

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER-, UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Immunologische Parameter in Proben der Mundschleimhaut bei Patienten mit  
akuter und chronischer Graft-versus-Host-Erkrankung

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Veronika Strauchs

2020



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER-, UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Immunologische Parameter in Proben der Mundschleimhaut bei Patienten mit  
akuter und chronischer Graft-versus-Host-Erkrankung

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Zahnmedizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Veronika Strauchs

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

2. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Daniel Wolff

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>1.1. HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLENTTRANSPLANTATION (HSZT)</b>	<b>3</b>
1.1.1. SPENDERAUSWAHL	4
1.1.2. KONDITIONIERUNGSTHERAPIE VOR HSZT	5
1.1.3. KOMPLIKATIONEN	7
<b>1.2. GRAFT- VERSUS HOST DISEASE (GvHD)</b>	<b>8</b>
1.2.1. PATHOGENESE DER AKUTEN GvHD	9
1.2.2. PATHOGENESE DER CHRONISCHEN GvHD (cGvHD)	11
1.2.3. EINTEILUNG DER cGvHD	11
<b>1.3. ORALE cGvHD</b>	<b>13</b>
1.3.1. cGvHD DER MUNDSCHLEIMHAUT	14
1.3.2. cGvHD DER KLEINEN UND GROßEN SPEICHELDRÜSEN	14
1.3.3. SKLEROSIERENDE cGvHD	15
1.3.4. DIAGNOSE DER ORALEN cGvHD	17
1.3.5. THERAPIE DER ORALEN cGvHD	20

<b>1.4. HISTOLOGISCHER AUFBAU DER MUND - UND DARMSCHLEIMHAUT</b>	<b>23</b>
<b>1.5. SPEICHEL</b>	<b>26</b>
1.5.1. SEKRETORISCHES IGA (S <sub>I</sub> GA)	26
<b>1.6. REGULATORISCHE T-ZELLEN (TREGS) UND FOXP3 (FORKHEAD-BOX-PROTEIN P3) BEI EINER GvHD</b>	<b>27</b>
<b>1.7. TH-17 ZELLEN UND INTERLEUKIN-17 (IL-17) BEI EINER GvHD</b>	<b>29</b>
<b>1.8. MACROSIALIN (CD 68) BEI EINER GvHD</b>	<b>31</b>
<b><u>2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG</u></b>	<b><u>32</u></b>
<b><u>3. PATIENTEN UND METHODIK</u></b>	<b><u>33</u></b>
3.1. PATIENTENKOLLEKTIV	33
3.2. KLINISCHE PARAMETER	33
3.3. BIOPSIE DER MUNDSCHLEIMHAUT UND SPEICHELFLIEBRATE	35
3.4. BESTIMMUNG DES S <sub>I</sub> GA	36
<b>3.5. BIOMARKERBESTIMMUNG FÜR DIE MUNDSCHLEIMHAUT UND DEN GASTROINTESTINALSTRAKT</b>	<b>36</b>
3.5.1. IMMUNHISTOCHEMIE UND IMMUNOFLUORESZENZ	37
3.6. STATISTISCHE VERFAHREN	39

---

<b>4.1. WIE VERHÄLT SICH DIE KONZENTRATION DES SIGA IM SPEICHEL IM VERLAUF NACH EINER ALLOGENEN HSZT.</b>	<b>41</b>
<b>4.2. BESTEHT EIN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DER KONZENTRATION DES SIGA IM SPEICHEL NACH HSZT UND DEM SCHWEREGRAD DER ORALEN cGvHD.</b>	<b>43</b>
<b>4.3. BESTEHT EIN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DER ANZAHL AUSGEWÄHLTER BIOMARKER UND DEM SCHWEREGRAD EINER ORALEN UND/ODER INTESTINALEN GvHD.</b>	<b>44</b>
4.3.1. VERGLEICH DER INFILTRATION VON CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE ORALER cGvHD	45
4.3.2. VERGLEICH DER INFILTRATION VON CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE INTESTINALER GvHD	46
4.3.3. VERGLEICH DER INFILTRATION VON CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE ORALER cGvHD	48
4.3.4. VERGLEICH DER INFILTRATION VON CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE INTESTINALER GvHD	49
4.3.5. VERGLEICH DER INFILTRATION VON CD68 <sup>+</sup> -ZELLEN UND Ki-67 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE ORALER cGvHD	50
4.3.6. VERGLEICH DER INFILTRATION VON CD68 <sup>+</sup> -ZELLEN UND Ki-67 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE INTESTINALER cGvHD	52
4.3.7. VERGLEICH DER INFILTRATION VON FOXP3 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE ORALER cGvHD	55
4.3.8. VERGLEICH DER INFILTRATION VON FOXP3 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE INTESTINALER cGvHD	56

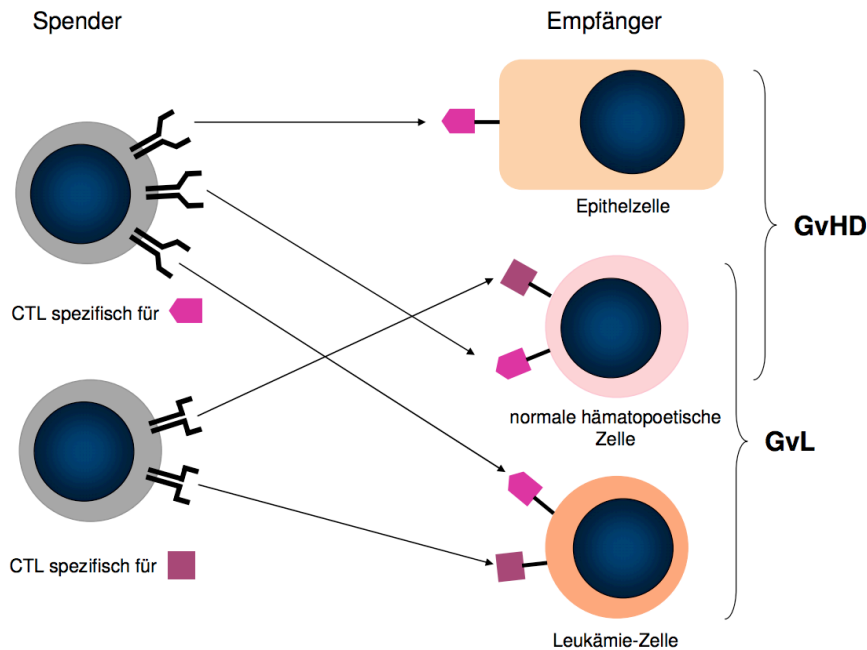
4.3.9. VERGLEICH DER INFILTRATION VON IL-17 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE ORALER cGvHD	58
4.3.10. VERGLEICH DER INFILTRATION VON IL-17 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE INTESTINALER cGvHD	59
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<hr/>	
<b>5.1. DIE RELATION ZWISCHEN DER KONZENTRATION VON SIgA IM SPEICHEL VOR UND NACH HSZT.</b>	<b>61</b>
<b>5.2. DIE RELATION DER SIgA KONZENTRATION IM SPEICHEL NACH HSZT UND DEM SCHWEREGAD EINER ORALEN cGvHD.</b>	<b>63</b>
<b>5.3. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DER ANZAHL AUSGEWÄHLTER BIOMARKER UND DEM SCHWEREGRAD EINER ORALEN BZW INTESTINALEN GvHD.</b>	<b>64</b>
5.3.1. INFILTRATION VON CD4 <sup>+</sup> T-ZELLEN UND CD8 <sup>+</sup> T-ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE EINER ORALEN BZW. INTESTINALEN GvHD.	64
5.3.2. INFILTRATION VON CD68 <sup>+</sup> MAKROPHAGEN UND KI-67 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE EINER ORALEN BZW. INTESTINALEN GvHD.	66
5.3.3. INFILTRATION VON FOXP3 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE EINER ORALEN BZW. INTESTINALEN GvHD	67
5.3.4. INFILTRATION VON IL-17 <sup>+</sup> -ZELLEN BEI PATIENTEN MIT UND OHNE EINER ORALEN BZW. INTESTINALEN GvHD	69
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
<hr/>	
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Hämatopoetische Stammzellentransplantation (HSZT)

Seit den 1950er Jahren wird die HSZT als eine erfolgreiche Therapie bei Patienten mit hämatologischen, onkologischen, erblichen und immunologischen Erkrankungen eingesetzt. Unter einer HSZT versteht man eine Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen eines Spenders an einen Empfänger. Man unterscheidet Stammzellen aus dem Knochenmark, aus dem peripheren Blut und aus dem Nabelschnurblut. Heutzutage werden hauptsächlich Stammzellen aus dem peripheren Blut verwendet (Gratwohl et al., 2002; Juric et al., 2016). Es wird eine autologe, allogene und syngene HSZT unterschieden. Bei einer autologen HSZT sind Spender und Empfänger dieselbe Person, wohingegen bei einer allogenen HSZT der Spender und der Empfänger unterschiedliche Personen sind. Eine HSZT syngener Stammzellen bezeichnet die Transplantation von Stammzellen eines genetisch identischen Zwillingsspenders. Da nur 30% der Patienten einen geeigneten Spender im Verwandtenkreis oder einen identischen Zwillingsspender haben und daher auf einen Fremdspender angewiesen sind, ist die allogene HSZT von einem nicht verwandtem Spender die am häufigsten angewendete Form der HSZT. Bei der allogenen HSZT kann im Gegensatz zu einer autologen und syngenen HSZT eine sogenannte Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) auftreten, die zur Schädigung gesunder Gewebe des Patienten führt. Zusätzlich wird bei der allogenen HSZT ein Graft-versus-Leukämie Effekt (GvL) beobachtet. Dabei greifen die transplantierten Blutzellen des Spenders (Graft) die Leukämiezellen des Empfängers an. Dieser Effekt ist gewünscht, da trotz vorangegangener Konditionierungstherapie im Körper verbliebene Leukämie- und Tumorzellen hierdurch vernichtet werden können. Der GvL-Effekt ist verantwortlich für das seltenere Wiederauftreten der Krankheit nach allogener HSZT im Vergleich zur autologen HSZT. Man versucht diesen Effekt besser zu steuern, indem man einige Zeit nach einer HSZT bei Rezidiven weitere Spender-Lymphozyten verabreicht. Dadurch kann es zu einer GvHD kommen, welche zumeist kontrollierbarer ist und milder ausfällt (Holler & Eissner, 2005). Die Hochdosis-Chemotherapie als Konditionierungsmaßnahme vor einer HSZT kann daher auch niedriger dosiert werden, um toxische Folgen zu verringern. Dies kann auch für die Therapie von älteren Patienten und multimorbiden Patienten sinnvoll sein (Imad, Tabbara, Zimmerman, Morgan, & Nahleh, 2002).



**Abb.1.** Ambivalente Rolle der Spender-T-Zellen nach allogener HSZT. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) des Spenders erkennen sowohl Leukämiezellen/Tumorzellen als auch gesunde hämatopoetische Zellen des Empfängers aufgrund von Minorantigen-Spezifitäten als fremd. Dies führt sowohl zum gewünschten GvL-Effekt als auch zu einer unerwünschten GvHD (Appelbaum, 2003).

### 1.1.1. Spenderauswahl

Um eine langfristig erfolgreiche HSZT zu gewährleisten, müssen zuvor die Humanen-Leukozyten-Antigen-Merkmale (HLA) des Empfängers und des Spenders untersucht werden. Hierbei handelt es sich um vererbare Gewebemerkmale, die möglichst zwischen Spender und Empfänger übereinstimmen sollten, um mögliche Komplikationen wie eine GvHD zu verhindern. (Holler & Eissner, 2005; Imad et al., 2002). HLA beschreibt eine polymorphe Proteinfamilie, die sich von Individuum zu Individuum unterscheidet. Es kommt in den Plasmamembranen aller kernhaltigen Zellen vor (daher nicht in Erythrozyten) und stellt die immunologische Selbsterkennung eines Individuums dar. Die Tolerierung (Histokompatibilität) bzw. die Abstoßung eines Transplantats wird durch die Funktionsweise dieses HLA-Systems bestimmt. Es gibt für jeden der Genorte multiple Allele, welche für Membranproteine codieren. Die Konsequenz dieser Funktion ist, dass der Organismus einerseits vor eindringenden unerwünschten Fremdzellen geschützt wird, andererseits aber auch allogene Transplantate abgestoßen werden. Vermittler dieser antigenspezifischen

---

Reaktion sind Lymphozyten, die in B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterteilt werden. Bezogen auf eine allogene HSZT können T-Zellen die vom HLA-System präsentierten Antigene des Empfängers als fremd erkennen. Nach Aktivierung spezifischer T-Zell-Rezeptoren kommt es zur Zerstörung der Empfängerzelle. Umgekehrt kann es durch Aktivierung der Empfänger T-Zelle auch zur Zerstörung der Spenderzelle kommen und daher zu einer Abstoßung des Transplantats. Zusammengefasst wären ideale Stammzellenspender HLA-identische Geschwister („matched sibling donor“). Da es aber aufgrund von Kleinfamilien immer schwieriger wird einen verwandten und somit ideal passenden Spender zu finden, ist der Großteil der Patienten auf Fremdspender angewiesen. Nach den geltenden Auswahlkriterien ist es aber heute bereits möglich für 80% der Patienten einen geeigneten HLA-gewebeverträglichen Fremdspender zu finden („matched unrelated donor“) (Cobelan, 2006).

### **1.1.2. Konditionierungstherapie vor HSZT**

Um eine erfolgreiche HSZT zu gewährleisten, ist es notwendig zuvor eine Konditionierungstherapie mittels einer hochdosierten Chemotherapie oder einer kombinierten Radiochemotherapie durchzuführen, um das Immunsystem des Empfängers soweit zu schwächen, dass eine Transplantatabstoßung unwahrscheinlicher wird. Eine zusätzliche Antikörpergabe führt zu einer zusätzlichen Schwächung des Empfängerimmunsystems. Des Weiteren wird von einer erleichterten Besiedlung und Einnistung der Spenderstammzellen ausgegangen, damit sich ein neues blutbildendes System entwickeln kann (Bacigalupo et al., 2009). Reife Immunzellen des Spenders werden ebenfalls übertragen, um einen gewissen Schutz gegen Viren und Pilze zu erzielen. Verbliebene Tumorzellen werden hierdurch im Idealfall ebenfalls abgetötet (GvL-Effekt) (Imad et al., 2002). 2009 hat man sich auf 3 Konditionierungsdefinitionen geeinigt (Bacigalupo et al., 2009). Folgende Vorgehensweisen werden unterschieden und sind nach ihrer Intensität eingeteilt:

- 1) Myeloablative Konditionierung (MA): Es handelt sich hierbei meist um alkylierende Substanzen, die in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung die Blutbildung und das Immunsystem des Empfängers irreversibel zerstören.
- 2) Nicht myeloablative Konditionierung (NMA): Diese Art der Konditionierung verursacht nur eine geringe Hämatotoxizität und erlaubt eine autologe Regeneration, falls es zu einer

Abstoßung des Transplantates kommt. Die extrahämatopoetische Toxizität dieser Konditionierung ist minimal.

3) Intensitätsreduzierte Konditionierung (RIC): Hierbei versteht man eine Intensitätsreduktion der Chemo-bzw. Strahlentherapie um mindestens 30%. Hierbei ist aufgrund der prolongierten Panzytopenie bei einer Abstoßung nicht mit einer autologen Regeneration zu rechnen.

Tabb.1. zeigt die von vielen Transplantationszentren weltweit verwendeten Konditionierungsverfahren für eine allogene HSZT.

**Tabb.1. Konditionierungsmaßnahmen**

Intensität	Substanz	Bemerkung
Myeloablativ	CY/TBI  BU/CY	Panzytopenie Stammzellensupport notwendig Erhebliche nicht hämatologische Toxizität
nicht myeloablativ	FLU/TBI 2 Gy  TLI/ATG  Low dose TBI	Minimale Zytopenie Kein Stammzellensupport notwendig
Intensitätsreduziert	FLU/MEL  FLU/BU  FLU/CY	temporäre Panzytopenie Reduzierte extrahämatologische Toxizität

*Abkürzungen: CY-Cyclophosphamid, TBI-Total Body Irradiation, BU-Busulfan, FLU-Fludarabin, TLI-Total Lymphoid Irradiation, ATG-Anti Thymocyte-Globulin, MEL-Melphalan*

Welche Intensität zur Anwendung kommt, wird aufgrund der Komorbidität, des Alters, des Remissionsstatus vor HSZT, des Rezidivrisikos und des bei den verschiedenen Krankheiten unterschiedlich stark ausgeprägten GvL-Effektes entschieden. (Giralt et al., 2009).

---

### 1.1.3. Komplikationen

Leider bringt eine HSZT mit vorhergehender Konditionierungstherapie diverse Komplikationen mit sich. Im Vordergrund stehen immunologische Abstoßungsreaktionen, die einerseits im Sinne eines Transplantatversagens (Graft-failure) vom Empfängerorganismus ausgehen können, d.h. die Hämatopoese durch die transplantierten Blutstammzellen wird verhindert, wesentlich häufiger aber auch durch das Transplantat selbst. Dabei kommt es zur einer T-Lymphozyten-Reaktion mit Oberflächenproteinen im Rahmen einer GvHD. Zusätzlich kommt es häufig zu infektiologischen Komplikationen bedingt durch die vorhergehende Konditionierungstherapie und Immunsuppression mit einem konsekutiv erhöhten Infektionsrisiko während der Panzytopenie. Vier Faktoren bestimmen im wesentlichen Toxizität und Ausmaß der Komplikationen:

Grunderkrankung, Art der Konditionierungstherapie (MA, NMA, RIC), Dauer und Ausprägung der Knochenmarksinsuffizienz (vor allem von Leukozytopenie, Thrombozytopenie und Immundefizienz), Ursprung der transplantierten hämatopoetischen Stammzellen und mögliches Auftreten von einer GvHD. Abhängig von der Toxizität der Konditionierungstherapie entwickeln viele Patienten eine starke Mukositis, insbesondere nach einer MA Konditionierung mit gleichzeitiger Gabe von Methotrexat als GvHD-Prophylaxe. Die Schleimhautbarriere wird temporär zerstört und es steigt dadurch das Infektionsrisiko. Durch das Einschwemmen bakterieller Toxine in das Blut erhöht sich das Risiko einer schweren GvHD durch Induktion einer massiven Zytokinausschüttung (Hill & Ferrara, 2000). In der frühen Phase nach einer HSZT treten gehäuft Virusinfektionen vor allem durch Herpes-simplex und Varizella Zoster Viren auf. Die Häufigkeit liegt bei fehlender Prophylaxe bei 70%. Daher ist eine Prophylaxe mit Aciclovir obligat. Ab Tag 50 nach allogener HSZT besteht die Gefahr einer Reaktivierung einer latenten Zytomegalie-Virus-Infektion (CMV). Das Risiko wird vor allem durch eine Kombination eines CMV-negativen Spenders mit einem CMV-positiven Empfänger erhöht. Nicht zu vernachlässigen sind Infektionen mit respiratorischen Viren wie z.B. Respiratory-Syncytial-Virus (RSV), Influenza-, Parainfluenza-, Adeno- und Rhinovirus. Ein weiteres Problem stellt die GvHD dar.

---

## 1.2. Graft- versus Host Disease (GvHD)

Die akute und chronische GvHD ist eine der bedeutendsten Komplikationen nach einer HSZT und gilt als Hauptursache für die Morbidität und Mortalität nach allogener HSZT (Vogelsang & Pavletic, 2009). Wie der Name GvHD schon verdeutlicht, kommt es zu einer „Transplantat gegen Wirt Reaktion“. Immunkompetente T-Lymphozyten des Spenders reagieren mit Antigenstrukturen des immunsupprimierten, histoinkompatiblen Empfängers (J. L. Ferrara & H. J. Deeg, 1991). Die HLA-Inkompatibilität der Spender - Lymphozyten bestimmt die Inzidenz und den Schweregrad der GvHD. Das Risiko einer GvHD ist daher am geringsten, wenn es einen HLA-identischen Familienspender gibt (Wahrscheinlichkeit bei 30-40%). Dabei spielen nicht nur HLA-Antigene eine Rolle, sondern auch Polymorphismen anderer Antigene (Minor-Histokompatibilitäts-Antigene), welche eine GvHD auslösen können. Durch eine prophylaktische Immunsuppression kann ein Auftreten einer GvHD reduziert werden (Saliba et al., 2007). Die wesentlichen Risikofaktoren für das Entstehen einer GvHD sind:

- Histoinkompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Davon abhängig sind auch Inzidenz, Beginn und Schweregrad einer GvHD.
- Hohes Lebensalter beim Spender (>37 Jahre) und Empfänger (>42 Jahre) (Weisdorf et al., 1991; Yakoup-Agha et al., 2006)
- Geschlecht des Spenders und Empfängers; das Risiko einer möglichen GvHD verdoppelt sich, wenn es sich um eine weibliche Spenderin und einen männlichen Empfänger handelt. Man vermutet Y-Chromosom-assoziierte Minor-Antigene als Urheber. Das Risiko nimmt weiter zu durch vorhergehende Schwangerschaften der Spenderin; es kommt zur sogenannten Alloimmunisierung (Nash et al., 1992).
- Das Stadium der Erkrankung während einer HSZT und die Art der Diagnose, sowie die vorangegangene Konditionierung (Saliba et al., 2007)

Die GvHD kann je nach klinischer Manifestation in akut oder chronisch eingeteilt werden. Lange ging man davon aus, dass sich innerhalb der ersten 100 Tage nach allogener HSZT eine akute GvHD und ab Tag 100 oder später sich eine chronische GvHD (cGvHD) entwickelt (Michallet et al., 2005). Heutzutage wird auch nach Tag 100 von einer akuten GvHD

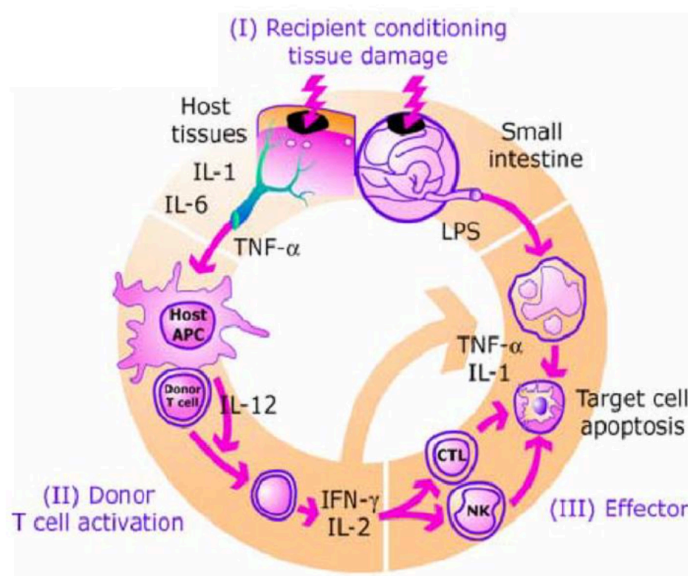
gesprochen, welche dann als late acute GvHD bezeichnet wird (z.B. nach Abschluss der Immunsuppression oder Spender-Lymphozyten-Gabe) wenn klinische Kriterien für eine akute GvHD sprechen. Der Übergang einer akuten zu einer cGvHD kann zeitlich fließend erfolgen (Filipovich et al., 2005). Eine cGvHD kann unabhängig vom Zeitpunkt nach HSZT auftreten und wird ebenfalls durch klinische Kriterien definiert.

### 1.2.1. Pathogenese der akuten GvHD

Billingham hat in seinen „Harvey Lectures“ 3 immunologische Voraussetzungen für das Entstehen einer GvHD formuliert (Billingham, 1966):

- Das Transplantat muss immunkompetente Zellen des Spenders enthalten.
- Der Empfänger muss im Spendergewebe nicht vorhandene Antigene (Histokompatibilitätsantigene) exprimieren, um eine immunologische Abwehrreaktion des Transplantats gegen den Empfänger auszulösen.
- Der Empfänger muss immunsupprimiert sein, damit er nicht in der Lage ist, eine effektive, gegen die Zellen des Transplantates gerichtete Immunantwort aufzubauen.

Wie bereits oben erwähnt, haben T-Lymphozyten die tragende Rolle bei der Entstehung einer akuten GvHD. Die dazugehörigen Mechanismen werden in einem 3 Phasen-Modell erklärt:



**Abb. 2.** Pathophysiologie der akuten GvHD (Hill & Ferrara, 2000).

---

*Phase 1:* Den Beginn stellt die Konditionierungsphase dar, in der das Empfängergewebe durch eine vorangegangene Chemotherapie und/oder Strahlentherapie geschädigt und aktiviert wird wodurch vermehrt TNF- $\alpha$  und proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, IL-12) freigesetzt werden (Ferrara, Cooke, & Teshima, 2003; Holler et al., 1997). Diese wiederum aktivieren die Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs) des Empfängers, welche wiederum Spender-T-Lymphozyten über IL-12 aktivieren können. Zusätzlich entstehen durch die Schädigung der intestinalen Mukosa und der Haut Eintrittspforten für Bakterien und deren Bestandteile wie insbesondere Lipopolysaccharide (LPS), die wiederum die Sezernierung von TNF- $\alpha$  und Interleukinen (IL-1, IL-12) bewirken. Die Rolle der TNF- $\alpha$  Freisetzung ist mitentscheidend bei der Entstehung einer GvHD. Holler et al. zeigten, dass bei Patienten mit einem plötzlichen, abnormen Anstieg der TNF- $\alpha$ -Produktion, eine schwere akute GvHD mit nur 30%iger Überlebenschance die Folge war. Eine deutlich höhere Überlebensrate hatten diejenigen, deren TNF- $\alpha$ -Produktion im Normbereich war oder erst zu einem späteren Zeitpunkt anstieg (Holler et al., 1995).

