bzw. negativem (rot) Lupusbandnachweis, abhängig von der Infiltration durch CD206⁺ Dendritische Zellen anhand der erläuterten semiquantitativen Einteilung (vgl. S. 31ff). Es zeigte sich, dass ein Lupusband nur bei zumindest mäßiger Infiltration durch CD206-positive DC vorlag.

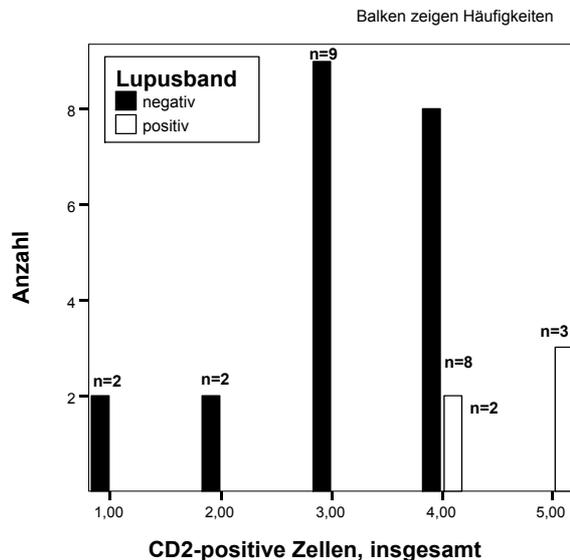


Abbildung 17: Infiltration durch T-Zellen bei aGvHD und positivem Lupusband stärker

Die Darstellung zeigt die Anzahl der Patienten (Y-Achse) mit positivem (blau) bzw. negativem (rot) Lupusbandnachweis, abhängig von der Infiltration durch CD2-positive T-Lymphozyten anhand der erläuterten semiquantitativen Einteilung (vgl. S. 31ff). Es zeigte sich, dass ein Lupusband nur bei ausgeprägter T-Zell-Infiltration vorlag.

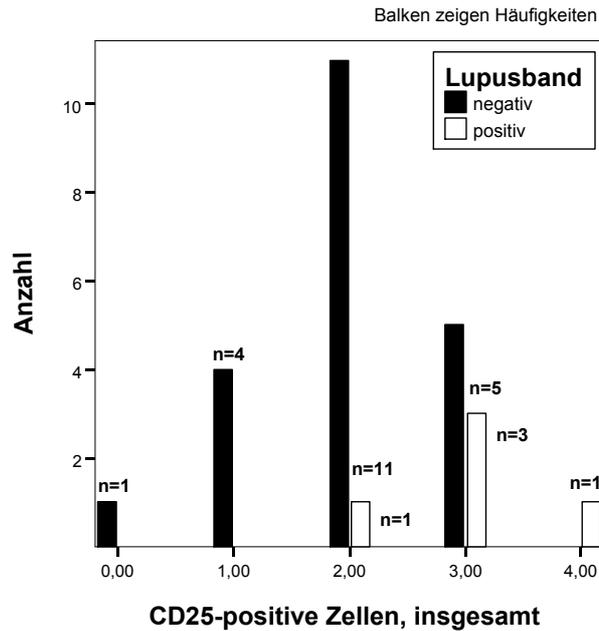


Abbildung 18: Infiltration durch Regulatorische T-Zellen bei aGvHD und positivem Lupusband stärker

Die Darstellung zeigt die Anzahl der Patienten (Y-Achse) mit positivem (blau) bzw. negativem (rot) Lupusbandnachweis, abhängig von der Infiltration durch CD25-positive regulatorische T-Zellen anhand der erläuterten semiquantitativen Einteilung (vgl. S. 31ff). Es zeigte sich, dass ein Lupuband nur bei zumindest mäßiger Infiltration durch Treg vorlag.

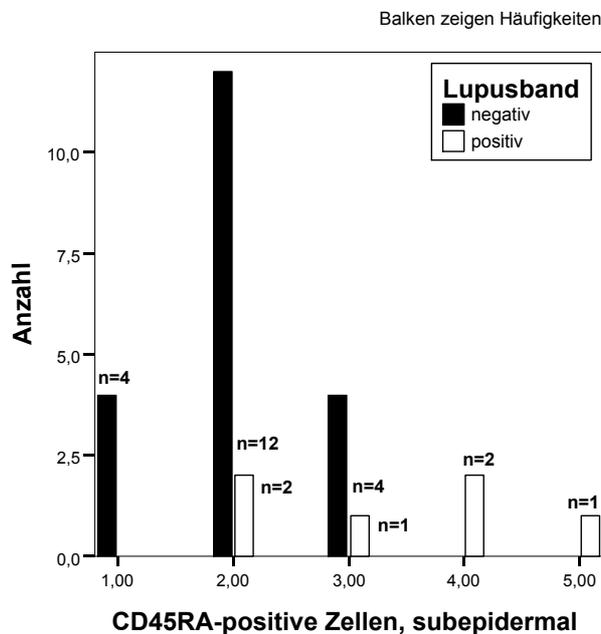


Abbildung 19: Infiltration durch CD45RA⁺ naive T-Lymphozyten bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusbandnachweis stärker ausgeprägt

Die Darstellung zeigt die Anzahl der Patienten (Y-Achse) mit positivem (blau) bzw. negativem (rot) Lupusbandnachweis, abhängig von der Infiltration durch CD45RA-positive naive T-Zellen anhand der erläuterten semiquantitativen Einteilung (vgl. S. 31ff). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Lupuband-Positivität und der Anzahl naiver T-Zellen.

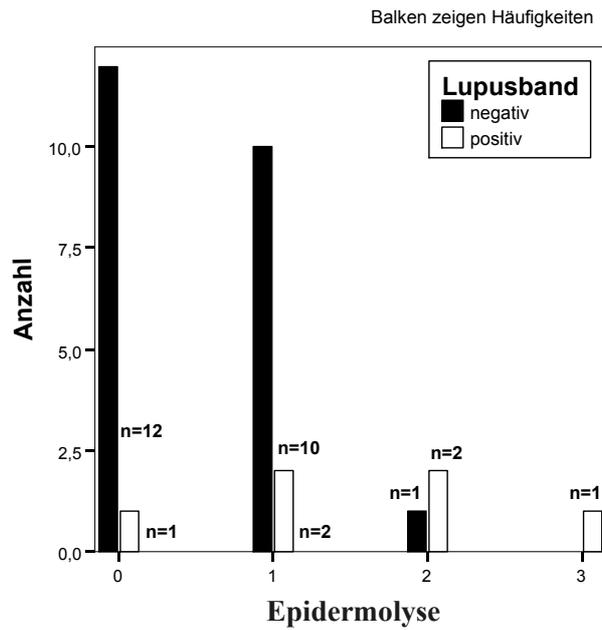


Abbildung 20: Epidermolyse bei GvHD und positivem Lupusband in der Regel deutlicher

Es besteht eine Korrelation zwischen Lupusband-Positivität (blau) und Epidermolyse (semiquantitative Klassifikation: vgl. S. 31ff). Y-Achse: Anzahl der Patienten.

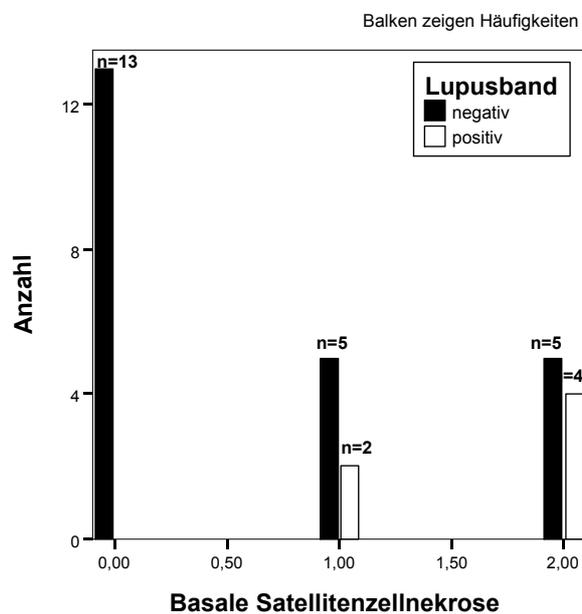


Abbildung 21: Satellitenzellnekrose in den basalen Schichten der Epidermis bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusband stets nachweisbar

Es besteht eine Korrelation zwischen Lupusband-Positivität (blau) und Satellitenzellnekrose im Stratum basale (semiquantitative Klassifikation: vgl. S. 31ff). Y-Achse: Anzahl der Patienten.

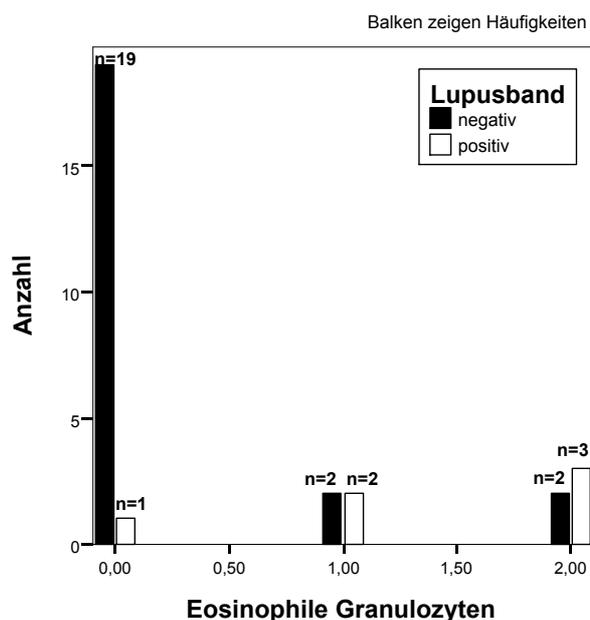


Abbildung 22: Subepidermales eosinophiles Infiltrat bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusband insgesamt häufiger als bei negativem Lupusband

Es besteht eine Korrelation zwischen Lupusband-Positivität (blau) und der Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Stratum basale (semiquantitative Klassifikation: vgl. S. 31ff). Y-Achse: Anzahl der Patienten.

3.3 Relevanz von Prädispositionsfaktoren und histologischen Untersuchungen für Schweregrad und Ein-Jahres-Überleben bei aGvHD

Die Ein-Jahres-Überlebensrate in der untersuchten Kohorte mit aGvHD lag bei 55%. Die Subgruppenanalyse wurde durchgeführt, um klinisch relevante Einflussfaktoren auf das Ein-Jahres-Überleben herauszufiltern.

Mastzellinfiltration korrelierte positiv mit Ein-Jahres-Überleben

Während bei den Patienten, die den Ein-Jahres-Follow-up-Zeitraum überlebten (N=11), in aller Regel eine zumindest geringe Mastzellinfiltration (semiquantitativ 2-20 Zellen/mm²) vorlag, war die Mastzellanalyse für alle Nicht-Überleber (N=9) stets negativ (N=20; Kk=0,472; Sg: P=0,031; für die übrigen Kriterien vgl. auch Tabelle 36).

Anzahl an DC und TLC korrelierte mit Schweregrad und Überleben

Große Zahlen plasmazytoider Dendritischer Zellen (PDC) korrelierten günstig mit klinischem Schweregrad (GvHSc) und Ein-Jahres-Überleben. Eine positive Korrelation fand sich auch

zwischen der Zellzahl an myeloiden DC (CD11c⁺; v.a. IDEC) und dem Ein-Jahres-Überleben. CD208⁺ mature DC waren im Hinblick auf das Ein-Jahres-Überleben dagegen prognostisch ungünstig. Die Zahl an TLC (CD2⁺)¹¹ korrelierte positiv mit dem klinischen Schweregrad (GvHSco). Höhere Zahlen an Treg und niedrigere Zahlen an CCR7⁺ aktivierte DC sowie Langerhans Zellen waren überzufällig häufig mit Spätmanifestation von GvHD assoziiert.

PDC kamen im Vergleich zu anderen DC wie z.B. IDEC bei akuter GvHD in der Regel in deutlich geringerer Zahl vor. Bei drei Patienten mit hoher Zahl an PDC (BDCA-2⁺; >20 Zellen/mm²) wiesen signifikant bessere Überlebensraten und einen niedrigeren Schweregrad nach Glucksberg auf¹².

Eine ausgeprägte subepidermale Infiltration durch myeloide DC (CD11c⁺; v.a. IDEC) ging mit einer höheren Ein-Jahres-Überlebensrate einher. Im Gegensatz hierzu korrelierte die Zellzahl an reifen DC (CD208⁺) ungünstig mit dem Ein-Jahres-Überleben¹³.

Je später die Ermanifestation der GvHD nach Transplantation, desto höher war die Zahl an Treg (CD25⁺). Die Infiltration durch die verschiedenen T-Lymphozyten zeigte mit dem Ein-Jahres-Überleben oder klinischem Schweregrad (getestet für alle Scores) keine signifikante Korrelation¹⁴.

Bei früher GvHD-Manifestation waren signifikant mehr dermale Langerhans'sche Zellen (LC) und den Migrationsmarker CCR-7 exprimierende DC nachweisbar als bei späterer Erstmanifestation¹⁵.

Einfluss patientenbezogener Daten auf Schweregrad und Verlauf bei aGvHD

Bei Spende durch Unverwandte und bei ungleichem Geschlecht von Spender und Empfänger traten tendentiell (p=0,16 / p=0,18) höhere GvHSco-Werte auf, diese waren jedoch ohne Einfluss auf das Überleben. Alle übrigen transplantatassoziierten Parameter sowie der Manifestationszeitpunkt nach Transplantation waren ohne Einfluss auf Ein-Jahres-Überleben und Schweregrad.

3.4 Entwicklung des modifizierten histologischen Scores zur Abschätzung des Schweregrads akuter GvHD (GvHiScore)

Die etablierte Klassifikation nach Lerner ([49]; vgl. auch Tabelle 3, Seite 7) basiert auf wenigen histologischen Kriterien (Vakuolisierung basaler Zellen, Dyskeratose und Epidermolysen), deren Einschätzung untersucherabhängig ist. Zudem bietet diese Klassifikation (vier Kategorien: I° – IV°,

¹¹ Statistischer Nachweis für Korrelation TLC – GvHSco signifikant (Korrelationskoeff.[Kk]=0,414; Signifikanz[Sg]: p=0,027)

¹² Statistischer Nachweis: vgl. Tabelle 30, Tabelle 31 und Tabelle 37

¹³ Statistischer Nachweis für Korrelation Ein-Jahres-Überleben – Zellinfiltration: CD11c⁺ signifikant (Kk=0,450; Sg: p=0,039); CD208⁺ subepidermal/gesamt hoch signifikant (Kk= (-)0,726/(-)0,735; Sg: p=0,001)

¹⁴ Statistischer Nachweis signifikant (Kk=0,368; Sg: p=0,039)

¹⁵ Statistischer Nachweis für Korrelation Erstmanifestationszeitpunkt (nach KMT/PBSCT) – Zellzahl: CCR7⁺ subepidermal signifikant (Kk=(-)0,421; Sg: p=0,019); CD207⁺ subepidermal signifikant: Kk=(-)0,365; Sg: p=0,043; gesamt: Kk=(-)0,411; Sg: p=0,020)

wobei IV° selten vorkommt¹⁶) wenig Spielraum für inter- und intraindividuelle Vergleiche, etwa im Rahmen der Verlaufskontrollen. Ziel war es daher, einen standardisierten Score, basierend auf klar definierten, untersucherunabhängigen Kriterien zu entwickeln, der feiner abgestuft ist. Dies erfolgte durch systematische, verblindete Analyse zuvor festgelegter Kriterien. Anschließend wurde eine Korrelationsanalyse im Hinblick auf den klinischen Schweregrad (Glucksberg) durchgeführt. Kriterien, die eine Korrelation mit der Klinik zeigten (Lymphozyteninfiltrat und Diskontinuität der Basalmembran¹⁷), wurden ausgewählt und als Multiplikatoren zusammen mit der Lernerklassifikation zu einem Score integriert. Das neu entwickelte Grading wurde als GvHiScore bezeichnet (vgl. Tabelle 21).

Die Verteilung des modifizierten histologischen Scores innerhalb der Patientengruppe wurde retrospektiv bestimmt (vgl. Tabelle 25). Die Stratifizierung des Gradings war im höheren Bereich sehr fein (Mittelwert: 16,58; Maximum: 45; vgl. Tabelle 25), was gerade bei ausgeprägten histopathologischen eine sensitive Verlaufskontrolle anhand des GvHiScore in Aussicht stellt.

Als Modifikation des histologischen Gradings nach Lerner verspricht der GvHiScore eine deutlich bessere Korrelation mit dem klinischen Schweregrad. Die Punktwerte des histologischen GvHiScore (vgl. Tabelle 13) zeigten eine hochsignifikante Korrelation mit der Bewertung der Hauteffloreszenzen nach Glucksberg¹⁸. Die nachgewiesene Korrelation mit den Punktwerten der Lerner-Klassifikation¹⁹ war naturgemäß zu erwarten, da der GvHiScore auf dieser basiert. Eine signifikante Korrelation mit dem 1-Jahres-Überleben lag weder für den GvHiScore noch für die Lerner-Klassifikation vor¹⁹. Eine prospektive Validierung des Scores steht noch aus.

¹⁶ Trotz mehrerer klinisch schwerer Verläufe zeigte in dieser Studie kein Patient einen Schweregrad IV° nach Lerner.

¹⁷ Eine Korrelation mit dem klinischen Schweregrad der kutanen Effloreszenzen nach Glucksberg zeigten nur die Kriterien „Lymphozyteninfiltration“, „Kontinuitätsverluste der Basalmembran“ und „Erythrozyten-Extravasate“. Da sich bei letzteren eine artifizielle Beeinflussung nur schwer ausschließen lässt, wurde dieses Kriterium nicht weiter verfolgt. Für die Abschätzung des Schweregrades wurden das lymphozytäre Infiltrat und die Kontinuität der Basalmembran einbezogen. Kontinuitätsverluste der Basalmembran wurden aufgrund der höheren Signifikanz und des höheren Korrelationskoeffizienten stärker gewichtet (vgl. 3.1 , S.37ff).

¹⁸ Statistischer Nachweis für Korrelation GvHiScore – kutaner Schweregrad nach Glucksberg hoch signifikant (Kk=0,561; Sg: p=0,004); für Korrelation GvHiScore – histologischer Schweregrad nach Lerner hoch signifikant (Kk=0,540; Sg: p=0,007); für Korrelation GvHiScore – Ein-Jahres-Überleben keine statistisch signifikanter Nachweis (Kk=(-)0,043; Sg: p=0,835)

¹⁹ Statistischer Nachweis für Korrelation GvHiScore – kutaner Schweregrad nach Glucksberg hoch signifikant (Kk=0,561; Sg: p=0,004); für Korrelation GvHiScore – histologischer Schweregrad nach Lerner hoch signifikant (Kk=0,540; Sg: p=0,007); für Korrelation GvHiScore – Ein-Jahres-Überleben keine statistisch signifikanter Nachweis (Kk=(-)0,043; Sg: p=0,835)

Tabelle 13: Modifizierter Histologischer Score zur Abschätzung des Schweregrads akuter GvHD (GvHiScore)

Der GvHiScore hat eine verbesserte Abschätzung des Schweregrads zum Ziel. Als Grundlage dient die Klassifikation nach Lerner mit dem entsprechenden Schweregrad (Kopfzeile; vgl. Tabelle 3, S.7). Die wesentlichen histologischen Kriterien (linke Spalte, farblos unterlegt) werden nach der Verteilung eingeteilt (linke Spalte, grau unterlegt). Zur besseren Übersicht wird dieser Wert in die farblos unterlegte rechte Spalte übertragen. Der histopathologische Grad (erste Zeilen) wird mit den Werten der Zeilen 2 und 5 multipliziert. Dabei ergibt sich ein Wert auf der Skala von 0-60, der rechts unten eingetragen wird (GvHiScore).

Histologischer Score nach Lerner (vgl. Tabelle 3, S.7)		① ② ③ ④
Lymphozytäres Infiltrat	Multipliziert mit	① ② ③
Diffus und epidermotrop	3	
Diffus, höchstens fokal epidermotrop	2	
Keines oder nur fokal	1	
Kontinuität der Basalmembran	Multipliziert mit	① ③ ⑤
Nicht mehr / kaum noch erhalten	5	
Lückenhaft	3	
Durchgehend erhalten	1	
Histologischer Gesamtscore	Skala: 0 – 60	Punktwert: _____

Ein Beispiel: Bei einem Patienten liegt Grad 3 nach Lerner vor. Dabei besteht ein diffuses lymphozytäres Infiltrat mit allenfalls fokaler Epidermotropie. Die Basalmembran ist größtenteils erhalten. Der GvHiScore beträgt $(3 \cdot 2 \cdot 3 =) 18$ Punkte.

Histologischer Score nach Lerner (vgl. Tabelle 3, S.7)		① ② ③ ④
Lymphozytäres Infiltrat	Multipliziert mit	① ② ③
Diffus und epidermotrop	3	
Diffus, höchstens fokal epidermotrop	2	
Keines oder nur fokal	1	
Kontinuität der Basalmembran	Multipliziert mit	① ③ ⑤
Nicht mehr / kaum noch erhalten	5	
Lückenhaft	3	
Durchgehend erhalten	1	
Histologischer Gesamtscore	Skala: 0 – 60	Punktwert: 18

3.5 Entwicklung eines Algorithmus zur Differentialdiagnostik von aGvHD und Arzneiexanthenen

3.5.1 Histopathologische Kriterien zur Differentialdiagnostik von aGvHD und Arzneiexanthem

Die histopathologische Untersuchung ist ein wesentliches Diagnosekriterium für die akute GvHD. Bislang sind jedoch keine klaren Unterscheidungsmerkmale zwischen der GvHD und akuter Arzneireaktion (AR) validiert worden. Ein wesentliches Ziel dieser Dissertation war es daher, mögliche histopathologische Unterscheidungskriterien zur Differentialdiagnose von akuter GvHD und Arzneireaktionen zu finden. Hierfür wurden alle erhobenen histopathologischen und immunhistochemischen Beurteilungskriterien auf signifikante Unterschiede zwischen aGvHD und AR hin überprüft.

Epidermolyse, Ballonierung von Basalzellen und lymphozytäres Infiltrat der Junktionszone sprechen für akute GvHD

Eine Ballonierung der basalen Keratinozyten ließ sich bei Patienten mit kutaner Graft versus Host Disease hochsignifikant häufiger nachweisen als bei Arzneireaktionen²⁰ (Abbildung 34). Auch Epidermolyse²⁰ (Abbildung 35) und die Infiltration der Junktionszone durch Lymphozyten²⁰ (Abbildung 36) waren signifikant häufiger nachweisbar. Für das Kriteriums Epidermolyse wird folgende Annahme getroffen: Alle Patienten mit Spaltbildung von mindestens 3 Zellen (Kategorien 1,2 und 3 nach histopathologischem Erhebungsbogen [HP]) werden denjenigen ohne signifikante Veränderungen (HP Kategorie 0) gegenübergestellt. Daraus ergibt sich für GvHD eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 79% im Vergleich zur Arzneireaktion (Berechnung vgl. Tabelle 14). Alle Patienten mit GvHD zeigten eine zumindest fokale (Sensitivität 100%, Spezifität 65%), die Mehrzahl eine diffuse Ballonierung basaler Zellen (Sensitivität 90%, Spezifität 77%) und ein zumindest fokales lymphozytäres Infiltrat im Bereich der Basalmembranzzone (Sensitivität 95%, Spezifität 65%). Etwa in der Hälfte der Fälle trat ein diffuses Infiltrat auf (Sensitivität 57,9%, Spezifität 67%). Alle übrigen analysierten Parameter ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen.

Die erarbeiteten Kriterien Lymphozyteninfiltration, Basalzellballonierung und Epidermolyse waren am vielversprechendsten für die Differentialdiagnostik; hierauf wird in der Folge zurückgegriffen.

Eosinophiles Infiltrat spricht für akute Arzneireaktionen

Bei deutlicher, diffuser Infiltration durch eosinophile Granulozyten²¹ (Grafik: Abbildung 37) lässt sich eine GvHD mit 90%iger Wahrscheinlichkeit ausschließen (vgl. Tabelle 40). Die Spezifität für

²⁰ Statistischer Nachweis für Unterschied bei GvHD – AR: Basalzellballonierung hoch signifikant (exakt: $p=0,002$; Monte Carlo-Signifikanz für 95%-Konfidenzintervall [MC95]: $p=0,000$); Epidermolyse signifikant (exakt: $p=0,032$; MC95: $p=0,000$); Lymphozyteninfiltrat BMZ signifikant (exakt: $p=0,104$; MC95: $p=0,030$)

²¹ Statistischer Nachweis für Unterschied eosinophiler Infiltration bei GvHD – AR: nicht signifikant (exakt: $p=0,113$; asymptot.: $p=0,057$; MC95: $p=0,152$)

die Diagnose Arzneireaktion liegt bei 71,4%, die Sensitivität bei 45,5% (vgl. Appendix, Tabelle 40).

Tabelle 14: Vier-Feldertafel zur Darstellung der Epidermolyse bei AR und aGvHD; Berechnung von Sensitivität und Spezifität

Epidermolyse spricht für das Vorliegen einer GvHD. Die Vier-Feldertafel diente als Grundlage für die Berechnung von Sensitivität ($p = 14/20 = 70\%$) und Spezifität. Es ist zu berücksichtigen, dass sich die Anzahl der Patienten für akute GvHD ($N = 20$) und Arzneireaktionen (hier: $N = 11$) unterscheidet. Diese berechnet sich am Beispiel Epidermolyse wie folgt: Spezifität ($p = 14/14+X$; $X = 2/11*20 \Rightarrow p = 79,4\%$); sie ist für das Kriterium Epidermolyse exemplarisch dargestellt und wurde für alle übrigen o.g. histopathologischen Kriterien in identischer Weise durchgeführt (vgl. Tabelle 40).

Epidermolyse bei aGvHD und AR im Vergleich

		Epidermolyse	
		nein	ja
		Anzahl	Anzahl
Diagnose	AR	9	2
	aGvHD	6	14
	Gesamt	15	16

Chi-Quadrat-Tests nach Pearson

		Epidermolyse
Diagnose	Chi-Quadrat	7,630
	df	1
	Sig.	,006 *

Die Ergebnisse beruhen auf den nicht leeren Zeilen und Spalten der innersten Untertabellen.

*. Die Chi-Quadrat-Statistik ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Basalzellballonierung und Epidermolyse stellten sich als aussagekräftigste histopathologische Kriterien für die Differentialdiagnose von akuter GvHD vs. Arzneireaktion heraus. Nützlich sind auch das eosinophile und lymphozytäre Infiltration.

Um die Bewertungskriterien hinsichtlich ihrer differentialdiagnostischen Aussagekraft zu ordnen, wurden zunächst zwei Rangordnungen für Spezifität und Sensitivität erstellt (vgl. Tabelle 14). Dies war die Grundlage für den erarbeiteten Score.