*Phase 2:* Es folgt die Aktivierungsphase, in der es zu einer T-Zell-Aktivierung der Spender-T-Lymphozyten mittels APCs des Empfängers und proinflammatorischen Zytokinen kommt. Eine Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten zu Effektorzellen (CD4<sup>+</sup> Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische Zellen) ist die Folge, wobei diese Aktivierung durch Produktion von TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-2 erfolgt und auch als Th1-Zytokinmuster bezeichnet wird (Ferrara et al., 2003)

*Phase 3:* Hier spricht man von der Effektorphase, in der es zu einer Gewebeschädigung des Empfängers kommt. Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK) und Zytokine wie TNF- $\alpha$  stehen hier im Vordergrund (Zytokin-induzierte Apoptose) (Ferrara, 2000). Genauer betrachtet aktivieren proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2) zytotoxische T-Zellen (CTLs) und NK, die mit Ihren zytotoxischen Eigenschaften das Empfängergewebe schädigen. An der lokalen Gewebeschädigung sind vor allem unspezifische Effektorzellen wie die Makrophagen und die von ihnen sezernierten inflammatorischen Zytokine beteiligt. Eine massive Freisetzung von Zytokinen und LPS fördert die Entzündungsreaktion und Schädigung der GvHD-Zielorgane wie den Gastrointestinaltrakt (Hill & Ferrara, 2000). Betroffen kann sowohl der obere als auch der untere Gastrointestinaltrakt sein. Typische klinische Symptome sind wässrige Diarrhoen mit schmerzhaften abdominellen Krämpfen. Es kommt zu starkem

---

Flüssigkeits- und Gewichtsverlust. Bei Befall des oberen Gastrointestinaltraktes zeigen sich Anorexie, Verdauungsstörungen und Gewichtsverlust. Histologisch wichtig für eine sichere Diagnose sind die Anzahl der Apoptosen, Kryptenabszesse und der Epithelverlust (Akpeg et al., 2003; J.L. Ferrara & H.J. Deeg, 1991). Weitere Manifestationsorgane sind die Haut und die Leber, wo es zu Apoptosen der Keratinozyten und Gallengangsepithelien kommt.

### **1.2.2. Pathogenese der chronischen GvHD (cGvHD)**

Bei der Pathogenese der cGvHD sind T-Lymphozyten ebenfalls ein entscheidender Faktor. Spender-T-Lymphozyten proliferieren in Antwort auf die differenten HLA-Antigene und Minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAs) des Empfängers, bei gleichzeitig fehlender Prägung der heranreifenden T-Lymphozyten im Thymus, der durch die vorhergehende Konditionierung und eventuell aufgetretene akute GvHD geschädigt wurde. Es folgt eine T-Zell gerichtete Zytolyse gegen das Zielgewebe des Empfängers mit gleichzeitiger Produktion von Zytokinen (Lee, 2005). Mittels tierexperimentellen Studien wurde zu Beginn angenommen, dass bei einer cGvHD im Unterschied zur akuten GvHD ein Th2-Zytokinmuster (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) vorliegt (Shlomchik et al., 2007). Aufgrund von aktuellen Daten sowohl aus Maus- als auch Humanstudien, geht man derzeit von einer Beteiligung von Th1/Th17-T-Zellen aus (Chen et al., 2007, Dander et al., 2009, van der Waart et al., 2012). Zusätzlich zur direkten Schädigung kommt es durch Zytokine (TGF- $\beta$ ) zu einer Fibroblastenaktivierung und dadurch zu einer verstärkten Bildung von Kollagen. Dieser Mechanismus spielt vor allem bei der oralen cGvHD eine wichtige Rolle. Man nimmt an, dass bei der cGvHD eine assoziierte Anikörperantwort gegen mHAs stattfindet und daher auch eine relevante B-Zell-Beteiligung vor allem bei der Pathogenese der cGvHD vorkommt (Miklos et al., 2005).

### **1.2.3. Einteilung der cGvHD**

Die cGvHD entwickelt sich meist nach dem Tag 100 infolge einer allogenen HSZT, manchmal aber auch erst nach Jahren. Betroffen sind ca. 30%-50% aller allogenen Transplantierten (Arai & Vogelsang, 2000; J.L. Ferrara & H.J. Deeg, 1991). Genauer betrachtet handelt es sich um eine Multi-Organ-Erkrankung, die sich direkt aus einer vorbestehenden akuten GvHD

entwickeln kann (progressive Form), sich nach einem erkrankungsfreien Intervall nach akuter GvHD manifestiert (quiescent Form) oder sich ohne vorherige akute GvHD (de novo Form) entwickelt. Die progressive Form hat die schlechteste und die sogenannte de novo Form die beste Prognose (Jagasia et al., 2015; Sullivan et al., 1981). Klinische Merkmale bestimmen, ob eine GvHD als akut oder chronisch eingeteilt wird (Jagasia et al., 2015). Der Schweregrad einer cGvHD wird nach den NIH-Konsensus-Kriterien aus dem Jahr 2005 sowie der Nachfolgekongferenz 2014 beurteilt:

**Tabb.2.** NIH-Konsensus-Kriterien (Filipovich et al., 2005)

<b>Gesamt-Schweregrad</b>	<b>mild</b>	<b>moderat</b>	<b>schwer</b>
Zahl der betroffenen Organe	1-2	>2	>2
Schweregrad der Organmanifestation	mild (außer Lunge)	mild-moderat Lunge: nur mild	schwer Lunge: moderat-schwer

Bei einer cGvHD sind extrakutane Manifestationen feststellbar: v.a die Leber, der Gastrointestinaltrakt, Lunge, Augen, Faszien und der neuromuskuläre Apparat sind hiervon betroffen. Besonders wichtig ist die assoziierte Immundefizienz, die zu einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber opportunistischer Krankheitserreger und dadurch häufig zum Tod führt (Meyers, 1986). Wie bei der akuten GvHD sind auch bei der cGvHD die Haut und Schleimhäute zu 80% betroffen. Wenn die Mundschleimhaut mitbetroffen ist, spricht man von einer oralen cGvHD (Filipovich et al., 2005).

### 1.3. Orale cGvHD

Bis zu 80% der Patienten mit cGvHD entwickeln eine orale cGvHD. Somit ist sie eine der häufigsten klinischen Manifestationen einer cGvHD (Baird et al.,2006, Schubert et al. 2008). Man beobachtet eine Beteiligung der unterschiedlichsten Bereiche in der Kopf/Halsregion, wie Veränderungen an der Mundschleimhaut, Veränderungen an den Lippen, der Muskulatur, den Speicheldrüsen und an der Gesichtshaut. Am häufigsten sind allerdings die Mundschleimhäute und die kleinen und großen Speicheldrüsen betroffen. Die Symptome der oralen cGvHD, welche meist proportional zum Schweregrad, der Lokalisation und dem Ausmaß sind, werden in der Tabelle (Tabb.3.) dargestellt (Vogelsang & Pavletic, 2009).

**Tabb.3.** *Klinische Anzeichen und Symptome einer oralen GvHD (Vogelsang & Pavletic, 2009)*

<u>cGvHD</u> der Mundschleimhaut		<u>cGvHD</u> der Speicheldrüsen	
<i>Klinische Anzeichen</i>	<i>Symptome</i>	<i>Klinische Anzeichen</i>	<i>Symptome</i>
Retikulationen	Verstärkte Sensibilität gegenüber Speisen/Getränken	Dicker, visköser Speichel	Xerostomie
Erythem	- Stark gewürzte /scharfe Speisen	Speichelmangel	Verstärkte Sensibilität gegenüber Speisen/Getränken
Ulzerationen	- Fruchtsäure (v.a. Zitrusfrüchte)	Atrophische Mucosa	Erschwertes Sprechen, Kauen und Schlucken
Glossitis	- Alkoholische Getränke alkoholhaltige Mundspülungen salzige Speisen	Karies (interdental/cervical)	Veränderter Geschmackssinn
Mucozelen	- Harte knusprige Speisen	Orale Candidiasis	
	- Warme Speisen/Getränke	Erhöhter Trinkbedarf	
	Verstärkte Sensibilität gegenüber Zahnpasta mit Minzgeschmack	Zungenschnalzen	
	Veränderter Geschmackssinn		

---

### **1.3.1. cGvHD der Mundschleimhaut**

Am häufigsten sind die Wangenschleimhäute, die Lippenschleimhäute und die Zunge betroffen. Der weiche Gaumen und der Oropharynx sind eher selten und der Ösophagus fast nie mitbetroffen. Es zeigen sich klinisch weißliche retikuläre Zeichnungen (das sogenannte Wickham-Phänomen wie beim oralen Lichen planus), Erytheme, Leukoplakien, Ulzerationen und Atrophien der Mukosa bis hin zu Vernarbungen (Treister et al., 2008; Vogelsang & Pavletic, 2009), wobei Retikulationen und Erytheme vorherrschen oder sich eine Kombination aus Retikulationen, Erythem und Ulzera zeigt (Chan et al., 1998). Klinisch auffallend sind die Fibrose-bedingte eingeschränkte Mundöffnung, der veränderte Geschmackssinn und die verstärkte Sensibilität gegenüber scharfen und stark gewürzten Speisen. Deswegen ist es den Patienten oft nicht mehr möglich sich adäquat zu ernähren, was zu einem zunehmenden Gewichtsverlust führt. Oft zu beobachten sind Sekundärinfektionen mit *Candida albicans*, dem Herpes simplex-Virus und dem Cytomegalie-Virus (CMV) hervorgerufen durch eine häufig verminderte Speichelproduktion und der konstanten Immunsuppression (Shulman et al., 2006). Histopathologisch typisch für eine cGvHD der Mundschleimhaut sind Hyperkeratosen, Epithelverluste und Atrophien, submuköses Lymphozyteninfiltrate, Basalzell-Apoptosen und Degenerationen. Das Entzündungsinfiltrat enthält CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD68<sup>+</sup> Makrophagen und Langerhans-Zellen (Mattsson et al., 1992; Soares et al., 2005).

### **1.3.2. cGvHD der kleinen und großen Speicheldrüsen**

Der Speichel hat eine sehr wichtige Funktion beim Erhalt einer gesunden Mundschleimhaut und der Verdauung. Immunologisch spielt er eine entscheidende Rolle bei der Vorbeugung von Infektionen. Bei einer cGvHD der Speicheldrüsen ist die Quantität und Qualität des Speichels kompromittiert; zumeist zeigt sich ein sehr dicker und eher visköser Speichel. Es dominiert eine Hyposalivation, die eine trockene und rissige Mundschleimhaut, Karies (vor allem interdental und cervical) und eine mögliche opportunistische Candidainfektion hervorruft (Alborghetti et al., 2005). Wenn man die Qualität des Speichels bei einer cGvHD der Speicheldrüsen näher betrachtet, fällt auf, dass Natrium, Magnesium, der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor EGF), Körper-Gesamteiweiß, Albumin, IgG in verminderter

---

Konzentration und eine erhöhte Konzentration an IgA nachgewiesen werden kann (Imanguli et al., 2007; R. M. Nagler & Nagler, 2004a; Sale et al., 1981; Soares et al., 2005). Weitere durch die Xerostomie hervorgerufene klinische Symptome sind Probleme beim Sprechen (Zungenschnalzen), erschwertes Kauen, verstärkte Empfindsamkeit gegenüber heißen, kalten, stark gewürzten und scharfen Speisen und Getränken. Die ständige Mundtrockenheit zwingt viele Patienten auch nachts zu trinken und verändert den Geschmackssinn nachhaltig (Couriel et al., 2006). Kleine oberflächliche Mukozelen, gefüllte Bläschen unter 0,5 cm Größe, sind meist am weichen Gaumen, seltener an den Wangeninnenseiten, der Zunge und der Lippen zu finden (Campana et al., 2006). Diese Entzündungen der kleinen Speicheldrüsen werden meist durch Vernarbungen des Speicheldrüsendanges hervorgerufen. Oft werden diese während des Essens bemerkt, wenn die Speichelproduktion im Gange ist, aber dieser durch den verlegten Gang nicht abfließen kann. Histopathologisch zeigt sich ein Lymphozyteninfiltrat mit vorwiegend CD8<sup>+</sup> T-Zellen und einigen wenigen B-Zellen mit Zytokin-Dysregulation (R. M. Nagler & Nagler, 2004a). Das Ausmaß der zellulären und molekularen Veränderungen steht eng im Zusammenhang mit dem klinischen Grad der Hyposalivation und diese wiederum korreliert mit dem Grad der oralen cGvHD (R. M. Nagler & Nagler, 2004b).

### **1.3.3. Sklerosierende cGvHD**

Diese Form der GvHD ist eher selten und zu einem späteren Zeitpunkt im Laufe einer cGvHD zu beobachten. Sie betrifft die oralen und perioralen Bindegewebs-Strukturen. Die betroffenen Patienten leiden unter erheblichen Einschränkungen beim Sprechen, Essen und der Mundhygiene (Couriel et al., 2006). Hauptursachen dafür sind die auftretende orofaziale Sklerose, Fibrosen und schmerzhaftes Myospasmen, die eine eingeschränkte Mundöffnung und eine verminderte Mobilität der Zunge verursachen (Meier et al., 2011). Unabhängig von einer zusätzlichen möglichen Beteiligung der Speicheldrüsen sind Patienten mit einer sklerosierenden cGvHD aufgrund von mangelnder oder nicht ausreichender Mundhygiene stark gefährdet, Karies und Parodontalerkrankungen zu entwickeln (Vogelsang & Pavletic, 2009).

---

**Tabb.4.** Indirekte orale Auswirkungen einer cGvHD (Meier et al.,2011)

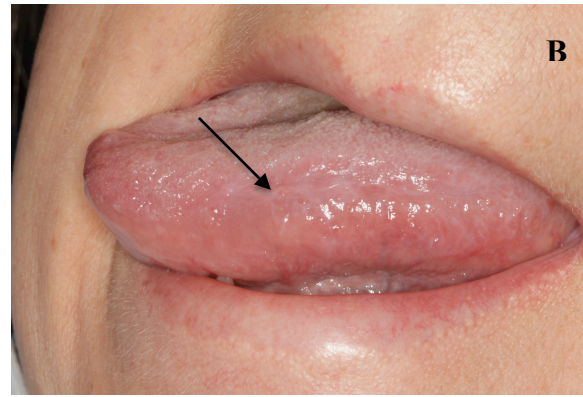
Betroffenes Gewebe	Auswirkungen	Ursache
Zähne	Karies	Xerostomie cGvHD der Speicheldrüsen
Parodontium	Attachmentverlust	cGvHD der Mundschleimhaut
Kieferknochen	Osteonekrose	Bisphosphonate
Mundschleimhaut	Candidiasis	Xerostomie cGvHD der Speicheldrüsen
Speicheldrüsen	Maligne Transformation	Chronische Entzündung cGvHD der Speicheldrüsen

### 1.3.4. Diagnose der oralen cGvHD

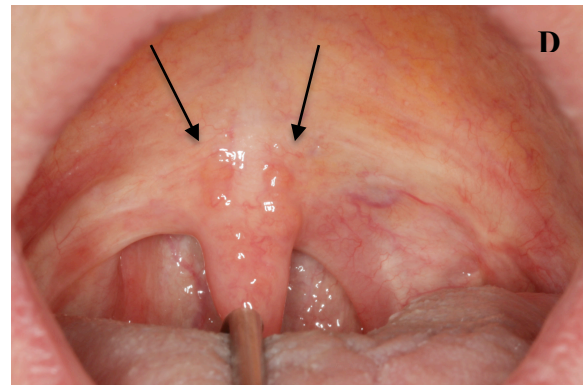
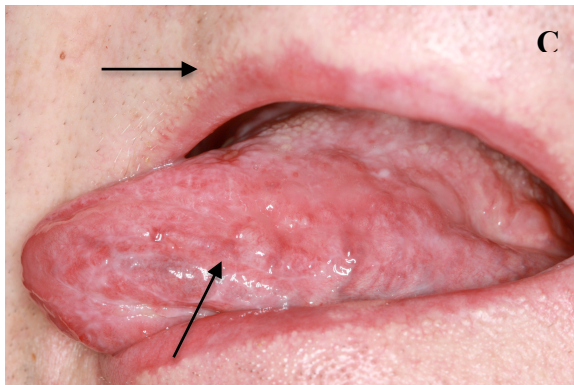
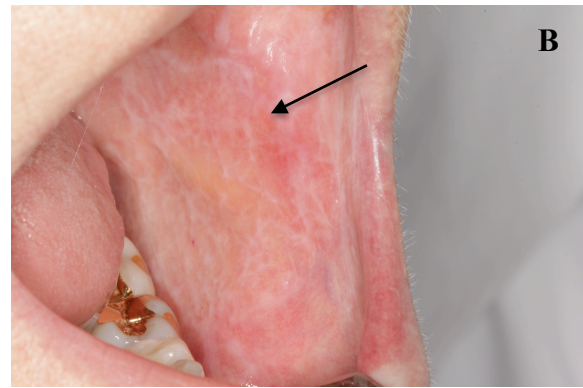
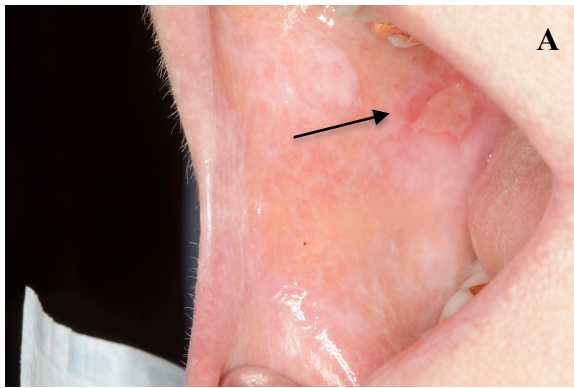
Das National Institute of Health (NIH) hat Kriterien zur Diagnose einer GvHD erstellt. Die Einteilung erfolgt nach diagnostischen und charakteristischen Gesichtspunkten mittels eines 4 Punkte-Systems (keine, milde, moderate und schwere) in Kombination mit oralen Anzeichen und funktionellen Einschränkungen und wird auch „NIH global score“ genannt (Filipovich et al., 2005), wobei die Schwere durch das Ausmaß der Beeinträchtigung definiert wird, die jedoch nicht immer mit den objektiven Veränderungen korreliert. Bassim et al. beschreibt einen NIH Oral Mucosal Score (NIH OMS), bei dem mittels einer Skala die 4 häufigsten klinisch sichtbaren Anzeichen einer oralen cGvHD bewertet werden. Diese sind Erythem, lichenoid Läsionen, Ulzerationen und Mukozelen. Für jede klinische Manifestation gibt es eine Bewertung; so können der Schweregrad von Erythem, lichenoiden Läsionen und Mukozelen von 0-3 und die Ulzerationen von 0-6 bewertet werden. Es ergibt sich eine Summenskala von 0-15 (Bassim et al., 2014).

**Tabb.5.** Der NIH Oral Mucosal Score bewertet die 4 häufigsten klinischen Veränderungen der Mundschleimhaut bei einer oralen cGvHD. Der Schweregrad von Erythem, lichenoiden Läsionen und Mukozelen werden von 0-3 und die Ulzerationen von 0-6 bewertet (Bassim et al., 2014.).

Mucosal change	No evidence of cGVHD		Mild		Moderate		Severe	
	None	0		1		2		3
Erythema	None	0	Mild erythema or moderate erythema (<25%)	1	Moderate (≥25%) or Severe erythema (<25%)	2	Severe erythema (≥25%)	3
Lichenoid	None	0	Hyperkeratotic changes (<25%)	1	Hyperkeratotic changes (25-50%)	2	Hyperkeratotic changes (>50%)	3
Ulcers	None	0	None	0	Ulcers involving (≤20%)	3	Severe ulcerations (>20%)	6
Mucocelles*	None	0	1-5 mucocelles	1	6-10 scattered mucocelles	2	Over 10 mucocelles	3
			*Mucocelles scored for lower labial and soft palate only			Total score for all mucosal changes		



**Abb.3.** Beispiele für klinische Zeichen einer milden oralen cGvHD (Grad 1).  
 A) mildes Erythem der Wangenschleimhaut, B) milde Ulzeration am Zungenrand.



**Abb.4.** Beispiele für klinische Zeichen einer moderaten oralen cGvHD (Grad 2).  
 A) Ulzeration umgeben von mäßigem Erythem, B) lichenoid Hyperkeratose der Wangeninnenseite, C) erhebliches Erythem der Lippenschleimhaut und am Zungenrand, D) kleine bläschenhafte Mukozelen am Übergang vom harten zum weichen Gaumen.



**Abb.5.** Beispiele für klinische Zeichen einer schweren oralen cGVHD (Grad 3).

A) Ulzeration mit pseudomembranösen Fibrin Exsudat umgeben von schwerem Erythem, B) Ulzeration des Zungenrandepithels, C) periorale Sklerose mit eingeschränkter Mundöffnung, D) Atrophie der befestigten Gingiva mit Attachmentverlust.

Klinische Zeichen wie lichenoiden Bereiche, hyperkeratotische Plaques und peri-/orale Sklerosen (eingeschränkte Mundöffnung und Mikrostomie) reichen für die Diagnosestellung einer oralen cGVHD aus. Anzeichen wie Xerostomie, Mukozelen, Atrophien der Schleimhäute, Ulzerationen und Pseudomembranen wiederum können alleine keine Diagnose sichern und werden daher von der NIH lediglich als charakteristisch oder kennzeichnend eingeteilt (Vogelsang & Pavletic, 2009). Eine weitere Möglichkeit einer Einteilung ist der subjektiv vom Patienten bestimmte „Oral Symptom Score of Pain, Sensitivity and Dryness“ nach Lee. Dabei ist es dem Patienten möglich nach individuellem Befinden jeweils eine Bewertung von 0-10 abzugeben (Lee et al., 2002). Wenn bereits eine cGVHD in anderen Organen, wie der Leber oder dem Gastrointestinaltrakt besteht, ist es nicht zwingend notwendig eine Biopsie durchzuführen. Besteht allerdings der Verdacht auf eine orale cGVHD ohne diagnostische Zeichen (isolierte Trockenheit, Erythem oder Ulzera), ist eine Gewebeprobe ratsam, um eine GvHD zu sichern oder auszuschließen. Eine orale cGVHD der Mundschleimhaut ist histolo-

---

gisch gekennzeichnet durch Apoptosen, Dyskeratosen der Epithelzellen und lichenoide Entzündungsinfiltrate unter der Basalmembran. Die Immunhistochemischen Parameter betreffend fällt auf, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD68<sup>+</sup> Zellen dominieren. Bei der oralen cGvHD der Speicheldrüsen, beobachtet man eine leichte Dominanz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Meier et al., 2011)

### **1.3.5. Therapie der oralen cGvHD**

Grundsätzlich ist einschränkend festzuhalten, dass bei der Therapie einer oralen cGvHD nicht die Heilung im Vordergrund steht, sondern eine Verbesserung der klinischen Symptomatik. Zu beachten ist, dass eine Therapie immer individuell angepasst sein muss, um mögliche Nebenwirkungen oder eine Verschlechterung der Symptome zu verhindern oder weitgehend zu minimieren. Ein wichtiger Punkt ist die Mundhygiene, die bei Patienten mit oraler cGvHD aufgrund der Schmerzsymptomatik oft vernachlässigt wird oder kaum durchführbar ist. Beispielsweise führt eine (peri-)orale Sklerose in manchen Fällen zu einer derart eingeschränkten Mundöffnung, dass dadurch die suffiziente Reinigung vor allem der Molaren unmöglich wird. Hyposalivation und mukosale Ulzerationen verursachen außerdem eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Zahnpastainhaltsstoffen und Mundspüllösungen. Daher ist es im Akutstadium sinnvoll Mundspüllösungen ohne Alkohol (Menthol), eine milde fluoridierte Kinderzahnpaste, eine Zahnbürste mit weichen Borsten und bei Bedarf eine Spülung mit Lidocain 2% zu empfehlen, um die Mundhöhle kurzzeitig zu betäuben und zumindest ein wenig Mundpflege zu ermöglichen (Couriel et al., 2006; Vogelsang & Pavletic, 2009). Zur Prävention einer oralen cGvHD und zur Kariesprävention ist es besonders wichtig, dass vor einer geplanten HSZT alle Kariesprädispositionen und Infektionsquellen (Wurzelreste, apikale Wurzelentzündungen, deutlich parodontal geschädigte Zähne) entfernt werden. Zusätzlich sollte ein entsprechend geschulter Zahnarzt alle 6 Monate ein Recall durchführen, wobei Sekundärmalignome der Mundschleimhaut auszuschließen sind und halbjährlich eine Professionelle Zahnreinigung (PZR) erfolgen soll. Bei der Therapie einer oralen cGvHD unterscheidet man zwischen einer systemischen und einer topischen Therapieform. Der Unterschied hierbei ist, dass die systemische Therapieform vor allem bei cGvHD-Patienten mit Multi-Organ-Beteiligung und die topische Therapie bei oral begrenzter cGvHD zur Anwendung kommt, wobei auch ein zusätzlicher topischer Einsatz von Immunsuppressiva zur systemischen Immunsuppression sinnvoll

---

ist. Die wichtigsten Medikamente der topischen Therapie einer oralen cGvHD lassen sich wie folgt einteilen:

- Budesonid

Ist ein synthetisches Glucocorticoid und wirkt am Ort seiner Zufuhr oder Freisetzung. Es hat eine niedrige Bioverfügbarkeit. Daher gibt es bei einem akzidentiellen Gelangen in die Blutbahn (z.B. durch Verschlucken) aufgrund des starken Abbaus bei der ersten Leber-Passage nur sehr geringe Nebenwirkungen. Häufig wird es als Spray oder Tropfen appliziert und ist generell leicht anzuwenden. Bei Inhalation kann es vor allem am Gaumen zu einer opportunistischen Candidainfektionen kommen, was eine Candidaprophylaxe unabdingbar macht. Die empfohlene Dosis liegt hier bei 3mg gelöst in 5-10ml NaCl 3-4mal täglich (Elad, Or, Garfunkel, & Shapira, 2003; Sari et al., 2007).

- Dexamethason

Dieses künstliche Glucocorticoid wirkt entzündungshemmend und dämpfend auf das Immunsystem und zählt zu den langwirksamen Glucocorticoiden. Zur Therapie der oralen cGvHD empfiehlt man 0,5mg/5ml Mundspülung 4-mal täglich in Kombination mit einer entsprechenden Candidaprophylaxe (Kley & Kaiser, 2002).

- Weitere topische Steroide zur Behandlung nicht superinfizierter Entzündungen der Mundschleimhaut sind: das mittelpotente Steroid Triamcinolon-Acetonid (Volon A Haftsalbe 0,1%), Fluocinolon-Acetonid 0,1%, ein höherpotentes Steroid und hochpotente Steroide wie Clobetasol-Propriolat 0,05% (Carbone et al., 2009). Dazu gehören Prednisolon, Triamcinolon, Clobetasol-Propriolat, Bethamethason-Dipropionat und Fluocinonid. Diese Steroide gibt es in unterschiedlichster Darreichungsform: Gele, Salben, Puder oder Cremes. Es wird empfohlen, diese 1-2mal täglich auf die betroffenen Stellen aufzutragen (Institute, 2009). Länger andauernde Therapien mit hochpotenten lokalwirksamen Steroiden können allerdings zur Toleranzbildung und Atrophie führen und somit den Therapieerfolg maßgeblich beeinflussen. Eine Möglichkeit dem entgegenzuwirken ist, initial ein hochwirksames Steroid wie Clobetasol zu verordnen und zur Erhaltungstherapie ein niedrigerpotentes Steroid wie Triamcinolon einzusetzen (Eisen, Carrozzo, Bagan, & Thongprasom, 2005).