Die statistische Auswertung zeigte eine hochsignifikante lineare Regression sowohl zwischen der Sensitivität und den entsprechenden Rängen (vgl. Abbildung 23 und Tabelle 32) als auch zwischen der Spezifität und den zugehörigen Rängen (vgl. Abbildung 24 und Tabelle 33). Eine Linearisierung wurde daher als valide betrachtet und angewandt. Vereinfachend wurde angenommen, dass Sensitivität und Spezifität im Hinblick auf die Fragestellung von vergleichbarer Wichtigkeit sind. Daher wurden beide entsprechenden Rangwerte addiert, sodass die niedrigste Rangsumme der höchsten, die höchste Rangsumme der niedrigsten differentialdiagnostischen Aussagekraft entspricht (vgl. Tabelle 16).

Die addierten Punktwerte ergaben, dass fokale und diffuse Basalzellballonierung sowie Epidermolyse differentialdiagnostisch am aussagekräftigsten sind. Es folgen mit absteigender Bedeutung fokales und diffuses lymphozytäres sowie eosinophiles Infiltrat. Mit Ausnahme der Eosinophilen sprechen alle Parameter für das Vorliegen einer akuten GvHD.

Tabelle 15: Ordinale Kategorisierung der histopathologischen Kriterien nach Sensitivität und Spezifität

Die sechs geeignetsten histopathologischen Beurteilungskriterien wurden nach der jeweiligen Spezifität und Sensitivität (Berechnung vgl. 0 und 0) in eine Rangordnung gebracht und von 1-6 durchnummeriert (vgl. auch Appendix, , S.121)

Kategorie	Spezifität (Rang)	Kategorie	Sensitivität (Rang)
Eosinophilie, diffus	82% (1)	Fokale Basalzellballonierung	100% (1)
Subepidermale Spaltbildung (Epidermolyse)	79% (2)	Fokal Lymphozyteninfiltrat (BMZ)	95% (2)
Diffuse Basalzellballonierung	77% (3)	Diffuse Basalzellballonierung	90% (3)
Diffus Lymphozyteninfiltrat (BMZ)	67% (4)	Subepidermale Spaltbildung (Epidermolyse)	70% (4)
Fokale Basalzellballonierung	65% (5)	Diffus Lymphozyteninfiltrat (BMZ)	55% (5)
Fokal Lymphozyteninfiltrat (BMZ)	57% (6)	Eosinophilie, diffus	45% (6)

Tabelle 16: Ordinale Kategorisierung der histopathologischen Kriterien nach Relevanz

Den anhand ihrer Spezifität und Sensitivität geordneten histopathologischen Kriterien wurde je ein ganzzahliger, ordinal skaliertes Wert für Spezifität und Sensitivität zugewiesen. Diese Vereinfachung war möglich, da für alle Kriterien Linearität zwischen Sensitivität/Spezifität und dem ordinal skalierten Punktwert nachgewiesen werden konnte. Da beide Parameter als etwa gleichbedeutend für die Differentialdiagnostik erachtet werden, wurden beide Punktwerte zu einer Rangsumme addiert. Dabei entspricht der niedrigste Wert der besten (trifft auf die oberen drei Kriterien zu), der höchste Wert der geringsten differential-diagnostischen Wertigkeit innerhalb der sechs Kriterien. Am aussagekräftigsten für die Differentialdiagnostik erscheinen gleichermaßen fokale/ diffuse Basalzellballonierung und subepidermale Spaltbildung / Epidermolyse (jeweils 6 Rangsummenpunkte).

Kategorie	Rangsumme
Basalzellballonierung, fokal	6
Basalzellballonierung, diffus	6
Subepidermale Spaltbildung	6
Eosinophiles Infiltrat, diffus	7
Lymphozytäres Infiltrat (BMZ), fokal	8
Lymphozytäres Infiltrat (BMZ), diffus	9

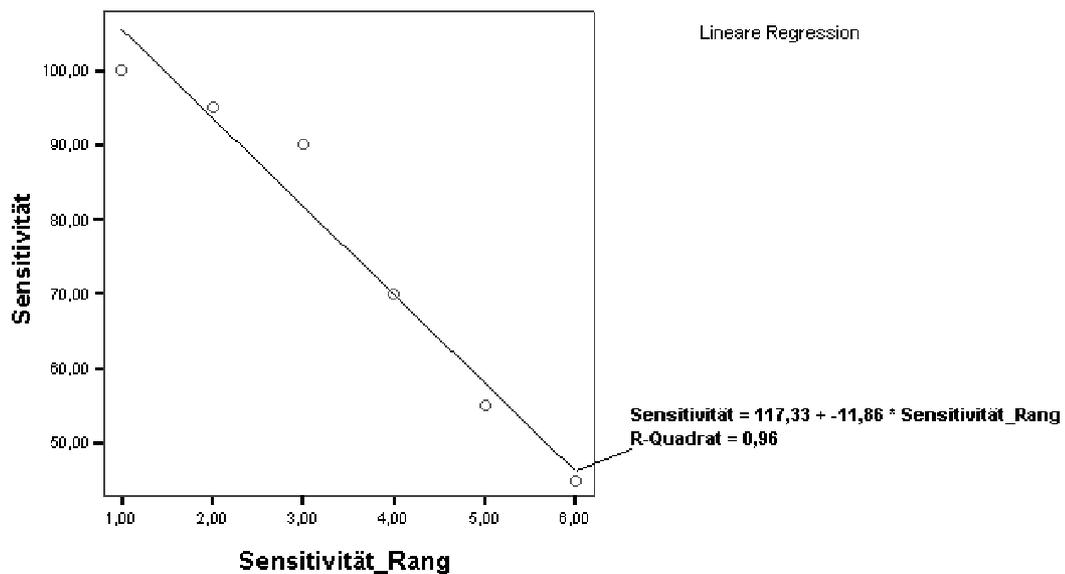


Abbildung 23: Lineare Regression zwischen Sensitivität histologischer Kriterien und Rang

Für die histopathologischen Kriterien diffuse und fokale Basalzellballonierung, diffuse und fokale lymphozytäre Infiltration, subepidermale Spaltbildung (Epidermolyse) und diffuses eosinophiles Infiltrat wurde eine Linearität zwischen der arithmetischen Sensitivität und dem ordinal ermittelten Rang innerhalb o.g. Kriterien nachgewiesen (ausführliche Statistik vgl. Tabelle 42 und Tabelle 43). Dieser Nachweis ist die Grundlage für die weitere Kalkulation anhand der ordinal skalierten, ganzzahligen Werte (Rang) und zur Erstellung von Rangsummen.

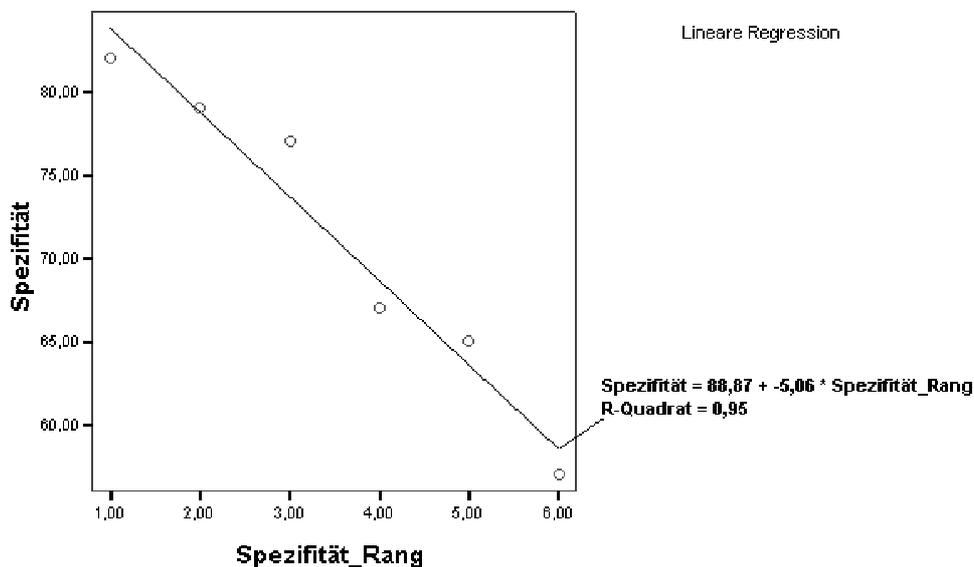


Abbildung 24: Lineare Regression zwischen Spezifität histologischer Kriterien und Rang

Für die histopathologischen Kriterien diffuse und fokale Basalzellballonierung, diffuse und fokale lymphozytäre Infiltration, subepidermale Spaltbildung (Epidermolyse) und diffuses eosinophiles Infiltrat wurde eine Linearität zwischen der arithmetischen Sensitivität und dem ordinal ermittelten Rang innerhalb o.g. Kriterien nachgewiesen (ausführliche Statistik vgl. Tabelle 42 und Tabelle 43). Dieser Nachweis ist die Grundlage für die weitere Kalkulation anhand der ordinal skalierten, ganzzahligen Werte (Rang) und zur Erstellung von Rangsummen.

3.5.2 Komplementablagerungen häufiger bei aGvHD

Komplement-, Fibrinogen- und Immunglobulinablagerungen wurden sowohl bei aGvHD als auch bei AR durch direkte Immunfluoreszenz semiquantitativ untersucht und anschließend gegenübergestellt. Dabei ergaben sich die folgenden Unterschiede:

C3-Ablagerungen in der Junktionszone sprechen für aGvHD

C3-Komplement-Ablagerungen in der Junktionszone traten bei keinem Fall von AR auf, bei aGvHD jedoch in 20% der Fälle (N=4/20; vgl. Tabelle 17). Dieser Unterschied war signifikant (asymptot. Signifikanz: $p=0,112$). Bei der kleinen Patientenzahl lag also eine 100%-ige Sensitivität vor für das Unterscheidungskriterium „C3-BMZ“ vor.

Tabelle 17: C3-Komplement-Ablagerungen in der Junktionszone spezifisch für GvHD

Die Ablagerung von Komplement 3 in der Junktionszone (BMZ) war zwar nur bei 20% der GvHD-Patienten nachweisbar, jedoch bei keinem der Patienten mit Arzneireaktionen. In der kleinen Stichprobe (N gesamt = 33) lag also eine 100%-ige Spezifität des Kriteriums vor.

Diagnose	C3 BMZ neg.	C3 BMZ leicht pos.	C3 BMZ stark pos.	Gesamtzahl
Akute GvHD	N = 16	N = 3	N = 1	N = 20
Arzneireaktion	N = 13	N = 0	N = 0	N = 13

Perivaskuläre C3- und Fibrinogenablagerungen bei GvHD stärker

Eine starke perivaskuläre C3-Ablagerung lag ebenfalls nur bei GvHD vor (N=2/20). Eine Korrelationsanalyse für akute GvHD zeigte, dass dermale Immunglobulin- und C3/4-Ablagerungen deutlich untereinander sowie mit junktionalen und perivaskulären Fibrinogenablagerungen und mit dermale IgM korrelierten (vgl. Tabelle 35). Zudem fand sich ein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen Ablagerungen in der Dermis (IgE) und der Basalmembranzzone (IgM).

Tabelle 18: Ausgeprägte perivaskuläre C3-Komplement-Ablagerungen sprechen für GvHD

Die Ablagerung von C3 in der Junktionszone (BMZ) war bei 20% der GvHD-Patienten nachweisbar (davon 50% stark), in der Dermis lag nur in einem Fall starke C3-Ablagerung vor. Bei Arzneireaktionen lag maximal leichte C3-Ablagerung vor. Bei kleiner Stichprobe (N ges.=31) waren starke C3-Ablagerungen also 100%-ig spezifisch für GvHD.

Diagnose	C3 negativ		C3 leicht pos.		C3 stark pos.		Gesamtzahl	
	Perivask.	Dermal	periv.	dermal	periv.	dermal	periv.	dermal
aGvHD	N = 16	N = 19	N = 2	N = 0	N = 2	N = 1	N = 20	N = 20
AR	N = 11	N = 12	N = 2	N = 1	N = 0	N = 0	N = 13	N = 13

3.5.3 Immunhistochemische Unterscheidungskriterien

Im Vergleich zwischen aGvHD und AR sprach die Präsenz vieler PDC, CCR-7⁺ DC und CD209⁺ unreifen DC, epidermotropen TLC (v.a. Memory-TLC) und epidermotropen APC/Makrophagen für das Vorliegen einer akuten GvHD, während epidermale Langerhans Zellen (LC), CD1a⁺ reife DC/LC und CD34⁺ fibroblastenartige Stammzellen häufiger bei Arzneiexanthenen vorkamen.

Zur Prüfung der differentialdiagnostische Aussagekraft aller zellulären immunhistochemischen Marker, die in der Analyse einen statistischen Unterschied zwischen akuter GvHD und Arzneiexanthenen zeigten, wurden Spezifität und Sensitivität bestimmt.

Für die Anzahl an Zellen, welche die folgenden Antigene tragen, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen aGvHD und AR: CD1a (reife / aktivierte DC), CD2 (TLC), CD34 (Stammzellen u.a.), CD45RO (Memory-TLC), CD68 (APC, v.a. Makrophagen)²². Ein Trend ließ sich für die Anzahl an CD197⁺ aktivierten DC, Langerhans Zellen (CD207⁺) und CD209⁺ unreifen DC zeigen²³:

Eine ausgeprägte subepidermale Infiltration durch PDC (BDCA-2⁺) zeigte sich ausschließlich bei Patienten mit GvHD (N=3/20). Für den Migrationsmarker CD197, der auf aktivierten DC exprimiert wird, ergab sich im Rahmen der Standardanalyse kein signifikanter Unterschied zwischen GvHD und AR. Modifiziert man die Analyse dahingehend, dass geringe Infiltration bis 5 Zellen pro Beobachtungsfeld eine einzige Kategorie bilden, ergibt sich ein signifikanter Unterschied für CCR-7 positive Dendritische Zellen (p=0,77²⁴). Diese Zellen finden sich häufiger in akuter Graft versus Host Disease.

Epidermale Infiltration durch T-Lymphozyten (CD2⁺), insbesondere nach Antigenkontakt (CD45RO⁺), trat signifikant häufiger bei GvHD-Patienten auf²⁵. Epidermale Makrophagen (CD68⁺) waren mit einer Spezifität von ca. 89% und einer Sensitivität von ca. 63% hochsignifikant häufiger bei GvHD²⁶. Makrophagen traten in deutlich höherer Zahl auf als plasmazytoide Dendritische Zellen. Es gab einen Fall akuter GvHD mit epidermaler Infiltration durch CD209⁺ unreife Dendritische Zellen. In den übrigen Fällen lag die Infiltration subepidermal vor und war bei akuter GvHD tendenziell stärker als bei Arzneireaktionen.

²² Statistischer Nachweis für Unterschiede zwischen aGvHD und AR bezüglich der Antikörperexpression: CCR-7 gesamt nicht signifikant (exakt: p=0,128; Monte Carlo Approximation bei 95%-Konfidenzintervall [MC95]: p=0,061), CD207 epidermal nicht signifikant (exakt: p=0,147; MC95: p=0,212), CD1a gesamt signifikant (exakt: p=0,063; MC95: p=0,030), CD2 epidermal signifikant (exakt: p=0,018; MC95: p=0,000), CD34 supepidermal/gesamt hochsignifikant (exakt: p=0,049; MC95: p=0,000), CD45RO epidermal hochsignifikant (exakt: p=0,025; MC95:p=0,000), CD68 epidermal hochsignifikant (exakt: p=0,070; MC95: p=0,000), CD209 nicht signifikant (exakt: p=0,147; MC95: p=0,121)

²³ Statistischer Nachweis für Unterschiede zwischen aGvHD und AR bezüglich der Antikörperexpression: CCR-7 gesamt nicht signifikant (exakt: p=0,128; Monte Carlo Approximation bei 95%-Konfidenzintervall [MC95]: p=0,061), CD207 epidermal nicht signifikant (exakt: p=0,147; MC95: p=0,212), CD1a gesamt signifikant (exakt: p=0,063; MC95: p=0,030), CD2 epidermal signifikant (exakt: p=0,018; MC95: p=0,000), CD34 supepidermal/gesamt hochsignifikant (exakt: p=0,049; MC95: p=0,000), CD45RO epidermal hochsignifikant (exakt: p=0,025; MC95:p=0,000), CD68 epidermal hochsignifikant (exakt: p=0,070; MC95: p=0,000), CD209 nicht signifikant (exakt: p=0,147; MC95: p=0,121)

²⁴ Für die Analyse wurde die Infiltration vereinfachend in zwei Kategorien eingeteilt: (1) 0-4 Zellen/mm²; (2) mind. 5 Zellen/mm². Die Vergleichsanalyse zwischen AR und aGvHD bzgl. Der Kriterien 1 und 2 ergab eine signifikant häufigere Infiltration durch CCR-7-positive Zellen bei akuter GvHD. N(aGvHD)=19, N(AR)=13; N(ges)=32; Rangsumme (aGvHD)=353,50; Rangsumme (AR)=174,50; Mann-Whitney-U: 83,500; Wilcoxon-W: 174,500; Z: -1,771; Sg (asymptot.): 0,077; Sg (exakt, 2-seitig): 0,126

²⁵ Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Statistik: vgl. Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27

²⁶ Berechnung Spezifität: $Sp=N(GvHD^+)/N(GvHD^++X)$; $X=N(AR^+)*N(GvHD)/N(AR)$; $S=12/(12+1*19/13)$; Berechnung Sensitivität: $Se=N(GvHD^+)/N(GvHD)=13/19$

CD207⁺ Langerhans Zellen und epidermal lokalisierte CD1a⁺ Dendritische Zellen waren in höheren Mengen signifikant häufiger bei akutem Arzneiexanthem zu finden, ebenso wie dermal gelegene CD34⁺ Stammzellen mit vorwiegend fibroblastärem Aspekt²⁷.

Ziel war es, auf Basis dieser Werte einen differentialdiagnostisch hilfreichen Score zu entwickeln. Hierfür war es nötig, für jedes betrachtete Kriterium bzw. die jeweiligen Zellzahlen einen geeigneten Grenzwert / Cut-Off zu finden, der eine dichotome Analyse ermöglicht. Es wurden diejenigen Cut-Off's ausgewählt, welche die höchste Sensitivität und Spezifität lieferten (vgl. Tabelle 19). Sensitivität und Spezifität waren als Gütekriterien für die klinische Relevanz der immunhistochemischen Parameter ausschlaggebend für die spätere Erstellung des DSHIG Score (vgl. Tabelle 22).

Memory-TLC, TLC und CD68⁺ APC/Makrophagen hinweisend auf aGvHD

Analog zu den histopathologischen wurden auch die immunhistochemischen Parameter genauer hinsichtlich Spezifität und Sensitivität analysiert und kategorisiert (vgl. Tabelle 19 und Tabelle 20).

Die statistische Auswertung zeigte eine hochsignifikante lineare Regression sowohl zwischen der Spezifität und den zugehörigen Rängen als auch zwischen der Sensitivität und den entsprechenden Rängen²⁸.

Die Linearisierung wird daher als valide betrachtet und analog zum Vorgehen in der histopathologischen Analyse in der Folge angewandt. Vereinfachend wird wie zuvor angenommen, dass Sensitivität und Spezifität im Hinblick auf die Fragestellung von vergleichbarer Wichtigkeit sind. Daher werden beide entsprechenden Rangwerte addiert, sodass die niedrigste Rangsumme der höchsten, die höchste Rangsumme der niedrigsten differentialdiagnostischen Aussagekraft entspricht (vgl. Tabelle 21).

Als bestes differentialdiagnostisches Kriterium auf Basis der Immunhistochemie dient somit die Anzahl epidermal infiltrierender Memory-TLC (CD45RO⁺; vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27), gefolgt von der Anzahl an TLC (CD2⁺; vgl. Abbildung 25) und CD68⁺ APC / Makrophagen in der Epidermis.

Von geringerem differentialdiagnostischen Stellenwert sind zu nennen: Hohe Zahlen an dermal gelegenen BDCA-2⁺ plasmazytoiden und CCR-7⁺ aktivierte Dendritischen Zellen sowie Mangel an CD1a⁺ und CD207⁺ Langerhans Zellen in der Epidermis und an dermalen CD34⁺ Zellen. Alle genannten Parameter sprechen in der angegebenen Richtung für eine akute GvHD im Vergleich zum Arzneiexanthem.

Die Anzahl an Memory-TLC, TLC und CD68⁺ APC (v.a. Makrophagen) sind daher die besten immunhistochemischen Kriterien für die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen akuter GvHD und AR.

²⁷ Immunhistochemische Färbungen: vgl. auch Paraffinschnitt 18 S.52 und Paraffinschnitt 17, S.52; Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Statistik: vgl. auch Abbildung 28 und Abbildung 29

²⁸ Zur Analyse der Spezifität vgl. Abbildung 32, Abbildung 31 sowie Tabelle 33 und Tabelle 34; zur Analyse der Sensitivität vgl. Abbildung 23 und Tabelle 32

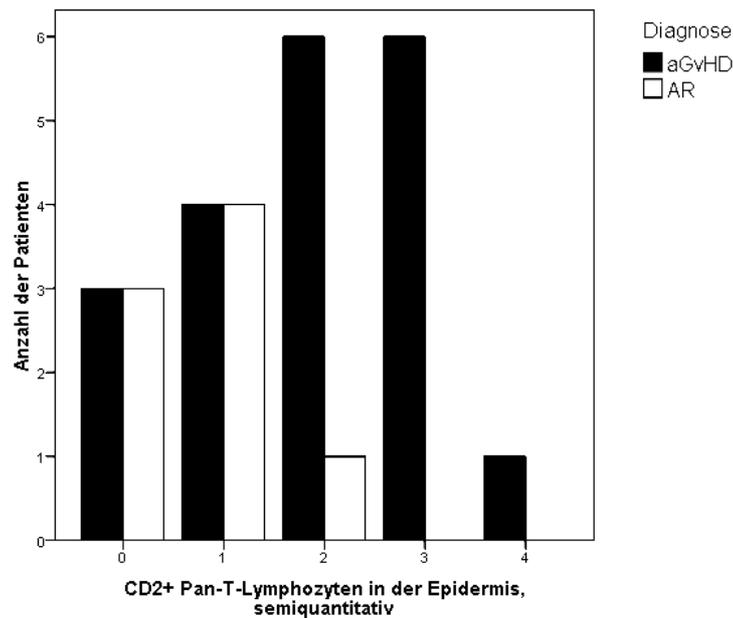


Abbildung 25: Epidermale Infiltration durch CD2⁺ TLC bei akuter GvHD stärker

Aufgetragen ist die Anzahl der Patienten (Y-Achse) mit akuter GvHD (blau) bzw. Arzneireaktion (grün) nach der Stärke der epidermalen Infiltration durch CD2⁺ T-Lymphozyten (immunhistochem. Nachweis) anhand semiquantitativer Bewertung (X-Achse). Es zeigt sich, dass hohe Zahlen epidermotroper TLC (Infiltrationsstärke mind. 20 Zellen/mm² entspricht Kategorie 3) nur bei akuter GvHD vorkommen, während ca. 90% der Patienten mit AR lediglich geringe (0-4 Zellen/mm², entspricht Kategorien 1 und 2) Infiltration aufweisen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant.

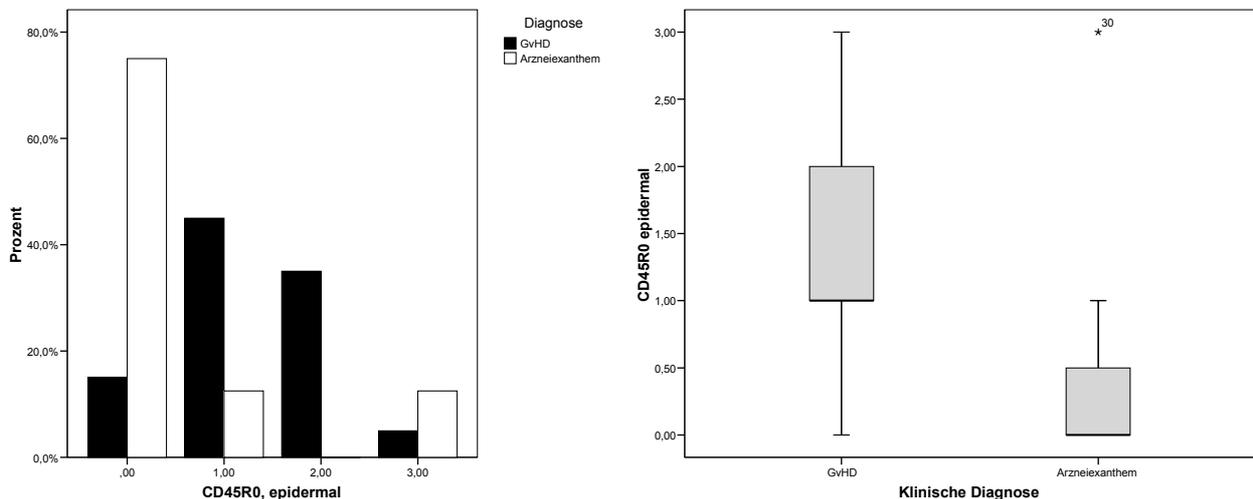


Abbildung 26: Stärkeres Infiltrat durch CD45RO⁺ Memory-TLC bei akuter GvHD

Balkendarstellung (links): Bei geringer Infiltration (X-Achse: Anzahl CD45RO⁺ T-Zellen, semiquantitativ) überwiegen Arzneiexantheme der GvHD bei Weitem (Y-Achse: Patientenanzahl in % aller Arzneiexanthem- bzw. GvHD-Patienten) und umgekehrt. Boxplot (rechts): Die Infiltrationsstärke ist bei GvHD mit einem Medianwert von 1 deutlich stärker ausgeprägt als bei Arzneiexanthenen (Median 0).