---

- Cyclosporin

Weit verbreitet ist die Anwendung von Cyclosporin, einem Calcineurin-Inhibitor. Für die lokale Anwendung ist es als Mundspülung (50- 1.500 mg/Tag) oder als Haftsalbe (26-48mg/Tag) verfügbar. Nachteilig sind allerdings die möglichen Nebenwirkungen wie ein potentiell Langzeitrisko für Malignome der Mundschleimhaut, die den Einsatz von Cyclosporin nur in niedrigen Dosen für kurze Zeit als topische Therapiemöglichkeit indiziert (Voute, Schulten, Langendijk, Nieboer, & van der Waal, 1994).

- Tacrolimus

Dieses Arzneimittel zählt zur Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren und hat eine immunsuppressive Wirkung. Es ist etwa 100 mal potenter als Cyclosporin (Lopez-Jornet, Camacho-Alonso, & Salazar-Sanchez, 2010). Für die topische Anwendung ist es vor allem als Salbe verfügbar, wobei aufgrund des feuchten Milieus in der Mundhöhle die Anwendung hier deutlich erschwert ist. Besonders geeignet ist die Anwendung vor allem bei Beteiligung der Lippen, da eine Hochdosistherapie mit Glucocorticoiden in diesem Falle eine Atrophie der Lippen verursachen kann (Treister, Duncan, Cutler, & Lehmann, 2012). Die übliche Konzentration in einer Mundspülung beträgt zwischen 0,03-0,1%. Leichte Nebenwirkungen wie Brennen der Mundschleimhaut werden beschrieben. Zu beachten ist generell bei längerer Tacrolimus-Anwendung die mögliche Begünstigung eines Sekundärmalignoms (Hodgson, Sahni, Kaliakatsou, Buchanan, & Porter, 2003)

- Topische Photochemotherapie (PUVA)

Eine Photochemotherapie beinhaltet eine Behandlung mit einer Kombination aus einer photosensibilisierenden Substanz (meist 8-Methoxypsoralen in Tablettenform oder Lösung) mit UVA-Bestrahlung. Es wird die länger wellige UVA-Strahlung gewählt, da diese über eine größere Eindringtiefe verfügt und nur dadurch eine Interaktion mit dem Photosensibilisator entsteht (Meier et al., 2011). Die PUVA stellt eine wichtige Behandlungsoption bei refraktärer oraler cGvHD dar. Die Ansprechrate beträgt 60-70%, allerdings kann eine Phototoxizität auftreten und dadurch ein Langzeitrisko für kutane Malignome bestehen (Wolff et al., 2011).

---

- Pilocarpin und Glandosane

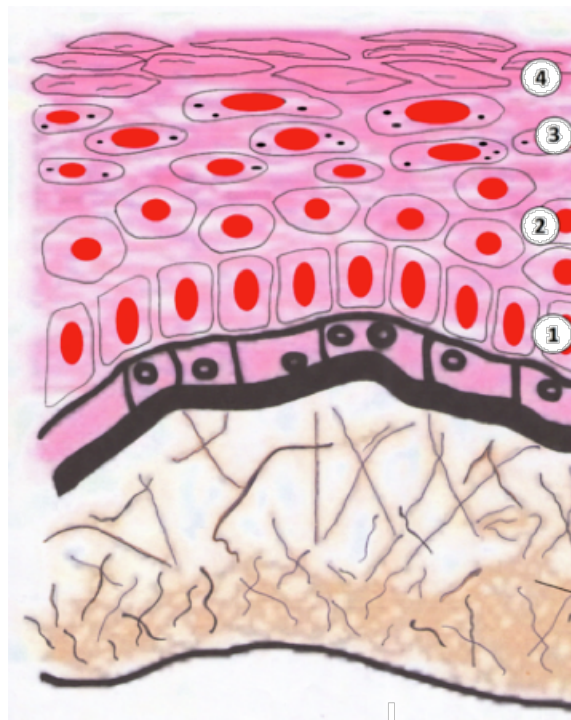
Bei einer oraler cGvHD mit Beteiligung der Speicheldrüsen und dadurch hervorgerufener Hyposalivation wird Pilocarpin- Hydrochlorid (z.B. Salagen®, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) 5-10mg 3-4 mal täglich eingesetzt (Porter, Scully, & Hegarty, 2004). Neben der systemischen Gabe kann es auch als Gel topisch verwendet werden. Es steigert als Parasympatomimetikum die Speichelsekretion und reduziert dadurch Beschwerden wie Mundtrockenheit (Xerostomie) und Kariesanfälligkeit (R. M. Nagler & Nagler, 2004b). Als klassisches Speichelersatzmittel kommt wie bei der postradiogenen Mundtrockenheit z.B. Glandosane zum Einsatz. Mit Wasser als Basissubstanz und dem Wirkstoff Carmellose wirkt es Mundtrockenheit entgegen (Hahnel, 2012).

#### **1.4. Histologischer Aufbau der Mund- und Darmschleimhaut**

Die Schleimhaut (Tunica mucosa) im Allgemeinen stellt eine Art Schutzschicht dar und kleidet die inneren Hohlorgane aus. Physiologisch dient sie der mechanischen Abgrenzung einer Organoberfläche, der Sekretion, der Resorption und der Infektionsabwehr mittels Sezernierung von Immunglobulinen (vor allem IgA). Sie besitzt keine echte Hornschicht, ist haarlos und zeigt einen dreischichtigen Aufbau: Eine Epithelschicht (Lamina epithelialis mucosae), eine Bindegewebsschicht (Lamina propria mucosae) und eine epitheliale Muskelschicht (Lamina muscularis mucosae) (Lüllmann-Rauch, 2003) Die Epithelschicht zeigt im Bereich des Gastrointestinaltrakts regionale Unterschiede und kann einschichtig oder mehrschichtig aufgebaut sein, eine oberflächliche Verhornung zeigen und eine Oberflächenvergrößerung mittels Mikrovilli beinhalten (Kühnel, 2014) Die Mundhöhle stellt den Eingang in den Verdauungstrakt dar und wird von der Mundschleimhaut (Tunica mucosa oris) ausgekleidet. Die Mundschleimhaut kann aufgrund funktioneller und struktureller Unterschiede in 3 Bereiche aufgeteilt werden: Den größten Anteil der Mundschleimhaut stellt die auskleidende Mundschleimhaut dar. Sie besteht aus nicht verhorntem Plattenepithel und kleidet die Zungenunterseite, den Mundboden, den weichen Gaumen, den Mundvorhof und die Alveolarfortsätze aus. Die mastikatorische Mundschleimhaut besteht aus verhorntem Plattenepithel und befindet sich am harten Gaumen und im Bereich der Gingiva. Man unterscheidet ein Stratum basale (Basalzellschicht mit Zellregeneration), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und ein Stra-

---

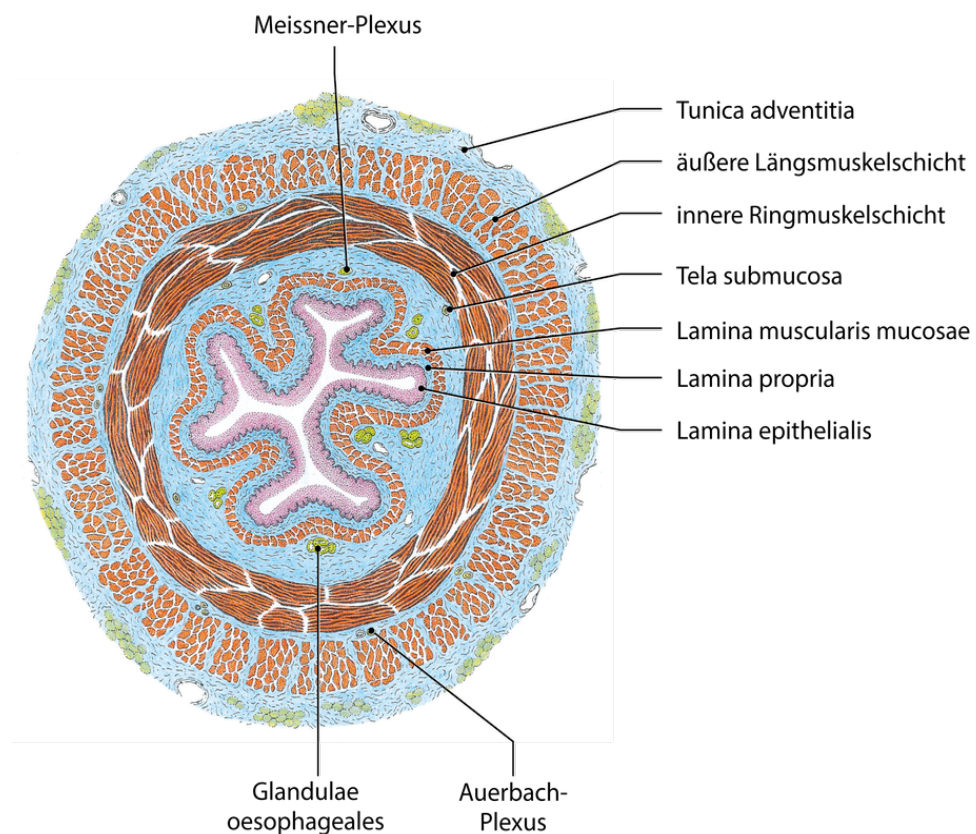
tum corneum (Hornschicht). Teilweise wird eine zusätzliche Körnerzellschicht (Stratum granulosum) beschrieben, die zwischen dem Stratum spinosum und dem Stratum corneum zu finden ist. Die Mundschleimhaut besteht oberflächlich aus unverhorntem mehrschichtigem Plattenepithel, das an den Lippen in ein verhorntes mehrschichtiges Plattenepithel übergeht. In Bereichen starker mechanischer Beanspruchung wie dem harten Gaumen, dem Zahnfleisch und dem Zungenrücken ist teilweise auch verhorntes Epithel zu finden. Es sind Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkelzellen sowie kleine Lymphozyten physiologisch vorhanden. Außerdem enthält das humane Mundschleimhautepithel seromuköse Drüsen wie die Glandulae labiales, Glandulae buccales, Glandulae sublinguales, und Glandulae palatinae (Bork, Burgdorf, & Hoede, 2008).



**Abb.6.** Schematische Darstellung der einzelnen Schichten der mastikatorischen Mundschleimhaut. 1. Stratum basale, 2. Stratum spinosum, 3. Stratum granulosum, 4. Stratum corneum (Lüllmann-Rauch, 2003).

Der Gastrointestinaltrakt (GI) beinhaltet den Großteil des Verdauungsapparates und reicht vom Ösophagus bis zum Anus. Der Wandaufbau setzt sich von innen nach außen aus folgenden Schichten zusammen: Tunica mucosa, unterteilt in die Lamina epithelialis (zeigt aufgrund verschiedener Funktionen im GI einen unterschiedlichen Aufbau), die Lamina propria (besteht aus zell- und blutgefäßreichem retikulärem Bindegewebe und wichtigen Immunzellen

wie z.B. Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, und Plasmazellen) und die Lamina muscularis mucosae (besteht aus glatter Muskulatur). Des Weiteren folgt die Tela submucosa (enthält lockeres Bindegewebe mit dem Plexus submucosus und Blut-,Lymphgefäße), die Tunica muscularis (unterteilt in Ring – und Längsmuskelschicht) und die Tunica serosa (mit Subserosa bei Organen, die von Peritoneum bedeckt sind sowie die Adventitia, wenn Organe extraperitoneal oder retroperitoneal liegen). Wie bereits erwähnt gibt es im Aufbau der Mukosa regionale Unterschiede: Der Ösophagus besteht aus mehrschichtigem unverhorntem Plattenepithel und sowohl quergestreifter als auch glatter Muskulatur im Unterschied zum restlichen GI-Trakt, der von einem einschichtigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet wird sowie der Lamina muscularis, welche aus glatter Muskulatur besteht. Die Besonderheit des Wandaufbaus im Dünndarm sind die Kerckring-Falten, die Darmzotten und die Lieberkühn-Krypten. Im Dickdarm fehlen die Darmzotten, jedoch finden sich sehr viele dicht nebeneinanderstehende tiefe Krypten (Holtmann & Bobkowski, 2009).



**Abb. 7.** Schematische Darstellung des typischen Wandaufbaus des Verdauungstrakts anhand des Ösophagus: Tunica mucosa (unterteilt in Lamina epithelialis, Lamina propria, Lamina muscularis mucosa), Tela submucosa, Tunica muscularis, Tunica adventitia (Ulfig, 2003)

---

## 1.5. Speichel

Der Speichel ist ein immunologisch aktives Sekret der großen und kleinen Speicheldrüsen. Täglich produziert der Mensch physiologisch ein Speichelvolumen von 500-1500 ml. Ca. 90% der Speichelsekretion übernehmen die großen Speicheldrüsen (Glandula parotis, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis), 10% sezernieren die kleinen Speicheldrüsen, die sich in der Mundschleimhaut verteilt befinden. Wenn man seine Zusammensetzung betrachtet, sieht man eine komplex zusammengesetzte Flüssigkeit mit 99 % Wasser und einer Vielzahl an organischen und anorganischen Verbindungen. Zu den physiologischen Bestandteilen zählen Proteine wie Mucine (MG1, MG2), Laktoferrin, Peroxidasen, sIgA, Amylasen (Ptyalin), Carboanhydrasen, Prolin-reiche Proteine (PRPs), Histatine, Cystatine, Statherine, Lysozyme und kleinmolekulare Bestandteile wie Elektrolyte, Ammoniak, Harnsäure und Harnstoff. Seine Funktionen sind vielfältig und für das tägliche Leben essentiell: Befeuchtung der Mundhöhle, Vorverdauung des Speisebreis, Abwehr pathogener Keime, Kontrolle der resistenten Mundflora, Plaquekontrolle, Neutralisation, Pufferung von Säuren und Schutz, Remineralisation der Zahnschmelze und Reparatur der Mundschleimhaut (Hahnel, 2009).

### 1.5.1. sekretorisches IgA (sIgA)

Ein besonders wichtiger Bestandteil des Speichels ist das sIgA, das als Antikörper auf Schleimhäuten zu finden ist und vor allem im Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin, Muttermilch, Schweiß und intestinalen Sekreten nachweisbar ist (Underdown & Mestecky, 1994). Es bildet eine wesentliche Schutzbarriere an den Eintrittspforten des Organismus gegenüber Krankheitserregern (Islam et al., 1994), wird von den Plasmazellen der Schleimhäute gebildet und von den exokrinen Drüsen sezerniert. Es liegt im Gegensatz zum IgA (Monomer) als Dimer vor, das ihm die nötige Stabilität gibt (Underdown & Mestecky, 1994). Die Konzentration im Speichel kann als Alter und Geschlecht unabhängiger Durchschnittswert angegeben werden und beträgt 10mg/dl (Hennig, 1994). Ein wichtiger Faktor, der die sIgA-Konzentration bestimmt ist der Speichelfluss, der wiederum von vielen Komponenten wie Verdauung, Stress, Medikamenten und Begleiterkrankungen beeinflusst wird. Die sIgA Sekretionsrate ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ) setzt sich aus dem Produkt der absoluten sekretorischen IgA-Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und der absoluten Speichelfließrate ( $\text{ml}/\text{min}$ ) zusammen. Bei einer oralen cGvHD mit Speicheldrü-

---

senbeteiligung stellte Izutsu et al. eine verminderte oder sogar fehlende Konzentration von sIgA und eine verminderte Speichelfließrate fest. Diese verminderten sIgA Werte tragen zu einem häufigen Auftreten sinubronchialer Infektionen bei Patienten mit cGvHD bei (Izutsu et al., 1983). Die Veränderung der Speichelqualität zeigte sich anhand erhöhter Konzentrationen an Natrium, Albumin und IgG. Die protektive Funktion des Speichel wird bei Beteiligung der Speicheldrüsen reduziert und folglich kommt es zu häufigem Auftreten einer oraler Mukositis sowie Karies (R. M. Nagler, Hadar, Lieba, & Nagler, 2006).

## **1.6. Regulatorische T-Zellen (Tregs) und FoxP3 (Forkhead-Box-Protein P3) bei einer GvHD**

Tregs sind eine Untergruppe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und kommen bei Wirbeltieren mit einem adaptiven Immunsystem vor. Sie unterdrücken die Aktivierung des Immunsystems und regulieren dessen Selbsttoleranz. Dadurch haben sie im gesunden Organismus eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen (Fontenot & Rudensky, 2005). Man unterscheidet 2 Hauptgruppen von CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen:

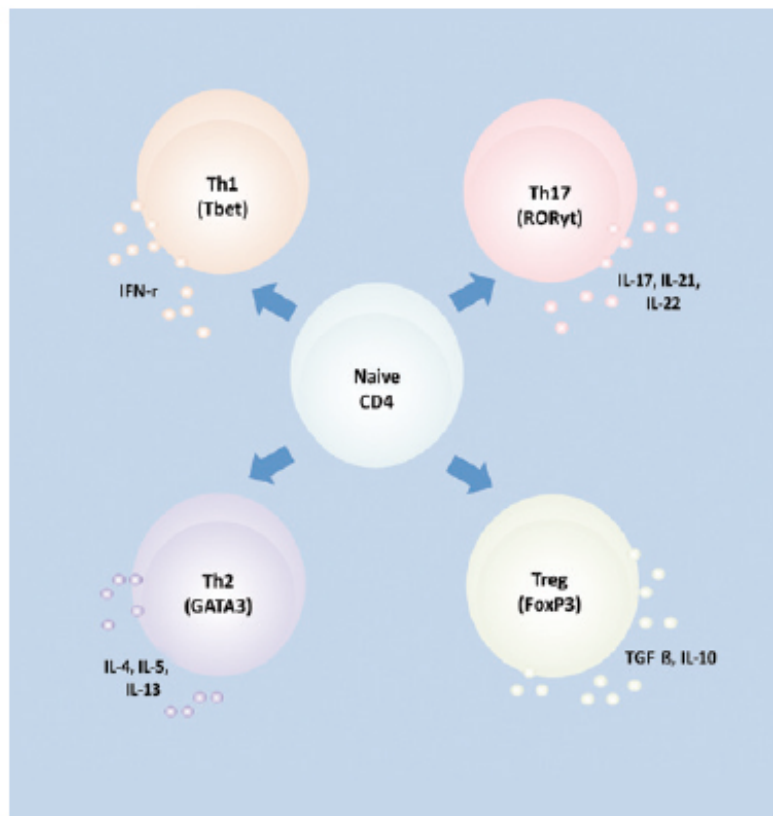
- regulatorische T-Zellen (Tregs) werden aufgrund einer Co-Expression von CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> Tregs zusammengefasst (Hori, Nomura, & Sakaguchi, 2003) und setzen sich aus natürlichen und induzierten Tregs zusammen.
- induzierte oder adaptive Tregs (iTregs) werden in den peripheren lymphoiden Organen in Gegenwart von TGF- $\beta$  gebildet (Cobbald et al., 2004) während natürliche Tregs primär bereits bei der Bildung im Thymus FoxP3 exprimieren und somit bereits als naive T-Zellen FoxP3 exprimieren, während induzierte Tregs immer einen Gedächtnis-Phänotyp aufweisen.

Tregs werden heute mithilfe des Transkriptionsfaktors FoxP3, ein Mitglied der Forkhead-Box-Proteine, nachgewiesen. Er bindet an die DNA und stimuliert dadurch Proteine, die in den Tregs vom Immunsystem gebraucht werden. Daher ist er essentiell für die Entstehung und Funktion von Tregs (Feurerer, Hill, Mathis, & Benoist, 2009; Fontenot & Rudensky, 2005). Tregs spielen eine sehr wichtige Rolle bei epithelialen Entzündungsreaktionen. Sie

---

produzieren unter anderem entzündungshemmende Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ . Dieser stimuliert wiederum die Produktion von IgA und hemmt die Proliferations- und Effektorfunktionen von T-Zellen und die Aktivierung von Makrophagen (Vignali, Collison, & Workman, 2008). In Bezug auf die GvHD scheint es, als ob Tregs zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes der Patienten beitragen. Li et al. zeigte einen Zusammenhang zwischen verminderter Konzentration an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs und einem erhöhten Schweregrad bei einer akuten und einer cGvHD (Li et al., 2010). Der Grund dafür könnte ein vollständiges Fehlen der Gegenregulation durch das FoxP3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zell Verhältnis sein (Rieger et al., 2006) Eine der ersten klinischen Studien am Menschen berichtete über einen Transfer ex-vivo expandierter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127 Tregs nach HSZT bei HLA-identischen Geschwistern. Es kam zu einer erhöhten Konzentration von Tregs und einer Abnahme der Konzentration entzündlicher Zytokine im peripheren Blut (Trzonkowski et al., 2009). Matsuoka et al. entdeckten eine von Tregs auf die cGvHD bezogene Wirkung. Sie verabreichten Patienten mit cGvHD täglich niedrig dosiertes IL-2. Dies induzierte eine selektive Expansion von funktionellen Tregs, wodurch eine Verbesserung der cGvHD, eine Wiederherstellung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Homöostase und der Immuntoleranz resultierte. IL-2 könnte daher eine neue mögliche Therapieform der cGvHD nach HSZT sein, um die Immunbalance wiederherzustellen (Matsuoka et al., 2013). Von Robb et al. wurde eine CD8<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg-Population entdeckt, die GvHD unterdrückte und die Mortalität nach HSZT im Mausmodell abschwächte (Robb et al., 2012).

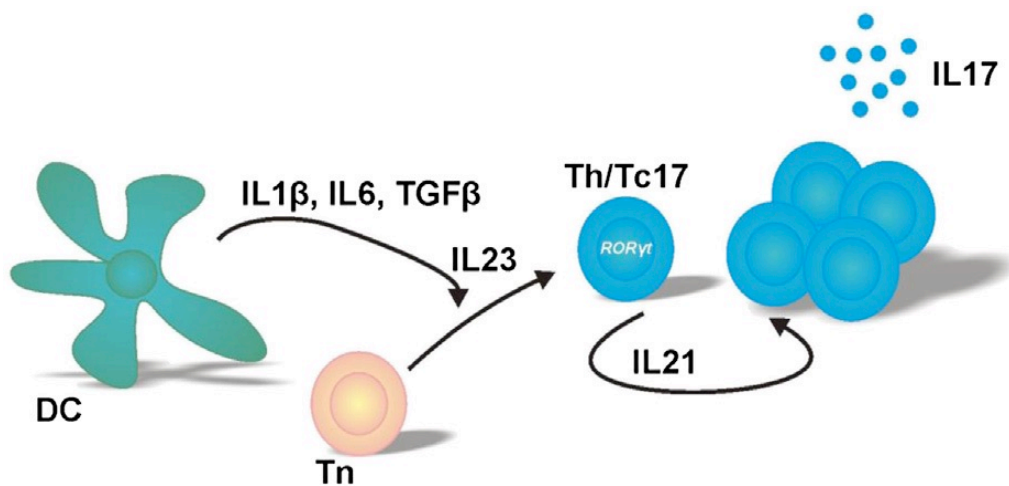
## 1.7. Th-17 Zellen und Interleukin-17 (IL-17) bei einer GvHD



**Abb.8.** Differenzierung naiver  $CD4^+$  T-Zellen in verschiedene Phänotypen (Normanton & Marti, 2013).

Th-17 Zellen sind eine spezielle Form von T-Helferzellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, der Entstehung von chronischen Entzündungen und werden auch in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen erwähnt. Die wichtigste physiologische Funktion die im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen steht ist die Unterdrückung der Bildung von Th1-Zellen. Dadurch wird die Bekämpfung von intrazellulären Krankheitserregern verhindert, was die Chronifizierung von Entzündungen begünstigt (van der Waart, van der Velden, Blijlevens, & Dolstra, 2014). Sie sezernieren eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$  und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (Resende et al., 2014). Das namensgebende IL-17 wird hauptsächlich sezerniert und als proinflammatorisches Zytokin bezeichnet. Ihm werden zahlreiche immunregulatorische Funktionen zugeschrieben, wobei die wichtigste Rolle die Beteiligung an der Entstehung und Vermittlung von proinflammatorischen Reaktionen und Autoimmunerkrankungen ist. Des Weiteren wirkt es auf Binde- und Knochengewebe, in

dem es die Bildung von Osteoklasten aktiviert und die Synthese von Proteoglykanen hemmt (van der Waart et al., 2014). Liu et al. konnte zu Beginn einer GvHD erhöhte Frequenzen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen, was auch die erhöhte Zahl an Th17-Zellen erklärt (Lui et al., 2013). Die Entstehung von Th17-Zellen aus naiven T-Zellen erfolgt über die Ausschüttung von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 und TGF- $\beta$  durch verschiedene Immunzellen (z.B. myeloide dendritische Zellen (DC), plasmazytoide DC und nicht immunantigenpräsentierende Zellen). Diese Zytokine sind bei Patienten nach einer allogenen HSZT stark erhöht. Th17-Zellen produzieren auch IL-21, dieses wiederum trägt zur Bildung von IL-17 bei (Dander et al., 2009).



**Abb.9.** Differenzierung von naiven T-Zellen in Th17-Zellen. DC, dendritische Zellen, Tn, naive T-Zellen, Th/Tc17, T-Helferzellen/zytotoxische T-Zellen (van der Waart et al., 2014).

Ein weiteres Sekretionsprodukt von Th17-Zellen ist das Zytokin IL-22. Es spielt bei Entzündungen eine paradoxe Rolle, da es sowohl eine schützende als auch eine entzündliche Wirkung hat. Zum Beispiel schützt es einerseits intestinale Stammzellen vor immunvermittelter Schädigung während einer GvHD-Erkrankung (Hamash et al., 2012), andererseits ist es auch bei der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen (z.B. rheumatoider Arthritis) beteiligt (Geboes et al., 2009). Courturier et al. beobachteten bei Studien an Mäusen, dass es bei einer Injektion von IL-22 zu einem Anstieg von Tregs kommt und dadurch zu einer Besserung der GvHD. Die Produktion von IL-17 wurde dadurch nicht beeinflusst (Courturier et al., 2013).

---

## 1.8. Macrosialin (CD68) bei einer GvHD

CD68 ist ein Oberflächenprotein, welches hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Traditionell wird CD68 als zytochemischer Marker zur Immunfärbung von Monozyten / Makrophagen bei der histochemischen Analysen von entzündeten Geweben, Tumorgewebe und anderen immunhistopathologischen Anwendungen genutzt (Greaves & Gordon, 2002). CD68 allein oder in Kombination mit anderen Zellmarkern zeigte einen guten prädiktiven Wert als prognostischer Marker für das Überleben bei Tumorpatienten. Es wird als tumor-assoziiertes diagnostischer und prognostischer Marker bzw. zur Identifizierung von Neoplasmen mit Makrophagen-Abstammung verwendet und kann auch von Tumorzellen aus anderen Abstammungslinien exprimiert werden. CD68<sup>+</sup> Makrophagen werden als tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet. TAMs erwerben immunsuppressive Eigenschaften und hemmen die zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Tumoren (Shabo & Svanvik, 2011). CD68<sup>+</sup> kann in Makrophagen, die auf Entzündungsreize reagieren, signifikant hochreguliert werden und es ist in der Lage modifiziertes LDL, Phosphatidylserin und apoptotische Zellen zu binden (Ramprasad et al., 1996). Des Weiteren hat es strukturelle Ähnlichkeiten mit Lysosomen-assoziierten Membranproteinen (LAMPs) und gehört zur LAMP-Familie der Glykoprotein (Holness et al., 1993). Die Funktion von CD68 bei Entzündungen und Karzinogenese ist trotz seiner routinemäßigen Verwendung als immunochemischer Marker für Makrophagen und andere mononukleäre Phagozyten nur unzureichend untersucht. Die Expression von CD68 bleibt ein wichtiges Instrument für die Beurteilung des Tumorgrades, der Malignität, des Fortschreitens und des metastasierten Potenzials eines Tumors. Der Beitrag von CD68 zur Immunität muss noch untersucht werden. Es scheint, dass CD68 keine zentrale Rolle bei der Regulierung angeborener und adaptiver Immunantworten spielt (Christiakov et al., 2017).

---

## 2. Fragestellung und Zielsetzung

Die cGVHD der Mundschleimhaut und des Gastrointestinaltrakts ist eine schwere, die Lebensqualität stark beeinflussende Komplikation nach allogener HSZT. Die cGvHD wirkt sich auf die Speichelzusammensetzung und den Speichelfluss aus. Das sIgA stellt einen wichtigen Bestandteil des Speichels und gastrointestinaler Sekrete dar und wirkt als Schutzbarriere auf den Schleimhäuten. In dieser Arbeit wird untersucht, welchen Einfluss die cGvHD auf die Konzentration des sIgA im Speichel nach einer allogenen HSZT hat und ob eine Korrelation mit dem Schweregrad einer oralen cGvHD besteht. Des Weiteren wird der Zusammenhang zwischen ausgewählten Biomarkern in der Mundschleimhaut bzw. in der Darmschleimhaut und dem Schweregrad einer oralen und/oder intestinalen GvHD untersucht, um herauszufinden, ob diese Biomarker als frühes Diagnosemerkmal einer GvHD fungieren können und folglich eine Prophylaxe bzw. eine zeitige Therapiemaßnahme ermöglichen, um schwere Verlaufsformen zu verhindern.

Im Einzelnen stellten sich folgende Fragen:

1. Wie verhält sich die Konzentration des sIgA im Speichel im Verlauf nach einer allogenen HSZT?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des sIgA im Speichel nach HSZT und dem Schweregrad einer oralen cGvHD?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Konzentration ausgewählter Biomarker in der Mundschleimhaut bzw. in der Darmschleimhaut und dem Schweregrad einer oralen und/oder intestinalen GvHD?

---

## **3. Patienten und Methodik**

### **3.1. Patientenkollektiv**

Aus der Klinik für Innere Medizin III des Klinikums der Universität Regensburg wurden 49 Patienten rekrutiert, die sich aufgrund hämatologischer Vorerkrankungen im Zeitraum von 3 Jahren einer allogenen HSZT unterzogen hatten und als Folge eine GvHD entwickelten. Als Transplantationsparameter wurden das Datum der HSZT, Patientenalter zum Zeitpunkt der HSZT, der Spendertyp (Familienspender/Fremdspender) und das Geschlecht der transplantierten Patienten dokumentiert. 22 Patienten hatten einen HLA-identischen Familienspender, 27 Patienten einen HLA-kompatiblen Fremdspender. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der HSZT lag zwischen 19 und 68 Jahren. 36 Patienten waren männlich (73%) und 13 Patienten weiblich (27%).

### **3.2. Klinische Parameter**

In Bezug auf die klinischen Charakteristika wurden folgende Parameter dokumentiert: Das Biopsiedatum, das Erstauftreten einer oralen cGvHD nach HSZT (in Tagen), die klinische und histologische Ausprägung der aufgetretenen cGvHD und die nachfolgende Therapiemaßnahme. Des Weiteren wurden die Speichelfließrate, das Speichelvolumen vor und nach HSZT, die Konzentration an sIgA vor HSZT und die des sIgA im Speichel nach HSZT sowie die immunhistochemischen Parameter (oral/intestinal) bestimmt und dokumentiert. Die Diagnosestellung der oralen cGvHD erfolgte nach dem NIH Oral Mucosal Score (NIH-OMS) (Bassim et al., 2014), in dem der Schweregrad und die klinisch sichtbaren Anzeichen berücksichtigt wurden. Als GvHD-Prophylaxe und GvHD-Therapie wurden hauptsächlich Glucocorticoide, Calcineurin-Inhibitoren und Mycophenolat Mofetil (MMF) separat oder in Kombination gegeben. Es erfolgte eine topische und/oder systemische Therapie.

**Tabb.6. Patientencharakteristika**

<b>Beobachtungszeitraum: 12/2001- 04/2014</b>	
<b>Patientenanzahl</b>	49
<b>Geschlecht</b>	
Männlich	36
Weiblich	13
<b>Alter</b>	19 bis 68 (Mittel 43,5 Jahre)
<b>Diagnose</b>	<b>Anzahl</b>
ALL	3
AML	23
MDS	2
Mb. Hodgkin	3
T-NHL	3
CML	2
Fanconi Anämie	1
Plasmozytom	2
Multiples Myelom	4
OMF	2
B-CLL	2
B-NHL	1
B-ALL	1
<b>Spender</b>	
Familienspender	22
Fremdspender	27
<b>Orale cGvHD</b>	
Grad 1 (mild)	24
Grad 2 (moderat)	17
Grad 3 (schwer)	4
Keine orale cGvHD	4

---

### 3.3. Biopsie der Mundschleimhaut und Speichelfließrate

Um die Diagnose cGvHD histologisch zu sichern, wurde bei allen 49 Patienten in der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Uniklinikums Regensburg eine Gewebeprobe (Inzisionsbiopsie) aus der betroffenen Wangenschleimhaut entnommen. Dies erfolgte unter örtlicher Betäubung der Wangenschleimhaut mittels Infiltrationsanästhesie und spindelförmiger Schnittführung intercalar mit einem Minimaldurchmesser von 5mm. Für den Wundverschluss wurde nicht resorbierbares Nahtmaterial der Stärke 4-0 verwendet. Die Nähte wurden nach vollständiger Wundheilung frühestens nach 7 und spätestens nach 10 Tagen entfernt. Unmittelbar vor der Gewebsentnahme wurde die Speichelfließrate bei allen 49 Patienten mittels Sialometrie bestimmt. Die Patienten wurden angewiesen eine Stunde vor diesem Test alles zu unterlassen, was Einfluss auf die Speichelsekretion hat, also nichts essen, trinken, nicht rauchen, nicht Kaugummi kauen und keine Mundhygienemaßnahmen zu betreiben. Für die Bestimmung der stimulierten Speichelfließrate sollte der Patient im aufrechten Sitz den Kopf leicht nach vorne beugen. Die Patienten bekamen Paraffin-Kautabletten um den Speichelfluss anzuregen. Bei einer Frequenz von einer Kaubewegung pro Sekunde sollte der Speichel für 5 min gesammelt werden. Die produzierte Speichelmenge wurde in einen Messbecher abgegeben und es wurde die Speichelmenge anhand eines kalibrierten Gefäßes abgemessen. Aufgrund von individuellen Schwankungen (z.B. abhängig von Hydratationszustand) bei der Speichelsekretion ist ein gesichertes Vorliegen einer Hyposalivation schwierig festzumachen. Basierend auf Studien ist eine Hyposalivation definiert durch eine unstimulierte Speichelfließrate von weniger als 0,1 ml/min und eine stimulierten Speichelfließrate von weniger als 0,5-0,7 ml/min (Dawes, 2004; Sreebny, 2000).

---

### **3.4. Bestimmung des sIgA**

Es erfolgte die Bestimmung des sIgA mittels Laser- Nephelometrie. Dieses Verfahren ermöglicht eine sichere und schnelle Bestimmung von Immunglobulinen mittels Messung der relativen Lichtbrechung einer konstanten Lichtquelle, wenn diese auf Flüssigkeitspartikel trifft. Diese Partikel stellen das sIgA dar, die Lösung den Speichel. Vor der Messung erfolgte eine Vibration der Küvetten, um die Lösungen durchzumischen und anschließend die Lichtbrechung zu messen. Diese wird in Bezug auf eine Standardkurve gemessen, wobei die Brechung der Lichtquelle proportional zum Gehalt an sIgA-Partikeln ist. 80% der im Speichel sezernierten Immunglobuline gehören der Klasse A an. Trotz individueller Variabilität hat sich als Normwert an sIgA 8-12mg/dl durchgesetzt (Murphy, 2018). Es wurde bei 49 Patienten die Konzentration an sIgA vor HSZT und die Konzentration an sIgA im Speichel nach HSZT bestimmt und dokumentiert.

### **3.5. Biomarkerbestimmung für die Mundschleimhaut und den Gastrointestinalstrakt**

Die Biopsieentnahme erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik bei Verdacht auf eine akute GvHD im Darm mittels Koloskopie und im Mund mittels Inzisionsbiopsie der betroffenen Mundschleimhaut von ausgebildeten Ärzten des Universitätsklinikums Regensburg. Die entnommenen Gewebeproben wurden am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg gelagert, 24 Stunden lang in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnitte mit einer Dicke von 2-4  $\mu\text{m}$  hergestellt und mittels Hämatoxylin (Hämalaun) und Eosin gefärbt.

---

### 3.5.1. Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode um mittels Antigen-Antikörper-Erkennung spezifische Antigene in Geweben oder Zellen zu lokalisieren. Die Antikörper wurden mit dem Ventana Benchmark und Ultra View Kit am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg gefärbt. Der Ventana Ultra View Kit ist ein indirektes, biotinfreies System zum Nachweis von Maus-IgG und Maus-IgM mit primären Kaninchenantikörpern. Das Kit dient zur Identifizierung von Zellen durch IHC in Formalin-fixierten, paraffineingebetteten und gefrorenen Geweben. Folgende Antikörper wurden mittels Ventana Ultra View gefärbt:

**Tabb. 7.**

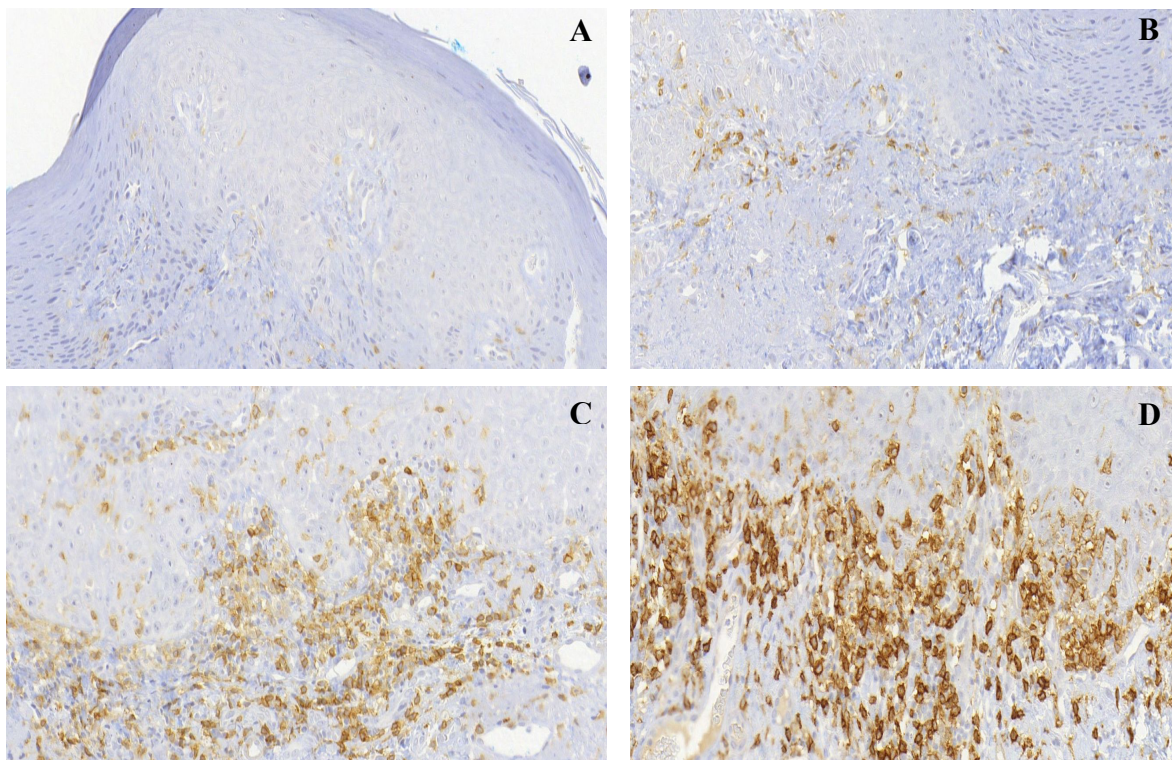
CD4 (Sp35)	Fa. Ventana	Best.Nr. 790-4423	Pur Vorbehandlung CC1
CD8 (Sp57)	Fa. Ventana	Best.Nr. 790-4460	1:2 Vorbehandlung CC1
CD68 (PG-M1)	Fa. Dako	Best.Nr. M0876	1:200 Vorbehandlung CC1
FoxP3	Fa eBioscience	Best.Nr. 14-4777-80	1:75 Vorbehandlung CC1
MIB 1 (Mib1)	Fa. Dako	Best.Nr. M7240	1:100 Vorbehandlung CC1

IL-17 wurde manuell mittels indirekter Immunhistochemie PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase Technik) gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Hämalaun:

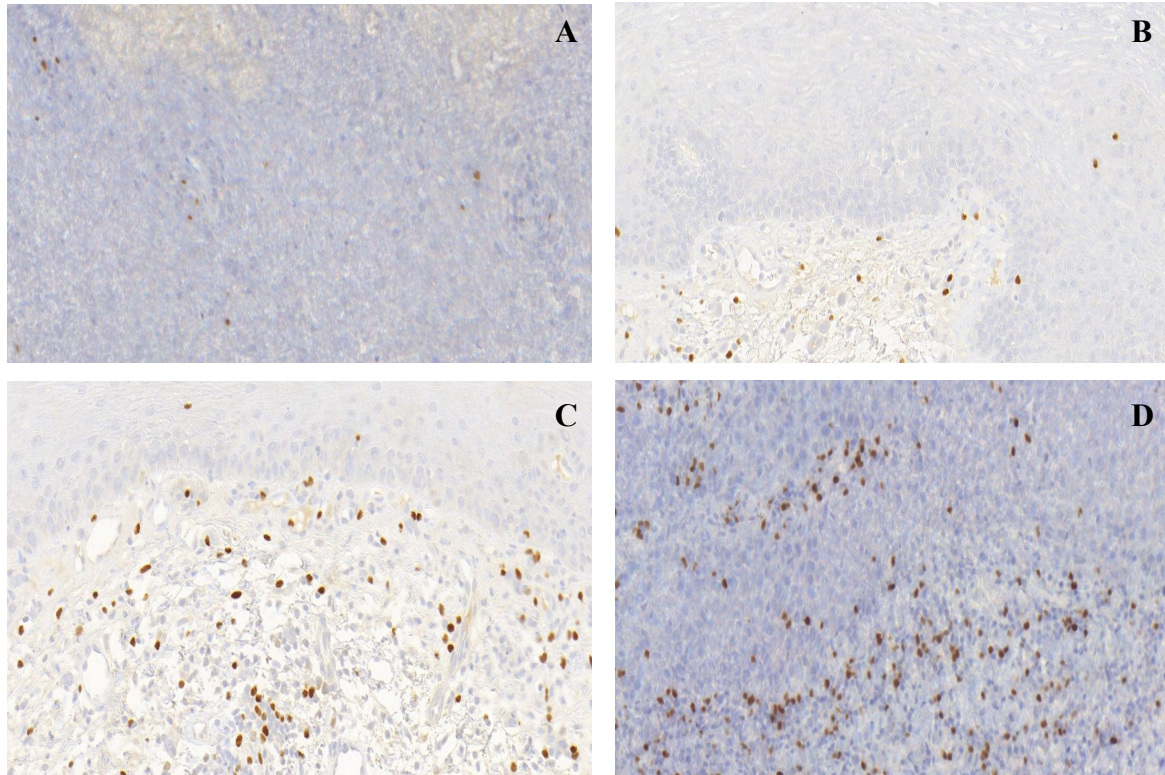
**Tabb. 8.**

IL-17	Fa. RD Systems	Best.Nr. AF-317-NA	1:25 Vorbehandlung MW
Sek. Antikörper: Anti-Goat HRP konju- giert	Fa. Sigma	Best.Nr. A4174-1	1:50

Bei allen Biomarkern wurden der Gesamtwert der positiven Zellen ausgewertet. IL-17 wurde separat für Stromazellen und intraepitheliale Zellen bestimmt, wobei nur die intrapithelialen Zellen in die Auswertung miteinbezogen wurden. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ auf einer Skala von 0-3. Diese Skala entspricht übersetzt 0 = keine positiven Zellen, 0,5 = einzelne wenige positive Zellen, 1 = geringe positive Zellen, 2 = mäßig positive Zellen, 3 = deutlich vermehrte positive Zellen.



**Abb.10.** Immunhistochemische Darstellung der  $CD4^+$  T-Zellen in der Mundschleimhaut.  $CD4^+$  T-Zellen im Epithel und im subepithelialen Stroma durch DAB (braun) dargestellt, Gegenfärbung durch Hämatoxylin (schwach blau) zur Darstellung der negativen Zellen im Gewebe. A) Semiquantitativer Score 0,5 B) Semiquantitativer Score 1 C) Semiquantitativer Score 2 D) Semiquantitativer Score 3. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.



**Abb.11.** Immunhistochemische Darstellung der FoxP3<sup>+</sup> Zellen in der Mundschleimhaut. FoxP3<sup>+</sup> Zellen im Epithel und im subepithelialen Stroma durch DAB (braun) dargestellt, Gegenfärbung durch Hämatoxylin (schwach blau) zur Darstellung der negativen Zellen im Gewebe. A) Semiquantitativer Score 0,5 B) Semiquantitativer Score 1 C) Semiquantitativer Score 2 D) Semiquantitativer Score 3. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

### 3.6. Statistische Verfahren

Es wurden 49 Patientendatensätze in die Untersuchung aufgenommen. Die Daten wurden aus dem SAP des Uniklinikums Regensburg gesammelt und mit Microsoft Excel 2013 weiterverarbeitet. Die gesammelten Daten wurden per Hand in eine erstellte SPSS-Tabelle übertragen und mittels IBM SPSS 24 ausgewertet und analysiert. Bei fehlenden Werten wurden einzelne Tests mit listenweisem Fallausschluss durchgeführt. Das heißt fehlende Werte wurden nicht in die jeweilige Berechnung aufgenommen. Die Hypothesentests wurden mittels T-Test für verbundene Stichproben und Univariate Varianzanalyse (ANOVA) auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha < .05$  durchgeführt. Die Daten wurden mittels der entsprechenden Verfahren (Shapiro-Wilk Test) auf Normalverteilung getestet. Der Shapiro-Wilk Test wurde für alle

---

erhobenen Biomarker nicht signifikant, womit die Normalverteilung nicht angenommen werden kann. Deshalb wurden bei allen statistischen Verfahren zusätzlich jeweils entsprechende nicht parametrische Tests berechnet (Mann-Whitney-U / Kolmogorow-Smirnov). Auf einem Signifikanzniveau  $\alpha < .05$  führte keiner der nicht parametrischen Tests zu einer anderen Testentscheidung als das korrespondierende parametrische Verfahren. Daher werden im Folgenden ausschließlich die Ergebnisse der linearen parametrischen Testverfahren berichtet.

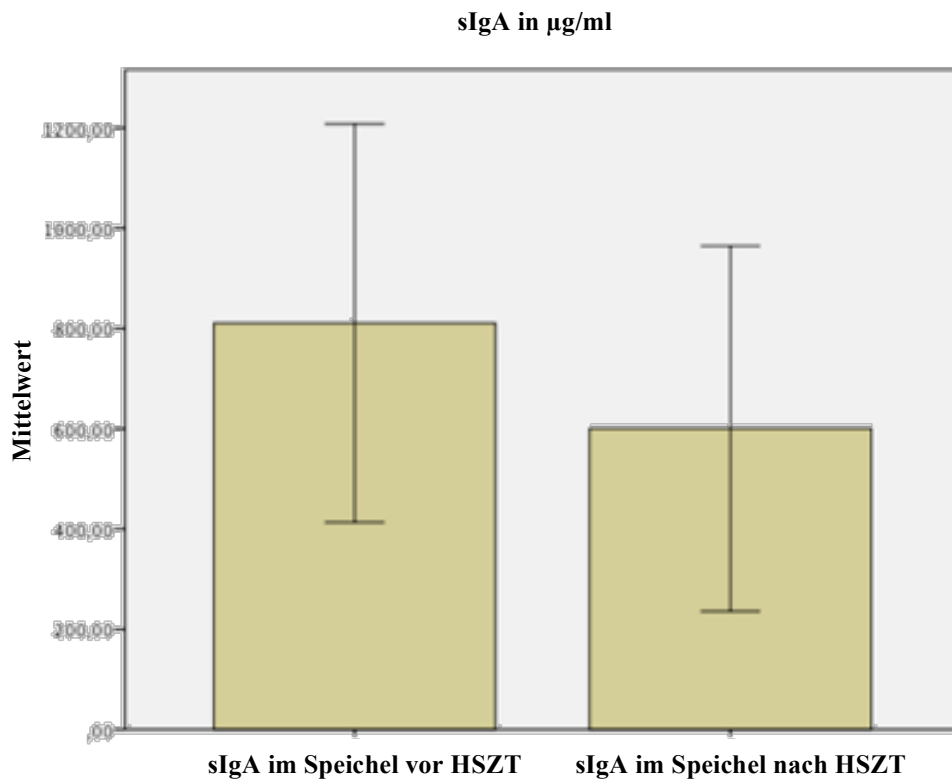
---

## 4. Ergebnisse

Diese Arbeit stellt eine retrospektive Analyse von 49 Patienten dar, die im Zeitraum von 3 Jahren am Klinikum der Universität Regensburg eine allogene HSZT erhalten haben und als Folge an einer oralen und/oder intestinalen GvHD erkrankten. Das Erstauftreten der oralen cGvHD manifestierte sich bei 37 von 45 Patienten nach dem Tag 100 post transplantationem, bei 4 Patienten bereits innerhalb von 100 Tagen nach HSZT und bei 4 Patienten wurde der Tag des erstmaligen Auftretens nicht dokumentiert. Von 49 Patienten hatten 24 eine milde Ausprägung, 17 eine moderate und 4 Patienten litten an einer schweren oralen cGvHD der Mundschleimhaut. Vier Patienten entwickelten keine orale cGvHD. Bei Betrachtung der klinischen Manifestationen zeigte sich, dass der Großteil der Patienten an Ulzerationen und lichenoiden Läsionen litten. Genauer betrachtet und statistisch ausgewertet wurden die Konzentrationen des sIgAs im Speichel im zeitlichen Zusammenhang zur HSZT und die Anzahl ausgewählter Biomarker im Vergleich zum Schweregrad einer GvHD.

### 4.1. Fragestellung 1: Wie verhält sich die Konzentration des sIgA im Speichel im Verlauf nach einer allogenen HSZT.

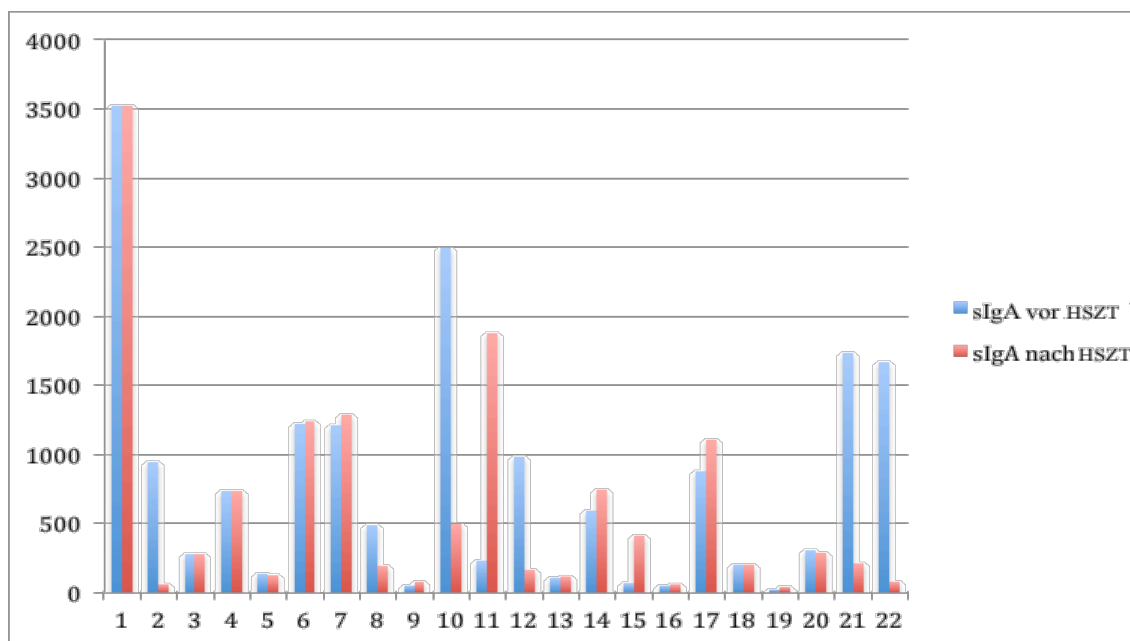
Es wurde bei 49 Patienten die Konzentration des sIgAs sowohl vor HSZT, als auch nach HSZT dokumentiert (Konzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$ ). Mittels T-Test bei verbundenen Stichproben wurden die Mittelwerte der Konzentration des sIgAs vor HSZT ( $n = 22$ ,  $M = 810,46$ ,  $SD = 896,10$ ) und die Konzentration des sIgAs nach HSZT ( $n = 22$ ,  $M = 600,30$ ,  $SD = 821,48$ ) miteinander verglichen und untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen und dem Zeitpunkt der HSZT besteht. 27 Fälle konnten nicht berücksichtigt werden, da sie in mindestens einer der beiden Variablen einen fehlenden Wert aufwiesen. Mittels T-Test bei gepaarten Stichproben konnte hinsichtlich der Konzentrationen des sIgA im Speichel im Vergleich vor allogener HSZT versus nach allogener HSZT kein signifikanter Unterschied gefunden werden. In der Grafik lässt sich allerdings eine tendenziell verminderte Konzentration an sIgA im Speichel nach HSZT erkennen.