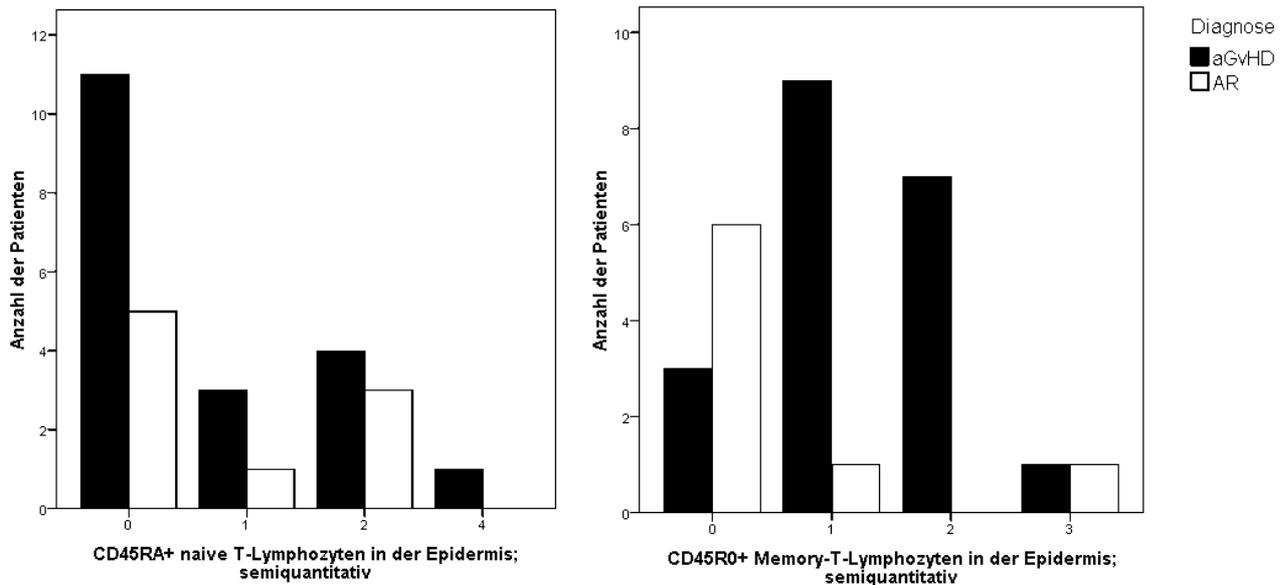


Abbildung 27: Memory-TLC als dominierender T-Zell-Typ bei akuter GvHD

Die epidermalen Infiltration durch TLC ist bei aGvHD signifikant stärker ausgeprägt als bei AR (vgl. Abbildung 25). Die Gegenüberstellung gilt der Beantwortung der Frage, um welchen Subtyp von TLC es sich hierbei vorwiegend handelt.

Links: Dargestellt ist die Anzahl der Patienten (Y-Achse) mit CD45RA⁺ naiven T-Lymphozyten in der Epidermis (X-Achse: Zellzahl semiquantitativ) im Vergleich zwischen GvHD (blau) und Arzneireaktionen (grün). Es zeigt sich eine tendenziell stärkere Infiltration durch naive TLC bei Arzneiexanthenen; dies ist statistisch nicht signifikant.

Rechts: Die Grafik zeigt die Anzahl an Patienten (Y-Achse) CD45RO⁺ Memory-T-Lymphozyten in der Epidermis (X-Achse: Zellzahl semiquantitativ) im Vergleich zwischen GvHD (blau) und Arzneireaktionen (grün). Memory-TLC kommen bei GvHD in deutlich und signifikant höherer Zahl vor (vgl. rechts), so dass diese als dominierende T-Zell-Subgruppe gewertet werden.

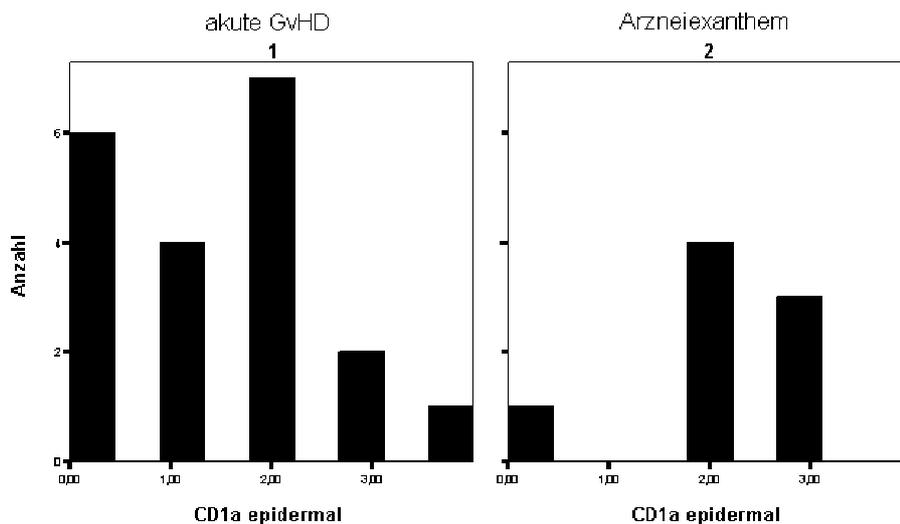


Abbildung 28: Geringere CD1a-Expression auf epidermalen DC bei akuter GvHD

Die CD1a-Expression (X-Achse: Anzahl der CD1a⁺ DC, semiquantitativ) ist bei akuter GvHD (links) in 50% der Fälle (Y-Achse: Anzahl der Patienten; N(0;1)= 10/20) gering ausgeprägt (Kategorie 0 oder 1, entspricht 0-4 Zellen/mm²), während bei akuten Arzneiexanthenen (rechts) in der Regel (N=10/11) eine deutliche Infiltration (mind. 5 Zellen/mm²) vorliegt. Dieser Unterschied ist signifikant.

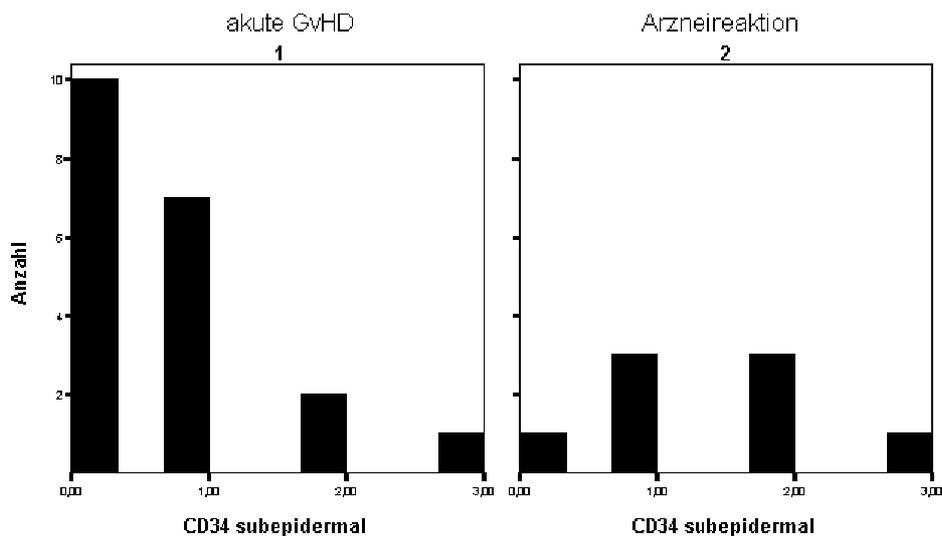


Abbildung 29: Stärkere subepidermale CD34-Expression bei Arzneiexanthenen

Die CD34-Expression auf dermalen Stammzellen war bei GvHD (links) signifikant geringer als beim Arzneiexanthem (rechts). Eine Infiltration durch mindestens fünf Zellen lag bei 15% der Patienten mit akuter GvHD und bei 50% der Patienten mit Arzneiexanthem vor.

Tabelle 19: Infiltration durch TLC, hämatopoietische Stammzellen und verschiedene APC als Unterscheidungskriterien zwischen GvHD und Arzneireaktionen

Die Tabelle gibt eine Übersicht über alle immunhistochemischen Kriterien, welche einen signifikanten Unterschied zwischen GvHD und Arzneiexanthenen erbrachten. Sensitivität und Spezifität sind jeweils in Abhängigkeit von dem Cut-Off bezüglich der Zellzahl angegeben. Ein Beispiel: Bei einem Patienten findet man 15 CD2-positive rundliche Zellen / mm². Bei dem gewählten Cut-Off von 20 Zellen spräche dies eher gegen eine akute GvHD (Wahrscheinlichkeit: 65% = 100%-35%). Bei einem anderen Patienten lassen sich 30 dieser Zellen / mm² nachweisen. Das spricht mit 100%-iger Wahrscheinlichkeit (Spezifität = 100%) für das Vorliegen einer akuten GvHD. Sensitivität und Spezifität sind wichtige Bewertungskriterien für den klinischen Wert der einzelnen Immunhistochemischen Kriterien. Die vielversprechendsten Kriterien stellen die Basis für den DSHIG Score dar (vgl. S.79).

Zelltyp	Antikörper	Lage	Cut-Off Zellen/mm ²	Sensitivität	Spezifität	Spricht für
TLC (pan-)	CD2	Epidermal	≥ 20	35%	100%	AGvHD
Memory-TLC	CD45RO	Epidermal	≥ 1	40%	76%	AGvHD
APC, v.a. Langerhans Zellen	CD1a	Epidermal	≥ 5	88%	64%	AR
			≥ 20	38%	71%	
Langerhans Zellen	CD207	Epidermal	≥ 5	77%	61%	AR
			≥ 20	38%	66%	
Hämatopoetische Stammzellen	CD34	Insgesamt	≥ 1	88%	64%	AR
			≥ 5	50%	77%	
			≥ 20	13%	71%	
APC, v.a. MPh	CD68	Epidermal	≥ 1	65%	84%	AGvHD
PDC	BDCA-2	Dermal	≥ 20	15%	100%	AGvHD
APC, DC	CCR-7	Insgesamt	≥ 1	90%	54%	AGvHD
			≥ 5	60%	66%	
			≥ 20	15%	66%	

Tabelle 20: Ordinale Kategorisierung der immunhistochemischen Kriterien zur Unterscheidung von GvHD und AR nach Sensitivität und Spezifität

Analog zur Histopathologie (vgl. S. 65 ff) wurde auch für die immunhistochemischen Kriterien eine Rangordnung anhand der Sensitivität und Spezifität erstellt (GvHD: N=20; AR: N=13; vgl. Abbildung 31, Abbildung 32 und Tabelle 33 u. Tabelle 21). (*) Um dem Sprung zwischen 84% und 100% Rechnung zu tragen (vgl. Abbildung 32, Abbildung 31 und Tabelle 21) wurde in diesem Fall von der Ordinalskalierung abgewichen und die Rangnummern von „2“ bis „3“ ausgesetzt.

Kategorie	Rang (Spezifität)	Kategorie	Rang (Sensitivität)
Epidermal CD2 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	1* (100%)	CCR-7 ⁺ gesamt Cut-off > 0 Zellen	1 (90%)
Subepidermal BDCA-2 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	1* (100%)	Epidermal CD1a ⁺ Cut-off > 4 Zellen	2 (88%)
Epidermal CD2 ⁺ Cut-off > 4 Zellen	4 (84%)	Subepidermal CD34 ⁺ Cut-off > 0 Zellen	2 (88%)
Epidermal CD68 ⁺ Cut-off > 0 Zellen	4 (84%)	Epidermal CD45RO ⁺ Cut-off > 0 Zellen	3 (85%)
Epidermal CD45RO ⁺ Cut-off > 0 Zellen	5 (77%)	Epidermal CD207 ⁺ Cut-off > 4 Zellen	4 (77%)
Subepidermal CD34 ⁺ Cut-off > 4 Zellen	5 (77%)	Epidermal CD2 ⁺ Cut-off > 4 Zellen	5 (65%)
Epidermal CD45RO ⁺ Cut-off > 4 Zellen	6 (76%)	Epidermal CD68 ⁺ Cut-off > 0 Zellen	5 (65%)
Epidermal CD1a ⁺ Cut-off > 19 Zellen	7 (71%)	CCR-7 ⁺ gesamt Cut-off > 4 Zellen	6 (60%)
Subepidermal CD34 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	7 (71%)	Subepidermal CD34 ⁺ Cut-off > 4 Zellen	7 (50%)
Epidermal CD207 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	8 (66%)	Epidermal CD45RO ⁺ Cut-off > 4 Zellen	8 (40%)
CCR-7 ⁺ gesamt Cut-off > 4 Zelle	8 (66%)	Epidermal CD207 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	9 (38%)
CCR-7 ⁺ gesamt Cut-off > 19 Zellen	8 (66%)	Epidermal CD1a ⁺ Cut-off > 19 Zellen	9 (38%)
Epidermal CD1a ⁺ Cut-off > 4 Zellen	9 (64%)	Epidermal CD2 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	10 (35%)
Subepidermal CD34 ⁺ Cut-off > 0 Zellen	9 (64%)	Subepidermal BDCA-2 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	11 (15%)
Epidermal CD207 ⁺ Cut-off > 4 Zellen	10 (61%)	CCR-7 ⁺ gesamt Cut-off > 19 Zellen	11 (15%)
CCR-7 ⁺ gesamt Cut-off > 0 Zellen	11 (54%)	Subepidermal CD34 ⁺ Cut-off > 19 Zellen	12 (13%)

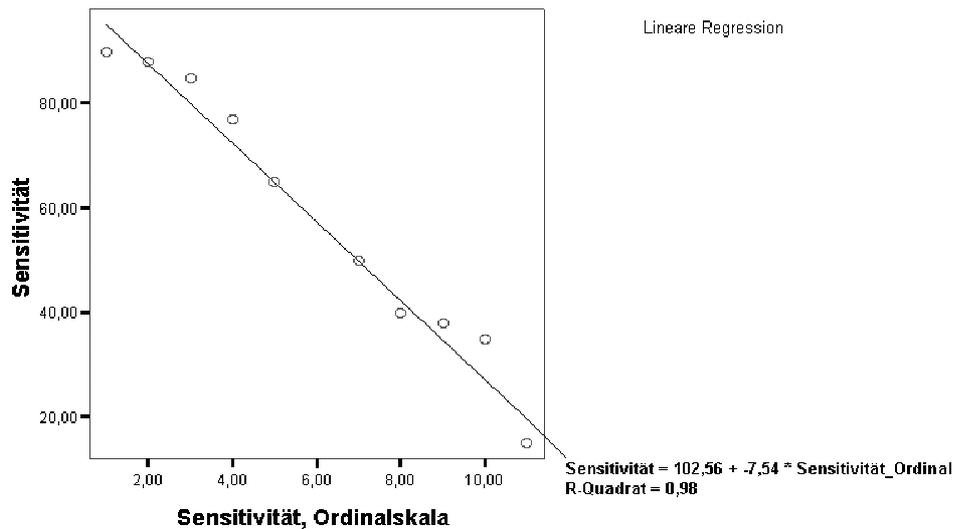


Abbildung 30: Regression der Sensitivität immunhistochemischer Parameter u. deren Rang

Analog zu den histopathologischen Kriterien wurde auch für die differentialdiagnostisch vielversprechendsten immunhistochemischen Parameter eine Rangliste anhand der jeweiligen Sensitivität des Kriteriums (Y-Achse) erstellt. Diese basiert auf einer ganzzahligen, stetigen Ordinalskala (X-Achse). Die Darstellung belegt grafisch die Linearität von Ordinalskala und Sensitivität (statistisch hoch signifikant; rechnerischer Nachweis: ANOVA-Test). Dieser Nachweis wurde geführt, um in der Folge vereinfachend den ordinalen Rang für die Rangsummenbildung zu verwenden.

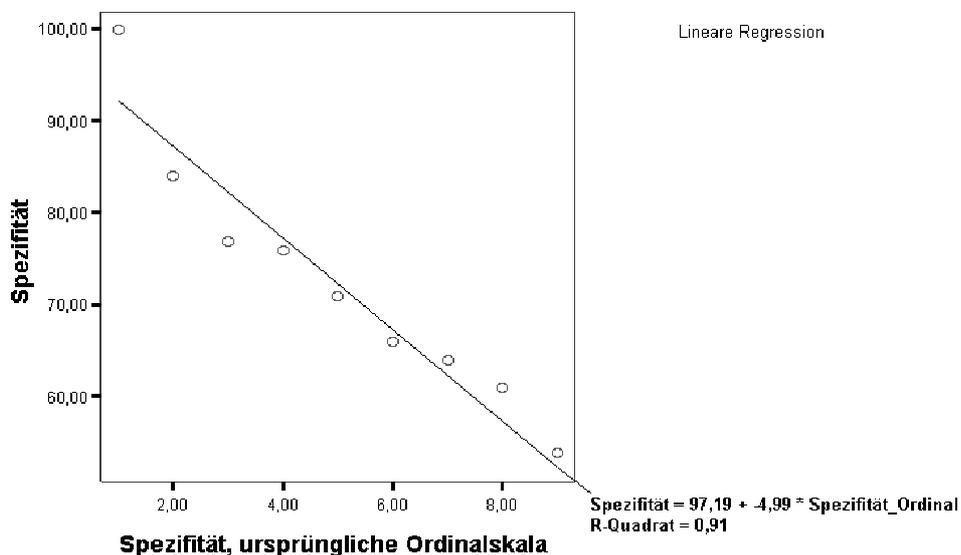


Abbildung 31: Regression der Spezifität immunhistochemischer Parameter u. deren Rang

Für die Spezifität der aussagekräftigsten immunhistochemischen Kriterien wurde analog zur Sensitivität eine Rangliste erstellt, die einer ganzzahligen, stetigen Ordinalskala entspricht. Die Darstellung zeigt ein Punktediagramm, das die empirisch gewählte Ordinalskala (X-Achse) gegen die Spezifität (Y-Achse) darstellt und der grafischen Darstellung der Linearität dient. Hierbei fiel auf, dass sich bis auf einen Ausreißer bei 100% Spezifität (entsprechend Ordinalwert 1) alle Wertepaare bei geringer Fehlerwahrscheinlichkeit (ANOVA-Test für lineare Regression hochsignifikant) linear darstellen. Um dem Ausreißer gerecht zu werden, wurde die Skala erweitert und in eine nicht stetige Ordinalskala (mit Lücke bei 2 und 3) überführt (vgl. hierzu Abbildung 32).

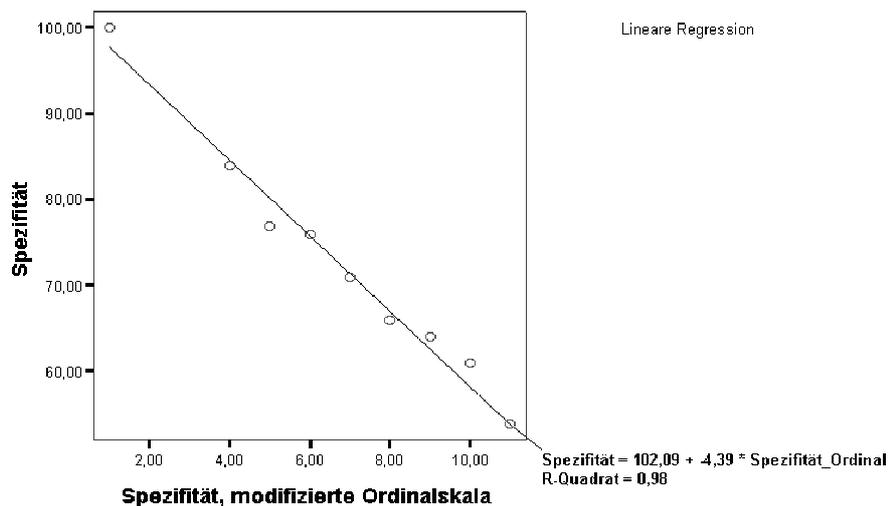


Abbildung 32: Regression der Spezifität verschiedener immunhistochemischer Parameter und deren jeweiliger Rangordnung, modifizierte Ordinalskala (Lücke bei 2 u. 3)

Zur Validierung der Überführung der Spezifitätswerte der relevanten immunhistochemischen Parameter (Y-Achse) in eine empirisch gewählte ganzzahlige Ordinalskala (X-Achse) wurde die lineare Regression geprüft und grafisch dargestellt (vgl. Abbildung 31). Um dem Ausreißer (Spezifität 100%, Ordinalwert 1) in der stetigen Ordinalskala gerecht zu werden, wurde diese erweitert und in eine nicht stetige Ordinalskala (mit Lücke bei 2 und 3) überführt. Letztere ist hier dargestellt; es zeigt sich nun eine statistisch deutlich gebesserte Linearität (Nachweis: ANOVA-Test). Die somit validierten modifizierten Ordinalwerte wurden in der Folge für die Ransummenbildung verwendet.

Tabelle 21: Ordinale Skalierung der immunhistochemischen Kriterien nach Relevanz

In Analogie zu den histopathologischen Kriterien (vgl. S.65 ff) wurde auch für die immunhistochemischen Parameter eine ordinale Kategorisierung für Sensitivität und Spezifität durchgeführt und diese (vorab linearisierten) ganzzahligen Punktwerte anschließend addiert. Das Ergebnis ist in obiger Tabelle dargestellt. Der niedrigste Punktwert entspricht der höchsten, der höchste Punktwert der niedrigsten differentialdiagnostischen Aussagekraft. Da die unterschiedlichen Cut-off's in die Auswertung einbezogen waren, wurde sekundär der jeweils günstigste Cut-off (mit dem niedrigsten Summenwert) ausgewählt und die übrigen grau unterlegt.

Kategorie	Rangsumme
Epidermal CD45RO ⁺ , Cut-off > 0 Zelle	8
Epidermal CD2 ⁺ , Cut-off > 4 Zellen	9
Epidermal CD68 ⁺ , Cut-off > 0 Zelle	9
Epidermal CD2 ⁺ , Cut-off > 19 Zellen	11
Epidermal CD1a ⁺ , Cut-off > 4 Zellen	11
Subepidermal CD34 ⁺ , Cut-off > 0 Zelle	11
Subepidermal BDCA-2 ⁺ , Cut-off > 19 Zellen	12
CCR-7 ⁺ gesamt, Cut-off > 0 Zelle	12
Subepidermal CD34 ⁺ , Cut-off > 4 Zellen	12
CCR-7 ⁺ gesamt, Cut-off > 0 Zelle	12
Epidermal CD45RO ⁺ , Cut-off > 4 Zellen	14
Epidermal CD207 ⁺ , Cut-off > 4 Zellen	14
Epidermal CD1a ⁺ , Cut-off > 19 Zellen	16
Epidermal CD207 ⁺ , Cut-off > 19 Zellen	17
Subepidermal CD34 ⁺ , Cut-off > 19 Zellen	19
CCR-7 ⁺ gesamt, Cut-off > 19 Zellen	19

Die jeweils weniger aussagekräftigen Cut-off's der Kriterien wurden grau unterlegt.

3.5.4 Differentialdiagnose von aGvHD und AR mittels histopathologischen und immunhistochemischen Kriterien: der DSHIG Score

Zur Abgrenzung von aGvHD und AR wurde auf der Basis der beschriebenen Daten ein neuer Score entwickelt (vgl. Tabelle 22²⁹), der die aussagekräftigsten vier histopathologischen (vgl. S.65ff) und drei immunhistochemischen Kriterien zu integriert. Dieser wurde als „**D**ifferentialdiagnostischer **S**core mittels **H**istopathologie und **I**mmunhistochemie für akute **G**raft versus Host Disease“ (DSHIG) bezeichnet.

Dieser retrospektiv entwickelte Score ist einzigartig darin, dass er auf klar definierten, untersucherunabhängigen Kriterien besteht und mit einer hohen Sensitivität und Spezifität die Unterscheidung zwischen aGvHD und AR ermöglicht.

Die Berechnung des DSHIG Scores kann Punktwerte zwischen 0 und 7 ergeben. Die nähere Betrachtung der Verteilung der DSHIG-Punktwerte bei beiden Patientengruppen legte es nahe, den differentialdiagnostischen Cut-off zwischen 3 und 4 Punkten zu wählen: Bei einer Punktsomme ≥ 4 ist von einer aGvHD auszugehen, während bei einer Punktsomme ≤ 3 der Verdacht auf AR begründet ist. Retrospektiv ergeben sich sowohl für die Diagnose „Akute GvHD“ als auch für die Diagnose „Arzneiexanthem“ eine Testsensitivität von 95% und Testspezifität von ca. 92%.

Zusammenfassend wird der DSHIG als differentialdiagnostischer Test, basierend auf Histopathologie und Immunhistochemie, vorgeschlagen. Die Testsensitivität für die Differentialdiagnosen „Akute GvHD“ und „Akutes Arzneiexanthem“ liegt bei 95%, die Testspezifität bei ca. 92%. Der Test wurde retrospektiv entwickelt, auch war die Patientengruppe vergleichsweise klein. Eine prospektive Testvalidierung ist daher anzustreben. Sollte diese die hohe Testsensitivität und –spezifität bestätigen, wäre der DSHIG ein äußerst hilfreiches Instrument für die bislang sehr schwierige Differenzierung zwischen AR und aGvHD.

²⁹ Statistischer Nachweis für Unterschied GvHD – AR bzgl. DSHIG: (Sg=0,000; mittlerer Rang für GvHD: 18,20; mittlerer Rang für Arzneiexanthem: 5,25)

Tabelle 22: Differentialdiagnostischer Score basierend auf Histopathologie und Immunhistochemie (DSHIG)

Anhand der Ergebnisse von immunhistochemischer und histopathologischer Auswertung wurden die aussagekräftigsten Kriterien für die Differentialdiagnostik von akuter GvHD und Arzneiexanthenen herausgearbeitet und der DSHIG (Differentialdiagnostischer Score basierend auf Histopathologie und Immunhistochemie) als integrativer Score erarbeitet. Die Bewertung der Kriterien ist dichotom und dadurch anwenderfreundlich, durch die eindeutigen Definitionen ist der Score reproduzierbar und untersucherunabhängig gestaltet.

Differentialdiagnostische Kriterien		Punkte
Histopathologische Kriterien	Basalzellballonierung, fokal	⊙ ⊙
	Basalzellballonierung, diffus	⊙ ⊙
	Subepidermale Spaltbildung	⊙ ⊙
	Kein diffuses eosinophiles Infiltrat	⊙ ⊙
Immunhistochemische Kriterien	CD45RO ⁺ , epidermal, mind. 1 Zelle	⊙ ⊙
	CD2 ⁺ , epidermal, mind. 5 Zellen	⊙ ⊙
	CD68 ⁺ , epidermal, mind. 1 Zelle	⊙ ⊙
Gesamtscore	Skala: 0 – 7	Punktwert: ____

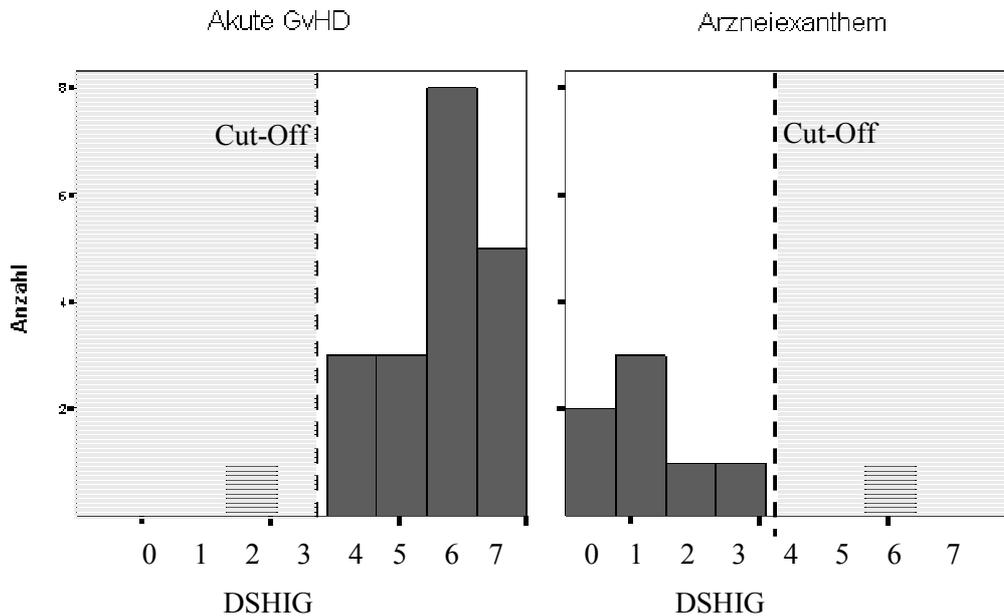


Abbildung 33: Retrospektive Cut-Off-Definition für den DSHIG-Score

Der differentialdiagnostische DSHIG Score zur histopathologischen und immunhistochemischen Differentialdiagnostik von akuter GvHD und Arzneiexanthenen wurde anhand der Ergebnisse dieser Arbeit retrospektiv erstellt. Die Daten versprechen bei einem Cut-Off zwischen 3 und 4 (Ausreißer jeweils grau unterlegt) eine Testsensitivität von 95% und – spezifität von ca. 92% (Berechnung korrigiert um unterschiedliche Fallzahlen für GvHD und Arzneiexantheme: $p = 19 / (19 + X)$; $X = 1 / 11 * 20$).