**Abb. 12.** Verhältnis der Konzentration an sIgA in µg/ml vor und nach HSZT.

**Tabb.9.** Vergleich der Konzentration von sIgA im Speichel vor und nach HSZT in µg/ml.

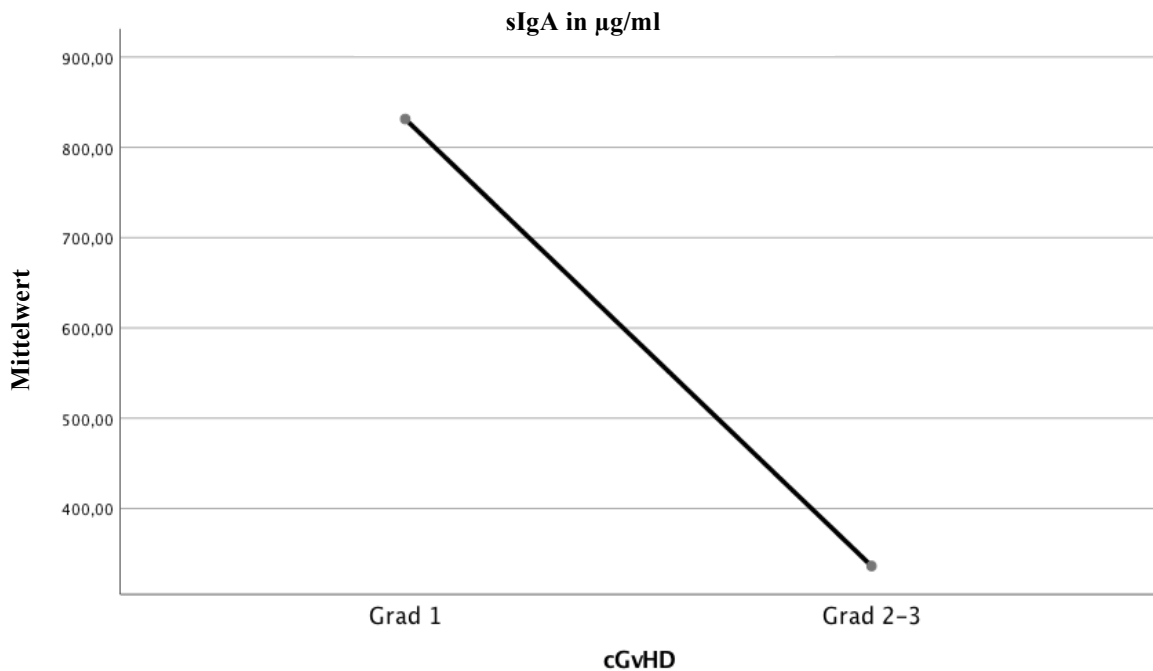
	n	Mittelwert	Std.-Abweichung	p-Wert
vor HSZT	22	810,46	896,10	,213
nach HSZT	22	600,30	821,48	



**Abb.13.** Verhältnis der Konzentrationen an sIgA im Speichel der Patienten vor und nach HSZT (in µg/ml).

#### **4.2. Fragestellung 2: Besteht ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des sIgAs im Speichel nach HSZT und dem Schweregrad der oralen cGvHD.**

Insgesamt konnten 29 Fälle von 49 Patienten berücksichtigt werden, da die übrigen 20 Patienten aufgrund von fehlenden Werten ausgeschlossen werden mussten. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration des sIgA im Speichel nach HSZT und dem Schweregrad der oralen cGvHD wurde mittels einfaktorieller ANOVA untersucht. Es wurden die Konzentrationen an sIgA im Speichel nach HSZT von Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 1 und mit einer oralen GvHD Grad 2-3 verglichen. Das Ergebnis war gerade noch nicht statistisch signifikant ( $p = .083$ ). Allerdings zeigte sich, dass Patienten, welche an einer milden oralen cGvHD (Grad 1) erkrankten ( $n=16$ ) im Mittel eine höhere Konzentration an sIgA im Speichel ( $M = 831,40 \mu\text{g/ml}$ ) hatten, als jene Patienten, die an einer moderaten oder schweren oralen cGvHD (Grad 2-3) ( $n=13$ ) litten ( $M = 336,25 \mu\text{g/ml}$ ). Es kann vermutet werden, dass der Schweregrad einer oralen cGvHD und die Konzentration von sIgA im Speichel nach HSZT assoziiert sind.



**Abb.14.** Verhältnis der Konzentration von sIgA nach HSZT in Bezug auf den Schweregrad einer oralen cGVHD.

**Tabb.10.** Konzentration von sIgA (µg/ml) im Speichel nach HSZT im Verhältnis zum Schweregrad einer oralen cGVHD (Grad 1-3).

	n	Mittelwert	Std.-Abweichung	p-Wert
Grad 1	16	831,40,	901,69	,083
Grad 2-3	13	336,25	455,56	

### 4.3. Fragestellung 3: Besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl ausgewählter Biomarker und dem Schweregrad einer oralen bzw. intestinalen GvHD.

Es wurden zusätzlich zu den 49 Patienten, welche eine orale cGVHD entwickelten, 41 Patienten miteinbezogen. Von denen erkrankten ca. die Hälfte (21 Patienten) an einer intestinalen GvHD. Es wurde der Zusammenhang zwischen der Dichte der ausgewählten Biomarker und

---

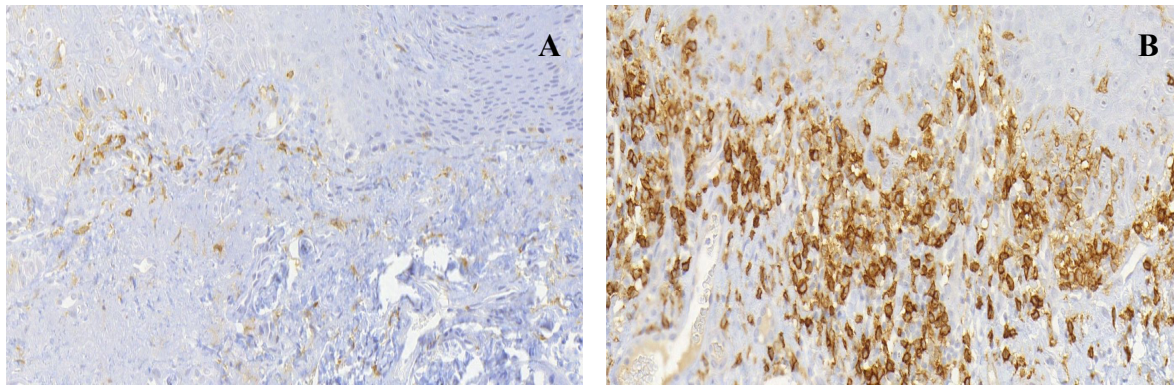
den Schweregraden sowohl bei einer oralen als auch bei einer intestinalen GvHD untersucht. Dazu wurden Patienten ohne GvHD und Patienten die eine GvHD Grad 1 oder Grad 2-3 entwickelten berücksichtigt. Dieser Vergleich wurde separat sowohl für die Mundschleimhaut, als auch für die Darmschleimhaut vollzogen und mittels Nichtparametrischer Tests (Kruskal-Wallis Test, Mann-Whitney Test) berechnet. In Bezug auf den Schweregrad wurden aufgrund der geringen Fallzahl Patienten mit GvHD Grad 2 und Grad 3 zusammengefasst. In den Vergleich miteinbezogen wurden die Biomarker CD4, CD8, CD68, MIB, FoxP3 und IL-17. Alle positiven Zellen wurden im Zeiss Axioscope 40- Mikroskop analysiert und semiquantitativ auf einer Skala von 0-3 angegeben.

#### **4.3.1. Vergleich der Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit und ohne oraler cGvHD.**

Die Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen Patienten die keine orale cGvHD (n=1) entwickelten und denen die an einer oralen cGvHD Grad 1 (n=19) erkrankten wurden verglichen. Eine höhere Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte bei einem Nichtauftreten einer oralen cGvHD nachgewiesen werden. Mit dem Auftreten einer oralen cGvHD Grad 1 sank die Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Mundschleimhaut. Der Vergleich zeigte statistisch kein signifikant differentes Ergebnis. Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 2-3 zeigten eine leicht erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup>T-Zellen im Vergleich zu Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 1. Sowohl der Vergleich keine orale cGvHD (n=1) versus eine orale cGvHD Grad 2-3 (n=17) als auch der Vergleich innerhalb der Schweregrade (orale cGvHD Grad 1 versus Grad 2-3) konnten keine signifikanten Ergebnisse zeigen.

**Tabb.11.** Vergleich der Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer oralen cGvHD

Vergleich		CD4						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	1	19	3,00	1,00	0,71	p = .110	
Keine GvHD	Grad 2-3	1	17	3,00	1,00	0,79	p = .109	
Grad 1	Grad 2-3	19	17	1,00	1,00	0,71	0,79	p = .423



**Abb.15.** Immunhistochemische Darstellung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Mundschleimhaut  
A) Semiquantitativer Score 1 ,B) Semiquantitativer Score 3. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

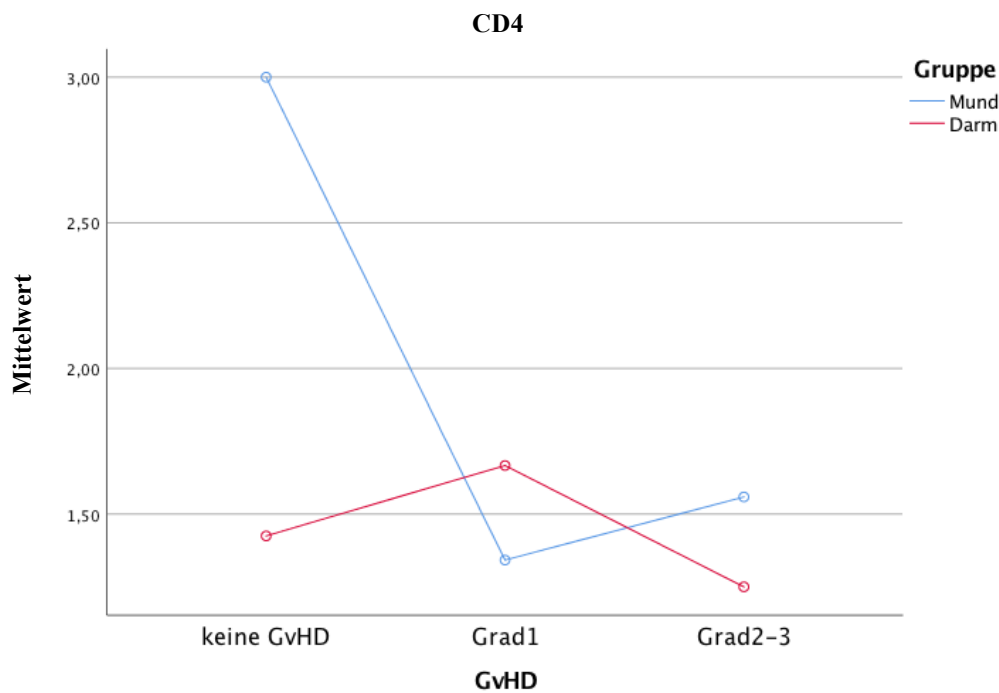
#### 4.3.2. Vergleich der Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit und ohne intestinale GvHD.

Patienten, bei denen eine intestinale GvHD Grad 1 (n=6) diagnostiziert wurde, zeigten im Vergleich zu Patienten ohne intestinale GvHD (n=20) eine leicht erhöhte Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bei einer Verschlechterung der intestinalen GvHD (Grad 2-3, n=14) konnte im Vergleich zu Patienten mit einer intestinalen GvHD Grad 1 eine geringere Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Patienten ohne intestinale GvHD verglichen mit denen, die eine intestinale GvHD Grad 2-3 entwickelten zeigten eine annähernd gleich hohe Dichte

an CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Alle Vergleiche an CD4<sup>+</sup> T-Zell-Infiltrate innerhalb der Schweregrade zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede.

**Tabb.12.** Vergleich der Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer intestinalen GvHD

Vergleich		CD4						
		n		Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test		
Keine GvHD	Grad 1	20	6	1,50	2,00	0,77	1,37	p = .534
Keine GvHD	Grad 2-3	20	14	1,50	1,00	0,77	0,55	p = .464
Grad 1	Grad 2-3	6	14	2,00	1,00	1,37	0,55	p = .385



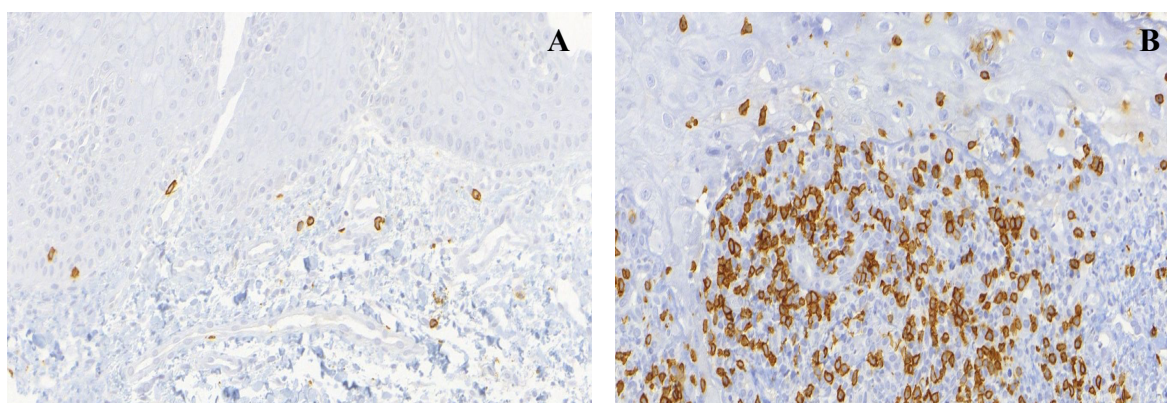
**Abb.16.** Verhältnis Biomarker CD4 und Schweregrad orale und intestinale GvHD.

### 4.3.3. Vergleich der Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit und ohne oraler cGvHD.

Generell konnte beobachtet werden, dass Patienten ohne orale cGvHD (n=1) eine höhere Dichte an CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen, als jene Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 1 (n=18). bzw. Grad 2-3 (n=16). Genauer betrachtet zeigte nur der Vergleich der Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen keiner oraler cGvhd und einer oralen cGvHD Grad 1 einen marginal signifikanten Unterschied. Alle anderen Vergleiche (keine orale cGvHD versus Grad 1 bzw. orale cGvHD Grad 1 versus orale cGvHD Grad 2-3) zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang.

**Tabb.13.** Vergleich der Dichte an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer oralen cGvHD.

Vergleich		CD8						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	1	18	1,50	0,50	0,44	p = .091	
Keine GvHD	Grad 2-3	1	16	1,50	0,50	0,58	p = .201	
Grad 1	Grad 2-3	18	16	0,50	0,50	0,44	0,58	p = .620



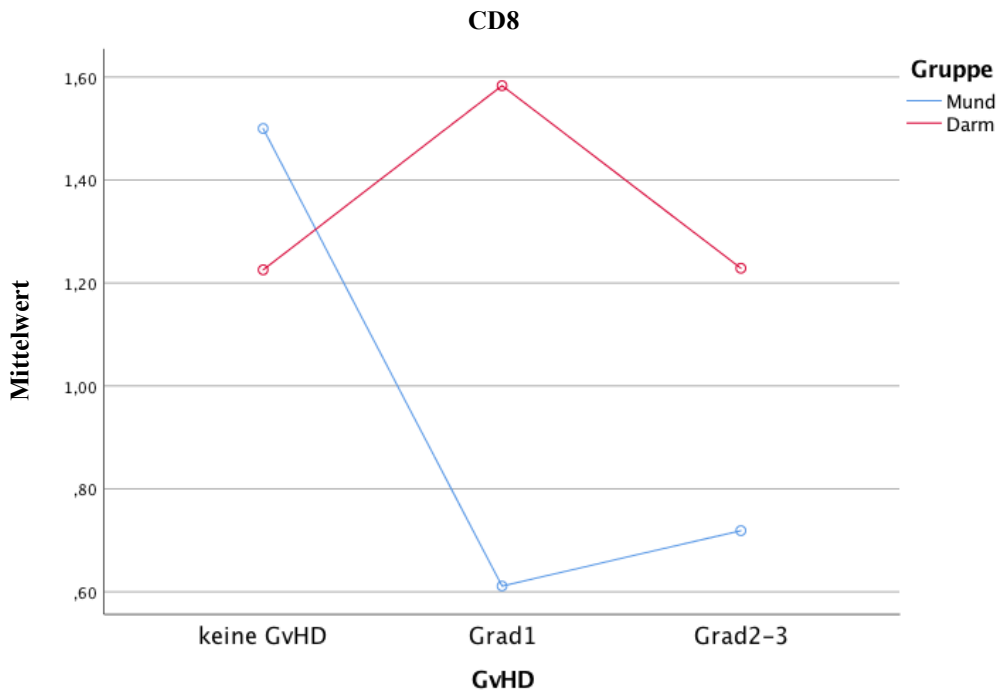
**Abb.17.** Immunhistochemische Darstellung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Mundschleimhaut  
A) Semiquantitativer Score 1 ,B) Semiquantitativer Score 3. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

#### 4.3.4. Vergleich der Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit und ohne intestinaler GvHD.

Es konnte gezeigt werden, dass im Gastrointestinaltrakt eine höhere Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden waren als in der Mundschleimhaut. Bei Patienten ohne intestinale GvHD Erkrankung (n=20) verglichen mit Patienten, die eine intestinale GvHD Grad 2-3 (n=14) entwickelten, wurde eine annähernd gleich hohe Dichte an CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte bei Patienten mit einer intestinalen GvHD Grad 1 (n=6) im Vergleich zu Patienten ohne eine intestinale GvHD bzw. bei solchen mit intestinaler GvHD Grad 2-3 ein höherer Anteil von CD8<sup>+</sup>T-Zellen festgestellt werden. Die Vergleiche zeigten allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede.

**Tabb.14.** Vergleich der Dichte an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer intestinalen GvHD.

Vergleich		CD8						
		n		Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test		
Keine GvHD	Grad 1	20	6	1,00	1,50	0,64	1,11	p = .424
Keine GvHD	Grad 2-3	20	14	1,00	1,00	0,64	0,49	p = .852
Grad 1	Grad 2-3	6	14	1,50	1,00	1,11	0,49	p = .409



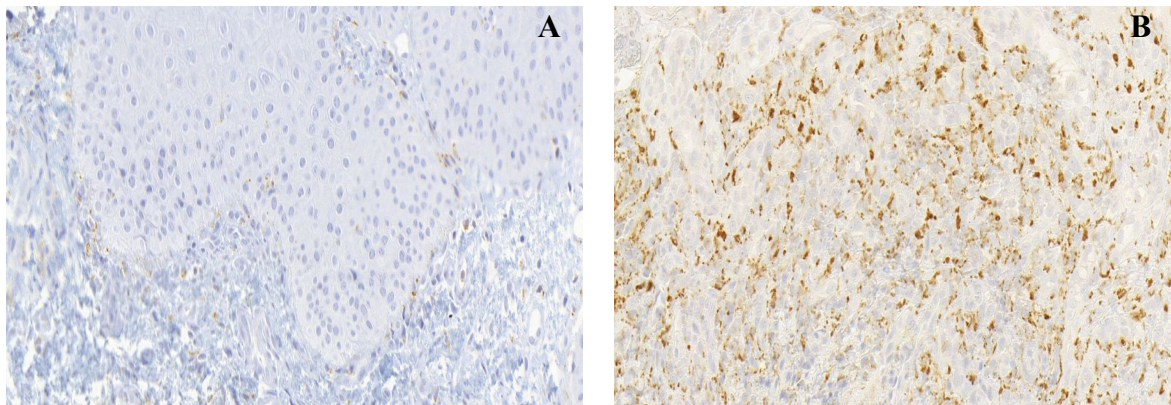
**Abb.18.** Verhältnis Biomarker CD8 zum Schweregrad einer oralen/intestinalen GvHD.

#### 4.3.5. Vergleich der Infiltration von CD68<sup>+</sup>-Zellen und Ki-67<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit und ohne oraler cGvHD.

Wie im Folgenden (Abb.21.) gezeigt, ist die Anzahl an CD68<sup>+</sup> Makrophagen in der Mundschleimhaut zum Zeitpunkt der Bestimmung niedriger als im Gastrointestinaltrakt. In Bezug auf eine orale cGvHD konnte gezeigt werden, dass Patienten sowohl mit einer oralen cGvHD Grad 1 (n=19) als auch einer oralen cGvHD Grad 2-3 (n=17) eine annähernd gleiche Dichte an CD68<sup>+</sup> Makrophagen aufwiesen. Im Vergleich zu Patienten ohne eine orale cGvHD Erkrankung (n=1) konnte eine verminderte Infiltration an CD68<sup>+</sup> Makrophagen beobachtet werden. Die Vergleiche bezüglich der Infiltration an CD68<sup>+</sup> Makrophagen bei Patienten ohne orale cGvHD und solchen mit einer oralen GvHD Grad 1 oder einer oralen cGvHD Grad 2-3 zeigten marginal signifikante Unterschiede. Vergleiche innerhalb der Schweregrade (Grad 1 versus Grad 2-3) waren statistisch nicht signifikant.

**Tabb.15.** Vergleich der Dichte an CD68 zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer oralen cGvHD.

Vergleich		CD68						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	1	19	3,00	0,50	0,60	p = .087	
Keine GvHD	Grad 2-3	1	17	3,00	1,00	0,75	p = .093	
Grad 1	Grad 2-3	19	17	0,50	1,00	0,60	0,75	p = .946

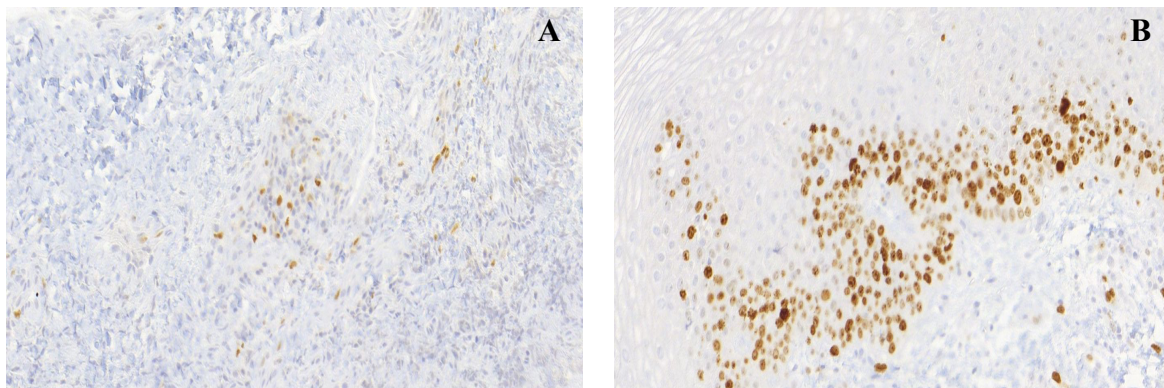


**Abb.19.** Immunhistochemische Darstellung der CD68<sup>+</sup> Zellen in der Mundschleimhaut  
 A) Semiquantitativer Score 0,5 ,B) Semiquantitativer Score 3. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

MIB bezeichnet den Klon des Antikörpers Ki-67. Dieses Protein tritt in allen Phasen der Zellteilung auf, wodurch es einen Hinweis auf schnell proliferierendes Gewebe gibt. In der Mundschleimhaut war auffällig, dass mit dem Auftreten einer oralen cGvHD die Dichte an proliferationsaktiven Zellen stark sank und mit dem Schweregrad annähernd gleich blieb. Sowohl der Vergleich zwischen Patienten ohne orale cGvHD (n=1) mit denen einer oralen cGvHD (Grad 1, n=19 und Grad 2-3, n=16) als auch der Vergleich innerhalb der Schweregrade zeigte keine signifikanten Ergebnisse.

**Tabb.16.** Vergleich der Dichte an proliferationsaktiven Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer oralen GvHD.

Vergleich		MIB						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	1	19	2,00	1,00	0,39	p = .840	
Keine GvHD	Grad 2-3	1	16	2,00	1,00	0,44	p = .860	
Grad 1	Grad 2-3	19	16	1,00	1,00	0,39	0,44	p = .986



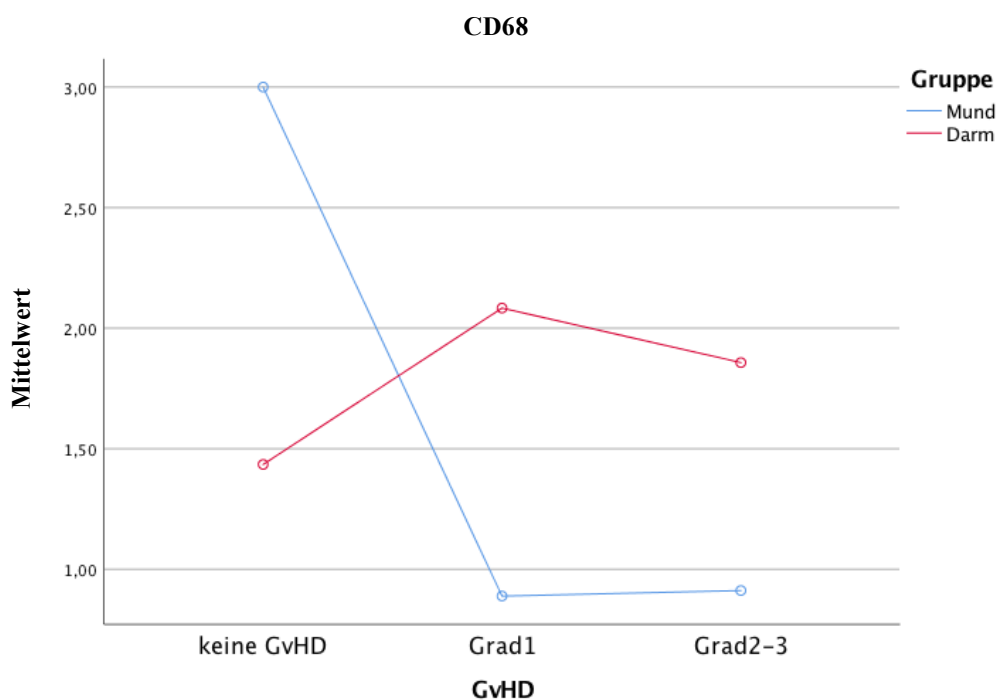
**Abb.20.** Immunhistochemische Darstellung der Ki-67<sup>+</sup> Zellen in der Mundschleimhaut  
 A) Semiquantitativer Score 0,5, B) Semiquantitativer Score 2. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

#### 4.3.6. Vergleich der Infiltration von CD68<sup>+</sup>-Zellen und Ki-67<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit und ohne intestinaler GvHD.

Intestinal stieg die Anzahl an CD68<sup>+</sup>-Zellen bei einer intestinalen GvHD an und sank mit steigendem Schweregrad leicht ab. Patienten mit einer intestinalen GvHD Erkrankung Grad 2-3 (n=14) hatten im Vergleich zu Patienten, die keine intestinale GvHD (n=20) entwickelt hatten, eine signifikant höhere Infiltration an CD68<sup>+</sup> Makrophagen. Bei einer intestinalen GvHD Grad 1 im Vergleich zu Patienten ohne intestinale GvHD kam es zu einer marginal signifikanten Erhöhung an CD68<sup>+</sup> Makrophagen. Innerhalb der Schweregrade (Vergleich Grad 1 versus Grad 2-3) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

**Tabb.17.** Vergleich der Dichte an CD68 zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer intestinalen GvHD.

Vergleich		CD68						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	20	6	1,50	2,25	0,47	0,92	p = .104
Keine GvHD	Grad 2-3	20	14	1,50	2,00	0,47	0,50	p = .017
Grad 1	Grad 2-3	6	14	2,25	2,00	0,92	0,50	p = .451

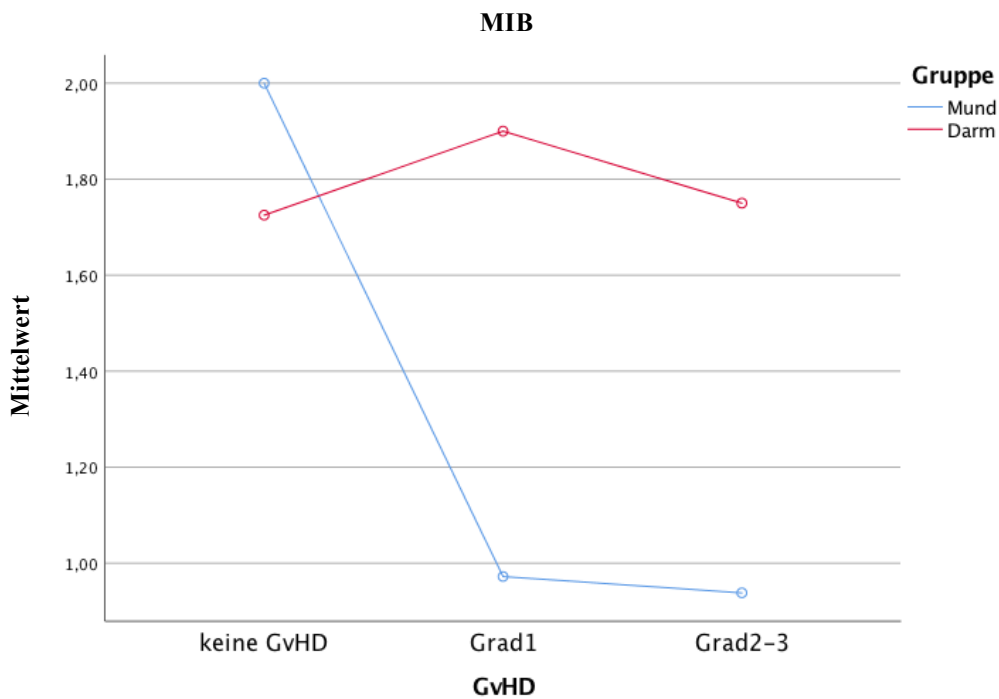


**Abb.21.** Verhältnis Biomarker CD68 zum Schweregrad einer oralen/intestinalen GvHD.

Die Proliferationsrate stieg mit Auftreten einer intestinalen GvHD an. Allerdings nahm diese mit dem Schweregrad wieder leicht ab. Sowohl der Vergleich der Proliferationsrate bei Patienten ohne intestinaler GvHD mit denen, welche eine intestinale GvHD Grad 1 bzw. Grad 2-3 entwickelten, als auch der Vergleich innerhalb der Schweregrade ergaben im Bezug auf Ki-67<sup>+</sup>-Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

**Tabb.18.** Vergleich der Dichte an proliferationsaktiven Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer intestinalen GvHD.

Vergleich		MIB						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	20	5	1,75	2,00	0,80	1,24	p = .556
Keine GvHD	Grad 2-3	20	14	1,75	1,75	0,80	0,55	p = .843
Grad 1	Grad 2-3	5	14	2,00	1,75	1,24	0,55	p = .508



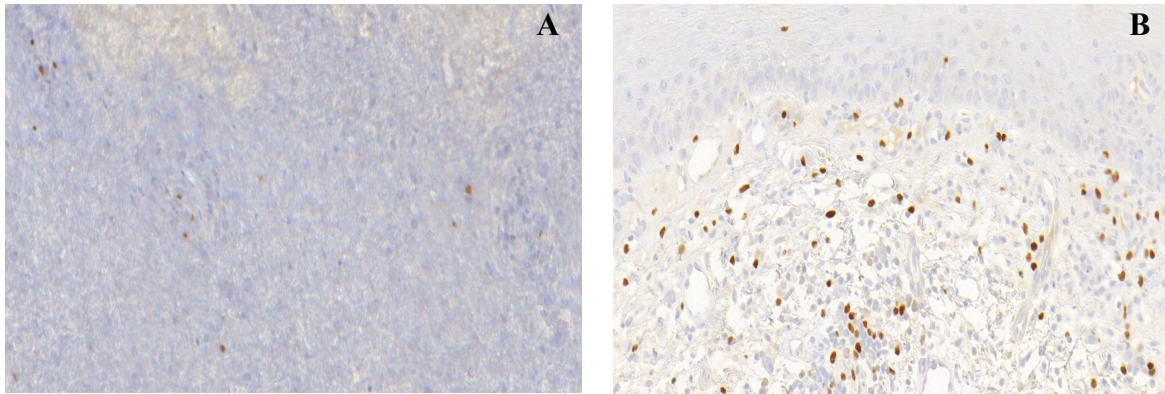
**Abb.22.** Verhältnis proliferationsaktiver Zellen zum Schweregrad einer oralen/intestinalen GvHD.

### 4.3.7. Vergleich der Infiltration von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit und ohne oraler cGvHD.

Zum Zeitpunkt der Bestimmung zeigte sich vor allem bei Patienten ohne GvHD (n=1) in der Mundschleimhaut ein erhöhter Wert an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu jenen, bei denen eine orale cGvHD Grad 1 (n=19) bzw. eine orale cGvHD Grad 2-3 (n=17) diagnostiziert wurde. Der Vergleich keine orale cGvHD versus orale cGvHD Grad 1 zeigte einen marginal signifikanten Unterschied. Keine orale cGvhd verglichen mit einer oralen cGvHD Grad 2-3 zeigte kein signifikantes Ergebnis. Bei einem Auftreten einer oralen cGvHD Grad 2-3 erhöhte sich im Vergleich zu einer oralen cGvHD Grad 1 die Dichte an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen leicht. Diese Beobachtung zeigte allerdings kein signifikantes Ergebnis.

**Tabb.19.** Vergleich der Dichte an FoxP3 zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer oralen cGvHD.

Vergleich		FoxP3						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	1	19	2,50	0,50	0,59	p = .082	
Keine GvHD	Grad 2-3	1	17	2,50	1,00	0,72	p = .137	
Grad 1	Grad 2-3	19	17	0,50	1,00	0,59	0,72	p = .243



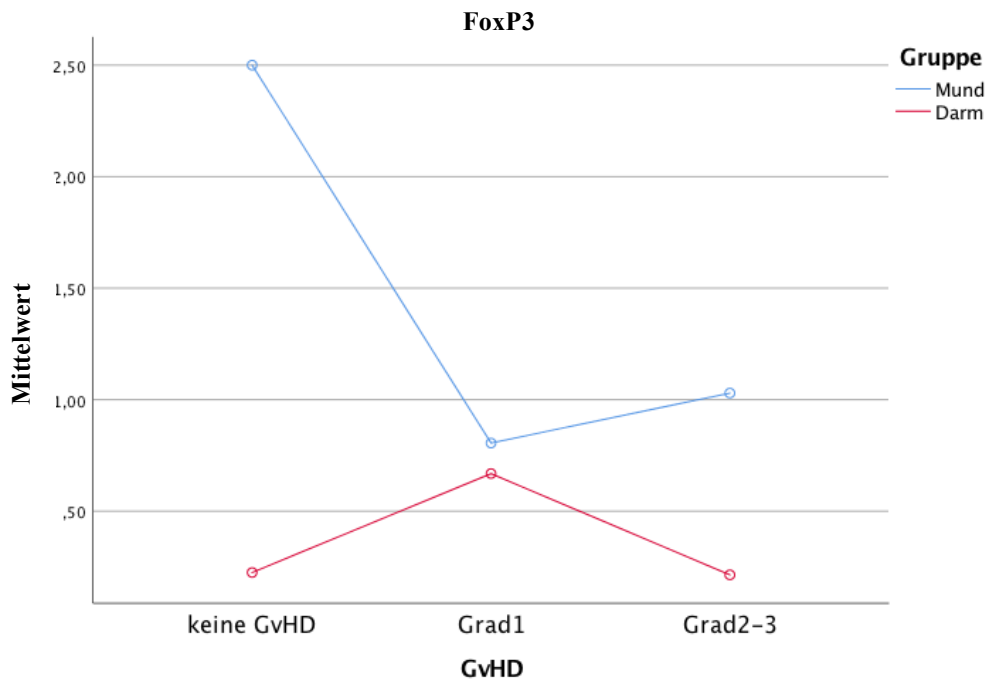
**Abb.23.** Immunhistochemische Darstellung der FoxP3<sup>+</sup>-Zellen in der Mundschleimhaut  
A) Semiquantitativer Score 0,5 ,B) Semiquantitativer Score 2. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

#### **4.3.8. Vergleich der Infiltration von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit und ohne intestinaler GvHD.**

Das Diagramm in Abbildung 24 verdeutlicht, dass im Gastrointestinaltrakt die Infiltration an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen generell niedriger war als in der Mundschleimhaut. Intestinal stieg die Dichte an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit intestinaler GvHD Grad 1 an und verringerte sich bei Patienten mit intestinaler GvHD Grad 2-3. Der Anstieg an FoxP3 infiltrierenden Zellen bei Patienten mit intestinaler GvHD Grad 1 (n=6) im Vergleich zu Patienten, die keine intestinale GvHD entwickelten (n=1) war marginal signifikant. Innerhalb der Schweregrade (Grad 1 versus Grad 2-3) zeigte der Vergleich der Dichte an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen auch einen marginal signifikanten Unterschied. Wenn man Patienten ohne intestinale GvHD (n=1) mit Patienten, die eine intestinale GvHD Grad 2-3 (n=14) entwickelten vergleicht, war auffällig, dass eine annähernd gleiche Dichte an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen zu beobachten war. Der statistische Vergleich (keine GvHD versus Grad 2-3) war allerdings nicht signifikant.

**Tabb.20.** Vergleich der Dichte an FoxP3 zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer intestinalen GvHD.

Vergleich		FoxP3						Mann-Whitney-Test
		n	Median	Std.-Abweichung	Median	Std.-Abweichung	Median	
Keine GvHD	Grad 1	20	6	0,00	0,50	0,38	0,81	p = .081
Keine GvHD	Grad 2-3	20	14	0,00	0,00	0,38	0,38	p = .930
Grad 1	Grad 2-3	6	14	0,50	0,00	0,81	0,38	p = .092



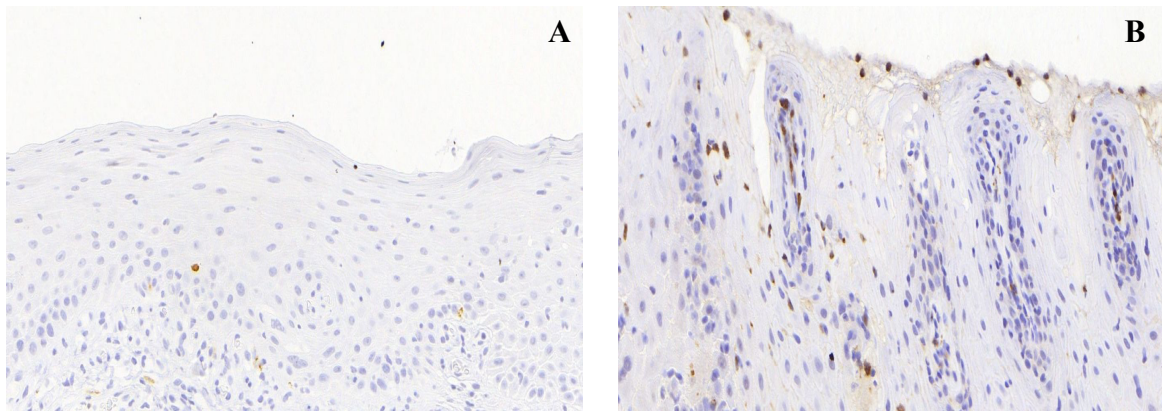
**Abb.24.** Verhältnis der Dichte an Tregs zum Schweregrad einer oralen und intestinalen GvHD mittels Nachweis von Biomarker FoxP3.

### 4.3.9. Vergleich der Infiltration von IL-17<sup>+</sup> Zellen bei Patienten mit und ohne oraler cGvHD.

Wenn man die Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen in Abbildung 26 betrachtet, wird ersichtlich, dass die Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen in der Mundschleimhaut deutlich niedriger war als in der intestinalen Schleimhaut. Beim Auftreten einer oralen cGvHD Grad 1 erhöhte sich oral die Anzahl an IL-17<sup>+</sup> Zellen leicht und stieg mit dem Schweregrad (orale GvHD Grad 2-3) kontinuierlich an. Das Verhältnis der Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen bei Patienten ohne orale cGvHD und Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 1 zeigte keinen signifikanten Unterschied. Es konnte auch kein signifikanter Zusammenhang im Bezug auf den Vergleich zwischen der Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen bei Patienten ohne orale cGvHD und Patienten mit oraler cGvHD Grad 2-3 bzw. zwischen den Schweregraden (Grad 1 versus Grad 2-3) festgestellt werden.

**Tabb.21.** Vergleich der Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer oralen GvHD.

Vergleich		IL17						
		n	Median	Std.-Abweichung	Mann-Whitney-Test			
Keine GvHD	Grad 1	1	17	0,00	0,00	0,12	p = .808	
Keine GvHD	Grad 2-3	1	16	0,00	0,00	0,27	p = .716	
Grad 1	Grad 2-3	17	16	0,00	0,00	0,12	0,27	p = .493



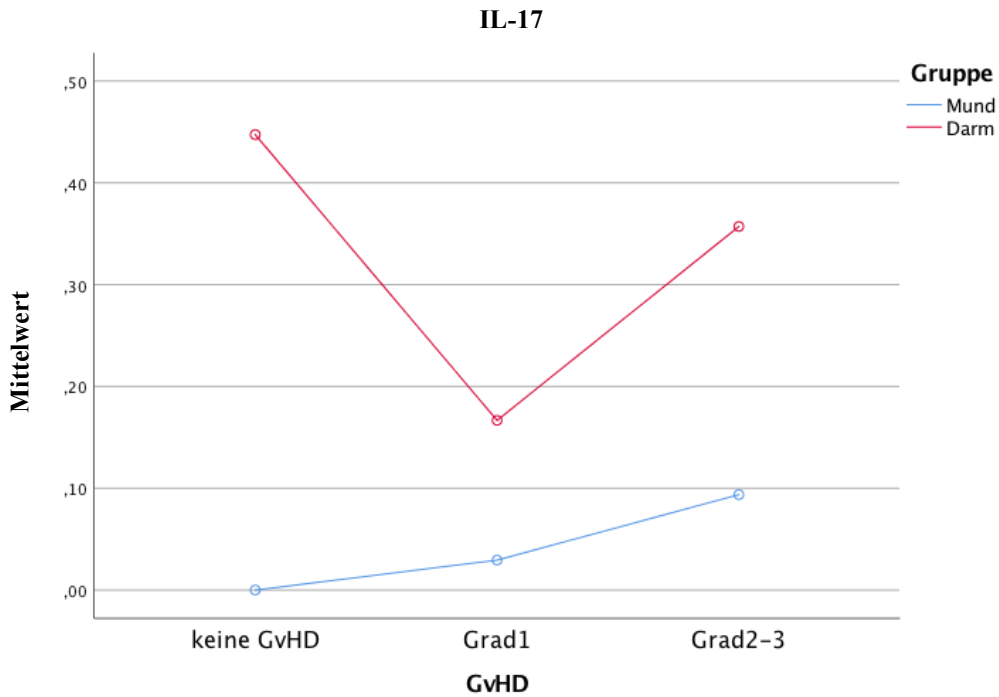
**Abb.25.** Immunhistochemische Darstellung der intraepithelialen IL-17<sup>+</sup> Zellen in der Mundschleimhaut A) Semiquantitativer Score 0,5, B) Semiquantitativer Score 1. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung aufgenommen.

#### 4.3.10. Vergleich der Infiltration von IL-17<sup>+</sup> Zellen bei Patienten mit und ohne intestinaler GvHD.

Das Verhältnis von IL-17<sup>+</sup> Zellen zum Schweregrad im Gastrointestinaltrakt zeigte einen starken, aber nicht signifikanten Abfall mit dem Auftreten einer intestinalen GvHD Grad 1 und einen leichten nicht signifikanten Wiederanstieg mit steigendem Schweregrad (Grad 2-3). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infiltration von IL-17<sup>+</sup> Zellen und dem Schweregrad einer intestinalen GvHD beobachtet werden.

**Tabb.22.** Vergleich der Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen zwischen den einzelnen Schweregraden bei einer intestinalen GvHD.

Vergleich		IL17						Mann-Whitney-Test
		n	Median	Std.-Abweichung	Median	Std.-Abweichung	Median	
Keine GvHD	Grad 1	19	6	0,50	0,00	0,40	0,26	p = .107
Keine GvHD	Grad 2-3	19	14	0,50	0,50	0,40	0,31	p = .597
Grad 1	Grad 2-3	6	14	0,00	0,50	0,26	0,31	p = .193



**Abb.26.** Anteil IL-17<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit vom Schweregrad einer oralen und intestinalen GvHD.

Abschließend muss einschränkend gesagt werden, dass aufgrund der geringen Fallzahl das Signifikanzniveau in Bezug auf den Vergleich zwischen der Anzahl ausgewählten Biomarker und dem Schweregrad einer intestinalen oder oralen GvHD häufig trotz bestehender Unterschiede nicht erreicht werden konnte.

---

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die wenig bekannte Rolle von sIgA und diversen ausgewählten Biomarkern in Bezug auf das Entstehen einer oralen cGvHD zu untersuchen. Dabei sollte die Frage, wie sich die Konzentration von sIgA im Verlauf nach einer HSZT verhält, näher betrachtet werden. Des Weiteren stellte sich die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der Konzentration von sIgA im Speichel nach HSZT und dem Schweregrad einer oralen cGvHD sowie die Anzahl ausgewählter Biomarker in Bezug auf den Schweregrad einer oralen und/oder intestinalen GvHD. Im Folgenden werden die gefundenen Ergebnisse mit Daten aus der Literatur verglichen. Bisher gibt es allerdings nur wenige Arbeitsgruppen, die sich mit der Konzentration von sIgA im Speichel nach HSZT und mit Biomarkern in Biopsien von Patienten mit oraler bzw. intestinaler GvHD beschäftigen.

### 5.1. Die Relation zwischen der Konzentration von sIgA im Speichel vor und nach HSZT.

Betrachtet man die Konzentrationen von sIgA im Speichel vor und nach HSZT in Abbildung 12, wird ersichtlich, dass sich eine tendenziell verminderte Konzentration an sIgA nach HSZT erkennen lässt. Dies wäre auch klinisch erklärbar, da der Speichelfluss vor HSZT im Gegensatz zum Zustand nach HSZT noch nicht beeinträchtigt war und daher die sIgA Konzentrationen normal waren. Es konnte allerdings mittels T-Test bei gepaarten Stichproben hinsichtlich der Konzentrationen von sIgA im Speichel kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Zeitpunkt der HSZT gezeigt werden. Die vorhergehende Konditionierungstherapie scheint bei unseren Patienten keinen wesentlichen Einfluss auf die sIgA Konzentration gehabt zu haben. Dies könnte daran liegen, dass in der vorliegenden Cohorte keine Patienten mit nicht-myeloablativer Konditionierung untersucht wurden, so dass davon auszugehen ist, dass der Austausch des Empfängerimmunsystems gegen das des Spenders bei den Patienten unabhängig von der Konditionierung in einem vergleichbaren Zeitrahmen erfolgte und die Konditionierung auch bei Dosis-reduzierter Konditionierung eine Reduktion von sIgA bewirkte. Imanguli et. al. untersuchten Speichelproteinveränderungen vor und nach allogener HSZT. Es wurde deutlich, dass eine allogene HSZT längerfristige Veränderungen im Speichelprotein mit sich bringt, die für die angeborene Immunantwort von Bedeutung ist. Genauer untersucht

---

und mittels ELISA nach Herstellerangaben bestimmt wurden Lactoferrin, Sekretorischer Leukozyten Protease Inhibitor (SLPI), sIgA und  $\beta$ 2-Mikroglobulin. In Bezug auf die Konditionierungstherapie und den Konzentrationen von sIgA im Speichel konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen myeloablativen und nicht myeloablativen Konditionierungsregimen beobachtet werden. Hinsichtlich des Zeitpunktes der HSZT kam es 1 Monat nach HSZT im Vergleich zu vor HSZT zu einem signifikanten Abfall der sIgA Konzentration im Speichel. Allerdings kam es zu einem Wiederanstieg der sIgA Konzentrationen im Speichel 6 Monate nach HSZT. Die Werte waren denen vor HSZT ähnlich und zeigten eine Rückkehr zu normalen sIgA Konzentrationen im Vergleich zu dem Niveau vor HSZT. Diese Daten legen nahe, dass sIgA im Speichel relativ rasch regeneriert und damit die Voraussetzung für eine Aufrechterhaltung der Homöostase in der Mundhöhle schafft. So wird beispielsweise ein Zusammenhang zwischen erniedrigten sIgA Konzentrationen im Speichel nach HSZT und einer erhöhten Schleimhautpermeabilität vermutet (Imanguli et al., 2007). Ein wichtiger Grund für erniedrigte sIgA Spiegel nach HSZT im Speichel könnte eine massive Schädigung der Speicheldrüsen sein. Dies wurde bereits intensiv von Izutsu et al. erforscht. Nach allogener HSZT wurden Biopsien von 12 Patienten mit schwerer cGvHD entnommen und mit Biopsien von 10 gesunden Patienten, die nach allogener HSZT bzw. syngener HSZT keine cGvHD entwickelt haben, verglichen. Es konnte beobachtet werden, dass eine Beteiligung der Speicheldrüsen bei cGvHD mit erniedrigten oder sogar fehlenden Konzentrationen an sIgA, anorganischen Phosphat, verminderter Speichelfließrate und erhöhten Konzentrationen von Natrium, Albumin und IgG einherging. Ein Mangel an sIgA im Speichel wird außerdem mit einem vermehrten Auftreten sinubronchialer Infektionen während einer cGvHD in Verbindung gebracht. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten ohne cGvHD normale sIgA Spiegel und Elektrolytzusammensetzung im Speichel (Izutsu et al., 1983).

---

## **5.2. Die Relation der sIgA Konzentration im Speichel nach HSZT und dem Schweregrad einer oralen cGvHD.**

Wir haben die Konzentrationen von sIgA im Speichel nach HSZT mit dem Auftreten einer oralen cGvHD bezüglich des Schweregrades in Verbindung gesetzt. Es konnte bei Patienten mit oraler cGvHD Grad 2-3 eine Tendenz zu niedrigeren sIgA-Konzentrationen im Speichel nach HSZT im Vergleich zu Patienten mit oraler cGvHD Grad 1 beobachtet werden. Wir konnten klinisch einen gewissen Zusammenhang feststellen, allerdings konnte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. Ein Grund dafür könnte die geringe Fallzahl sein (n=29) bzw. die geringe Anzahl an Patienten mit oraler cGvHD Grad 2-3 (n=13). Bereits Izutsu et al. beschrieben 1983 bei einer extensiven oralen cGvHD eine stark verminderte Konzentration an sIgA im Speichel. Des Weiteren wurden eine verminderte Konzentration an Albumin und erhöhte IgG Konzentrationen im Speichel beobachtet. Diese erhöhten Konzentrationen waren reversibel mit einem verminderten Auftreten einer Entzündung (Izutsu et al., 1983). Im Gegensatz dazu konnten Larsen et al. feststellen, dass bei Patienten mit OLP die Konzentration an sIgA im Speichel höher war im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Larsen et al., 2017) Bezüglich Speicheldrüsenbeteiligung bei einer oralen cGvHD beschäftigten sich Nagler et al. sehr intensiv und beschrieben eine Schädigung sowohl der kleinen als auch der großen Speicheldrüsen. Diese intensive Beteiligung und der daraus resultierende verminderte Speichelfluss spiegelten die Schwere einer GvHD-Erkrankung wider (R. M. Nagler & Nagler, 2004a). Bereits 2003 stellten Nagler et al. fest, dass bei einer cGvHD die Speicheldrüsenbeteiligung früh auftritt und schwerwiegende Folgen wie z.B. eine rasche Abnahme des Speichelflusses für den Patienten hat. Eine Erholung im 1. Jahr nach HSZT konnte bei Patienten mit GvHD nicht verzeichnet werden (A. Nagler et al., 2003).

---

### **5.3. Zusammenhang zwischen der Anzahl ausgewählter Biomarker und dem Schweregrad einer oralen bzw. intestinalen GvHD.**

Um eine frühzeitige Therapie und eine Prophylaxe zu ermöglichen, wird das Thema Biomarkerbestimmung im Rahmen der GvHD-Forschung immer wichtiger. Biomarker sind charakteristische biologische Merkmale, die objektiv gemessen werden und auf einen gesunden biologischen oder krankhaften Prozess im Körper hinweisen können. In unserer Studie wurden die Biomarker CD4, CD8, CD68, MIB, FoxP3 und IL-17 genauer betrachtet. Es wurde der Zusammenhang zwischen der Dichte dieser ausgewählten Biomarker und den Schweregraden sowohl bei einer oralen als auch bei einer intestinalen GvHD untersucht. Dazu wurden Patienten ohne GvHD und Patienten die eine orale bzw. intestinale GvHD Grad 1 oder Grad 2-3 entwickelten berücksichtigt und miteinander verglichen. Diese Vergleiche wurden separat sowohl für die Mundschleimhaut, als auch für die Darmschleimhaut vollzogen.