4 DISKUSSION

Die Differentialdiagnostik von akuter GvHD und akutem Arzneiexanthem ist ein klinisch relevantes Problem, für das er bisher keine allgemein akzeptierte Leitlinie gibt. Den Standard für die Festlegung des klinischen Schweregrads von akuter GvHD stellt der Glucksberg-Score (Bewertung anhand von Klinik / Organbefall) [31] dar. Die histopathologischen Befunde werden vorwiegend nach Lerner [49] klassifiziert.

Ziel der Arbeit war es, die Bewertung des klinischen Schweregrads für die dermatologische Verlaufskontrolle zu adaptieren (GvHSc), ein untersucherunabhängiges histologisches Bewertungssystem mit klar definierten Kriterien zu entwickeln (GvHiScore) und ein differentialdiagnostisches Bewertungssystem zur Unterscheidung von GvHD und Arzneireaktionen, basierend auf Histologie und Immunhistochemie, zu entwickeln (DSHIG).

Zwanzig Patienten mit klinisch gesicherter akuter GvHD (Erstmanifestation maximal 100 Tage nach Transplantation) nach allogener Knochenmarks- oder Blutstammzelltransplantation und 13 Patienten mit klinisch verifiziertem akutem Arzneiexanthem wurden in die Studie aufgenommen und nach dem Glucksberg- sowie dem klinischen GvHSc klassifiziert. Zusätzlich wurden Hautproben entnommen und histopathologisch sowie immunhistochemisch analysiert. Klinische und histologische Ergebnisse wurden einzeln analysiert und miteinander korreliert.

Der klinische GvHSc war in seiner prognostischen Aussagekraft, gemessen am Ein-Jahres-Überleben der Patienten, der Glucksberg-Klassifikation vergleichbar, bietet jedoch durch die Standardisierung und die hundertteilige Skala Vorteile bezüglich der individuellen Verlaufskontrolle. Als histologische Kriterien korrelierten epidermotrope lymphozytäre Infiltration, dermale Erythrozytenextravasate und Kontinuitätsverluste der Basalmembran am deutlichsten mit dem klinischen Schweregrad. Differentialdiagnostisch waren die histopathologischen Parameter Epidermolyse, Basalzellballonierung, junktionales lymphozytäres Infiltrat und eosinophiles Infiltrat, immunhistochemisch die Expression von CD1a, CD2, CD34, CD45RO, CD68, CD197 und CD207 am bedeutendsten.

Die akute GvHD mit IgG-/IgM-Ablagerungen im Sinne eines positiven Lupusbandes und einer Interface Dermatitis stellt eine klinisch bedeutsame Subgruppe dar. Diese zeigt eine besonders ausgeprägte Epidermolyse, das histologische Korrelat für Bläschenbildung. Diese klinische Manifestation ist sowohl für LE als auch für die schwere akute GvHD typisch. Die Prädominanz naiver T-Lymphozyten lässt eine frühe Phase der GvHD vermuten. IDEC und naive T-Lymphozyten sowie regulatorische T-Zellen scheinen kommen in dieser Subgruppe häufig vor.

Die Zellzahl an Mastzellen sowie CD206⁺ und CD11c⁺ DC (v.a. IDEC) zeigte eine positive Korrelation mit dem Ein-Jahres-Überleben bei aGvHD. Hohe Zahlen PDC (BDCA-2⁺) kamen bei ca. 15% der Fälle akuter GvHD vor und wiesen wie IDEC eine günstige Korrelation mit dem Ein-Jahres-Überleben und dem klinischen Schweregrad auf.

Aufgrund der Ergebnisse wird eine Modifikation des histologischen Gradings nach Lerner (GvHiScore) vorgeschlagen: Als Multiplikatoren dienen das lymphozytäre Infiltrat und die Diskontinuität der Basalmembran. Der GvHiScore zeigt eine deutlich bessere Korrelation mit dem klinischen Schweregrad. Ballonierung, Vakuolisierung und Apoptose von Keratinozyten werden als Vorstufe von Epidermolyse und Atrophie der Epidermis betrachtet. Basalzellballonierung und Epidermolyse erwiesen sich hierbei als aussagekräftigste Indikatoren für akute GvHD. Nützlich sind auch das lymphozytäre und eosinophile Infiltrat. Letzteres spricht gegen eine GvHD.

CD45RO⁺/CD2⁺ Lymphozyten und CD68⁺ Makrophagen sind am stärksten suggestiv für akute GvHD.

Hohe Zellzahlen an PDC sind hinsichtlich des Ein-Jahres-Überlebens bei akuter GvHD günstig.

Die retrospektive Analyse des DSHIG („**D**ifferentialdiagnostischer **S**core mittels **H**istopathologie und **I**mmunhistochemie für akute **G**raft versus Host Disease“) ergibt eine Testspezifität und -sensitivität von 95%. Eine prospektive Testvalidierung ist angezeigt, jedoch nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

4.1 Charakteristische histologische Befunde der akuten GvHD

Kritische Wertung der histologischen Charakteristika

Die histopathologischen Charakteristika der aGvHD, wie sie in dieser Arbeit herausgearbeitet wurden, zeigten das folgende Bild: eine lückenhafte Basalmembran normaler Breite mit diffusem lymphozytären Infiltrat v.a. der Junktionszone, ballonierte Keratinozyten, fokal apoptotische / dyskeratotische Zellen und Satellitenzellnekrosen. Damit einhergehend bestanden meist eine epidermale Differenzierungsstörung, fokale Spongiose und subepidermale Spaltbildungen. Wichtig für die Einschätzung des histologischen Schweregrades war neben der Lymphozyteninfiltration der Kontinuitätsverlust der Basalmembran.

Diese Charakteristika der akuten GvHD decken sich im Wesentlichen mit der Literatur. So finden sich die durch Lerner [49] vorgeschlagenen Klassifikationskriterien Basalzellballonierung, Satellitenzellnekrose und Lymphozyteninfiltrat repräsentiert. Außerdem fand sich in der Mehrzahl der Präparate Spongiose, analog zu den Erkenntnissen von Elliott et al. [21] sowie Massi et al. [56]. Als neue Aspekte wurden die histopathologischen Unterschiede zwischen aGvHD und AR herausgearbeitet. Auch den Kontinuitätsverlusten der Basalmembran wurde bislang wenig Bedeutung beigemessen, sie erwiesen sich jedoch in dieser Arbeit als wichtiger Faktor für die Einschätzung des histologischen Schweregrades und wurden daher als ein Kriterium in den histologischen GvHiScore integriert. Zumindest fokaler Verlust der Basalmembran lag bei der Mehrzahl der Patienten vor.

Die standardisierte Analyse der histopathologischen Parameter hat sich im Rahmen dieser Arbeit bewährt. Diese erfolgte prospektiv und verblindet. Bei der geringen Fallzahl (N=20) sollten diese systematischen Befunderhebung und der GvHiScore in einer größeren Serie validiert werden.

Pathophysiologische Interpretation zur Korrelation histopathologischer Parameter

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die einzelnen histopathologischen Parameter systematisch auf ihre Korrelationen untereinander untersucht. Statistisch signifikante Korrelationen fanden sich für folgende Kriterien: Basalzellapoptose, Epidermisdicke (Akanthose), Parakeratose, Epidermolyse, Basalzellapoptose, und basale Satellitenzellnekrose (einzelne Korrelationen: vgl. Tabelle 36). Diese Resultate waren angesichts der klassischen histopathologischen Kriterien akuter GvHD (vgl. Einleitung; Klassifikation nach Lerner u. Horn, S.7) zu erwarten. Ihre Korrelation untereinander lässt schließen, dass die entsprechenden Veränderungen in der Regel kombiniert auftreten. Hier könnte ein gemeinsamer pathophysiologischer Prozess zu Grunde liegen. Es bleibt zu diskutieren, ob die Basalzellapoptose ursächlich für die Differenzierungsstörung der Epidermis ist und somit zu Atrophie und Epidermolyse führt (vgl. hierzu [91]). Andererseits könnte die

Korrelation beider Phänomene auch als gemeinsame Endstrecke bei höherem Schweregrad interpretiert werden.

Hypergranulose korrelierte hochsignifikant ausschließlich mit Apoptose suprabasaler Keratinozyten und Ballonierung von Keratinozyten. Zahlreiche Patienten wiesen auch melaninhaltige Makrophagen in der oberen Dermis auf. Hyperpigmentierung ist als Zeichen chronischer GvHD bekannt [33]; in diesem Zusammenhang weist die Assoziation mit schwerer Veränderung auch suprabasaler Keratinozyten möglicherweise auf einen fortgeschrittenen Krankheitsprozess und/oder beginnende Chronifizierung hin.

Bereits 1976 hat Hashimoto an Lichen ruber beschrieben [36], dass es im Rahmen einer vorzeitigen Verhornung von Keratinozyten zu eine „Filamentären Degeneration“ mit Bildung eosinophiler Körperchen kommt. Im pathogenetischen Verlauf berichtet er von einem Stadium der Vakuolisierung. Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass es die kutane Graft versus Host Disease in einem dem Lichen ruber ähnlichen pathogenetischen Prozess endet. Die histopathologischen Ähnlichkeiten zwischen (chronischer) Graft versus Host Disease und Lichen ruber wurden bereits 1997 von Hitchins et al. an zwei Patienten näher untersucht [39]. Hierbei wurden immunbiologische Unterschiede im lymphozytären Infiltrat zur Differentialdiagnostik genutzt: Im Gegensatz zum Lichen ruber seien bei chronischer Graft versus Host Disease zytotoxische/ T-Suppressorzellen vorherrschend. Sale et al. beschrieben bereits 1984 an GvHD die Aggression zytotoxischer T-Zellen gegen Keratinozyten [74]. Bei diesen handelt es sich nach Peszkowski et al. [70] um aktivierte Donor-T-Zellen.

Vakuolisierung und Basalzellapoptose bedingen möglicherweise durch den Verlust geminativer Zellen eine epidermale Differenzierungsstörung, die den Schweregrad der GvHD maßgeblich beeinflusst. Satellitenzellnekrose ist in diesem Zusammenhang als fokale Koninzidenz von lymphozytärem Infiltrat und Keratinozytenapoptose zu verstehen. Dabei ist zu vermuten, dass diese Entzündungszellen durch Ausschüttung von Zytokinen wie TNF [77] und durch Fas(CD95)-Ligandenbindung [4] über den extrinsischen Weg an der Apoptoseinduktion beteiligt sind.

Diese Anschauung deckt sich mit dem 2003 von Ferrara et al. vorgestellten Modell zur Pathophysiologie der GvHD, auf das bereits in der Einleitung hingewiesen wurde [27].

Das Auftreten von Epidermolyse, welche in dieser Arbeit als ein wesentliches Kriterium der schweren aGvHD beschrieben wurde, könnte durch die Basalzellapoptose insofern erklärt werden, als diese mit dem Verlust der Hemidesmosomen und damit der Verankerung der Epidemis in der Basalmembran verbunden ist.

Immunhistochemisches Bild der akuten GvHD: Kritische Wertung

Die untersuchten Entzündungszellen fanden sich vorwiegend subepidermal und zeigten abhängig von der quantitativen Ausprägung des Infiltrats Epidermotropie. Hierbei gab es folgende Ausnahmen: Plasmazytoide Dendritische Zellen (PDC), CD208⁺ reife und CD209⁺ unreife Dendritische Zellen kamen nie epidermal vor, während CD207⁺ Langerhans Zellen vorwiegend epidermal lokalisiert waren. Bei den Dendritischen Zellen dominierten IDEC. Diese Erkenntnisse sind in der Literatur nicht vorbeschrieben. Die Beschreibung des genauen zellulären Profils der aGvHD ist nicht nur von wissenschaftlich-theoretischem Interesse, sondern kann künftig auch für alternative Therapieansätze (molecular target therapy) von Bedeutung sein.

Bei den Lymphozyten dominierten TLC klar das Bild. Am häufigsten waren Memory-T-Zellen; naive und regulatorische TLC kamen etwa gleich häufig vor, wobei letztere fast ausschließlich

subepidermal zu finden waren. Diese Memory-TLC-Prädominanz deckt sich mit den bislang wenigen Literaturdaten [18].

Dermale CD34⁺ Fibroblasten bei akuter GvHD

Bei der Durchsicht der CD34-gefärbten Schnitte fiel auf, dass sich in drei Fällen zahlreiche CD34-positive Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie in der Dermis befanden. Da dies nicht Gegenstand der Forschungsfrage war, wurden die Zellen aus der Analyse ausgeschlossen. Dennoch soll vermerkt werden, dass aktivierte Fibroblasten bei kutaner GvHD bislang nur von Janin-Mercier et al. im oberen Drittel der Dermis als Charakteristikum der späten sklerotischen GvHD-Phase (200 bis 360 Tage nach Transplantation) beschrieben wurden [44]. Das Vorkommen CD34⁺ Fibroblasten bei chronischer GvHD wurde auch im Stroma von Tränendrüsen von Ogawa et al. beschrieben [67]. In den eigenen drei Fällen zeigte sich kein Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Biopsie nach Transplantation, dem Erstmanifestations-Zeitpunkt oder dem Ein-Jahres-Überleben³⁰. Die Annahme liegt nahe, dass es sich bei diesen Zellen um Fibroblasten (-vorläufer) handelt, die für die weitere Entwicklung einer chronischen GvHD vom sklerodermiformen Typ relevant sind.

4.2 Für akute GvHD klinisch bedeutsame Zellarten

Hohe PDC-Zellzahlen prognostisch günstig für das Ein-Jahres-Überleben

Relativ zum Arzneiexanthem fanden sich bei akuter GvHD deutlich mehr BDCA-2⁺ PDC's, wobei die Gesamtzahl etwa im Vergleich zu CD209⁺ unreifen DC's gering war. Dennoch fanden sich in drei Fällen (ca. 15%) mehr als 20 PDC's pro mm² Epidermis. Diese Fälle zeigten eine günstige Korrelation mit dem Ein-Jahres-Überleben und der Ausprägung des klinischen Schweregrads nach Glucksberg. Dies stützt die Annahme, dass BDCA-2 positive Zellen einen quoad vitam günstigen Effekt auf die Immunbiologie der aGvHD ausüben, was auch durch die Ergebnisse von Vakkila et al. suggeriert wird [85]. Diese konnten zeigen, dass bei niedriger Zelldichte an monozytoiden und plasmazytoiden DC's im peripheren Blut typischerweise eine sehr schwere akute GvHD vorlag [85], ebenso Reddy et al. [72]. Am eigenen Biopsiematerial konnten wir zeigen, dass die Korrelation auch für die Hautbiopsie zutreffen dürfte: Hohe PDC-Zahlen sprachen für günstige Verläufe. Wollenberg et al. zeigten 2002, dass PDC bei Lupus erythematoses in hohen Zahlen, bei Atopischer Dermatitis jedoch kaum vorkommen. In Zusammenschau mit der Rolle des durch PDC produzierten Interferon Typ I für die Virusabwehr wurden PDC als protektiv im Hinblick auf kutane Virusinfektionen gewertet [94]. Möglicherweise hängt der in den vorliegenden Arbeit beschriebene protektive Effekt damit zusammen, dass PDC vor durch Virusinfektion komplizierten klinischen Verläufen schützen.

Plasmazytoide Dendritische Zellen stellen eine unabhängige Population Dendritischer Zellen (PDC) dar, die sich in normaler Haut nur in geringem Maß findet [20]. Wollenberg et al. [94]

³⁰ Zeitraum zwischen Erstmanifestation und Transplantation bei aGvHD-Fällen mit ausgeprägter (semiquantitativ: Kat. 2/3), fibroblastärer CD34-Infiltration subepidermal: 14 (Fall 1) / 14 (Fall 2) / 97 (Fall 3) Tage; Zeitraum zwischen Biopsie und Transplantation: 48 (Fall 1) / 49 (Fall 2) / 110 (Fall 3) Tage

haben gezeigt, dass PDC in hoher Zahl beispielsweise bei Psoriasis vulgaris und Lupus Erythematoses vorkommen, in Haut von Patienten mit Atopischem Ekzem jedoch selten sind. Dies könnte eine Erklärung für die hohe Rate an viralen Superinfektionen bei atopischem Ekzem liefern, da PDC's im Rahmen von Virusinfektionen viel Interferon produzieren [94]. Der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene positive Effekt hoher PDC-Zahlen auf das Ein-Jahres-Überleben könnte sich durch eine bessere Virusinfektabwehr erklären, die sowohl Superinfektionen bei akuter GvHD verhindert als auch GvHD-triggernde Virusinfektionen reduziert.

PDC könnten eine wichtige Rolle für die Toleranzinduktion bei akuter GvHD spielen, indem sie nach Antigenkontakt mit Lymphozyten interagieren, wobei entsprechende regulatorische T-Zellen generiert werden. Ein entsprechendes Konzept wurde für die Allograft-Toleranzinduktion publiziert [66]. Dies ist ein Erklärungsmodell für den scheinbar günstigen Effekt deutlicher Infiltration durch BDCA-2⁺ Dendritische Zellen auf Ein-Jahres-Überleben und klinischen Schweregrad der GvHD.

CD206⁺/CD11c⁺ IDEC assoziiert mit längerem Überleben bei akuter GvHD

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zellzahlen an CD206⁺ und CD11c⁺ DC (v.a. IDEC) negativ mit der Zahl an reifen (CD208⁺) und unreifen (CD209⁺) DC und positiv mit dem Ein-Jahres-Überleben korrelieren. Wie Wollenberg et al. durch FACS-Analyse an epidermaler Einzelzellsuspension zeigen konnten, wird CD11c in hoher Menge auf Inflammatorischen Dendritischen Zellen (IDEC), gering jedoch auch auf Langerhans Zellen exprimiert [94]. Letzteres deckt sich mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Korrelation zwischen den folgenden Zellzahlen: CD1a⁺, CD207⁺ und CD11c⁺. Es ist bekannt, dass CD1b auf aktivierten Dendritischen Zellen exprimiert wird [50] und maßgeblich an der T-Zell-Interaktion beteiligt ist [71].

Kritische Wertung der Korrelationen zwischen klinischen / prognostischen Daten und Immunhistochemie

Kurz zusammengefasst, wirkten sich hohe Zahlen an PDC prognostisch günstig auf Schweregrad und Ein-Jahres-Überleben aus: Wenn auch in deutlich geringerer Zahl vorhanden, waren sie insofern von besonderer Bedeutung, als eine ausgeprägte Infiltration sowohl mit dem klinischen Schweregrad als auch mit dem Ein-Jahres-Überleben günstig korrelierte. Eine positive Korrelation fand sich auch zwischen der Zellzahl an myeloiden DC (CD11c⁺; v.a. IDEC) und dem Ein-Jahres-Überleben. Hohe Zellzahlen an reifen DC (CD208⁺) waren im Hinblick auf das Ein-Jahres-Überleben dagegen prognostisch ungünstig. Die Zahl an TLC korrelierte positiv mit dem klinischen Schweregrad (GvHSc). Höhere Zahlen an Treg und niedrigere Zahlen an CCR7⁺ aktivierte DC sowie Langerhans Zellen waren überzufällig häufig mit Spätmanifestation von GvHD assoziiert. Die Anzahl epidermotroper TLC korrelierte mit dem klinischen Schweregrad nach GvHSc. Eine prognostische Relevanz der Memory-TLC-Zahl für die GvHD wurde bislang nicht nachgewiesen.

Für CD208⁺ mature DC liegen kaum Daten vor; Laurin et al. konnten am ex-vivo-Modell zeigen, dass es unter allostimulatorischen Bedingungen zur einer Reifung und Neoexpression von Chemokinrezeptoren von Dendritischen Zellen kommt [47]. Zur prognostischen Relevanz und an explantierter Haut wurden bislang keine Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchungen von Laurin et al. sprechen in Zusammenschau mit den Erkenntnissen dieser Studie dafür, dass es sich bei der erhöhten Mortalität bei ausgeprägter Infiltration durch mature, CD208⁺ DC um GvHD-assoziierte Mortalität handelt.

4.3 Lupusband-positive akute GvHD – Eine für den Schweregrad bedeutsame Subgruppe

Die histologisch schwere akute Graft versus Host Disease und der Systemische Lupus Erythematoses besitzen aus histologischer und immunpathologischer Sicht Gemeinsamkeiten. Die Analyse der Lupusband-positiven Subgruppe von aGvHD-Patienten ist ein neuer Ansatz, der bislang nicht untersucht wurde.

GvHD-Patienten mit positivem Lupusband wiesen mehr CD206⁺ IDEC, Eosinophile, naive TLC und Treg auf, assoziiert mit subepidermaler Spaltbildung auf. Es bestand keine Korrelation mit dem Ein-Jahres-Überleben. Tendentiell war der klinische GvHScO bei Lupusband-positiven aGvHD-Patienten schwerer ausgeprägt.

Für die Diagnostik des Lupus Erythematoses (LE) ist der immunhistochemische Nachweis des sogenannten Lupusbandes wesentlich. Hierbei handelt es sich um den bandförmigen Nachweis von Immunglobulinen in der epidermodermalen Junktionszone durch direkte Immunfluoreszenz (DIF), was einem Ausfall von Immunkomplexen im Rahmen der fehlgesteuerten Immunreaktion entspricht.

Immunvermittelte Apoptose/Einzelzellnekrose von Keratinozyten insbesondere der basalen Zellschichten ist ein wesentliches Kriterium akuter kutaner GvHD. Lupus Erythematoses weist nicht nur durch das klinische Bild mit erythematösen Effloreszenzen, sekundär narbiger Degeneration und Zerstörung von Hautanhangsgebilden, sondern auch durch die zentrale Rolle der Apoptose Ähnlichkeiten mit der aGvHD auf. Verschiedenen äußeren Ursachen wie UV-Lichtexposition bedingen die Apoptose kutaner Zellen und die Freisetzung von Autoantigenen, welche eine inadäquate Immunreaktion auslösen. Entsprechend könnte man sich vorstellen, dass es bei GvHD aus verschiedenen Ursachen (z.B. Chemotherapie im Rahmen der Konditionierung) zur Apoptose von Keratinozyten und Freisetzung von Autoantigenen kommt, welche durch Spenderimmunzellen als fremd erkannt werden.

Die Unterschiede zwischen den Lupusband-positiven und –negativen Patienten können entweder durch unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen begründet oder aber eine Folge unterschiedlicher klinischer Schweregrade sein. Obwohl sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des klinischen Schweregrads nicht direkt nachweisen ließ, wird letztere Annahme aufgrund der Korrelation mit den wesentlich histologischen Kriterien (Epidermolyse und Satellitenzellnekrose) favorisiert. Das Auftreten von eosinophilen Granulozyten (vgl. Abbildung 22 und Tabelle 36) scheint Ausdruck einer massiven Entzündungsreaktion bei histologisch stark ausgeprägtem Krankheitsbild zu sein.

Lupusband-positive aGvHD assoziiert mit schwereren histologischen Veränderungen

Die Subgruppe Lupusband-positiver aGvHD mit ausgeprägter Interface Dermatitis und Komplementablagerungen in der Junktionszone zeigte eine besonders ausgeprägte Epidermolyse bzw. Bläschenbildung, die auch für LE typisch ist. Lupusband-positive Patienten weisen jedoch keine günstigere Prognose bezüglich des Ein-Jahres-Überlebens auf.

4.4 Kritische Wertung der angewandten Methodik

Inter- und intraindividuelle Variabilitäten durch unterschiedliche Hautbeschaffenheiten

Im Hinblick auf die Zielsetzung vorliegender Arbeit stehen inter- und intraindividuelle Variabilitäten der Vergleichbarkeit der Patientengruppen im Weg. Die unterschiedliche Beschaffenheit von Hautbiopsien ist abhängig von folgenden Parametern:

- Biopsielokalisation (Körperregion; intraindividuelle Variable; aufgrund der Abhängigkeit von Exanthemlokalisation und ästhetischer Vertretbarkeit der Probenentnahme nicht vermeidbarer bias)
- Dermatologische Vorerkrankungen (interindividuelle Variable)
- Genetische Prädisposition (z.B. Atopie), ethnischer Zugehörigkeit (interindividuelle Variable)
- Therapieeffekte (z.B. im Rahmen einer Steroidtherapie; interindividuelle, bei topischer Therapie auch intraindividuelle Variable)
- Vorbestehendes zelluläres Infiltrat (z.B. eosinophiles Infiltrat bei Atopikern; interindividuelle, bei topischer Therapie auch intraindividuelle Variable)
- Andere sekundäre Veränderungen der Haut unabhängig von der untersuchten Erkrankung

Alle erwähnten Faktoren wurden in die Endauswertung nicht einbezogen, da die Berücksichtigung von Einzelfaktoren wegen der geringen Fallzahl schwierig war und die Einflussparameter in Patienten- und Kontrollgruppe gleichmäßig verteilt sein sollten. Eine a priori geplante Faktorenanalyse wurde für die Variable Biopsielokalisation durchgeführt (vgl. Abbildung 7, S.15f); bei relativer geringer Fallzahl und hoher Ausprägungsvariabilität der genannten Faktoren war eine genauere Berücksichtigung statistisch nicht möglich. Ein Einfluss der o.g. Faktoren als bias kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Kritische Wertung der immunhistochemischen Zellquantifizierung

Die Probleme der Zählweise epidermaler Dendritischer Zellen bei immunhistochemischen Färbungen wurde in der Literatur mehrfach diskutiert. Die relevanten Aspekte der Arbeit von Bieber et al. [7] werden in der Folge kurz dargelegt und kommentiert:

Betrachtet man Langerhans Zellen ausschließlich als suprabasales Netzwerk, ergibt sich eine unidimensionale Herangehensweise. Dieses Konzept kam für die vorliegende Arbeit nicht in Frage, da auch subepidermale Präsenz von Langerhanszellen von Interesse ist. Diese konnte in der Vorbereitungsphase verifiziert werden.