#### **5.3.1. Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit und ohne einer oralen bzw. intestinalen GvHD.**

In unserer Studie konnten sowohl beim Vergleich der Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten ohne eine orale cGvHD mit Patienten, die eine orale cGvHD entwickelten (Grad 1 bzw. Grad 2-3) als auch beim Vergleich innerhalb der Schweregrade (Grad 1 versus Grad 2-3) keine signifikanten Ergebnisse gezeigt werden. Bei Patienten mit intestinaler GvHD Grad 1 wurde im Vergleich zu Patienten ohne intestinale GvHD eine höhere Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen, während bei einer intestinalen GvHD Grad 2-3 eine verringerte Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestand. Alle Vergleiche zeigten im Bezug auf die Dichte der CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der Schweregrade keine signifikanten Unterschiede. Wenn man die Ergebnisse graphisch betrachtet fiel auf, dass sich die Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Mundschleimhaut im Vergleich zur Darmschleimhaut gegensätzlich verhielt. So zeigten Patienten ohne orale cGvHD eine stark erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Patienten mit cGvHD. CD4<sup>+</sup> T-Zellen verkörpern unter anderem das zelluläre Immunsystem und spielen bei der Regulation der humoralen Immunität eine wichtige Rolle. Man kann vermuten, dass diejenigen Patienten, die keine orale cGvHD entwickelten, erhöhte Werte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufgrund einer besse-

---

ren humoralen Immunantwort aufwiesen. Auf der anderen Seite wurde die Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut als wichtiger Biomarker im Rahmen einer GvHD belegt (Schultz et al., 2006). Patienten mit intestinaler GvHD bekamen neben der medikamentösen GvHD-Prophylaxe eine systemische Therapie mit hoch dosiertem Kortison. Diese Medikation könnte auch die Regeneration der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen stark beeinträchtigt haben. Beim Vergleich der Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit und ohne oraler GvHD zeigte nur der Vergleich der Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen keiner oraler cGvHD und einer oralen cGvHD Grad 1 einen marginal signifikanten Unterschied. Im Gastrointestinaltrakt zeigten die Vergleiche dagegen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass im Gastrointestinaltrakt eine höhere Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden war als in der Mundschleimhaut. CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine essentielle Rolle bei einer GvHD, weil sie einen essentiellen Bestandteil der erworbenen Immunität repräsentieren. Bereits 1992 verglichen Mattson et al. Biopsien der Mundschleimhaut von Patienten mit oraler cGvHD nach einer HSZT und denen von Patienten mit Oralen Lichen Planus (OLP) und einer Kontrollgruppe von gesunden Patienten sowie Biopsien von Patienten vor einer HSZT. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen in allen Gruppen variierte zwischen 4:1 vor HSZT und 6:1 nach HSZT mit bereits entwickelter oraler cGvHD. Bei Patienten mit OLP zeigte sich ein Verhältnis von 5:1. Außerdem zeigten die Biopsien der Patienten mit cGvHD eine Korrelation zwischen Infiltration von zytotoxischen T-Zellen und dem Schweregrad der GvHD (Mattsson et al., 1992). Dies steht im Einklang mit unseren Untersuchungen. Einen anderen Vergleich in Bezug auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zog Hiroki et al. Er setzte aufgrund des ähnlichen Krankheitsbildes das Sjögren-Syndrom der oralen cGvHD gegenüber. Es konnten beim Sjögren-Syndrom vermehrt CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten beobachtet werden. Dies lässt sich u.a. durch die Beteiligung des B-Zell-Systems mit dem Nachweis von Autoantikörpern erklären. Bei der oralen cGvHD waren dagegen CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorherrschend (Hiroki et al., 1996) wobei darauf hingewiesen werden muss, dass bei der oralen cGvHD zwei unterschiedliche Organsysteme (Speicheldrüsen und Schleimhaut) betroffen sein können, die eine unterschiedliche Pathophysiologie aufweisen können. Brügggen et al. untersuchten 2014 in einer Studie mit 65 Patienten, die sich einer HSZT unterzogen hatten, die unterschiedlichen T-Zellmuster, welche akute und chronische Formen einer GvHD der Haut charakterisieren. Bei einer akuten GvHD der Haut kam es zu einem Anstieg von CD3<sup>+</sup> T-Zellen, der sich sowohl auf die CD4<sup>+</sup>- als auch auf die CD8<sup>+</sup> Subpopulation auswirkte, jedoch nicht auf T-Zellen vom regulatorischen Phänotyp und auf NK T-Zellen. Jedoch waren

---

bei einer lichenoiden cGvHD der Haut CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorherrschend. Bei einer sklerosierenden cGvHD der Haut wurden sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen und eine erhebliche Anzahl an Mastzellen beobachtet (Brüggen et al., 2014). Die Untersuchungen von Pidala et al. betonten, dass eine diagnostizierte cGvHD mit einer Veränderung der Immunzellpopulationen verbunden ist. Unter anderem kommt es zur einer erhöhten Anzahl an CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Sowohl CD4<sup>+</sup>-als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen) (Pidala, Sarwal, Roedder, & Lee, 2014). Diese Aussage unterstützt unsere Untersuchungen. Li et al. kamen zu dem Ergebnis, dass es in Bezug auf die Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen Patienten mit einer cGvHD und Patienten ohne ein cGvHD keinen Unterschied gibt (Li et al., 2010).

### **5.3.2. Infiltration von CD68<sup>+</sup> Makrophagen und Ki-67<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit und ohne einer oralen bzw. intestinalen GvHD.**

Bereits in der Routine-Histologie ist eine Beteiligung von Makrophagen an den entzündlichen Infiltraten einer GvHD feststellbar. Deshalb wurden die oralen und gastrointestinalen Biopsien mit Antikörpern gegen den Makrophagen-Monozyten Marker CD68 immunhistologisch untersucht. Der Nachweis von CD68 im Gewebe beschreibt die Anzahl von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. Ihre Aufgabe ist die Zerstörung körperfremder Struktur mittels Phagozytose und die Aktivierung der erworbenen Immunabwehr mittels Antigenpräsentation (Greaves & Gordon, 2002). Wie in der Abbildung 21 ersichtlich, beinhalteten die Biopsien sowohl bei einer gastrointestinalen als auch einer oralen cGvHD jeweils reichlich CD68<sup>+</sup> Makrophagen, was durch die zu beobachtende Gewebeschädigung im Rahmen einer GvHD leicht erklärbar ist. Aus Abbildung 21 geht weiterhin hervor, dass insgesamt intestinal mehr Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden konnten als in der Mundschleimhaut. In Bezug auf eine orale cGvHD konnte gezeigt werden, dass Patienten ohne eine orale cGvHD im Vergleich zu Patienten, die an einer oralen cGvHD Grad 1 bzw. Grad 2-3 litten eine deutlich höher Dichte an CD68<sup>+</sup> Makrophagen zeigten. Dies steht im Widerspruch zu der Assoziation mit Entzündungen. Dieser Wert kommt vermutlich dadurch zu Stande, dass nur ein Patient ohne orale GvHD in den Vergleich miteinbezogen wurde und sich dadurch kein vernünftiger Vergleich ziehen lässt. Intestinal hingegen zeigten Patienten ohne intestinale cGvHD eine signifikant geringere Dichte an CD68<sup>+</sup> Makrophagen im Vergleich zu Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 2-3. Sato et al. zeigten eine höhere Dichte an CD68<sup>+</sup> Makro

---

phagen bei Patienten mit einer cGvHD bzw. OLP als bei einer gesunden Kontrollgruppe (Sato et al., 2006). Da bei einer GvHD Grad 2-3 die durch Entzündungen zu beobachtende Gewebeschädigung höher ist als bei Patienten ohne eine GvHD ist dieser Unterschied in der Anzahl an Makrophagen leicht erklärbar. Der immunhistologische Nachweis von CD68<sup>+</sup> Makrophagen könnte daher eine Bedeutung für die Differentialdiagnostik der GvHD besitzen. Ähnliche Ergebnisse konnten wir in Bezug auf das Proliferations-assoziierte Antigen Ki-67 beobachten. Ki-67 tritt in allen Phasen der Zellteilung auf und zeigt schnell proliferierendes Gewebe an. Während einer GvHD des Gastrointestinaltraktes konnte im Vergleich zur Mundschleimhaut eine erhöhte Zellproliferation beobachtet werden, was durch Regenerationsvorgänge zu erklären ist. Im Bezug auf den Schweregrad konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Imanguli et al. hingegen beschrieben in einer Studie eine erhöhte Proliferation von T-Zellen bei Patienten mit schwerer oraler cGvHD mittels Nachweis von Ki-67 (Imanguli et al., 2009).

### **5.3.3. Infiltration von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen bei Patienten mit und ohne einer oralen bzw. intestinalen GvHD.**

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert Tregs. Während einer GvHD kommt es zu einer unkontrollierten T-Zell vermittelten Entzündungsreaktion, die u.a. durch einen Mangel von FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T- Zellen erklärbar sein könnte. Wir konnten beobachten, dass es sowohl bei Patienten ohne orale cGvHD zum Zeitpunkt der Biopsie als auch bei Patienten, die eine orale cGvHD entwickelt haben im Vergleich zu einer intestinalen GvHD höheren Konzentrationen an FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar waren, was wahrscheinlich durch die spezielle Physiologie der Mundschleimhaut zu erklären ist. Allerdings waren sowohl die Vergleiche zwischen Patienten mit und ohne GvHD oral als auch intestinal statistisch nicht signifikant. Auffällig war, dass Patienten ohne orale cGvHD eine stark erhöhte Dichte an FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen der Mundschleimhaut zeigten. Dies deutet auf ein physiologisches immunregulatorisches Geschehen in der Mundschleimhaut nach HSZT hin. Die Infiltration von Tregs bei Patienten mit histologischen und klinischen Anzeichen einer GvHD der Darmschleimhaut stieg zunächst an und fiel mit steigendem Schweregrad. Der Anstieg an FoxP3 infiltrierenden Zellen bei Patienten mit intestinaler GvHD Grad 1 im Vergleich zu Patienten, die keine intestinale GvHD entwickelten war marginal signifikant. Ratajczak et. al berichtete, dass die Dichte an

---

FoxP3<sup>+</sup>-Zellen während einer GvHD anstieg was im Einklang mit unserer Beobachtung in Bezug auf die GvHD der Darmschleimhaut steht (Ratajczak et al., 2010). Es kann angenommen werden, dass der Anstieg von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen ein gegenregulierender Mechanismus von T-Zellen darstellt, um eine Entzündung während einer GvHD zu unterdrücken. Der Abfall von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen bei schwerer intestinaler GvHD könnte durch die intensive Immunsuppression bedingt sein, die bei schwerer intestinaler GvHD eingesetzt wird. Im Gegensatz dazu wird die orale cGvHD deutlich weniger intensiv behandelt. Auch muss bei der Interpretation der Daten beachtet werden, dass die gastrointestinale GvHD eher früh nach HSZT auftritt, während die orale cGvHD in der Regel frühestens 3 Monaten nach HSZT beginnt. Zu Bedenken ist, dass Patienten mit einer gastrointestinalen GvHD in der Regel mit einer Kombination aus Cyclosporin A und Prednisolon behandelt werden. Cyclosporin verhindert spezifisch und reversibel die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, die Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-2), sowie die T-Zell vermittelte Aktivierung von B-Zellen und deren Antikörperproduktion. Außerdem werden die Aktivierung und Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen blockiert. Vor allem die Suppression von IL-2, welches ein essentieller Wachstumsfaktor für Tregs ist, könnte eine Erklärung für die im Diagramm ersichtliche verminderte Infiltration von Tregs bei Patienten nach HSZT auch ohne Auftreten einer GvHD sein. Dagegen erhalten deutlich weniger Patienten mit oraler cGvHD Cyclosporin. Diese Befunde liefern einen indirekten Hinweis, dass die Unterdrückung des Immunsystems mittels Immunsuppressiva eine supprimierende Wirkung auf die regulatorischen FoxP3<sup>+</sup>-Zellen bei GvHD Patienten haben könnte. Des Weiteren weisen neuere Daten darauf hin, dass eine Antibiose zur Bekämpfung oder Prophylaxe von bakteriellen Infektionen eine GvHD eher fördert (Holler et al., 2014). Da in unserer Studie die Antibiotikagabe der Patienten mit GvHD nicht berücksichtigt wurde, kann dieser Effekt nicht in unsere Interpretation miteinbezogen werden. Imanguli et al. haben die Häufigkeit und die Funktion von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen im Blut und Gewebe von Patienten mit cGvHD verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass die Gesamtanzahl von FoxP3<sup>+</sup> Zellen mit zunehmender T-Zell-Infiltration ansteigt. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass die Anzahl an FoxP3<sup>+</sup>-Zellen in der Mundschleimhaut bei oraler cGvHD im Vergleich zu Patienten mit cGvHD ohne orale Beteiligung stark erhöht war (Imanguli et al., 2014). Mittels Mausmodellen konnte man feststellen, dass Treg-Zellen eine wichtige Rolle bei der Prävention von cGvHD spielen und dass ein Transfer von frisch isolierten oder ex vivo expandierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen eine GvHD verhindern konnte (Hoffmann, Ermann, Edinger, Fathman, & Strober, 2002; Taylor, Lees, & Blazar, 2002). Bei

---

Menschen war es allerdings schwierig, eine direkte Korrelation zwischen Zahlen und Funktion von Tregs und dem GvHD Schweregrad herzustellen. Manche Studien zeigten, dass Patienten mit GvHD eine deutlich erhöhte Anzahl an Tregs hatten (Young, DuTemple, Phillips, & Zhang, 2003), andere hingegen berichteten von verminderten Konzentrationen an Tregs bei einer GvHD (Clark et al., 2004). Eine CD4<sup>+</sup> Effektor T-Zellaktivierung ist mit einer reaktiven Expansion von FoxP3<sup>+</sup>-Zellen assoziiert und könnte ein Grund für die erhöhten Treg-Werte sein (Meignin et al., 2005). Weitere detaillierte Studien sind nötig, um die genaue Rolle von FoxP3<sup>+</sup> Tregs bei einer cGvHD zu untersuchen. Man sollte auch bedenken, dass das Enzym Indolamin -2,3- Dioxygenase (IDO) eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tregs spielt. IDO wirkt als Katalysator bei der Umwandlung von der essentiellen Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin. Kynurenin ist ein Agonist für den Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AHR), der wiederum zur Entstehung von Tregs erforderlich ist (Baban et al., 2009) Eine genaue Untersuchung und ein Vergleich der Konzentrationen des regulatorischen Enzyms IDO während einer intestinalen und einer oralen cGvHD bedarf weiterer Untersuchungen.

#### **5.3.4. Infiltration von IL-17<sup>+</sup> Zellen bei Patienten mit und ohne einer oralen bzw. intestinalen GvHD.**

Eine weitere wichtige Funktion im Rahmen einer GvHD erfüllen die Th17-Zellen. Besonders das proinflammatorische Zytokin IL-17, ein Sekretionsprodukt der Th17-Zellen, ist in den letzten Jahren im Rahmen einer GvHD in den Vordergrund gerückt. Mehrere Studien beschreiben die entzündliche Wirkung von IL-17 während einer GvHD im Mausmodell (Henden & Hill, 2015; Kappel et al., 2009). In unseren Untersuchungen beobachteten wir eine von einer GvHD unabhängig höhere Konzentration an IL-17<sup>+</sup> Zellen im Darmepithel im Vergleich zur Mundschleimhaut. Anders als erwartet kam es im Gastrointestinaltrakt beim Auftreten einer intestinalen GvHD zu einem starken, aber nicht signifikanten Abfall der Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen und zu einem Wiederanstieg der Dichte mit steigendem Schweregrad. Es ist bekannt, dass eine verringerte Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen zu einer höheren transplantationsbedingten Mortalität führt (Ghimire, 2017). In der Mundschleimhaut stiegen IL-17<sup>+</sup> Zellen mit steigendem Schweregrad kontinuierlich an, allerdings konnten keine signifikanten Zusammenhänge beschrieben werden. Zu Bedenken ist, dass es auch zu einer IL-17-Produktion

---

durch Nicht-T-Zellpopulationen kommen kann. Es wurde eine neue Art von Immunzellen identifiziert. Diese Zellen werden als innate lymphoide Zellen (ILCs) bezeichnet und haben eine zentrale Bedeutung beim Erhalt der epithelialen Integrität und der Gewebeimmunität (Hazenberg & Spits, 2014). Sie produzieren ähnliche Zytokine und Transkriptionsfaktoren (u.a. IL-17) und spiegeln dadurch die Helfer T-Zell-Funktion wieder. Man vermutet, dass ILCs durch die Produktion von T-Zell-verwandter Zytokine die angeborene Immunantwort ergänzen, um bei frühen Infektionen die Abwehr zu verstärken (Walker, Barlow, & McKenzie, 2013). Im Dickdarmepithel wurde bereits versucht IL-17<sup>+</sup> Zellen besser zu charakterisieren. Es wurden Proben auf IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen mittels Doppelfärbung untersucht. Anders als erwartet, waren alle im Dickdarm identifizierten IL-17<sup>+</sup> Zellen CD4 negativ. Dies wird als erster klinischer Nachweis gesehen, dass IL-17<sup>+</sup> Zellen im Dickdarm von Nicht-T-Zellen produziert werden und möglicherweise angeborenen Ursprungs sind (Ghimire, 2017). Um die Rolle des angeborenen IL-17 bei einer GvHD zu verstehen, ist es notwendig seine Heterogenität zu verstehen. Interessant wäre in Bezug auf eine orale cGvHD, inwieweit die IL-17<sup>+</sup> Zellen CD4 positiv oder CD4 negativ sind und die Produktion von IL-17 in der Mundschleimhaut durch T-Zellen oder andere IL-17 exprimierende Zellpopulationen erfolgt. Es ist bekannt, dass Patienten mit einer cGvHD an einer die Lebensqualität einschränkender Fibrose leiden. Alexander et al. beobachteten eine durch eine erhöhte Dichte von IL-17<sup>+</sup> Zellen und einer M-CSF1-abhängigen Akkumulation von Makrophagen entstehende Fibrose in Haut und Lunge. Eine Hemmung der Th17-Differenzierung und von M-CSF1 könnte für die Prävention und Behandlung von cGvHD von hoher Relevanz sein (Alexander et al., 2014). Die Hemmung von terminalen Zytokinen, die an der Fibrose beteiligt sind, wie TGF- $\beta$  und IL-13, stellen zusätzliche Ziele dar; Die TGF- $\beta$ -Inhibition ist jedoch problematisch, da sie eine wichtige Rolle bei der Treg-Hämostase spielt (Banovic et al., 2005).

Nur wenige Studien haben versucht, den Einfluss der Behandlung mit Immunsuppressiva auf die beobachteten Biomarker zwischen cGvHD und nicht cGvHD zu untersuchen, da Patienten mit cGvHD häufig mit mehreren Immunsuppressiva behandelt wurden, während Patienten ohne cGvHD oft nicht medikamentös behandelt wurden. Des Weiteren wurden Biomarker ohne Berücksichtigung des Auftretens der cGvHD und dem Zeitpunkt der Biopsie nach HSZT untersucht bzw. ohne Vergleich zu Kontrollgruppen nach HSZT analysiert. Die Zeit von der HSZT bis zur Biopsie, das Intervall zwischen Probenentnahme und Auftreten einer cGvHD,

---

sowie der Grad und die Art der Immunsuppression und kleine limitierte Patientengruppen wirken sich auf die Ergebnisse aus.

In unsere Untersuchungen konnten zu wenig Patienten mit einbezogen werden. Insbesondere der Vergleich eines einzelnen Patienten ohne orale GvHD (n=1) mit einer Gruppe von beispielsweise 19 Patienten mit einer oralen GvHD Grad 1 (n=19) ist statistisch gesehen nicht sinnvoll und wirkt sich auf die Ergebnisse aus. Sinnvoll wäre gegebenenfalls auch eine gesunde Kontrollgruppe in den Vergleich mit einzubeziehen, um statistisch sinnvolle Ergebnisse zeigen zu können.

---

## 6. Zusammenfassung

Die GvHD gilt trotz großer Fortschritte als Hauptkomplikation nach einer HSZT. Es kommt zu einer „Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion“ bei der immunkompetente Lymphozyten des Spenders mit Antigenstrukturen des immunsupprimierten, histoinkompatiblen Empfängers reagieren. 80% der Patienten mit cGvHD entwickeln eine orale cGvHD, womit die orale cGvHD einer der häufigsten klinischen Manifestationen der cGvHD darstellt. Unterschiedliche Bereiche in der Kopf-Hals-Region können betroffen sein, besonders häufig allerdings die Mundschleimhaut und die kleinen und großen Speicheldrüsen. Folglich spielen die Zusammensetzung des Speichels sowie der durch die Toxizität der HSZT verminderte Speichelfluss eine große Rolle beim Krankheitsverlauf einer oralen cGvHD. Eine große Bedeutung wird dem sIgA zugeschrieben, das als sekretorischer Antikörper eine Schutzfunktion auf Schleimhäuten, sowohl auf der Mundschleimhaut als auch auf der intestinalen Schleimhaut, gegenüber Krankheitserregern einnimmt. Zielsetzung dieser Arbeit war es unter anderem, die Rolle des sIgA in Bezug auf den Zeitpunkt der HSZT und in Bezug auf den Schweregrad einer oralen cGvHD näher zu untersuchen. Es wurden von 49 Patienten (36 männlich, 13 weiblich, Durchschnittsalter 43,5 Jahre), die sich im Zeitraum von 3 Jahren am Universitätsklinikum Regensburg aufgrund einer hämatologischen Grunderkrankung einer HSZT unterziehen mussten, Biopsien der Mundschleimhaut und Speichelproben entnommen und die Konzentrationen von sIgA im Speichel bestimmt. Die Konzentrationen von sIgA im Speichel wurden zudem in zeitlichen Zusammenhang zur HSZT gesetzt. In unserer Studie konnte man eine tendenziell verminderte Konzentration an sIgA im Speichel nach HSZT erkennen. Statistisch gesehen konnte kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen an sIgA im Speichel bei dem Vergleich vor und nach HSZT beobachtet werden. Der Vergleich der Konzentration des sIgA im Speichel nach HSZT in Korrelation zum Auftreten einer oralen cGvHD zeigte, dass bei Patienten mit oraler cGvHD Grad 2-3 eine Tendenz zu niedrigeren sIgA-Konzentrationen im Speichel nach HSZT im Vergleich zu Patienten mit oraler cGvHD Grad 1 erkennbar waren, wobei das Signifikanzniveau bei kleiner Stichprobe knapp verfehlt wurde. Des Weiteren wurde die Dichte ausgewählter immunhistochemischer Biomarker während einer gastrointestinalen und oralen GvHD in Bezug auf den Schweregrad untersucht. Dazu wurden Patienten ohne GvHD und Patienten, die eine GvHD Grad 1 oder Grad 2-3 entwickelten berücksichtigt. Dieser Vergleich wurde separat sowohl für die Mundschleimhaut, als auch für die Darm-schleimhaut vollzogen. In der Mundschleimhaut war auffällig, dass bei Patienten ohne orale

---

cGvHD eine höhere Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 1 bzw. Grad 2-3 zu beobachten war. Man kann vermuten, dass diejenigen Patienten, die keine orale cGvHD entwickelt haben, erhöhte Werte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufgrund einer besseren humoralen Immunantwort aufwiesen. Mit dem Auftreten einer oralen cGvHD Grad 1 sank die Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Mundschleimhaut. Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 2-3 zeigten hingegen eine leicht erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Patienten mit einer oralen cGvHD Grad 1. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei der oralen GvHD CD4<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt sind. Zu beachten ist dabei die eingeschränkte Beurteilbarkeit auf Grund der kleinen Stichprobe, v.a bei der Variablen keine GvHD (n=1). Graphisch betrachtet fiel auf, dass sich die Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Mundschleimhaut im Vergleich zur Darmschleimhaut gegensätzlich verhielt. So zeigten Patienten mit intestinaler GvHD Grad 1 im Vergleich zu Patienten ohne intestinale GvHD bzw. mit intestinaler GvHD Grad 2-3 eine höhere Dichte an CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Alle Vergleiche der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Infiltrate zeigten allerdings sowohl oral als auch intestinal zwischen den einzelnen Schweregraden keine signifikanten Unterschiede.

Im Vergleich dazu dominierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gastrointestinaltrakt. Es konnte bei Patienten mit einer intestinalen GvHD Grad 1 im Vergleich zu Patienten ohne eine intestinale GvHD bzw. bei solchen mit intestinaler GvHD Grad 2-3 ein höherer Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. Dieser Vergleich erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau. Genauer betrachtet zeigte in der Mundschleimhaut nur der Vergleich der Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwischen einer oraler cGvHD Grad 1 und keiner oralen cGvHD bei sehr kleiner Stichprobe einen marginal signifikanten Unterschied. CD4<sup>+</sup>T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine essentielle Rolle bei einer GvHD, weil sie einen wichtigen Teil der adaptiven Immunität repräsentieren. Zu bedenken ist, dass Patienten mit intestinaler GvHD neben der medikamentösen GvHD-Prophylaxe eine systemische Therapie mit hoch dosiertem Kortison bekommen haben. Diese Medikation könnte auch die Regeneration der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen stark beeinträchtigt haben.

CD68<sup>+</sup> Makrophagen waren sowohl in den gastrointestinalen als auch in oralen Infiltraten zu finden, was durch die aufgrund von Entzündungen zu beobachtende Gewebeschädigung leicht erklärbar ist. Insgesamt konnten intestinal mehr Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden als in der Mundschleimhaut. Außerdem zeigten Patienten ohne intestinale GvHD eine

---

signifikant geringere Dichte an CD68<sup>+</sup> Makrophagen im Vergleich zu Patienten mit einer intestinalen GvHD Grad 2-3. In Bezug auf eine orale cGvHD konnte graphisch gezeigt werden, dass Patienten ohne eine orale cGvHD auf Grund der kleinen Stichprobe im Vergleich zu Patienten, die an einer oralen cGvHD Grad 1 bzw. Grad 2-3 litten eine deutlich höhere Dichte an CD68<sup>+</sup> Makrophagen zeigten. Die Vergleiche waren statistisch jedoch nur marginal signifikant.

Ähnliche Ergebnisse konnten wir in Bezug auf das Proliferation-assoziierte Antigen Ki-67 beobachten. Während einer GvHD des Gastrointestinaltraktes war die Zellproliferation im Vergleich zur Mundschleimhaut erhöht, was durch Regenerationsvorgänge zu erklären ist. In der Mundschleimhaut hingegen war auffällig, dass mit dem Auftreten einer oralen cGvHD die Dichte an proliferationsaktiven Zellen stark sank und mit steigendem Schweregrad annähernd gleich blieb. Hingegen stieg die Proliferationsrate mit Auftreten einer intestinalen GvHD an und nahm mit dem Schweregrad wieder leicht ab. Alle Vergleiche sowohl im Bezug auf eine orale bzw. intestinale GvHD zeigten keine signifikanten Differenzen.