„Die Langerhanszelle als epidermale Proliferationseinheit“ ist ein anderes Konzept, das vorgestellt wird. Es legt den Bezug der Zahl an positiven Zellen auf beispielsweise 200 Basalzellen nahe. Dieser Ansatz erscheint zum einen insbesondere hinsichtlich der häufigen Akanthose bei GvH-Patienten wenig repräsentativ und spiegelt zudem (wie der erste Ansatz) die Rolle der Langerhanszelle für die Dermis als Ganzes nicht angemessen wieder.

Rückt man die Rolle der antigenpräsentierenden Zellen (APC) für die gesamte Dermis in den Vordergrund, schlagen Bieber und Ring ein zweidimensionales Konzept mittels morphometrischer

Analyse vor. Da uns die dermale Repräsentation der APC ein besonderes Interesse ist, schien diese Zählweise angebracht. Alle quantitativen Angaben zu Zellen wurden auf einen Quadratmillimeter Dermis bezogen. Zwar bleibt eine Verfälschung des Ergebnisses hinsichtlich der differentiellen Quantifizierung für „epidermal“ und „subepidermal“ durch Akanthose einerseits und Epidermisdegeneration andererseits praktisch unumgänglich, dies wurde aber als möglicher bias akzeptiert.

In Folge der Zwei-Dimensionalität der Schnitte werden insbesondere bei Dendritischen Zellen häufig Zellausläufer mehrfach angeschnitten, sodass nicht bestimmbar ist, ob die positiv gefärbten Abschnitte unterschiedlichen Zellen angehören. Bedingt durch inhomogenes Antigen Retrieval und andere methodenspezifische Effekte liegt im Randbereich des Schnitts häufig eine stärkere Färbeintensität vor.

Um diesen methodischen Problemstellungen bestmöglich Rechnung zu tragen wurde unter Berücksichtigung genannter Literatur folgendes Konzept zur Auszählung erarbeitet :

- 1 Im Rahmen der Möglichkeiten wurde versucht eine möglichst große Anzahl an Patienten zu untersuchen um die oben genannten individuellen Unterschiede in der Patientendisposition auszugleichen.
- 2 Die Stanzbiopsien wurden wenn möglich stets der selben Region (klavikulär oder Dekolleté bzw. pectoral) entnommen.
- 3 Um Subjektivität bei der Auszählung der positiven Zellen und der Auswahl des Beurteilungsbereichs zu vermeiden wurde die Analyse anhand anonymisierter Präparate und unter randomisierter Auswahl der begutachteten Gewebsabschnitte durchgeführt.
- 4 Als Beurteilungsbereich wurden vier jeweils randomisiert ausgewählte quadratische Felder der Seitenlänge 0,5mm gewählt, die die Epidermis vollständig einschließen. Somit fand die Auszählung pro Patient auf einer Epidermislänge von 2 mm bei einer Schichtdicke von 0,5 mm statt (Fläche: 1 mm²).
- 5 Um unspezifische Effekte auszuschalten wurden die Randbereiche der Gewebsschnitte von der Beurteilung ausgenommen. Es wurden ausschließlich Zellen gezählt, die sich im Färbeverhalten deutlich vom Hintergrund abzeichneten und eine vergleichbare Intensität bezüglich der anderen positiven Zellen aufweisen. Um Doppelzählungen zu verhindern wurden nur gefärbte Zellen als positiv gewertet, deren Zellkern klar erkennbar war.
- 6 Aus Gründen der zeitlichen Realisierbarkeit wurde entsprechend mehrerer Experten-Meinungen von einer absolut quantitativen Zählung Abstand genommen. Statt dessen wurde der Bewertung folgende a priori empirisch festgelegte semiquantitative Ordinalskala zu Grunde gelegt (vgl. Tabelle 23).

Tabelle 23: Semiquantitative Bewertung des zellulären Infiltrats

Grad der Zellinfiltration		Zellzahl/mm ²
0	Keine	0
1	Leicht	1 – 4
2	Mäßig	5 – 19
3	Stark	20 – 49
4	Sehr stark	50 – 149
5	Massiv	Über 150

Kritische Wertung möglicher Confounder bei der Patientenauswahl

Die Auswahl der Patienten erfolgte prospektiv, Histopathologe und Untersucher waren bezüglich der Diagnose verblindet. Ein Detection Bias ist daher sehr unwahrscheinlich. Ein möglicher Confounder ist die Vorbehandlung der Patienten: Während alle Patienten mit akuter GvHD multimodal (z.B. mit Zytoreduktiva) vorbehandelt waren, ist das in der Gruppe der Arzneiexantheme oftmals nicht der Fall. Sicher wäre die Vergleichbarkeit optimaler, wenn alle Patienten mit Arzneiexanthem auch eine Knochenmarks- / Stammzelltransplantation durchgemacht hätten. Dies ist jedoch nicht wahrscheinlich.

Auch hinsichtlich dieses möglichen Confounders ist eine prospektive Reevaluation des differentialdiagnostischen DSHIG sinnvoll.

Ein möglicher Confounder ist die unterschiedliche Verteilung der histologischen Schweregrade. Bei akuter GvHD lagen durchschnittlich schwerere Veränderungen vor als bei Arzneireaktionen. Dies könnte eine höhere Zahl an Entzündungszellen bedingen. Der histologische Schweregrad allein ist bei geringer Spezifität kein valides Kriterium für die Differentialdiagnose. Unter den Einzelkriterien des DSHIG wies nur die lymphozytäre Infiltration eine signifikante Korrelation mit dem histologischen Schweregrad auf. Dies war zu erwarten, da die Lymphozyteninfiltration auch ein Bewertungskriterium des bisherigen Scores nach Lerner (modif.) darstellt. Der differentialdiagnostische DSHIG sollte somit ein von möglichen Confoundern unabhängiges Instrument für die Unterscheidung von AR und GvHD darstellen.

4.5 Klinische und differentialdiagnostische Bewertungssysteme – Vor- und Nachteile

4.5.1 Kritische Wertung des klinischen klinischen GvHScO als Messinstrument für den Schweregrad kutaner aGvHD

Der GvHScO wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Er ist einfach anwendbar und beruht ausschließlich auf der Beurteilung kutaner Effloreszenzen anhand klar definierter Kriterien. Er bietet durch seine hundertteilige Skala eine breite Differenzierungsmöglichkeit zwischen unterschiedlich stark ausgeprägten Krankheitsbildern. Der Klinische GvHScOGrade und der

hundertteilige GvHScos zeigen eine allerdings nicht signifikante Korrelation mit dem etablierten Glucksberg Skin Grading. Von der Validität des Scores ist daher prinzipiell auszugehen. Die Ergebnisse der Beurteilung anhand des klinischen GvHScograde lagen deutlich näher am histopathologischen Ergebnis (Klassifikation nach Lerner) als die konventionelle Beurteilung nach Glucksberg. Dies kann aber als Hinweis auf eine höhere Präzision des GvHScos gewertet werden.

Mehrfach wurde bereits versucht den Glucksberg Score zu verbessern. So ist die relativ ungenaue Definition der Schweregrade und der große, untersucherabhängige Beurteilungsspielraum beim Glucksberg Score problematisch. Dies war Grund für Studien zur Verbesserung der Beurteilungskonsistenz: So wurde von Weisdorf et al. ein entsprechender Algorithmus vorgeschlagen und prospektiv auf Konsistenz der Schweregrad-Beurteilung getestet [92]. Wie der Glucksberg Score beruht dieser Algorithmus nicht ausschließlich auf kutanen Effloreszenzen. Hierin liegt ein wesentlicher Unterschied zum GvHScos, der eine Schweregradbeurteilung nach standardisierten Kriterien allein durch den klinisch tätigen Dermatologen ermöglicht. Auch Cahn et al. fanden eine prognostische Relevanz für das Überleben nur bei maximal ausgeprägter akuter GvHD [9]. Dies deckt sich mit den Daten aus der Korrelationsanalyse von Schweregrad und Ein-Jahres-Überleben in der vorliegenden Studie.

Die Suche nach einem validen System zur Prognosebestimmung bei akuter GvHD war auch Gegenstand der Arbeit von Leisenring et al., die nach einem logistischen Regressionsmodell an 386 Patienten die prognostische Aussagekraft verschiedener Parameter untersuchten. Sie werteten die prognostische Aussagekraft von Leber- und intestinalen Befall positiv; kutane Effloreszenzen wurden hingegen nicht als aussagekräftig erachtet und gingen nicht in den Algorithmus ein [48].

Im Gegensatz zur Glucksberg-Klassifikation beruht der klinische GvHScos ausschließlich auf kutanen Effloreszenzen, es ist also keine zusätzliche Labordiagnostik nötig. Der GvHScos eignet sich daher hervorragend als Bedside-Test.

Während die Glucksberg-Klassifikation der akuten kutanen GvHD nur auf den Kriterien Erythemfläche und Blasenbildung beruht, werden für den klinischen GvHScos die GvHD-typischen Effloreszenzen Erythem, Papeln und Bläschen/Epidermolysen bei jedem Patienten gesondert und differenziert beurteilt. Die hundertteilige Skala lässt im Vergleich zum vierstufigen Grading größeren Abstufungsspielraum, was die bessere Eignung des Scores als Verlaufsparemeter begründet.

Die vorliegende Analyse zeigte eine enge Korrelation zwischen GvHScos und Glucksberg-Klassifikation der akuten kutanen GvHD. Hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft, gemessen am Ein-Jahres-Überleben, waren beide Testsysteme vergleichbar. Hieraus lässt sich schließen, dass der GvHScos einen ebenbürtigen klinischen Standard darstellen könnte. Der GvHScos überzeugte bei der Auswertung bekannter Risikofaktoren wie der Verwandtschaft von Spender und Empfänger im Vergleich zum Glucksberg-Score mit Daten auf höherem Signifikanzniveau.

Klinischer GvHScos und GvHScograde sollten in einer größeren Studie im Rahmen der klinischen Routine getestet werden. Gerade im Hinblick auf den Arbeitsalltag des hinzugezogenen Dermatologen dürfte die hundertteilige Skala das Follow-up-Monitoring bezüglich des klinischen Schweregrades erleichtern. Da die vorliegenden Daten um der Vergleichbarkeit willen auf der klinischen Einschätzung des jeweils gleichen erfahrenen Dermatologen beruhen, bleibt zu validieren, inwiefern der Score von mehreren Beurteilern unabhängig reproduzierbar ist.

4.5.2 Kritische Wertung der immunhistochemischen Differentialdiagnostik von akuter GvHD und Arzneiexanthenen

Immunhistochemisch war das GvHD-Infiltrat durch PDC, CCR-7⁺ migrationsaktive DC und CD209⁺ unreife DC, epidermotrope TLC (v.a. Memory-TLC) und epidermotrope Makrophagen / APC für das Vorliegen einer akuten GvHD charakterisiert, während epidermale Langerhans Zellen (LC), CD1a⁺ mature DC/LC und CD34⁺ fibroblastenartige Stammzellen häufiger bei Arzneiexanthenen (50%) als bei aGvHD (15%) vorkamen.

Damit scheinen die Memory-TLC, TLC und CD68 auf APC (v.a. Makrophagen) die besten Marker für die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen akuter GvHD und Arzneiexanthem darzustellen. Diese Resultate sind bislang nicht in der Literatur beschrieben. Die Daten bildeten die Grundlage für die Erstellung des differentialdiagnostischen Scores DSHIG.

Infiltration durch naive T-Lymphozyten und epidermale CD68⁺ Zellen bei akuter GvHD stärker als bei Arzneiexanthenen

Die Analyse der Lymphozytenmarker ergab im Hinblick auf die Differentialdiagnostik, dass CD2⁺ T-Lymphozyten und CD45RO⁺ mature T-Lymphozyten in der Epidermis in größerer Anzahl bei akuter GvHD als beim akuten Arzneiexanthem auftraten. Dies ist gut vereinbar mit aktuellen Hypothesen der Pathogenese von aGvHD. Die Präsenz CD45RO⁺ reifer T-Zellen bei aGvHD im Vergleich zu anderen entzündlichen Erkrankungen wurde anhand von Biopsaten aus Haut, Gastrointestinaltrakt und Leber bereits von Diamond et al. nachgewiesen [18].

Der Makrophagenmarker CD68 erwies sich ebenfalls als hilfreich die Differentialdiagnose der akuten GvHD. Ein Unterschied hinsichtlich der Makrophageninfiltration bei GvHD im Vergleich zu Arzneireaktionen war bereits von Esteban et al. beschrieben, jedoch nicht signifikant gezeigt worden [22]. Dies ist möglicherweise durch die geringere Anzahl von 22 gegenüber 33 Proben in der vorliegenden Arbeit begründet. Möglicherweise handelt es sich bei den CD68⁺ Zellen nicht nur um Makrophagen, sondern auch um einen anderen Typ von APC wie Interferon-produzierenden Zellen vom Typ 1 (IPC-1). Ersten In-vitro-Studien zufolge spielen diese Zellen eine Rolle bei GvHD [58]. Die Daten zeigen, dass womöglich auch BDCA-2⁺ PDC zu einem kleinen Teil an der Entität CD68⁺ Zellen beteiligt sind [23].

Differentialdiagnostisch sprechen CD45RO⁺ Lymphozyten und epidermale CD68⁺ Zellen für akute GvHD. Bei letzteren handelt es sich am ehesten um Makrophagen oder IPC-1.

Depletion von CD1a⁺/CD207⁺ Langerhans Zellen bei akuter GvHD

Ein immunhistochemisches Modell zur Differentialdiagnose von GvHD und Arzneireaktionen wurde von Nagata et al. vorgeschlagen [61]: In diesem Zusammenhang wird unter anderem eine Verminderung epidermaler CD1a-positiver Dendritischer Zellen berichtet, was in späteren Studien an akuter und chronischer GvHD [15] und im Vergleich zwischen GvHD und Arzneiexanthenen [68] bestätigt wurde. Dies ließ sich anhand der vorliegenden Daten insofern reproduzieren, als sich ein signifikanter Unterschied zwischen akuter GvHD und Arzneiexanthenen sowohl für epidermale CD1a⁺ Zellen als auch epidermale CD207⁺ Langerhans Zellen nachweisen ließ. Eine Depletion von Langerhans Zellen wurde auch von Aractingi et al. an chronischer GvHD berichtet [3]. Eine gestörte Rekonstitution von Langerhans Zellen bei Patienten mit akuter GvHD ist bekannt [69]. Womöglich handelt es sich bei dem von uns beobachteten Phänomen um eine verzögerte Rekonstitution der durch die Konditionierungstherapie depletierten Empfänger-LC.

Plasmazytoide und CCR-7⁺ DC häufiger bei akuter GvHD

Hohe Zahlen an PDC (mehr als 20 Zellen/mm²) fanden sich bei 3 Patienten mit akuter GvHD, jedoch nie bei Arzneimittelexanthenen. Diese Erkenntnis widerspricht Daten aus der Literatur, die einen initialen Rückgang der Anzahl plasmazytoider Zellen bei GvHD beschreiben [85]. Zur Bedeutung der Anzahl an PDC für die Differentialdiagnostik der GvHD wurde bisher keine Arbeit publiziert. Leider lässt die geringe Anzahl an GvHD-Patienten mit starkem Infiltrat durch PDC's keine statistisch signifikante Aussage zu. Es erscheint daher sinnvoll, diesen Punkt im Rahmen einer weiteren prospektiven Studie zu validieren.

Bei aGvHD zeigten sich signifikant mehr CCR-7⁺ Zellen als bei AR, sodass dieser Marker differentialdiagnostisch für aGvHD spricht. Chen et al. haben mit Hilfe des anti-autoimmunen Wirkstoffs Triptolid (TPT) unter anderem nachgewiesen dass Dendritische Zellen im GvHD-in-vitro-Modell unter TPT niedrigere Level an CCR-7 aufzeigten [12]. Mit einem umgekehrten Ansatz konnten Laurin et al. an Zytokin-stimulierten Dendritischen Zellen unter anderem die Neoexpression von CCR-7 bei gleichzeitiger Verbesserung der allostimulatorischen Kapazität zeigen [47]. Beide Studien stützen das Ergebnis, dass akute GvHD mit einer vermehrten Expression des Chemokinrezeptors CCR-7 auf Dendritischen Zellen einhergeht. Dieser scheint eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des autoimmunpathologischen Prozesses zu besitzen. Insofern ist zu vermuten, dass CCR-7 für die Abgrenzung zu anderen Autoimmunkrankheiten wenig hilfreich ist; im Vergleich zum akuten Arzneiexanthen scheint dies jedoch der Fall zu sein.

Zusammenfassend sind PDC und CCR-7⁺ Dendritische Zellen sinnvolle Marker für die Differentialdiagnostik zwischen aGvHD und Arzneireaktionen und bei AR seltener nachweisbar.

4.5.3 Histologischer Schweregrad der akuten GvHD: Kritische Wertung der bestehenden Scores und des GvHiScore

Kritische Wertung der Korrelation zwischen Histopathologie und herkömmlichen Scores

Im Hinblick auf die Korrelation der einzelnen Kriterien mit dem histologischen Grading nach Lerner (vgl. S. 1ff und [49]) zeigte sich ein Zusammenhang zwischen klinischem Schweregrad der aGvHD und histologischem Nachweis von Epidermolyse, Keratinozytenballonierung, Satellitenzellnekrose, basaler Apoptose, Lymphozyteninfiltration von Epidermis und Junktionszone (BMZ) sowie Kontinuitätsunterbrechungen der Basalmembran. Bis auf letzteres Kriterium sind alle Kriterien Bestandteil der histologischen Klassifikation nach Lerner, sodass es nicht verwunderlich ist, dass eine Korrelation zwischen den genannten Einzelkriterien und dem Lerner-Score nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis kann somit vor allem als Zeichen der Datenvalidität gewertet werden. Allerdings sind Kontinuitätsunterbrechungen der Basalmembran kein Bestandteil der histologischen Schweregrad-Klassifikation nach Lerner, so dass es sich hierbei um ein weiteres Beurteilungskriterium des histopathologischen Schweregrads handelt. Dieses ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die Annahme, dass Basalmembranverlust bei aGvHD als Kriterium für den Schweregrad dienen kann, sollte in einer größeren Serie prospektiv validiert werden.

Das einzige *quoad vitam* günstige histopathologische Kriterium war die dermale Mastzellinfiltration. Als Ursache hierfür wurde ein positiver Effekt von Mastzell-abhängigen Zytokinen auf die Immunregulation bei akuter GvHD vermutet: Bereits 1994 hatten Murphy et al. die Rolle von Mastzellen in akuter GvHD untersucht und vermutet, dass TNF-alpha-abhängige Mastzelldegranulation eine wesentliche Rolle für die frühe zytotoxische Reaktion gegen

Keratinocyten spielt [60]. Dies erklärt jedoch nicht den statistisch gesehen lebensverlängernden Effekt der Mastzellinfiltration. Stuart et al. hatten bereits 1987 gezeigt, dass eine erhöhte Mastzellinfiltration ein Effekt im frühen Stadium akuter GvHD ist, der von einer Verminderung der Infiltration auf normales oder erniedrigtes Niveau gefolgt wird [80]. Letztere Arbeit stützt die eigenen Daten; bei der heterogenen Datenlage ist eine genauere, prospektive Untersuchung dieses Aspekts sinnvoll.

Kritische Wertung des histologischen GvHiScore für die Differentialdiagnostik von akuter GvHD und Arzneiexanthenen

Als histopathologische Kriterien zur Differentialdiagnostik von aGvHD und AR wurden anhand der statistischen Analyse folgende Beurteilungsparameter entwickelt: Ballonierung basaler Keratinocyten, Epidermolyse, lymphozytäre Infiltration der Basalmembranzone und Fehlen eines dermalen eosinophilen Infiltrats.

Als Goldstandard für die histopathologische Klassifikation der kutanen GvHD gilt die Einteilung nach Lerner [49], die als Kriterien Vakuolisierung basaler Zellen, Dyskeratose und Epidermolyse heranzieht. 1999 zeigten Massi et al. die Untersucherabhängigkeit der Lerner-Klassifikation insbesondere für die Schweregrade I°/II° auf [56]. Höhere Schweregrade waren gut reproduzierbar. Die Klassifikation nach Lerner lässt Rückschlüsse auf das Ein-Jahres-Überleben der Patienten zu.

Das Kriterium der eosinophilen Infiltration wurde bereits von Autoren wie Canniga et al. [10] für die Differentialdiagnostik angeführt, allerdings aufgrund der fraglichen Spezifität als weniger hilfreich beurteilt. Auf der Basis unserer Patientendaten verspricht das Kriterium einer diffusen eosinophilen Infiltration, definiert als mindestens 20 Zellen pro Beurteilungseinheit bei durchgehendem Befall der einsehbaren dermalen Schichten, eine hohe differentialdiagnostische Validität bei klarer Definition, sodass eine untersucherunabhängige Reproduzierbarkeit angenommen werden darf. Daher ist der Nachweis eosinophiler Granulozyten nicht als absolutes Ausschlusskriterium zu werten. Ein Fallbericht vom Marra et al. [52] verdeutlicht dies: Die Präsenz eosinophiler Granulozyten bei klinisch gesicherter aGvHD führte in drei Fällen zur Fehldiagnose „Akute Arzneireaktion“. Dennoch bestätigen die vorliegenden Daten den relativ hohen diagnostischen Wert der Eosinophilie.

Epidermolyse im Sinne einer Ablösung der Epidermis von der Basalmembran mit Bildung von Spalten bis hin zur Abhebung der Epidermis ist sowohl als Charakteristikum der schweren GvHD als auch von Arzneireaktionen bekannt. So berichteten verschiedene Arbeitsgruppen im Rahmen von Fallstudien über Fälle TEN-ähnlicher akuter GvHD [13, 68, 82].

Die vorliegende Studie zeigt, dass Epidermolyse bei akuter GvHD insgesamt häufiger vorkommt als bei Arzneireaktionen. Aufgrund seiner relativ hohen Spezifität und Sensitivität erscheint dieses Kriterium differentialdiagnostisch hilfreich. Ähnliches gilt für lymphozytäre Infiltration der Basalmembranzone sowie für die Ballonierung basaler Keratinocyten, wobei die genauere Analyse der vorliegenden Daten gezeigt hat, dass sich die einzelnen Kriterien hinsichtlich Spezifität und Sensitivität deutlich unterscheiden. Eine Korrelation mit dem klinischen Scheregrad der kutanen Effloreszenzen nach Glucksberg zeigten allerdings nur Lymphozyteninfiltration, Kontinuitätsverluste der Basalmembran und Erythrozytenextravasate.

4.5.4 Kritische Wertung des differentialdiagnostischen DSHIG Scores für die histopathologische Beurteilung des Schweregrads akuter kutaner GvHD

Basierend auf den Ergebnissen der immunhistochemischen und histopathologischen Auswertung wurden die aussagekräftigsten Kriterien für die Differentialdiagnostik von akuter GvHD und Arzneiexanthenen herausgearbeitet und zu einem integrativen Score zusammengefasst. In den Score gingen die Kriterien Basalzellballonierung, subepidermale Spaltbildung und Infiltration durch Eosinophile, TLC (CD2⁺), Memory-TLC (CD45RO⁺) und Makrophagen (CD68⁺) ein. Diese Parameter wurden zum DSHIG (Differentialdiagnostischer Score basierend auf Histopathologie und Immunhistochemie) zusammengefasst. Die Bewertung der Kriterien ist dichotom und dadurch anwenderfreundlich, durch die eindeutigen Definitionen ist der Score reproduzierbar und untersucherunabhängig gestaltet. Dieser differentialdiagnostische Test, basierend auf Histopathologie und Immunhistochemie, lieferte in der retrospektiven Analyse eine Testsensitivität von 95% und -spezifität von ca. 92% für die Differentialdiagnosen „Akute GvHD“ und „Akutes Arzneiexanthem“.

In der Praxis wäre neben einer HE-Färbung der semiquantitative immunhistochemische Nachweis von CD2, C45RO und CD68 notwendig.

Da die differentialdiagnostische Aussagekraft, gemessen an Testsensitivität und –spezifität retrospektiv erhoben wurde, ist eine prospektive Validierung des Tests sinnvoll und nötig.

Der differentialdiagnostische DSHIG Score stellt daher einen neuartigen und vielversprechenden Ansatz zur Differentialdiagnostik akuter GvHD dar, der weiter verfolgt werden sollte.

4.6 Ausblick

Der Nachweis von Mastzellinfiltration, plasmazytoiden Dendritischen Zellen (PDC) und IDEC scheint für die Prognose der akuten GvHD relevant zu sein. Es ist daher empfehlenswert, diese Zellarten bei der histologischen Aufarbeitung zu untersuchen. Möglicherweise wäre eine gezielte FACS-Analyse für die Untersuchung auf IDEC und PDC für die quantitative Routineanalyse das geeignetere Instrument. Dies sollte in einem Folgeprojekt prospektiv geprüft werden.

Der GvHSCO kann für den klinisch tätigen Dermatologen ein hilfreiches Instrument zur untersucherunabhängigen Verlaufskontrolle bei akuter GvHD darstellen und kann den Glucksberg Score sinnvoll ergänzen.

Der histologische GvHiScore wurde so entwickelt, dass eine einfache, untersucherunabhängige Anwendbarkeit für klinisch tätige Histopathologen möglich ist. Dies wird durch klar definierte, prospektiv erarbeitete Bewertungskriterien gewährleistet. Wegen der eher geringen Patientenzahl der vorliegenden Arbeit sollte der GvHiScore in einer größeren Serie reevaluiert werden.

So ist der differentialdiagnostische DSHIG Score anhand der vorliegenden Daten als vielversprechendes diagnostisches Instrument zu werten. Über eine prospektive Validierung des DSHIG und des histologischen GvHiScore hinaus erscheint es sinnvoll, die dargestellten Hypothesen zur Immunpathologie der akuten GvHD mittels anderer Methoden wie Durchflusszytometrie auf ihre Richtigkeit hin zu prüfen, indem auch der zeitlichen Entwicklung durch die Analyse mehrerer Biopsien im Krankheitsverlauf Rechnung getragen wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Differentialdiagnostik von akuter Graft versus Host Disease (aGvHD) und akuter Arzneireaktion (AR) ist schwierig, jedoch therapeutisch bedeutsam. Hierfür gibt es bislang keine definierten Unterscheidungskriterien. Die Feststellung des Schweregrads der aGvHD ist bislang eher untersucherabhängig. Diese Punkte zu verbessern und einen Beitrag zur Aufklärung der Immunpathologie der aGvHD zu leisten waren die Hauptziele der vorliegenden Dissertation.

Zwanzig Patienten mit klinisch gesicherter aGvHD nach allogener Knochenmarks- oder Blutstammzelltransplantation und dreizehn Patienten mit klinisch verifizierter AR wurden in die Studie aufgenommen. Die klinischen Befunde wurden nach dem etablierten Glucksberg-Score sowie dem neu entwickelten klinischen GvHD-Schweregrad-Score (GvHSc) klassifiziert. Zusätzlich wurden Hautproben entnommen und histopathologisch sowie immunhistochemisch (Expression von CD1a, CD2, CD11c, CD20, CD25, CD34, CD68, CD197, CD206, CD207, CD208, CD209, CD303 und S100) analysiert. Klinische und histologische Ergebnisse wurden einzeln analysiert und miteinander korreliert.

Zur besseren Beschreibung des klinischen Schweregrades der kutanen GvHD wurde der klinische GvHSc a priori entwickelt. Er bietet durch die Standardisierung und die hundertteilige Skala im Vergleich zum Glucksberg Score Vorteile bezüglich der individuellen Verlaufskontrolle.

Als histologische Schweregradkriterien korrelierten epidermotrope lymphozytäre Infiltration und Kontinuitätsverluste der Basalmembran (Epidermolyse) am deutlichsten mit dem klinischen Schweregrad.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf der Basis des histologischen Scores nach Lerner durch Ergänzung des Kriteriums Epidermolyse und durch besondere Gewichtung des Kriteriums Lymphozyteninfiltration der Modifizierte **H**istologische Score zur Abschätzung des Schweregrads akuter **G**vHD (GvHiScore) entwickelt. Die Vorteile dieser modifizierten Klassifikation sind die genaue, Untersucher-unabhängige Definition und die feinere Stratifizierung der Schweregrade. So wird eine bessere inter- und intraindividuelle Differenzierbarkeit erreicht.

Als differentialdiagnostische Parameter sprachen hohe Zahlen reifer T-Zellen (CD2⁺, CD45RA⁺) und Makrophagen (CD68⁺), Epidermolyse, Basalzellballonierung, junktionales lymphozytäres Infiltrat differentialdiagnostisch für aGvHD, eosinophiles Infiltrat jedoch gegen eine aGvHD. Basierend auf diesen neuen Erkenntnissen wurde der differentialdiagnostische Test DSHIG („**D**ifferentialdiagnostischer **S**core mittels **H**istopathologie und **I**mmunhistochemie für akute **G**raft versus Host Disease“) entwickelt. Der Test errechnet sich aus der Addition sieben dichotomer Kriterien. Die retrospektive Analyse des DSHIG ergibt eine Testspezifität und -sensitivität von 95% für die Differentialdiagnose „Akute GvHD“ versus „Akutes Arzneiexanthem“. Der differentialdiagnostisch vielversprechende DSHIG sollte prospektiv validiert werden.

Bei der Lupusband-positiven akuten GvHD zeigte sich ein histologisch besonders schweres Bild mit ausgeprägter Epidermolyse. Ein Einfluss quoad vitam oder auf den klinischen Schweregrad

ließ sich nicht zeigen. Die Lupusband-positiven Fälle traten bevorzugt in der späteren Phase von aGvHD auf.

Für den klinischen Schweregrad und das Ein-Jahres-Überleben bei aGvHD günstig waren hohe Zellzahlen von IDEC (CD206⁺/CD11c⁺), plasmazytoiden Dendritischen Zellen (BDCA-2⁺) und Mastzellen. Diese Zusammenhänge wurden bislang nicht an Hautbiopsien gezeigt und könnten klinisch bedeutsam sein.

Die in dieser Arbeit an Hand einer kleineren Fallzahl retrospektiv erstellten Scores sollten in zukünftigen Untersuchungen mit höherer Patientenzahl unabhängig prospektiv validiert werden. Die Dynamik der kutanen GvHD könnte darüber hinaus mit weiteren Methoden wie durchflußzytometrischer Analyse und Gewinnung von sequentiellen Hautproben im zeitlichen Verlauf analysiert werden.

Referenzen

1. Abraham DJ, Bou-Gharios G, Beauchamp JR, Plater-Zyberk C, Maini RN, Olsen I : Function and regulation of the murine lymphocyte CD2 receptor. **J Leukoc Biol** **49**: 329-41, 1991
2. Adamkiewicz TV, Szaboles P, Haight A, Baker KS, Staba S, Kedar A et al. : Unrelated cord blood transplantation in children with sickle cell disease: review of four-center experience. **Pediatr Transplant** **11**: 641-4, 2007
3. Aractingi S, Gluckman E, Dauge-Geffroy MC, Le Goué C, Flahaut A, Dubertret L et al. : Langerhans' cells are depleted in chronic graft versus host disease. **J Clin Pathol** **50**: 305-9, 1997
4. Ashkenazi A : Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nat Rev Cancer** **2**: 420-30, 2002
5. Banchereau J, Steinman RM : Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** **392**: 245-52, 1998
6. Bautista EM, Gregg D, Golde WT : Characterization and functional analysis of skin-derived dendritic cells from swine without a requirement for in vitro propagation. **Vet Immunol Immunopathol** **88**: 131-48, 2002
7. Bieber T, Ring J, Braun-Falco O : Comparison of different methods for enumeration of Langerhans cells in vertical cryosections of human skin. **Br J Dermatol** **118**: 385-92, 1988
8. Billingham RE : The biology of graft-versus-host reactions. **Harvey Lect** **62**: 21-78, 1966-1967
9. Cahn J, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH et al. : Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. **Blood** **106**: 1495-500, 2005
10. Canninga-van Dijk MR, Sanders CJ, Verdonck LF, Fijnheer R, van den Tweel JG : Differential diagnosis of skin lesions after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. **Histopathology** **42**: 313-30, 2003
11. Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R : Mini-allografts: ongoing trials in humans. **Bone Marrow Transplant** **25**: 345-50, 2000
12. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OMZ : Triptolide, a constituent of immunosuppressive Chinese herbal medicine, is a potent suppressor of dendritic-cell maturation and trafficking. **Blood** **106**: 2409-16, 2005
13. Correia O, Delgado L, Barbosa IL, Domingues JC, Azevedo R, Vaz CP et al. : CD8+ lymphocytes in the blister fluid of severe acute cutaneous graft-versus-host disease: further similarities with toxic epidermal necrolysis. **Dermatology (Basel)** **203**: 212-6, 2001
14. De Bueger M, Bakker A, Goulmy E : Existence of mature human CD4+ T cells with genuine class I restriction. **Eur J Immunol.** **22**: 875-8, 1992
15. Deguchi M, Aiba S, Ohtani H, Nagura H, Tagami H : Comparison of the distribution and numbers of antigen-presenting cells among T-lymphocyte-mediated dermatoses: CD1a+, factor XIIIa+, and CD68+ cells in eczematous dermatitis, psoriasis, lichen planus and graft-versus-host disease. **Arch Dermatol Res** **294**: 297-302, 2002

16. Delgado-Jimenez Y, Goiriz R, Vargas-Diez E, Fraga J, Garcia-Diez A, Fernandez-Herrera J : Acute graft-versus-host disease (GVHD) overlapping chronic GVHD after reinduction chemotherapy. **Br J Dermatol** **156**: 388-90, 2007
17. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J et al. : Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. **J Clin Invest** **104**: 173-80, 1999
18. Diamond DJ, Chang KL, Jenkins KA, Forman SJ : Immunohistochemical analysis of T cell phenotypes in patients with graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation** **59**: 1436-44, 1995
19. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Aït-Yahia S et al. : Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J Exp Med** **188**: 373-86, 1998
20. Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S, Schwingshackl P, Forstner M, Stoitzner P et al. : Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. **Int Immunol** **16**: 877-87, 2004
21. Elliott CJ, Sloane JP, Sanderson KV, Vincent M, Shepherd V, Powles R : The histological diagnosis of cutaneous graft versus host disease: relationship of skin changes to marrow purging and other clinical variables. **Histopathology** **11**: 145-55, 1987
22. Esteban JM, Somlo G : Skin biopsy in allogeneic and autologous bone marrow transplant patients: a histologic and immunohistochemical study and review of the literature. **Mod Pathol** **8**: 59-64, 1995
23. Facchetti F, Vermi W : [Plasmacytoid monocytes and plasmacytoid dendritic cells. Immune system cells linking innate and acquired immunity] **Pathologica** **94**: 163-75, 2002
24. Facchetti F, Vermi W, Mason D, Colonna M : The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. **Virchows Arch** **443**: 703-17, 2003
25. Fehérvári Z, Sakaguchi S : CD4+ Tregs and immune control. **J Clin Invest** **114**: 1209-17, 2004
26. Ferrara JL : Cellular and molecular mechanisms of graft-versus-host disease. **Transfus Sci** **15**: 197-206, 1994
27. Ferrara JLM, Cooke KR, Teshima T : The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. **Int J Hematol** **78**: 181-7, 2003
28. Fimiani M, Di Renzo M, Rubegni P : Mechanism of action of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. **Br J Dermatol** **150**: 1055-60, 2004
29. Fithian E, Kung P, Goldstein G, Rubinfeld M, Fenoglio C, Edelson R : Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. **Proc Natl Acad Sci USA** **78**: 2541-4, 1981
30. Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondón G, Anderlini P et al. : Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. **Blood** **89**: 4531-6, 1997
31. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA et al. : Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. **Transplantation** **18**: 295-304, 1974
32. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A et al. : Expression of CD68 in non-myeloid cell types. **Scand J Immunol** **67**: 453-63, 2008

33. Graze PR, Gale RP : Chronic graft versus host disease: a syndrome of disordered immunity. **Am J Med** **66**: 611-20, 1979
34. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT et al. : Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. **J Exp Med** **189**: 451-60, 1999
35. Gökbuget N, Hoelzer D, Arnold R, Böhme A, Bartram CR, Freund M et al. : Treatment of Adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). **Hematol Oncol Clin North Am** **14**: 1307-25, ix, 2000
36. Hashimoto K : Apoptosis in lichen planus and several other dermatoses. Intra-epidermal cell death with filamentous degeneration. **Acta Derm Venereol** **56**: 187-210, 1976
37. Hepburn NC, McLaren KM, Turner ML, Beveridge GW : The role of skin biopsies in bone marrow transplant recipients. **Q J Med** **86**: 715-7, 1993
38. Hertl-Yazdi MS, Hertl M : [Bullous drug reactions] **Hautarzt** **56**: 16-23, 2005
39. Hitchins L, Fucich LF, Freeman SM, Millikan LE, Marrogi AJ : Immunophenotyping as a diagnostic tool to differentiate lichen planus from chronic graft-versus-host disease: diagnostic observations on two patients. **J Investig Med** **45**: 463-8, 1997
40. Horn TD : Acute cutaneous eruptions after marrow ablation: roses by other names? **J Cutan Pathol** **21**: 385-92, 1994
41. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ et al. : Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. **Blood** **75**: 555-62, 1990
42. Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH et al. : Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. **J Clin Invest** **113**: 701-8, 2004
43. Ingalls RR, Golenbock DT : CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. **J Exp Med** **181**: 1473-9, 1995
44. Janin-Mercier A, Saurat JH, Bourges M, Sohier J, Jean LD, Gluckman E : The lichen planus like and sclerotic phases of the graft versus host disease in man: an ultrastructural study of six cases. **Acta Derm Venereol** **61**: 187-93, 1981
45. Keever-Taylor CA, Bredeson C, Loberiza FR, Casper JT, Lawton C, Rizzo D et al. : Analysis of risk factors for the development of GVHD after T cell-depleted allogeneic BMT: effect of HLA disparity, ABO incompatibility, and method of T-cell depletion. **Biol Blood Marrow Transplant** **7**: 620-30, 2001
46. Kondo S, Akashi T, Katsuta H, Iwakiri R, Anzai K, Nagafuchi S et al. : [B cells as key contributors in determining the level of immune responses -B-cell-targeted therapy in patients with autoimmune diseases] **Fukuoka Igaku Zasshi** **96**: 86-92, 2005
47. Laurin D, Kanitakis J, Bienvenu J, Bardin C, Bernaud J, Lebecque S et al. : Allogeneic reaction induces dendritic cell maturation through proinflammatory cytokine secretion. **Transplantation** **77**: 267-75, 2004
48. Leisenring WM, Martin PJ, Petersdorf EW, Regan AE, Aboulhosn N, Stern JM et al. : An acute graft-versus-host disease activity index to predict survival after hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens. **Blood** **108**: 749-55, 2006
49. Lerner KG, Kao GF, Storb R, Buckner CD, Clift RA, Thomas ED : Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. **Transplant Proc** **6**: 367-71, 1974

50. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ : Characterization of human blood dendritic cell subsets. **Blood** **100**: 4512-20, 2002
51. Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG et al. : Dendritic cell development from common myeloid progenitors. **Ann N Y Acad Sci** **938**: 167-73; discussion 173-4, 2001
52. Marra DE, McKee PH, Nghiem P : Tissue eosinophils and the perils of using skin biopsy specimens to distinguish between drug hypersensitivity and cutaneous graft-versus-host disease. **J Am Acad Dermatol** **51**: 543-6, 2004
53. Martin P, Nash R, Sanders J, Leisenring W, Anasetti C, Deeg HJ et al. : Reproducibility in retrospective grading of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant** **21**: 273-9, 1998
54. Martino R, Romero P, Subirá M, Bellido M, Altés A, Sureda A et al. : Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. International Bone Marrow Transplant Registry. **Bone Marrow Transplant** **24**: 283-7, 1999
55. Marvel J, Lightstone E, Samberg NL, Ettinghausen D, Stauss HJ : The CD45RA molecule is expressed in naive murine CTL precursors but absent in memory and effector CTL. **Int Immunol** **3**: 21-8, 1991
56. Massi D, Franchi A, Pimpinelli N, Laszlo D, Bosi A, Santucci M : A reappraisal of the histopathologic criteria for the diagnosis of cutaneous allogeneic acute graft-vs-host disease. **Am J Clin Pathol** **112**: 791-800, 1999
57. McKenna K, Beignon A, Bhardwaj N : Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. **J Virol** **79**: 17-27, 2005
58. Meng X, Lin M, Mou H, Fu J, Zhang R : [Evaluation of interferon-gamma producing-cells using enzyme linked immunospot assay in mice model of acute graft versus host disease] **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban** **35**: 397-402, 2006
59. Mohty M, Blaise D, Faucher C, Bardou V, Gastaut J, Viens P et al. : Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. **Leukemia** **19**: 1-6, 2005
60. Murphy GF, Sueki H, Teuscher C, Whitaker D, Korngold R : Role of mast cells in early epithelial target cell injury in experimental acute graft-versus-host disease. **J Invest Dermatol** **102**: 451-61, 1994
61. Nagata S, Soh I, Ogura M, Iijima M : [Differential diagnosis of post-transfusion graft-versus-host disease (GVHD) by rapid immunopathologic examination of the skin] **Nippon Rinsho** **55**: 2262-6, 1997
62. Nagorsen D, Voigt S, Berg E, Stein H, Thiel E, Loddenkemper C : Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. **J Transl Med** **5**: 62, 2007
63. Naseri M, Moazzeni SM, Pourfathollah AA : APAAP complex: production and usage in immunocytochemical and immunohistochemical staining. **Hum Antibodies** **16**: 107-15, 2007
64. Natkunam Y, Rouse RV, Zhu S, Fisher C, van De Rijn M : Immunoblot analysis of CD34 expression in histologically diverse neoplasms. **Am J Pathol** **156**: 21-7, 2000

65. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N et al. : Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. **Immunology** **82**: 487-93, 1994
66. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F et al. : Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts **Nat Immunol** **7**: 652-62, 2006
67. Ogawa Y, Yamazaki K, Kuwana M, Mashima Y, Nakamura Y, Ishida S et al. : A significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye in patients with chronic GVHD. **Invest Ophthalmol Vis Sci** **42**: 111-9, 2001
68. Osawa J, Kitamura K, Saito S, Ikezawa Z, Nakajima H : Immunohistochemical study of graft-versus-host reaction (GVHR)-type drug eruptions. **J Dermatol** **21**: 25-30, 1994
69. Perreault C, Pelletier M, Landry D, Gyger M : Study of Langerhans cells after allogeneic bone marrow transplantation. **Blood** **63**: 807-11, 1984
70. Peszkowski MJ, Fujiwara K, Warfvinge G, Larsson A : Experimental graft versus host disease in the (BN x LEW) F1 rat hybrid: an immunohistochemical study of early disease in oral mucosa. **Oral Dis** **2**: 2-10, 1996
71. Porcelli SA, Segelke BW, Sugita M, Wilson IA, Brenner MB : The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. **Immunol Today** **19**: 362-8, 1998
72. Reddy V, Iturraspe JA, Tzolas AC, Meier-Kriesche H, Schold J, Wingard JR : Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. **Blood** **103**: 4330-5, 2004
73. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J et al. : High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. **Blood** **108**: 1291-7, 2006
74. Sale GE, Shulman HM, Gallucci BB, Thomas ED : Young rete ridge keratinocytes are preferred targets in cutaneous graft-versus-host disease. **Am J Pathol** **118**: 278-87, 1985
75. Sanchez-Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E, Strominger JL, Burakoff SJ et al. : Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytolysis: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. **Proc Natl Acad Sci USA** **79**: 7489-93, 1982
76. Santoro A, Majorana A, Roversi L, Gentili F, Marrelli S, Vermi W et al. : Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. **J Pathol** **205**: 426-34, 2005
77. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH : Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. **Chembiochem** **2**: 20-9, 2001
78. Schnopp C : [Bullae and blisters--differential diagnosis] **MMW Fortschr Med** **149**: 29-32, 2007
79. Shibaki A, Meunier L, Ra C, Shimada S, Ohkawara A, Cooper KD : Differential responsiveness of Langerhans cell subsets of varying phenotypic states in normal human epidermis. **J Invest Dermatol** **104**: 42-6, 1995
80. Stuart SP, Klein RM, Clancy JJ : Kinetics of mast cell, fibroblast, and epidermal cell proliferation during acute graft-versus-host disease in the neonatal rat. **J Invest Dermatol** **88**: 369-74, 1987
81. Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Sonobe H, Takeda I, Akagi T : Immunohistochemical localization and distribution of S-100 proteins in the human lymphoreticular system. **Am J Pathol** **116**: 497-503, 1984

82. Takeda H, Mitsuhashi Y, Kondo S, Kato Y, Tajima K : Toxic epidermal necrolysis possibly linked to hyperacute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. **J Dermatol** **24**: 635-41, 1997
83. Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM et al. : Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. **Science** **288**: 522-7, 2000
84. Vakkila J, Lotze MT, Riga C, Jaffe R : A basis for distinguishing cultured dendritic cells and macrophages in cytopins and fixed sections. **Pediatr Dev Pathol** **8**: 43-51, 2005
85. Vakkila J, Thomson AW, Hovi L, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM : Circulating dendritic cell subset levels after allogeneic stem cell transplantation in children correlate with time post transplant and severity of acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant** **35**: 501-7, 2005
86. Valks R, Fernández-Herrera J, Bartolomé B, Fraga J, Daudén E, Garcia-Diéz A : Late appearance of acute graft-vs-host disease after suspending or tapering immunosuppressive drugs. **Arch Dermatol** **137**: 61-5, 2001
87. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y et al. : Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. **Immunity** **12**: 71-81, 2000
88. Van de Velde H, Lorré K, Bakkus M, Thielemans K, Ceuppens JL, de Boer M : CD45RO+ memory T cells but not CD45RA+ naive T cells can be efficiently activated by remote co-stimulation with B7. **Int Immunol** **5**: 1483-7, 1993
89. Vassallo C, Brazzelli V, Alessandrino PE, Varettoni M, Ardigò M, Lazzarino M et al. : Normal-looking skin in oncohaematological patients after allogenic bone marrow transplantation is not normal. **Br J Dermatol** **151**: 579-86, 2004
90. Warren EH, Gavin M, Greenberg PD, Riddell SR : Minor histocompatibility antigens as targets for T-cell therapy after bone marrow transplantation. **Curr Opin Hematol** **5**: 429-33, 1998
91. Weedon D, Searle J, Kerr JF : Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. **Am J Dermatopathol** **1**: 133-44, 1979
92. Weisdorf DJ, Hurd D, Carter S, Howe C, Jensen LA, Wagner J et al. : Prospective grading of graft-versus-host disease after unrelated donor marrow transplantation: a grading algorithm versus blinded expert panel review. **Biol Blood Marrow Transplant** **9**: 512-8, 2003
93. Wollenberg A, Mommaas M, Oppel T, Schottdorf E, Günther S, Moderer M : Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. **J Invest Dermatol** **118**: 327-34, 2002
94. Wollenberg A, Wagner M, Günther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M et al. : Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. **J Invest Dermatol** **119**: 1096-102, 2002
95. Wollenberg A, Wen S, Bieber T : Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical applications of a flow cytometric micromethod. **Cytometry** **37**: 147-55, 1999
96. Zuniga EI, McGavern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C, Oldstone MBA : Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. **Nat Immunol** **5**: 1227-34, 2004
97. del Hoyo GM, Martín P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C : Characterization of a common precursor population for dendritic cells. **Nature** **415**: 1043-7, 2002

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinisches Bild von akuter Graft versus Host Disease (links) im Vergleich zu Arzneireaktion (rechts) am Beispiel zweier Patienten mit Befall der Rückenpartie	1
Abbildung 2: Chronische lichenoid GvHD, 9 Monate nach KMT	4
Abbildung 3: Sklerodermiforme GvHD, Verlaufskontrolle 1 Jahr nach Abbildung 2	4
Abbildung 4: Hypothese zur Pathophysiologie der akuten Graft versus Host Disease. Ferrara et al. (1998)	7
Abbildung 5: Verteilung der Grunderkrankungen unter Patienten mit akuter GvHD	14
Abbildung 6: Zeitpunkt der Erstmanifestation von GvHD nach allogener Transplantation	15
Abbildung 7: Gegenüberstellung der Biopsieregionen in beiden Patientengruppen	15
Abbildung 8: „Neuner-Regel“ zur Abschätzung der Körperoberfläche nach Wallace	17
Abbildung 9: Histopathologischer Beurteilungsbogen	22
Abbildung 10: Schema zur APAAP-Methode	27
Abbildung 11 : Klinischer Erhebungsbogen zur Evaluation des GvHSco	33
Abbildung 12: Positive Korrelation von GvHSco und Glucksberg Score, jeweils unabhängig vom Ein-Jahres-Überleben	41
Abbildung 13: Negative Korrelation zwischen Anzahl CD1a ⁺ und CD208 ⁺ reifer DC	54
Abbildung 14: Memory-TLC bei akuter GvHD vorwiegend subepidermal nachweisbar	55
Abbildung 15: Lupusband typisch für spät-manifestierende aGvHD-Fälle	57
Abbildung 16: Epidermale Infiltration durch CD206 ⁺ IDEC bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusbandnachweis stärker	58
Abbildung 17: Infiltration durch T-Zellen bei aGvHD und positivem Lupusband stärker	58
Abbildung 18: Infiltration durch Regulatorische T-Zellen bei aGvHD und positivem Lupusband stärker	59
Abbildung 19: Infiltration durch CD45RA ⁺ naive T-Lymphozyten bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusbandnachweis stärker ausgeprägt	59
Abbildung 20: Epidermolyse bei GvHD und positivem Lupusband in der Regel deutlicher	60
Abbildung 21: Satellitenzellnekrose in den basalen Schichten der Epidermis bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusband stets nachweisbar	60
Abbildung 22: Subepidermales eosinophiles Infiltrat bei GvHD-Patienten mit positivem Lupusband insgesamt häufiger als bei negativem Lupusband	61
Abbildung 23: Lineare Regression zwischen Sensitivität histologischer Kriterien und Rang	68
Abbildung 24: Lineare Regression zwischen Spezifität histologischer Kriterien und Rang	68
Abbildung 25: Epidermale Infiltration durch CD2 ⁺ TLC bei akuter GvHD stärker	72
Abbildung 26: Stärkeres Infiltrat durch CD45RO ⁺ Memory-TLC bei akuter GvHD	72
Abbildung 27: Memory-TLC als dominierender T-Zell-Typ bei akuter GvHD	73
Abbildung 28: Geringere CD1a-Expression auf epidermalen DC bei akuter GvHD	73
Abbildung 29: Stärkere subepidermale CD34-Expression bei Arzneiexanthenen	74
Abbildung 30: Regression der Sensitivität immunhistochemischer Parameter u. deren Rang	76

Abbildung 31: Regression der Spezifität immunhistochemischer Parameter u. deren Rang	76
Abbildung 32: Regression der Spezifität verschiedener immunhistochemischer Parameter und deren jeweiliger Rangordnung, modifizierte Ordinalskala (Lücke bei 2 u. 3)	77
Abbildung 33: Retrospektive Cut-Off-Definition für den DSHIG-Score	79
Abbildung 34: Ballonierung basaler Zellen differentialdiagnostisch typisch für akute GvHD	118
Abbildung 35 : Subepidermale Spaltbildung (Epidermolyse) bei akuter GvHD häufiger	118
Abbildung 36: Diffuses lymphozytäres Infiltrat in d. Basalmembranzzone typisch für GvHD	119
Abbildung 37 : Eosinophiles Infiltrat bei Arzneireaktionen häufiger	119

Verzeichnis der Paraffinschnitte

Paraffinschnitt 1: Infiltration von Junktionszone und Epidermis durch Lymphozyten.....	38
Paraffinschnitt 2: Ballonierung basaler Zellen bei epidermaler Differenzierungsstörung.....	38
Paraffinschnitt 3: Epidermale Dyskeratose mit eosinophilen Körperchen.....	39
Paraffinschnitt 4: Ausgeprägte Spongiose bei aGvHD.....	39
Paraffinschnitt 5: Lückenhafte Basalmembran bei aGvHD.....	40
Paraffinschnitt 6: Histologisches Vollbild einer schweren initialen GvHD.....	40
Paraffinschnitt 7 : Epidermotrope Infiltration durch T-Lymphozyten bei GvHD (Détail).....	43
Paraffinschnitt 8: Epidermotrope Infiltration durch T-Lymphozyten bei aGvHD (Übersicht).....	44
Paraffinschnitt 9: CD25 ⁺ epidermotrope Regulatorische T-Zellen bei akuter GvHD.....	44
Paraffinschnitt 10: CD45RO ⁺ epidermotrope mature T-Zellen bei akuter GvHD.....	45
Paraffinschnitt 11: CD45RA ⁺ v.a. subepidermal gelegene naive T-Zellen (Übersicht).....	45
Paraffinschnitt 12: CD45RA ⁺ v.a. subepidermal gelegene naive T-Zellen (Detail).....	46
Paraffinschnitt 13: CD209 (DC-SIGN) ⁺ Dendritische Zellen in der Dermis bei akuter GvHD.....	49
Paraffinschnitt 14: CD208 (DC-LAMP) ⁺ Dendritische Zellen in der Dermis bei akuter GvHD.....	49
Paraffinschnitt 15: Epidermotrope CD68 ⁺ Zellen bei einem Patienten mit akuter GvHD.....	51
Paraffinschnitt 16: CD34-Expression auf vaskulären Endothelzellen und Fibroblasten ähnelnden subepidermal gelegenen Zellen bei einem Patienten mit akuter GvHD.....	51
Paraffinschnitt 17: CD207 (Langerin) ⁺ epidermale Langerhans Zellen bei Arzneiexanthem.....	52
Paraffinschnitt 18: Epidermale CD1a ⁺ Langerhans Zellen bei Arzneiexanthem.....	52

Verzeichnis der Gefrierschnitte

Gefrierschnitt 1: Subepidermal gelegene CD1b ⁺ IDEC bei akuter GvHD (Ausschnitt 1).....	46
Gefrierschnitt 2: Subepidermal gelegene CD1b ⁺ IDEC bei akuter GvHD (Ausschnitt 2).....	47
Gefrierschnitt 3: CD11c ⁺ Dendritische Zellen in Epidermis und Junktionszone bei aGvHD.....	47
Gefrierschnitt 4: CD206 ⁺ Inflammatorische Dendritische Epidermale Zellen bei aGvHD.....	48
Gefrierschnitt 5: Subepidermal gelegene CD197 (CCR-7) ⁺ Dendritische Zellen bei GvHD.....	50
Gefrierschnitt 6: Subepidermale plasmazytoide Dendritische Zellen (CD303 ⁺) bei aGvHD.....	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikationen für Knochenmarks- und Stammzelltransplantation.....	2
Tabelle 2: Klinische Klassifikation nach Glucksberg [31].....	6
Tabelle 3: Histologische Klassifikation, modifiziert nach Horn (1994) [40].....	7
Tabelle 4: Alters- und Geschlechterverteilung der Patientengruppen.....	14
Tabelle 5: Transplantatassoziierte Grunddaten.....	14
Tabelle 6: Stadieneinteilung nach GvHScO (enstpricht GvHScOGrade).....	19
Tabelle 7: Erläuterungen zum Antikörperprotokoll.....	25
Tabelle 8: Semiquantitative Bewertung des zellulären Infiltrats.....	33
Tabelle 9: Technische Daten und Bezugsquellen zu den verwendeten Antikörper.....	35
Tabelle 10 : Klinische und histologische Schweregrade der Patienten mit GvHD.....	41
Tabelle 11: Histologische Klassifikation bei Patienten mit Arzneiexanthem.....	41
Tabelle 12: Lupusband bei Patienten mit GvHD häufiger nachweisbar.....	56
Tabelle 13: Modifizierter Histologischer Score zur Abschätzung des Schweregrads akuter GvHD (GvHiScore).....	64
Tabelle 14: Vier-Feldertafel zur Darstellung der Epidermolysen bei AR und aGvHD; Berechnung von Sensitivität und Spezifität.....	66
Tabelle 15: Ordinale Kategorisierung der histopathologischen Kriterien nach Sensitivität und Spezifität.....	67
Tabelle 16: Ordinale Kategorisierung der histopathologischen Kriterien nach Relevanz.....	67
Tabelle 17: C3-Komplement-Ablagerungen in der Junktionszone spezifisch für GvHD.....	69
Tabelle 18: Ausgeprägte perivaskuläre C3-Komplement-Ablagerungen sprechen für GvHD.....	69
Tabelle 19: Infiltration durch TLC, hämatopoietische Stammzellen und verschiedene APC als Unterscheidungskriterien zwischen GvHD und Arzneireaktionen.....	74
Tabelle 20: Ordinale Kategorisierung der immunhistochemischen Kriterien zur Unterscheidung von GvHD und AR nach Sensitivität und Spezifität.....	75
Tabelle 21: Ordinale Skalierung der immunhistochemischen Kriterien nach Relevanz.....	77
Tabelle 22: Differentialdiagnostischer Score basierend auf Histopathologie und Immunhistochemie (DSHIG).....	79
Tabelle 23: Semiquantitative Bewertung des zellulären Infiltrats.....	89
Tabelle 24: Typische Histopathologie bei akuter Graft versus Host Disease.....	107
Tabelle 25: Verteilung der Werte des modifizierten histologischen Scores (GvHiScore).....	107
Tabelle 26: Korrelationen von Leber- und gastrointestinaler Kompromission nach Glucksberg mit der Überlebensrate bei akuter Graft versus Host Disease.....	108
Tabelle 27: Korrelationen von klinischem GvHScO und GvHScOGrade mit dem Glucksberg Score.....	108
Tabelle 28: Antigenexpression auf Zelloberflächen bei Patienten mit akuter GvHD.....	109
Tabelle 29: Immunglobulin-, Komplement-, und Fibrinogenablagerungen bei aGvHD.....	110

Tabelle 30: Korrelation zwischen immunhistochemischen Markern (epidermal) und Schweregrad der kutanen GvHD (Glucksberg)	111
Tabelle 31: Korrelation zwischen immunhistochemischen Markern (subepidermal) und Schweregrad der kutanen GvHD (Glucksberg).....	112
Tabelle 32: Regression zwischen Sensitivität immunhistochemischer Kriterien und deren Rang	113
Tabelle 33: Regression zwischen Spezifität immunhistochemischer Kriterien und deren Rang; basierend auf der ursprünglichen Ordinalskala	113
Tabelle 34: Regression zwischen Spezifität immunhistochemischer Kriterien und deren Rang; basierend auf der modifizierten Ordinalskala	113
Tabelle 35: Korrelationen der Komplement-, Immunglobulin- und Fibrinogenablagerungen bei akuter GvHD	114
Tabelle 36: Korrelation der histopathologischen Kriterien bei akuter Graft versus Host Disease.	115
Tabelle 37: Korrelationen von immunhistochemischen Markern (gesamt) und klinischem Schweregrad (Haut) nach Glucksberg.....	116
Tabelle 38: Unterschiede zwischen Lupusband-positiven und –negativen Patienten mit akuter GvHD bezüglich histopathologischer Kriterien	117
Tabelle 39: Unterschiede zwischen Lupusband-positiven und –negativen Patienten mit akuter GvHD bezüglich immunhistochemischer Marker	117
Tabelle 40: Übersicht über Kreuztabellen zur Histopathologie von AR und aGvHD	120
Tabelle 41: Übersichtstabellen zur Ordinalskalierung der ausgewählten histopathologischen Kriterien anhand deren Sensitivität (oben) und Spezifität (unten).....	121
Tabelle 42: Weitere Tabellen zur Regressionsanalyse von Sensitivität und Ordinalskalierung	121
Tabelle 43: Weitere Tabellen zur Regressionanalyse von Spezifität histopathologischer Kriterien und zugehöriger Ordinalskalierung	122

6 APPENDIX

Tabelle 24: Typische Histopathologie bei akuter Graft versus Host Disease

Die vorliegende Tabelle verdeutlicht das typische histopathologische Bild der akuten GvHD im Rahmen der Studie (zur Erklärung der Chiffren vgl. Material und Methoden, Seite 22). In der Mehrzahl der Fälle (Median) lag folgendes histopathologische Bild vor: deutliche lymphozytäre Infiltration von dermoepidermaler Junctionszone (diffus = 2, dunkelgrau unterlegt) und den übrigen Abschnitten (fokal = 1, hellgrau unterlegt), diffuse Ballonierung basaler und suprabasaler Keratinozyten (diffus = 2, dunkelgrau unterlegt), Einzelzellapoptose (basal fokal, suprabasal diffus), eine diffuse epidermale Differenzierungsstörung, fokale Satellitenzell-Nekrose, Epidermolyse, Spongiose und Ausdünnung der Basalmembran. Um dem Leser eine genauere Vorstellung über die Statistik zu ermöglichen, wurden zusätzl. zum Median die 25. und 75. Perzentile angegeben.

Histomorphologisches Kriterium	Median	Perzentil 25	Perzentil 75
Erythrozytenextravasate, dermal	0	0	1
Kollagenes Bindegewebe	0	0	0
Breite der Basalmembran	1	1	1
Kontinuität der Basalm.	1	0	1
Melanozyteninfiltration	0	0	1
Mastzellinfiltration	0	0	0
Infiltration durch eosinophile Granulozyten	0	0	0
Subepidermale Infiltration durch Lymphozyten	1	0	2
Infiltration der Junctionszone durch Lymphozyten	2	1	2
Epidermale Infiltration durch Lymphozyten	1	0	2
Satellitenzellnekrose im Stratum basale	1	0	2
Ballonierung basaler Zellen	2	2	2
Apoptose basaler Zellen	1	1	2
Satellitenzellnekrose in höheren Schichten	1	0	2
Apoptose von Keratinozyten höherer Schichten	2	1	2
Ballonierung suprabasaler Keratinozyten	2	1	2
Epidermale Differenzierungsstörung	2	1	2
Verhornungstyp (Ortho-/ Dyskeratose)	0	0	0
Spongiose	1	0	1
Epidermisdicke	1	0	1
Epidermolyse	1	0	1

Tabelle 25: Verteilung der Werte des modifizierten histologischen Scores (GvHiScore)

Mit einem Medianwert von 9 lag bei den meisten untersuchten Patienten ein niedriger GvHiScore vor; mit einem Mittelwert von 16,58 und einem Maximum von 45 ist die Stratifizierung des Gradings bei starken Veränderungen größer. Der GvHiScore dient der verbesserten Verlaufsbeurteilung auf histopathologischer Basis.

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Median	Perzentil 25	Perzentil 75
GvHiScore	16,58	2,00	45,00	9,00	6,00	27,00

Tabelle 26: Korrelationen von Leber- und gastrointestinaler Kompromission nach Glucksberg mit der Überlebensrate bei akuter Graft versus Host Disease

Untersucht wurden der Einfluss von intestinale („GIT“= Gastrointestinaltrakt) und Leberbefall durch akute GvHD (nach Aktenlage zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme, bewertet nach Glucksbergkriterien, bei 19 von 20 Patienten ausreichend dokumentiert) auf das Ein-Jahres-Überleben der Patienten. Eine hochsignifikante negative Korrelation war für beide Parameter nachweisbar. Somit haben GI- und Leberbefall durch akute GvHD einen nachweislich negativen Effekt auf die Prognose. (**) Korrelation auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

Nicht-parametrische		Korrelation		
Kendall-Tau-b		Einjahres- überleben	Leber	GIT
Einjahres- überleben	Korrelationskoeffizient	1,000	-,601(**)	-,656(**)
	Sig. (2-seitig)	.	,008	,003
	N	20	19	19
Leber	Korrelationskoeffizient	-,601(**)	1,000	,775(**)
	Sig. (2-seitig)	,008	.	,000
	N	19	19	19
GIT	Korrelationskoeffizient	-,656(**)	,775(**)	1,000
	Sig. (2-seitig)	,003	,000	.
	N	19	19	19

Tabelle 27: Korrelationen von klinischem GvHSCO und GvHSCOGrade mit dem Glucksberg Score

Untersucht wurden Korrelation zwischen dem etablierten Glucksberg-Score und dem im Rahmen dieser Dissertation neu entwickelten klinischen GvHSCO / GvHSCOGrade zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme. Erwartungsgemäß korrelierten die GvHSCO und GvHSCOGrade sowie der Glucksberg Score und die kutane Bewertungskomponente hochsignifikant (nicht unabhängig). Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem kutanen Glucksberg-Score und dem vorgeschlagenen GvHSCO bzw. GvHSCOGrade besteht. (**) Korrelation auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig); (*) Korrelation auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)

Nicht-parametrische	Korrelation	Kendall-	Glucksbergscor	GvHSCO	Glucksberg,
Tau-b	Koeffizient	e	Grade	GvHSCO	kutan
<u>Glucksberg score</u>	<u>Korrelationskoeffizient</u>	1,000	,262	,237	,555(**)
	Sig. (2-seitig)	.	,200	,195	,006
	N	20	20	20	20
GvHSCOGrade	Korrelationskoeffizient	,262	1,000	,833(**)	,506(*)
	Sig. (2-seitig)	,200	.	,000	,014
	N	20	20	20	20
GvHSCO	Korrelationskoeffizient	,237	,833(**)	1,000	,428(*)
	Sig. (2-seitig)	,195	,000	.	,020
	N	20	20	20	20
Glucksberg, kutan	Korrelationskoeffizient	,555(**)	,506(*)	,428(*)	1,000
	Sig. (2-seitig)	,006	,014	,020	.
	N	20	20	20	20

Tabelle 28: Antigenexpression auf Zelloberflächen bei Patienten mit akuter GvHD

Um das zelluläre Profil der akuten GvHD durch Immunhistochemie genau zu skizzieren, wurden die einzelnen zellulären Marker deskriptiv analysiert und jeweils auf Basis der semiquantitativen Zellzahl Medianwert, 25. und 75. Perzentile bestimmt (semiquantitative, ordinal skalierte Bewertung vgl. S. 31ff: 0 = 0; 1 = 1-4; 2 = 5-19; 3 = 20-49; 4 = 50-149). Um die Übersichtlichkeit zu verbessern, wurden die zusammengehörigen Antikörper, jeweils drei Zeilen entsprechend der Zelllagen epidermal (_e), subepidermal (_s) und gesamt (_g), im Wechsel grau und farblos unterlegt.

Antikörper Zelllage	Zellzahl semiquantitativ			Antikörper Zelllage	Zellzahl semiquantitativ		
	Mediar	Perzentil 25	Perzentil 75		Mediar	Perzentil 25	Perzentil 75
CD1a_e	1	0	2	CD45R0_e	1	1	2
CD1a_s	1	0	2	CD45R0_s	3	2,50	4
CD1a_g	2	0,50	2	CD45R0_g	3	2,50	4
CD1b_e	0	0	1	CD68_e	1	0	2
CD1b_s	2	1	2	CD68_s	3,50	3	4
CD1b_g	2	1	3	CD68_g	3,50	3	4
CD2_e	2	1	3	CD206_e	1	0	2
CD2_s	3,50	3	4	CD206_s	4	3	4
CD2_g	4	3	4	CD206_g	4	3	4
CD11c_e	1	0	2	CD207_e	2	1	2
CD11c_s	3	2	4	CD207_s	1	1	2
CD11c_g	3	2	4	CD207_g	2	2	3
CD20_e	0	0	0	CD208_e	0	0	0
CD20_s	0	0	1	CD208_s	3	2	3
CD20_g	0	0	1	CD208_g	3	2	3
CD25_e	0	0	1	CD209_e	0	0	0
CD25_s	2	1,50	3	CD209_s	3	3	4
CD25_g	2	1,50	3	CD209_g	3	3	4
CD34_e	0	0	0	BDCA2_e	0	0	0
CD34_s	0,50	0	1	BDCA2_s	1	1	2
CD34_g	0,50	0	1	BDCA2_g	1	1	2
CD45RA_e	0	0	2	CCR-7_e	0	0	1
CD45RA_s	2	2	3	CCR-7_s	1	0,25	2
CD45RA_g	2	2	3	CCR-7_g	2	1	2
Erläuterung:				S100_e	2	1	2
„_s“: subepidermal; „_e“: epidermal; „_g“: gesamt;				S100_s	1,50	1	2
Daten: semiquantitativ, ordinal skaliert				S100_g	2	1	3

Tabelle 29: Immunglobulin-, Komplement-, und Fibrinogenablagerungen bei aGvHD

Die tabellarische Übersicht fasst die Ergebnisse der Direkten Immunfluoreszenzuntersuchung (DIF) für Immunglobuline (Ig), Komplementfaktoren (C) und Fibrinogen zusammen. Für alle untersuchten Faktoren gilt, dass die Untersuchung in >50% der Fälle negativ war (Median = 0). Am deutlichsten war der Nachweis für perivaskuläre Fibrinogenablagerungen (Mittelwert 0,35, 75.Perzentile 0,50), gefolgt von perivaskulärem (Mittelwert 0,30) und juktionalem (Mittelwert 0,25) C3, dermalen IgM-Ablagerungen (Mittelwert 0,20). Zusammenfassend lassen die vorwiegend perivaskulären Immunkomplexnachweise auf eine vaskulitische Komponente der akuten GvHD schließen.

Art und Ort der Ablagerung	Mittelwert	Median	25. Perzentil	75. Perzentil
IgA, Basamembranzone	,00	,00	,00	,00
IgA, perivaskulär	,00	,00	,00	,00
IgE, dermal	,15	,00	,00	,00
IgE, Basamembranzone	,00	,00	,00	,00
IgE, perivaskulär	,00	,00	,00	,00
IgG, dermal	,05	,00	,00	,00
IgG, perivaskulär	,00	,00	,00	,00
IgM, dermal	,20	,00	,00	,00
IgM, Basamembranzone	,10	,00	,00	,00
IgM, perivaskulär	,05	,00	,00	,00
Komplement C3, dermal	,10	,00	,00	,00
Komplement C3, Basamembranzone	,25	,00	,00	,00
Komplement C3, perivaskulär	,30	,00	,00	,00
Komplement C4, dermal	,05	,00	,00	,00
Komplement C4, Basamembranzone	,05	,00	,00	,00
Komplement C4, perivaskulär	,00	,00	,00	,00
Fibrinogen, dermal	,15	,00	,00	,00
Fibrinogen, Basamembranzone	,15	,00	,00	,00
Fibrinogen, perivaskulär	,35	,00	,00	,50

Tabelle 30: Korrelation zwischen immunhistochemischen Markern (epidermal) und Schweregrad der kutanen GvHD (Glucksberg)

*) Korrelation auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig). **) Korrelation auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig). Listenweises N= 18. Positiv gefärbte Zellen quantifiziert pro 2mm Epidermislänge

NICHT-PARAMETRISCHE KORRELATIONEN (Kendall-Tau-b)		Glucksberg Haut																
		CCR-7	BDC42	CD11b	CD11c	CD206	CD207	CD1a	CD2	CD20	CD25	CD45R0	CD45RA	CD68	CD208	CD209	S100	
Glucksberg	Korrelationskoeffizient	1,000																
Haut	Sig. (2-seitig)																	
CCR-7	Korrelationskoeffizient		1,000															
	Sig. (2-seitig)																	
BDC42	Korrelationskoeffizient			1,000														
	Sig. (2-seitig)																	
CD11b	Korrelationskoeffizient				1,000													
	Sig. (2-seitig)																	
CD11c	Korrelationskoeffizient					1,000												
	Sig. (2-seitig)																	
CD206	Korrelationskoeffizient						1,000											
	Sig. (2-seitig)																	
CD207	Korrelationskoeffizient							1,000										
	Sig. (2-seitig)																	
CD1a	Korrelationskoeffizient								1,000									
	Sig. (2-seitig)																	
CD2	Korrelationskoeffizient									1,000								
	Sig. (2-seitig)																	
CD20	Korrelationskoeffizient										1,000							
	Sig. (2-seitig)																	
CD25	Korrelationskoeffizient											1,000						
	Sig. (2-seitig)																	
CD45R0	Korrelationskoeffizient												1,000					
	Sig. (2-seitig)																	
CD45RA	Korrelationskoeffizient													1,000				
	Sig. (2-seitig)																	
CD68	Korrelationskoeffizient														1,000			
	Sig. (2-seitig)																	
CD208	Korrelationskoeffizient															1,000		
	Sig. (2-seitig)																	
CD209	Korrelationskoeffizient																1,000	
	Sig. (2-seitig)																	
S100	Korrelationskoeffizient																	1,000
	Sig. (2-seitig)																	

Tabelle 31: Korrelation zwischen immunhistochemischen Markern (subepidermal) und Schweregrad der kutanen GvHD (Glucksberg)

*) Korrelation auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig). **) Korrelation auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig). Listenweises N= 18. Positiv gefärbte Zellen quantifiziert pro 2mm Epidermislänge

NIVEL-PARAMETRISCHE KORRELATIONEN (Kendall-Tau-B)		Hautscore nach Glucksberg															
Hautscore nach Glucksberg	Korrelationskoeff.	CCR-7	BDCA2	CD1b	CD11c	CD206	CD207	CD1a	CD2	CD25	CD34	CD45RO	CD45RA	CD68	CD38	CD39	S100
Hautscore nach Glucksberg	1,000	,301	,133	-,018	,052	1,000	,553(**)	-,237	,009	,077	-,064	-,306	,043	-,106	-,121	-,196	-,188
CCR-7	,155	1,000	,524	,932	,801	1,000	,009	,263	,966	,730	,763	,154	,833	,610	,371	,350	,371
BDCA2	,001	,711(**)	1,000	,228	,272	,192	,636(**)	,072	-,180	,130	,081	-,510(*)	,000	-,009	-,384	,158	-,159
CD1b	,155	,001	,044	1,000	,183	,353	,003	,733	,381	,557	,701	,017	1,000	,966	,453	,448	,447
CD11c	,133	,711(**)	,044	,410(*)	1,000	,170	,372	,184	-,133	,063	,123	-,322	-,025	,000	-,340	,051	-,172
CD206	,524	,001	,286	,044	,286	1,000	,074	,376	,510	,772	,555	,128	,902	1,000	,096	,323	,803
CD207	-,018	,228	,410(*)	1,000	,289	-,043	,053	-,211	-,058	,158	-,053	,239	,075	-,187	-,111	-,300	-,444(*)
CD1a	,932	,269	,044	,044	,834	-,043	,797	,308	,771	,465	,799	,253	,709	,356	,585	,029	,501
CD2	,052	,272	,215	,289	1,000	,478(*)	,283	,365	,081	,581(**)	,289	-,187	,337	,066	-,148	-,258	,008
CD34	,801	,183	,286	,147	-,017	-,017	,165	,074	,685	,007	,157	,367	,088	,742	,459	,194	,967
CD25	,000	,192	,170	-,043	,478(*)	1,000	,335	,411(*)	,340	,325	,288	-,321	,248	,458(*)	-,042	,075	,153
CD38	1,000	,353	,405	,834	,017	-,017	1,000	,105	,047	,134	,164	,127	,217	,024	,835	,711	,368
CD39	,553(**)	,656(**)	,372	-,053	,283	,335	1,000	,127	,017	,131	,245	-,372	,224	,035	-,291	,009	,009
CD45RO	,009	,003	,074	,797	,165	,105	,009	,546	,933	,553	,244	,082	,273	,865	,159	,268	,966
CD45RA	-,237	,072	,184	,211	,365	,411(*)	,127	1,000	,103	,184	,126	,009	,247	,157	,044	-,368	,317
CD68	,263	,733	,376	,308	,074	,047	,546	,617	,103	,406	,550	,965	,227	,448	,833	,073	,643
CD38	,009	-,180	-,133	-,058	,081	,340	,017	1,000	,226	,226	,591(**)	,224	,632(**)	,606(**)	,457(*)	,398(*)	,452(*)
CD25	,966	,381	,510	,771	,685	,091	,933	,617	,933	,293	,004	,281	,001	,003	,023	,046	,026
CD34	,077	,130	,063	,158	,581(**)	,325	,131	,184	,226	1,000	,476(*)	-,125	,532(*)	,304	,073	-,349	-,053
CD38	,730	,557	,772	,465	,007	,134	,553	,406	,293	,031	,031	,578	,013	,161	,735	,104	,809
CD25	,064	,081	,123	-,053	,289	,288	,245	,126	,591(**)	,476(*)	1,000	-,009	,682(**)	,559(**)	,210	,000	,491(*)
CD34	,763	,701	,555	,799	,157	,164	,244	,550	,004	,031	-,009	,965	,001	,007	,311	1,000	,028
CD45RO	-,306	-,510(*)	-,322	,239	-,187	-,321	-,372	,009	,224	-,125	1,000	1,000	,152	-,147	,458(*)	,153	-,379
CD45RA	,154	,017	,128	,253	,367	,127	,082	,965	,281	,578	,965	-,009	,464	,485	,029	,464	,073
CD68	,043	,000	-,025	,075	,337	,248	,224	,247	,632(**)	,532(*)	,152	,152	1,000	,471(*)	,372	,040	,365
CD38	,833	1,000	,902	,709	,088	,217	,273	,227	,001	,013	,464	-,001	1,000	,019	,064	,839	,070
CD25	-,106	-,009	,000	-,187	,066	,458(*)	,035	,157	,606(**)	,304	-,147	-,147	,471(*)	1,000	,169	,216	,171
CD34	,610	,966	1,000	,356	,742	,024	,865	,448	,003	,161	,007	,485	,019	-,404	,284	,088	,404
CD68	-,186	-,384	-,340	,111	,148	-,042	-,291	,044	,457(*)	,073	,210	,458(*)	,372	,169	1,000	,183	,213
CD38	,371	,063	,096	,585	,459	,835	,159	,833	,023	,735	,311	,029	,064	,404	,365	,298	,024
CD206	,121	-,154	-,200	-,300	-,258	,075	,009	-,368	,398(*)	-,349	,000	,153	,040	,216	1,000	,342	-,126
CD209	,556	,453	,323	,135	,194	,711	,966	,073	,046	1,000	-,464	,839	,040	,284	,365	-,092	,536
S100	,196	,158	,051	-,444(*)	,008	,153	-,053	-,073	,450(*)	-,053	-,184	-,184	,365	,349	,213	1,000	,137
	,350	,448	,803	,029	,967	,454	,268	,643	,026	,809	,018	,384	,070	,088	,298	-,092	,505
	-,188	-,159	-,172	,137	,448(*)	,188	-,009	,317	,452(*)	,603(**)	,379	-,379	,734(**)	,171	-,462(*)	-,126	1,000
	,371	,447	,404	,501	,026	,358	,966	,128	,026	,006	,028	,073	,000	,404	,024	,536	,505

Tabelle 32: Regression zwischen Sensitivität immunhistochemischer Kriterien und deren Rang

Es wurde ein ANOVA-Test durchgeführt (Abhängige Variable: Spezifität Ordinal; Modell 1). Dieser zeigte eine klare Regression zwischen Sensitivität der immunhistochemischen Kriterien und deren numerischem Rang auf der angepassten Ordinalskala.

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz (Abhängige Variable)
Regression	85,055	1	85,055	142,056	,000 (Spezifität_Ordinal)
Residuen	8,382	14	,599		
Gesamt	93,438	15			

Tabelle 33: Regression zwischen Spezifität immunhistochemischer Kriterien und deren Rang; basierend auf der ursprünglichen Ordinalskala

Es wurde ein ANOVA-Test durchgeführt (Abhängige Variable: Sensitivität Ordinal; Modell 1). Dieser zeigte eine klare Regression zwischen Sensitivität der immunhistochemischen Kriterien und deren numerischem Rang auf der ursprünglichen Ordinalskala.

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz (Einflußvariable)
Regression	206,134	1	206,134	670,564	,000 (Sensitivität)
Residuen	4,304	14	,307		
Gesamt	210,438	15			

Tabelle 34: Regression zwischen Spezifität immunhistochemischer Kriterien und deren Rang; basierend auf der modifizierten Ordinalskala

Es wurde ein ANOVA-Test durchgeführt (Abhängige Variable: Spezifität_Ordinal; Modell 1). Dieser zeigte eine klare Regression zwischen Spezifität der immunhistochemischen Kriterien und deren numerischem Rang auf der angepassten Ordinalskala.

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz (Einflußvariable)
Regression	127,597	1	127,597	763,349	,000 (Spezifität)
Residuen	2,340	14	,167		
Gesamt	129,938	15			

Tabelle 36: Korrelation der histopathologischen Kriterien bei akuter Graft versus Host Disease

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig). ** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig). a) Listenweises N=20

NICHT-PARAMETRISCH KORRELATION (KENDALL-TAU-B)		1-Jahres-Survival	Dicke der Epidermis	Epidermo-lyse	epiderm. Ödem	Verhornungstyp	Str. basale	Ballonierung	Apoptose suprabasal	Ballonierung basal	Apoptose basal	Satellitenzell basal	Lymphozyten, epidermal	Lymphozyten, Junktionsz.	Lymphozyten, subepidermal	Infiltrat, Eosinophilie	Basalmembr., Breite
1-Jahres-überleben	Korrelationskoeff. 1,000	1,000	-0,19	251	241	201	042	050	050	034	175	000	070	-146	-025	-156	-100
Dicke der Epidermis	Sig. (2-seitig) 0,933	-0,19	0,933	253	269	381	842	812	812	884	436	1,000	747	517	905	483	644
Epidermo-lyse	Korrelationskoeff. 0,251	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Epiderm. Ödem	Sig. (2-seitig) 0,253	0,933	0,933	1,000	180	095	970	309	309	330	149	050	084	048	031	050	1,000
Verhornungstyp	Korrelationskoeff. 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Str. basale	Sig. (2-seitig) 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Apoptose suprabasal	Korrelationskoeff. 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Ballonierung basal	Sig. (2-seitig) 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Apoptose basal	Korrelationskoeff. 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Satellitenzell	Sig. (2-seitig) 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Infiltrat, eosinophil	Korrelationskoeff. 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Basalmembr., Breite	Sig. (2-seitig) 0,241	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
1-Jahres-überleben	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Dicke der Epidermis	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Epidermo-lyse	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Epiderm. Ödem	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Verhornungstyp	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Str. basale	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Apoptose suprabasal	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Ballonierung basal	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Apoptose basal	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Satellitenzell	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Infiltrat, eosinophil	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Basalmembr., Breite	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
1-Jahres-überleben	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Dicke der Epidermis	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Epidermo-lyse	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Epiderm. Ödem	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Verhornungstyp	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Str. basale	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Apoptose suprabasal	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Ballonierung basal	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Apoptose basal	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Satellitenzell	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Infiltrat, eosinophil	Korrelationskoeff. 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000
Basalmembr., Breite	Sig. (2-seitig) 0,218	0,933	0,933	0,021	345	370	-0,008	-207	-207	-216	313	0,000	361	429(*)	441(*)	421	0,000

Tabelle 37: Korrelationen von immunhistochemischen Markern (gesamt) und klinischem Schweregrad (Haut) nach Glucksberg

Korrel. n. Kendall-Tau B, *) Signifikanzniveau 0,05 (zweiseitig), **) Signifikanzniveau 0,01 (zweiseitig). Listenweises N= 18. Positiv gefärbte Zellen quantifiziert pro mm² Haut

Nicht-parametr. Korrelationen	CCR-7	3DCA2	CD1b	CD11c	CD206	CD207	CD1a	CD2	CD20	CD25	CD34	CD45R1	CD45RA	CD68	CD208	CD209	S100	Glucksberg Haut
CCR-7	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,000	,450(*)	,261	,027	,413(*)	,009	,096	,000	,184	,203	,098	,188	,115	,081	,198	,168	
BDC A2	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,530(**)	,028	,202	,896	,048	,965	,664	,000	,391	,325	,636	,364	,576	,698	,343	,427	
CD1b	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,011	,147	,368	,557	,151	,473	,588	,710	,128	,837	,836	,096	,362	,803	,105	,524	
CD11c	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,450(*)	,000	,211	,144	,060	,206	,042	,020	,335	,124	,083	,192	,266	,437(*)	,101	,035	
CD206	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,028	,478	,289	,478	,768	,313	,836	,926	,801	,537	,680	,340	,187	,031	,620	,866	
CD207	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,261	,211	,000	,442(*)	,414(*)	,431(*)	,058	,363	,169	,325	,041	,206	,229	,017	,149	,060	
CD1a	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,202	,289	,442(*)	,029	,041	,034	,774	,090	,198	,104	,838	,305	,253	,935	,462	,769	
CD2	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,027	,144	,442(*)	,000	,643(**)	,476(*)	,412(*)	,246	,345	,280	,477(*)	,009	,102	,216	,069	,036	
CD20	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,896	,478	,029	,000	,002	,022	,044	,260	,098	,170	,019	,967	,616	,295	,738	,864	
CD25	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,413(*)	,060	,414(*)	,643(**)	,000	,455(*)	,331	,176	,332	,395	,241	,276	,209	,009	,114	,282	
CD34	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,048	,768	,041	,002	,455(*)	,029	,108	,421	,113	,063	,177	,309	,966	,583	,499	,180	
CD45R0	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,009	,042	,058	,412(*)	,331	,087	,000	,364	,629(**)	,165	,611(**)	,588(**)	,297	,311	,417(*)	,053	
CD45RA	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,966	,836	,774	,044	,108	,672	,094	,000	,002	,432	,003	,004	,145	,125	,041	,383	
CD68	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,096	,081	,363	,246	,176	,052	,364	,542(*)	,542(*)	,044	,599(**)	,401	,212	,240	,091	,169	
CD208	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,664	,710	,090	,260	,421	,813	,094	,014	,846	,006	,063	,328	,266	,676	,265	,447	
CD209	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,000	,052	,263	,345	,332	,170	,629(**)	,000	,009	,673(**)	,511(*)	,210	,026	,491(*)	,035	,064	
S100	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,184	,322	,169	,315	,395	,085	,165	,009	,965	,001	,013	,311	,900	,018	,866	,763	
Glucksberg Haut	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,391	,128	,108	,135	,063	,691	,432	,965	,000	,172	,164	,458(*)	,118	,184	,515(*)	,306	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,203	,042	,325	,280	,241	,017	,611(**)	,673(**)	,172	,000	,398(*)	,385	,008	,361	,378	,026	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,325	,837	,104	,170	,240	,933	,003	,001	,411	,048	,048	,057	,967	,076	,064	,899	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,098	,042	,083	,477(*)	,276	,147	,588(**)	,511(*)	,164	,398(*)	,000	,151	,200	,363	,101	,132	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,636	,836	,838	,019	,177	,474	,004	,013	,434	,048	,048	,455	,321	,075	,619	,525	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,188	,340	,206	,009	,209	,148	,297	,210	,458(*)	,385	,151	,000	,168	,213	,272	,186	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,364	,096	,340	,967	,309	,472	,145	,328	,311	,029	,455	,168	,407	,298	,183	,371	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,115	,186	,229	,102	,009	,242	,311	,026	,118	,008	,200	,168	,000	,388	,203	,167	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,576	,362	,187	,616	,966	,239	,125	,266	,900	,573	,967	,407	,000	,057	,321	,421	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,081	,051	,017	,216	,114	,157	,417(*)	,491(*)	,184	,361	,363	,213	,388	,000	,188	,196	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,698	,803	,935	,295	,583	,447	,041	,676	,018	,384	,076	,298	,057	,000	,361	,350	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,198	,333	,101	,069	,140	,035	,179	,244	,035	,515(*)	,378	,101	,272	,188	,000	,445(*)	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,343	,105	,462	,738	,499	,866	,383	,265	,866	,015	,064	,619	,183	,321	,361	,034	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,168	,133	,060	,036	,282	,091	,053	,169	,064	,306	,026	,132	,186	,167	,196	,000	
	Korrelationskoeff. sig. (2-seitig)	,427	,524	,769	,864	,180	,666	,798	,447	,763	,154	,899	,525	,371	,421	,350	,034	

Tabelle 38: Unterschiede zwischen Lupusband-positiven und –negativen Patienten mit akuter GvHD bezüglich histopathologischer Kriterien

a) Nicht für Bindungen korrigiert. b) Gruppenvariable: Lupusband-positiv / -negativ

	Epidermo- lyse	Satellitenzell- nekrose, basal	Lymphozyt. Infiltrat, epidermal	Lymphozyt. Infiltrat, BMZ	Lymphozyt. Infiltrat, subepid.	Eosinophile Granuloz.	Epidermis- dicke	Basalzell -apoptose	Erythrozyt. Extravasat
Mann-Whitney-U	30,000	25,000	34,500	33,500	41,500	22,500	33,500	39,000	35,000
Wilcoxon-W	306,000	301,000	310,500	309,500	317,500	298,500	309,500	315,000	311,000
Z	-2,292	-2,544	-1,975	-2,089	-1,608	-3,070	-2,139	-1,751	-2,038
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,022	,011	,048	,037	,108	,002	,032	,080	,042
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,036(a)	,016(a)	,062(a)	,054(a)	,142(a)	,009(a)	,054(a)	,114(a)	,071(a)

Tabelle 39: Unterschiede zwischen Lupusband-positiven und –negativen Patienten mit akuter GvHD bezüglich immunhistochemischer Marker

a) Nicht für Bindungen korrigiert. b) Gruppenvariable: Lupusband-positiv / -negativ

	CD206 (MR) epidermal	CD206 (MR) gesamt	CD2 subepidermal	<u>CD2</u> <u>gesamt</u>	CD25 subepidermal	CD25 gesamt	CD45RA subepidermal	CD45RA gesamt
Mann-Whitney-U	12,500	32,500	24,000	8,000	18,000	18,000	22,000	23,500
Wilcoxon-W	288,500	308,500	255,000	239,000	249,000	249,000	232,000	233,500
Z	-3,242	-2,086	-1,942	-3,051	-2,406	-2,406	-2,533	-2,429
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,001	,037	,052	,002	,016	,016	,011	,015
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,001(a)	,047(a)	,067(a)	,002(a)	,023(a)	,023(a)	,019(a)	,023(a)

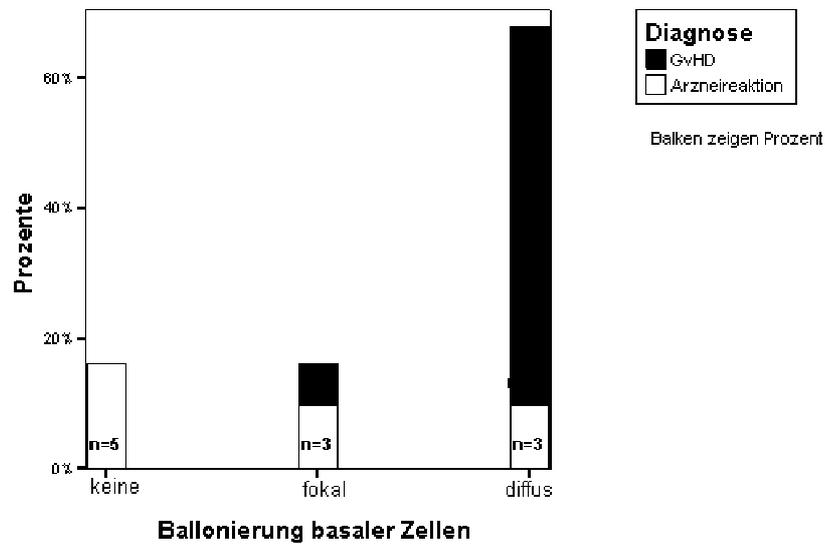


Abbildung 34: Ballonierung basaler Zellen differentialdiagnostisch typisch für akute GvHD

In allen Fällen akuter GvHD (rot dargestellt) lag eine Ballonierung basaler Zellen vor; diese war in 10% (N = 2/20) fokal, in 90% der Fälle diffus. Bei akuten Arzneiexanthenen war in ca. 45% (N = 5/11) der Fälle keine, in jeweils 3 Fällen aber fokale bzw. diffuse basale Zellballonierung festzustellen. Daraus ergibt sich für die Differentialdiagnostik eine Sensitivität von 100% für das Kriterium Basalzellballonierung, diese ist jedoch nicht spezifisch.

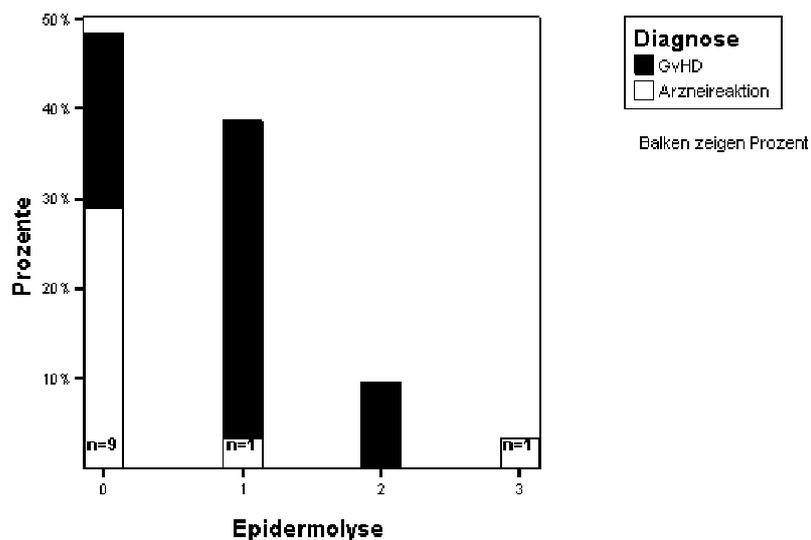


Abbildung 35 : Subepidermale Spaltbildung (Epidermolyse) bei akuter GvHD häufiger

In 70% der Fälle (N=14/20) akuter GvHD (rot dargestellt) lag eine zumindest fokale subepidermale Spaltbildung über eine Länge von mindestens 3 angrenzenden Zellen (vgl. Kriterien für die histopathologische Auswertung) vor. Zeichen einer Epidermolyse waren dagegen bei akuten Arzneiexanthenen deutlich seltener (N = 2/11) festzustellen.

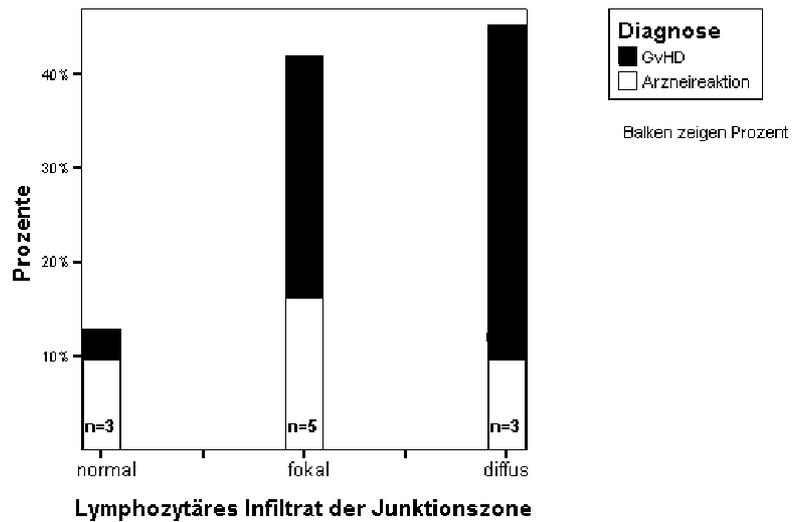


Abbildung 36: Diffuses lymphozytäres Infiltrat in d. Basalmembranzzone typisch für GvHD

Lymphozytäres Infiltrat war sowohl bei akuter GvHD (rot dargestellt) als auch bei akuten Arzneiexanthenen (blau dargestellt) nachweisbar. Im Gegensatz zu letzteren lag dieses Infiltrat bei GvHD jedoch in der Mehrzahl der Fälle (N = 11/20) diffus vor.

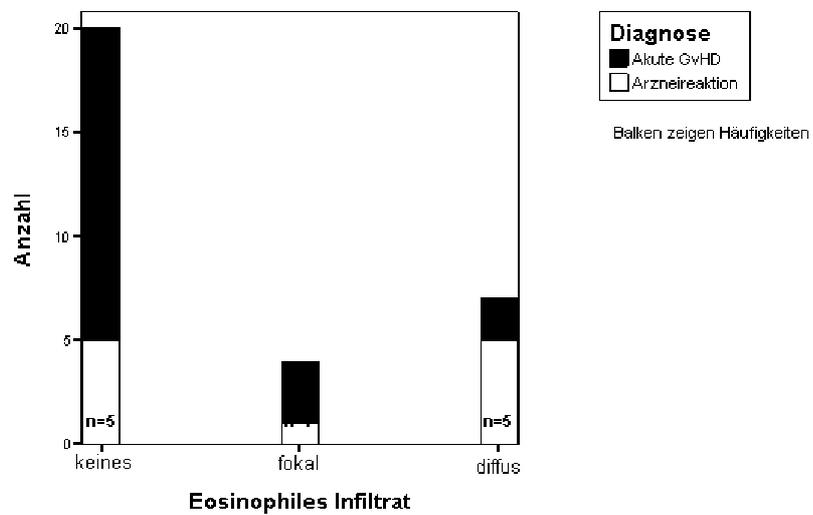


Abbildung 37 : Eosinophiles Infiltrat bei Arzneireaktionen häufiger

Bei akuter GvHD (rot dargestellt) lag in 75% der Fälle kein eosinophiles Infiltrat vor; dieses war nur in 10% der Fälle diffus nachweisbar. Bei akuten Arzneiexanthenen dagegen lag in der Mehrzahl der Fälle (N = 6/11) ein eosinophiles Infiltrat (subepidermal) vor. Vor allem bei diffusem Infiltrat spricht dieses differentialdiagnostisch für Arzneireaktionen.

Tabelle 40: Übersicht über Kreuztabellen zur Histopathologie von AR und aGvHD

Die folgenden Vier-Feldertafeln dienen als Berechnungsgrundlage für Sensitivität und Spezifität der einzelnen histopathologischen Kriterien. Epidermolyse und die hier genannten Kriterien waren differentialdiagnostisch am wichtigsten (d.h. wiesen die höchste Spezifität und Sensitivität auf).

Diffuse Basalzellballonierung bei AR und aGvHD

		Basalzellballonierung, diffus	
		nein	ja
		Anzahl	Anzahl
Diagnose	AR	3	3
	aGvHD	2	13
	Gesamt	10	21

Fokale Basalzellballonierung bei AR und aGvHD

		Basalzellballonierung, mind. fokal	
		nein	ja
		Anzahl	Anzahl
Diagnose	AR	5	6
	aGvHD	0	20
	Gesamt	5	26

Diffuse junctionale LC-Infiltration bei AR und aGvHD

		Lymphozyteninfiltration junctional, diffus	
		nein	ja
		Anzahl	Anzahl
Diagnose	AR	3	3
	aGvHD	3	11
	Gesamt	16	14

Mind. fokale junctionale LC-Infiltration bei AR und aGvHD

		Junctionale LC-Infiltration, mind. fokal	
		nein	ja
		Anzahl	Anzahl
Diagnose	AR	3	3
	aGvHD	1	19
	Gesamt	4	27

Eosinophilie (subkut.) bei AR und aGvHD

		Eosinophiles Infiltrat	
		nein	ja
		Anzahl	Anzahl
Diagnose	AR	6	5
	aGvHD	13	2
	Gesamt	24	7

Tabelle 41: Übersichtstabellen zur Ordinalskalierung der ausgewählten histopathologischen Kriterien anhand deren Sensitivität (oben) und Spezifität (unten)

Übersicht über Ordinalskalierung anhand der Sensitivität histopathologischer Kriterien

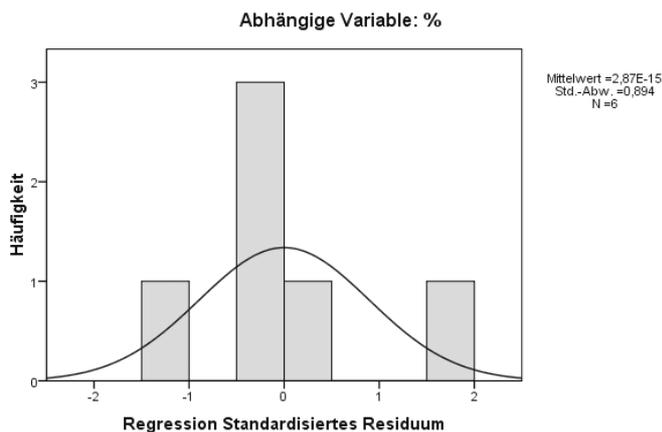
			Kriterium					
			Diffuse Ballonierung von Basalzellen	Fokale Ballonierung von Basalzellen	Diffuses eosinophiles Infiltrat	Subepidermale Spalbildung (Epidermolyse)	Diffuses lymphozytäres Infiltrat	Fokales lymphozytäres Infiltrat
%	Rang anhand Ordinalskala der Sensitivität	1,00	.	100,00
		2,00	95,00	
		3,00	90,00	
		4,00	.	.	.	70,00	.	
		5,00	57,90	
		6,00	.	.	45,50	.	.	

Übersicht über Ordinalskalierung anhand der Spezifität histopathologischer Kriterien

			Kriterium					
			Diffuse Ballonierung von Basalzellen	Fokale Ballonierung von Basalzellen	Diffus eosinophiles Infiltrat	Subepidermale Spalbildung (Epidermolyse)	Diffuses lymphozytäres Infiltrat	Fokales lymphozytäres Infiltrat
Rang anhand Ordinalskala der Spezifität	1	%	.	.	.	87,50	.	.
	2	%	85,70
	3	%	78,60	.
	4	%	.	.	71,40	.	.	.
	5	%	70,30
	6	%	.	64,70

Tabelle 42: Weitere Tabellen zur Regressionsanalyse von Sensitivität und Ordinalskalierung

Histogramm



Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Standardabweichung	N
%	76,4000	22,02680	6
Rang_Sens	3,5000	1,87083	6

Modellzusammenfassung^b

Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	,980 ^a	,960	,950	4,91301

a. Einflussvariablen : (Konstante), Rang_Sens

b. Abhängige Variable: %

ANOVA^b

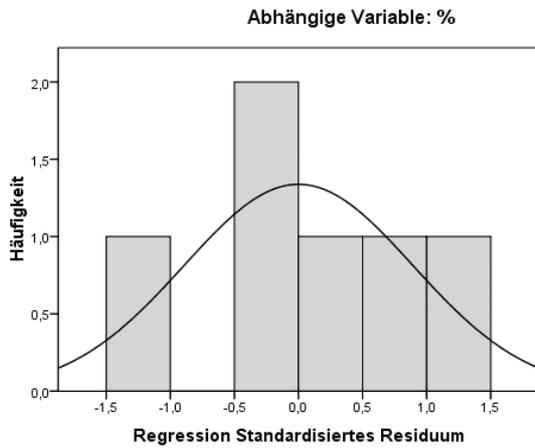
Modell	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
1 Regression	2329,349	1	2329,349	96,502	,001 ^a
Residuen	96,551	4	24,138		
Gesamt	2425,900	5			

a. Einflussvariablen : (Konstante), Rang_Sens

b. Abhängige Variable: %

Tabelle 43: Weitere Tabellen zur Regressionanalyse von Spezifität histopathologischer Kriterien und zugehöriger Ordinalskalierung

Histogramm



Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Standardabweichung	N
%	76,3667	9,09542	6
Rang_Spez	3,5000	1,87083	6

Modellzusammenfassung^b

Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers
1	,984 ^a	,968	,960	1,82402

a. Einflußvariablen : (Konstante), Rang_Spez

b. Abhängige Variable: %

ANOVA^b

Modell	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
1 Regression	400,325	1	400,325	120,324	,000 ^a
Residuen	13,308	4	3,327		
Gesamt	413,633	5			

a. Einflußvariablen : (Konstante), Rang_Spez

b. Abhängige Variable: %

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen für ihre konstante und konstruktive Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken: Meinem Doktorvater Prof. A. Wollenberg für die gute Betreuung bei der Planung und Durchführung des Forschungsprojekts, insbesondere auch dafür, dass er bei Problemen stets kurzfristig ansprechbar und für Modifikationsvorschläge offen war. Außerdem möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, die Ergebnisse der Arbeit im Rahmen eines Vortrags beim Weltallergiekongress 2007 vorzustellen. Herrn Prof. W. Burgdorf bin ich für die überaus kompetente, detailgenaue und ambitionierte Durchsicht sämtlicher histologischer Schnitte verbunden; er ist ein hervorragender Lehrer und war für die dermatohistologischen Aspekte in dieser Arbeit eine wesentliche Säule.

Weiterhin danke ich dem ehemaligen Direktor der Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. G. Plewig sowie dem aktuellen Direktor, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Th. Ruzicka für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Dermatologischen Klinik durchführen zu können. Meinen Kollegen des immunbiologischen Labors und insbesondere auch den Mitarbeitern aus dem Labor für Immunhistochemie und Dermatohistopathologie der Dermatologischen Klinik (LMU) und Herrn Dr. M. Flaig bin ich für die kompetente und praktische Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen sehr verbunden.

Des Weiteren danke ich den Kollegen und Mitarbeitern der Transplantationseinheit des Klinikums Großhadern unter der Leitung von Prof. Kolb, namentlich u.a. Dr. Johanna Tischer und Dr. Christoph Schmid für die Kooperation und konstruktive Beiträge zur Studienplanung.

Den Kollegen des Instituts für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (IBE) danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Auswahl der statistischen Verfahren.

In Verbundenheit und mit aufrichtigem Dank wird diese Arbeit darüber hinaus all denen gewidmet, die mich über die vergangenen Jahre stetig intellektuell und tatkräftig unterstützten, insbesondere meinen Eltern und der Familie, engen Freunden und Michael Meyer.

Uns würdigte einst eurer Weisheit Wille, / Der Kirche Dienst auch uns zu weihn, / Wer, Brüder, säumt, daß er die Schuld des Danks erfülle, / Die wir uns solcher Gnade freun? // Froh eilt der Wanderer, durch dunkle Wälder, / Durch Wüsten, die von Hitze glühn, / Erblickt er nur von fern des Lands beglückte Felder, / Wo Ruh und Friede blihn. // So können wir die frohe Bahn durchheilen, / Weil schon das hohe Ziel uns lacht / Und der Bestimmung Sporn, ein Feind von trägen Weilen, / Uns froh und emsig macht. // Ja, dieses Glück, das große Mäcenaten, / Ihr schenkt, soll nie ein träger Sinn / Bei uns verdunkeln, nein! verehren Fleiß und Taten, / Und Tugend immerhin. // Euch aber kröne Ruhm und hohe Ehre, / Die dem Verdienste stets gebührt, / Und jeder künftige Tag erhöhe und vermehre / Den Glanz, der euch schon ziert // Und was ist wohl für euch die schönste Krone? / Der Kirche und des Staates Wohl, / Stets eurer Sorgen Ziel. Wohlan, der Himmel lohne / Euch stets mit ihrem Wohl.
(Titel: Dankgedicht an die Lehrer, Autor: Friedrich Hölderlin, 1770-1843)

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass diese Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt wurde und ich ausschließlich die genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe.

München, den 9. Juli 2010

Carolin Weiß