Die Dichte an FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen war sowohl bei Patienten ohne orale cGvHD als auch bei Patienten, die eine orale cGvHD entwickelt haben im Vergleich zu einer gastrointestinalen GvHD höher. Dies ist wahrscheinlich durch die spezielle Physiologie der Mundschleimhaut zu erklären. Allerdings waren sowohl die Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen (mit und ohne GvHD) oral als auch intestinal statistisch nicht signifikant. Auffällig war, dass besonders Patienten ohne orale cGvHD eine stark erhöhte Dichte von FoxP3<sup>+</sup>-exprimierenden T-Zellen zeigten. Es kann angenommen werden, dass FoxP3<sup>+</sup>regulatorische T-Zellen eine Rolle bei der Protektion gegenüber der cGvHD vermitteln, dieser Effekt jedoch nicht vollständig vor einer oralen cGvHD schützt. Die Infiltration von FoxP3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen bei Patienten mit einer intestinalen GvHD stieg zunächst an und fiel mit steigendem Schweregrad. Es kann angenommen werden, dass der Anstieg von FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen ein gegenregulierender Mechanismus von T-Zellen darstellt, um eine Entzündung während einer GvHD zu unterdrücken. Der Abfall von FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen bei schwerer intestinaler GvHD könnte durch die intensive Immunsuppression bedingt sein, die bei schwerer intestinaler GvHD eingesetzt wird. Im Gegensatz dazu wird die orale cGvHD deutlich weniger intensiv behandelt. Zu bedenken ist, dass Patienten mit einer gastrointestinalen GvHD in der Regel mit einer Kombination aus Cyclosporin A und Prednisolon behandelt werden. Cyclosporin verhindert spezifisch

---

und reversibel die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, die Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-2), sowie die T-Zell vermittelte Aktivierung von B-Zellen und deren Antikörperproduktion. Vor allem die Suppression von IL-2, welches ein essentieller Wachstumsfaktor für Tregs ist, könnte eine Erklärung für die im Diagramm ersichtliche verminderte Infiltration von Tregs bei Patienten nach HSZT auch ohne Auftreten einer GvHD sein. Dagegen erhalten deutlich weniger Patienten mit oraler cGvHD Cyclosporin. Ergänzend wären eine detailliertere Untersuchung im Verlauf und ein Vergleich der Expression des regulatorischen Enzym IDO während einer intestinalen GvHD und einer oralen cGvHD in Bezug auf den Schweregrad sinnvoll. Dies könnte einen neuen bisher nicht bekannten regulatorischen Regelkreis repräsentieren.

Wir beobachteten eine von einer GvHD unabhängig höhere Konzentration an IL-17<sup>+</sup> Zellen im Darmepithel im Vergleich zur Mundschleimhaut. Anders als erwartet kam es im Gastrointestinaltrakt beim Auftreten einer intestinalen GvHD zu einem starken, aber nicht signifikanten Abfall der Dichte an IL-17<sup>+</sup> Zellen und zu einem Wiederanstieg der Dichte mit steigendem Schweregrad. In der Mundschleimhaut stieg dagegen die Dichte der IL-17<sup>+</sup> exprimierenden Zellen mit dem Schweregrad kontinuierlich an. Allerdings wurde bei den Vergleichen das Signifikanzniveau nicht erreicht. Die kürzlich erfolgte Identifizierung von angeborenen (innate) lymphoiden Zellen (ILCs) und ihre Rolle bei der Produktion von IL-17 zeigt, dass sich das Kompartiment von IL-17<sup>+</sup> Zellen nicht allein auf T-Zellen beschränkt.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen auf mehreren Ebenen, dass eine GvHD als eine Dysbalance zwischen der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und der Suppression regulatorischer Populationen wie z.B. Tregs gesehen werden kann. Eine zentrale Bedeutung für die Verbesserung der GvHD-Prophylaxe und Therapie scheint die Wiederherstellung der Immunregulation zu sein. Aufgrund der Komplexität des Immunsystems und der Reaktionen, die im Zusammenhang mit GvHD ausgelöst werden, gestaltet sich die Identifizierung einzelner und spezifischer Biomarker schwierig. Daher ist es wichtig, bei Studien zu Biomarkern die klinische Interpretation der GvHD zu berücksichtigen, um die Datensammlung zu vereinfachen und einer genaueren Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- Akpeg, G., Chinratanalab, W., Lee, L., Torbenson, M., Hallick, J. P., Anders, V., & Vogelsang, G. (2003). Gastrointestinal involvement in chronic graft-versus-host disease: A clinicopathologic study. *Biol Blood Marrow Transplant*, *9*, 46-51. doi:10.1053/bbmt.2003.49999
- Alborghetti, M. R., Correa, M. E., Adam, R. L., Metze, K., Coracin, F. L., De Souza, C. A., & Cintra, M. L. (2005). Late effects of chronic graft-vs.-host disease in minor salivary glands. *J Oral Pathol Med*, *34*, 486-493.
- Alexander, K. A., Flynn, R., Lineburg, K. E., Kuns, R. D., Teal, B. E., Olver, S. D., . . . Leveque, M. (2014). CSF-1–dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest*, *124*, 4266-4280.
- Appelbaum, F. (2003). The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu. Rev. Med.*, *54*, 491-512.
- Arai, S., & Vogelsang, G. B. (2000). Management of graft-versus-host disease. *Blood Reviews*, *14*, 190-204. doi:10.1054/ blre.2000.0137
- Bacigalupo, A., Ballen, K., Rizzo, J. D., Giralt, S., Lazarus, H. M., Ho, V., . . . Horowitz, M. (2009). DEFINING THE INTENSITY OF CONDITIONING REGIMENS: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*, *15*, 1628-1633. doi:10.1016/j.bbmt.2009.07.004.
- Banovic, T., MacDonald, K. P., Morris, E. S., Rowe, V., Kuns, R., Don, A., . . . Hill, G. R. (2005). TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? . *Blood*, *106*, 2206-2214. doi:doi.org/10.1182/blood-2005-01-0062
- Bassim, C. W., Fassil, H., Mays, J. W., Edwards, D., Baird, K., Steinberg, S. M., . . . Pavletic, S. Z. (2014). Validation of the National Institutes of Health chronic GVHD Oral Mucosal Score using component-specific measures. *Bone Marrow Transplant*, *49*(1), 116-121. doi:10.1038/bmt.2013.137
- Billingham, R. E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*, *62*, 21-78.
- Bork, K., Burgdorf, W., & Hoede, N. (2008). *Mundschleimhaut -und Lippenkrankheiten:Klinik, Diagnostik und Therapie* (Vol. 3.Auflage): Schattauer Verlag.
- Campana, F., Sibaud, V., Chauvel, A., Boiron, J. M., Taieb, A., & Fricain, J. C. (2006). Recurrent superficial mucoceles associated with lichenoid disorders. *J Oral Maxillofac Surg*, *64*(12), 1830-1833. doi:doi:10.1016/j.joms.2005.11.059
- Carbone, M., Arduino, P. G., Carrozzo, M., Caiazzo, G., Broccoletti, R., Conrotto, D., . . . Gandolfo, S. (2009 ). Topical clobetasol in the treatment of atrophic-erosive oral lichen planus: a randomized controlled trial to compare two preparations with different concentrations. *J Oral Pathol Med*, *38*, 227-233. doi:doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00688.x
- Chan, L. S., Vanderlugt, C., Hashimoto, T., Nishikawa, T., Zone, J. J., Black, M., . . . Gordon, K. B. (1998). Epitope Spreading: Lessons From Autoimmune Skin Diseases. *J Invest Dermatol*, *110*, 103-109.
- Clark , F. J., Gregg, R., Piper, K., Dunnion, D., Freeman, L., Griffiths, M., . . . Chakraverty, R. (2004). Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood*, *103*(6), 2410–2416. doi:doi.org/10.1182/blood-2003-06-2073
- Cobbold, S., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., & Waldmann, H. (2004). Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol*, *172*, 6003-6010. doi:10.4049/jimmunol.172.10.6003

- 
- Cobelan, E. A. (2006). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 354, 1813-1826.
- Couriel, D., Carpenter, P. A., Cutler, C., Bolanos-Meade, J., Treister, N., Gea-Banacloche, J., . . . Flowers, E. D. (2006). Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-Versus-Host Disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12, 375-396. doi:10.1016/j.bbmt.2006.02.003
- Courturier, M., Lamarthée, B., Arbez, J., Renauld, J. C., Bossard, C., Malard, F., . . . Gaugler, B. (2013). IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia*, 27, 1527-1537. doi:10.1038/leu.2013.39
- Dander, E., Balduzzi, A., Zappa, G., Luccini, G., Perseghin, P., André, V., . . . D'Amico, G. (2009). Interleukin-17–Producing T-Helper Cells as New Potential Player Mediating Graft-Versus-Host Disease in Patients Undergoing Allogeneic Stem-Cell Transplantation. *Transplantation*, 88, 1261-1272. doi:10.1097/TP.0b013e3181bc267e
- Dawes, C. (2004). How Much Saliva Is Enough for Avoidance of Xerostomia? *Caries Res*, 38, 236-240. doi:10.1159/000077760
- van der Waart, A. B., van der Velden, W., Blijlevens, N., & Dolstra, H. (2014). Targeting the IL17 pathway for the prevention of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20, 752-759. doi:10.1016/j.bbmt.2014.02.007
- Eisen, D., Carrozzo, M., Bagan, J., & Thongprasom, K. (2005). Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral diseases*, 11, 338-349. doi:10.1111/j.1601-0825.2005.01142.x
- Elad, S., Or, R., Garfunkel, A. A., & Shapira, M. Y. (2003). Budesonide: a novel treatment for oral chronic graft versus host disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95, 308-311. doi:10.1067/moe.2003.23
- Ferrara, J. L. (2000). Pathogenesis of akute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J. Hematother Stem Cell Res*, 9(3), 299-230.
- Ferrara, J. L., Cooke, K. R., & Teshima, T. (2003). The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol*, 78, 181-187.
- Ferrara, J. L., & Deeg, H. J. (1991). Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 324, 667-674.
- Ferrara, J. L., & Deeg, H. J. (1991). Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 324, 667-674.
- Feuerer, M., Hill, J., Mathis, D., & Benoist, C. (2009). Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *NATURE IMMUNOLOGY*, 10(7), 689-695. doi:10.1038/ni.1760/
- Filipovich, A. H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J. R., Lee, S. J., . . . Flowers, M. E. (2005). National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11(12), 945-956. doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.004
- Fontenot, J., & Rudensky, A. (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *NATURE IMMUNOLOGY*, 6(4), 331-337. doi:10.1038/ni1179
- Geboes, L., Dumoutier, L., Kelchtermanns, H., Schurgers, E., Mitera, T., Renauld, J. C., & Matthys, P. (2009). Proinflammatory Role of the Th17 Cytokine Interleukin-22 in Collagen-Induced Arthritis in C57BL/6 Mice. *Arthritis & Rheumatism*, 60(2), 390-395. doi:10.1002/art.24220
- Giralt, S., Ballen, K., Rizzo, J. D., Bacigalupo, A., Horowitz, M., Pasquini, M., & Sandmaier, B. (2009). Reduced-intensity conditioning regimen workshop: defining the dose

- 
- spectrum. Report of a workshop convened by the center of international blood and marrow transplant research. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15, 367-369.
- Gratwohl, A., Baldomero, H., Horisberger, B., Schmid, C., Passweg, J., & Urbano-Ispizua, A. (2002). Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood*, 100, 2374-2386. doi:10.1182/blood-2002-03-0675
- Hahnel, S. (2012). *Mundtrockenheit*: Spitta Verlag GmbH&Co. KG.
- Hamash, A., Dudakov, J., Hua, G., O'Connor, M. H., Young, L., Singer, N., . . . van den Brink, M. (2012). Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells from Immune-Mediated Tissue Damage and Regulates Sensitivity to Graft versus Host Disease. *Immunity*, 37, 339-350. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.028
- Hazenberg, M., & Spits, H. (2014). Human innate lymphoid cells. *Blood*, 124(5), 700-709. doi:10.1182/blood-2013-11-427781
- Henden, A. S., & Hill, G. R. (2015). Cytokines in Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*, 194, 4604-4612. doi:10.4049/jimmunol.1500117
- Hennig, J. (1994). Die psychobiologische Bedeutung des sekretorischen Immunglobulin A im Speichel. Münster. In Waxmann (Ed.), (Vol. Auflage 1).
- Hill, G. R., & Ferrara, J. L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 95, 2754-2759.
- Hiroki, A., Nakamuri, S., Shinohara, M., Gondo, H., Ohyama, Y., Hayashi, S., . . . Oka, M. (1996). A comparison of glandular involvement between chronic graft-versus-host disease and Sjorgren's syndrome. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 298-307. doi:10.1016/S0901-5027(06)80062-7
- Hodgson, T. A., Sahni, N., Kaliakatsou, F., Buchanan, J., & Porter, S. (2003). Long-term efficacy and safety of topical tacrolimus in the management of ulcerative/erosive oral lichen planus. *Eur J Dermatol*, 13, 466-470.
- Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C., & Strober, S. (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.*, 196(3), 389-399. doi:10.1084/jem.20020399
- Holler, E., Butzhammer, P., Schmid, K., Hundsrucker, C., Koestler, J., Peter, K., . . . Oefner, P. (2014). Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: Loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20(5), 640-645. doi:doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.030
- Holler, E., & Eissner, G. (2005). *GvHD-state of the art. A summary of workshops held in Regensburg in 2003* (1. Auflage ed.): Uni-Med Verlag.
- Holler, E., Ertl, B., Hintermeier-Knabe, R., Roncarolo, M. G., Eissner, G., Mayer, F., . . . Wilmanns, W. (1997). Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning – an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation? *Leuk Lymph*, 25, 217. doi: 10.3109/10428199709114161
- Holler, E., Kolb, H. J., Mittermüller, J., Kaul, M., Ledderose, G., Duell, T., . . . Wilmanns, W. (1995). Modulation of acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) release in the course of pretransplant conditioning: Role of conditionings regimes and prophylactic application of monoclonal antibody neutralizing human TNF-alpha (MAK195F). *Blood*, 86, 860.
- Holtmann, H., & Bobkowski, M. (2009). *Histologie Basics* (Vol. 1). München: Elsevier GmbH.
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcriptionfactor Foxp3. *Science*, 299, 1057–1061. doi:10.1126/science.1079490

- Imad, A., Tabbara, M. D., Zimmerman, K., Morgan, C., & Nahleh, Z. (2002). Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Complications and Results. *Arch Intern Med*, *162*(14), 1558-1566.
- Imanguli, M. M., Atkinson, J. C., Harvey, K. E., Hoehn, G. T., Ryu, O. H., Wu, T., . . . Hart, T. (2007). Changes in salivary proteome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, *35*, 184-192. doi:10.1016/j.exphem.2006.10.009
- Imanguli, M. M., Cowen, E. W., Rose, J., Dhamala, S., Swaim, W., Lafond, S., . . . Hakim, F. (2014). Comparative analysis of FoxP3+ regulatory T cells in the target tissues and blood in chronic graft versus host disease. *Leukemia*, *28*, 2016-2027. doi:doi:10.1038/leu.2014.92
- Institute, N. C. (2009). Graft-versus-host disease. Retrieved from <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/supportivecare/oralcomplications/HealthProfessional/page10>
- Islam, K. B., Baskin, B., Nilsson, L., Hammarström, L., Sideras, P., & Smith, E. (1994). Molecular Analysis of IgA Deficiency. *J Immunol*, *152*, 1442-1452;.
- Izutsu, K. T., Sullivan, K. M., Schubert, M. M., Truelove, E. L., Shulman, H., Sale, G. E., . . . Thomas, E. D. (1983). Disordered salivary immunoglobulin secretion and sodium transport in human chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*, *35*(5), 441-445.
- Jagasia, M., Greinix, H. T., Arora, M., Williams, K. M., Wolff, D., Cowen, E. W., . . . Flowers, E. D. (2015). National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*, *21*(3), 389-401. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.001
- Juric, M. K., Ghimire, S., Ogonek, J., Weissinger, E. M., Holler, E., van Rood, J. J., . . . Greinix, H. T. (2016). Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Front Immunol*, *7*, 470. doi:10.3389/fimmu.2016.00470
- Kappel, L. W., Goldberg, S. L., King, C. G., Suh, D., Smith, O., Ligh, C., . . . al, e. (2009). IL-17 Contributes to CD4-mediated Graft-Versus-Host Disease. *Blood*, *113*, 945-952. doi: 10.1182/blood-2008-08-172155
- Larsen, K., Johansen, J., Reibel, J., Zachariae, C., Rosing, K., & Pedersen, A. (2017). Oral symptoms and salivary findings in oral lichen planus, oral lichenoid lesions and stomatitis. *BMC Oral Health (2017) 17:103*, *17*(103), 2-9. doi: 10.1186/s12903-017-0393-2
- Lee, S. J. (2005). New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood*, *105*, 4200-4206. doi:10.1182/blood-2004-10-4023.
- Lee, S. J., Klein, J. P., Barrett, A. J., Ringden, O., Antin, J. H., Cahn, J. Y., . . . Horowitz, M. M. (2002). Severity of chronic graft-versus-host disease association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*, *100*, 406-414. doi:10.1182/blood.V100.2.406
- Li, Q., Zhai, Z., Xu, X., Shen, Y., Zhang, A., Sun, Z., . . . Wang, Y. (2010). Decrease of CD4+ CD25+ regulatory T cells and TGF-β at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leukemia Research*, *34*, 1158-1168. doi:10.1016/j.leukres.2010.03.017
- Lopez-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., & Salazar-Sanchez, N. (2010). Topical tacrolimus and pimecrolimus in the treatment of oral lichen planus: an update. *J Oral Pathol Med*, *39*, 201-205. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00830.x
- Lui, Y., Cai, Y., Dai, L., Chen, G., Ma, X., Wang, Y., . . . Liu, H. (2013). The Expression of Th17-Associated Cytokines in Human Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, *19*, 1421-1429. doi:10.1016/j.bbmt.2013.06.013

- 
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Histologie: verstehen- lernen- nachschlagen* (Vol. 4): Thieme.
- Matsuoka, K., Koreth, J., Kim, H., Bascug, G., McDonough, S., Kawano, Y., . . . Ritz, J. (2013). Low-Dose Interleukin-2 Therapy Restores Regulatory T Cell Homeostasis in Patients with Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Sci Transl Med*, 5, 1-11. doi:10.1126/scitranslmed.3005265
- Mattsson, T., Sunqvist, K. G., Heimdahl, A., Dahllof, G., Ljungman, P., & Ringden, O. (1992). A comparative immunological analysis of the oral mucosa in chronic graft-versus-host disease and oral lichen planus. *Arch Oral Biol.*, 37, 539-547.
- Meier, J. K., Wolff, D., Pavletic, S., Greinix, H., Gosau, M., Bertz, H., . . . Elad, S. (2011). Oral chronic graft-versus-host disease: report from the International Consensus Conference on clinical practice in cGVHD. *Clin Oral Investig*, 15(2), 127-139. doi:10.1007/s00784-010-0450-6
- Meignin, V., Latour, R., Zuber, J., Regnault, A., Mounier, N., Lemaitre, F., . . . Socié, G. (2005). Numbers of Foxp3-expressing CD4+CD25 high T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 33, 894-900. doi:10.1016/j.exphem.2005.05.001
- Meyers, J. D. (1986). Infection in bone marrow transplant recipients. *Am J Med*, 81, 27-38.
- Michallet, A. S., Nicolini, F., Furst, S., Le, Q. H., Dubois, V., Hayette, S., . . . Michallet, M. (2005). Outcome and long-term follow-up of alloreactive donor lymphocyte infusions given for relapse after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantations (HSCT). *Bone Marrow Transplant*, 35, 601-608. doi:10.1038/sj.bmt.1704807
- Miklos, D. B., Kim, H. T., Miller, K. H., Guo, L., Zorn, E., Lee, S. J., . . . Ritz, J. (2005). Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*, 105, 2973-2978. doi:10.1182/blood-2004-09-3660
- Nagler, A., Ohana, M., Alper, R., Doviner, V., Sherman, Y., Rabbani, E., . . . Ilan, Y. (2003). Induction of oral tolerance in bone marrow transplantation recipients suppresses graft-versus-host disease in a semiallogeneic mouse model. *Bone Marrow Transplant*, 32, 363-369. doi:10.1038/sj.bmt.1704145
- Nagler, R. M., Hadar, L., Lieba, M., & Nagler, A. (2006). Salivary Antioxidant Capacity in Graft versus Host Disease. *Cancer Invest*, 24, 269-277. doi:10.1080/07357900600634013
- Nagler, R. M., & Nagler, A. (2004a). The molecular basis of salivary gland involvement in graft-vs.-host disease. *J Dent Res*, 83(2), 98-103.
- Nagler, R. M., & Nagler, A. (2004b). Salivary gland involvement in graft- versus-host disease: the underlying mechanism and implicated treatment. *Isr Med Assoc J*, 6(3), 167-172.
- Nash, R. A., Sullivan Pepe, M., Storb, R., Longton, G., Pettinger, M., Anasetti, C., . . . Witherspoon, P. (1992). Acute Graft-Versus-Host Disease. Analysis of Risk Factors After Allogeneic Marrow Transplantation and Prophylaxis With Cyclosporine and Methotrexate. *Blood*, 80, 1838-1845
- Normanton, M., & Marti, L. (2013). Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein (Sao Paulo)*, 11(2), 237-246.
- Pidala, J., Sarwal, M., Roedder, S., & Lee, S. (2014). Biologic markers of chronic graft vs. host disease. *Bone Marrow Transplant.*, 49, 324-331. doi:10.1038/bmt.2013.97
- Porter, S. R., Scully, C., & Hegarty, A. M. (2004). An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral surg Oral Med Oral Pathol*, 97(1), 28-46. doi:10.1016/j.tripleo.2003.07.010

- Resende, R. G., Correia-Silva, J., Silva, T., Salomao, U., Marques-Silva, L., Vieira, E., . . . Gomez, R. S. (2014). IL-17 Genetic and Immunophenotypic Evaluation in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Mediators of Inflammation*, 1-7. doi:10.1155/2014/571231
- Rieger, K., Loddenkemper, C., Maul, J., Fietz, T., Wolff, D., Terpe, H., . . . Uharek, L. (2006). Mucosal FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood*, 107(4), 1717-1723. doi:10.1182/blood-2005-06-2529
- Robb, J., Lineburg, K., Kuns, R., Wilson, Y., Raffelt, N. C., Olver, S. D., . . . MacDonald, K. P. (2012). Identification and expansion of highly suppressive CD8<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 119(24), 5898-5908. doi:10.1182/blood-2011-12-396119
- Sale, G. E., Shulman, H. M., Schubert, M. M., Sullivan, K. M., Kopecky, K. J., Hackman, R. C., . . . Thomas, E. D. (1981). Oral and ophthalmic pathology of graft versus host disease in man: predictive value of the lip biopsy. *Hum Pathol*, 12(11), 1022-1030. doi:10.1016/s0046-8177(81)80260-2
- Saliba, R., De Lima, M., Giralt, S., Andersson, B., Khouri, I., Hosing, C., . . . Couriel, D. (2007). Hyperactive GVHD: risk factors, outcomes and clinical implications. *Blood*, 109, 2751-2758. doi:10.1182/blood-2006-07-034348
- Sari, I., Altuntas, F., Kocyigit, I., Sisman, Y., Eser, B., Unal, A., . . . Cetin, M. (2007). The Effect of Budesonide Mouthwash on Oral Chronic Graft Versus Host Disease. *Am J Hematol*, 82(5), 349-356. doi:10.1002/ajh.20814
- Sato, M., Tokuda, N., Fukumoto, T., Mano, T., Sato, T., & Ueyama, Y. (2006). Immunohistopathological study of the oral lichenoid lesions of chronic GVHD. *J Oral Pathol Med* (2006) 35: 33–6, 35, 33-36.
- Shulman, H., Kleiner, D., Lee, S. J., Morton, T. H., Pavletic, S., Farmer, E., . . . Vogelsang, G. B. (2006). Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 12(1), 31-47. doi:10.1016/j.bbmt.2005.10.023
- Soares, A. B., Faria, P. R., Magna, L. A., Correa, M. E., de Sousa, C. A., Almeida, O. P., & Cintra, M. L. (2005). Chronic GVHD in minor salivary glands and oral mucosa: histopathological and immunohistochemical evaluation of 25 patients. *J Oral Pathol Med*, 34(6), 368-373. doi:10.1111/j.1600-0714.2005.00322.x
- Sreebny, L. M. (2000). Saliva in health and disease: appraisal and update. *International Dental Journal*, 50, 140-161. doi:10.1111/j.1875-595x.2000.tb00554.x
- Sullivan, K. M., Shulman, H., Storb, R., Weiden, P., Witherspoon, R., McDonald, G., . . . Thomas, E. D. (1981). Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood*, 57, 267-276.
- Taylor, P. A., Lees, C., & Blazar, B. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 99(10), 3493–3499. doi:10.1182/blood.V99.10.3493
- Treister, N., Cook, E. F., Antin, J. A., Lee, S., Soiffer, R., & Woo, S. (2008). Clinical evaluation of oral chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14, 110-115. doi:10.1016/j.bbmt.2007.06.017
- Treister, N., Duncan, C., Cutler, C., & Lehmann, L. (2012). How we treat oral chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 120(17), 3407-3418. doi:10.1182/blood-2012-05-393389
- Trzonkowska, P., Bieniaszewska, M., Juscinska, J., Dobyszyk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., . . . Hellmann. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>-</sup> T regulatory cells. *Clinical Immunology*, 133, 22-26. doi:10.1016/j.clim.2009.06.001
- Ulfig, N. (2003). *Kurzlehrbuch Histologie* (Vol. 4.Auflage): Thieme.

- 
- Underdown, B. J., & Mestecky, J. (1994). Mucosal immunoglobulins. In P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. R. McGhee, & J. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology* (pp. 79-97). San Diego: Academic Press.
- Vignali, D., Collison, L., & Workman, C. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7), 523-532. doi:10.1038/nri2343
- Vogelsang, G., & Pavletic, S. (2009). *Chronic Graft versus Host Disease: Interdisciplinary Management* (G. Vogelsang & S. Pavletic Eds.): Cambridge University Press.
- Voute, A. B., Schulten, E. A., Langendijk, P. N., Nieboer, C., & van der Waal, I. (1994). Cyclosporin A in an adhesive base for treatment of recalcitrant oral lichen planus. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, 78, 437-441.
- Walker, J. A., Barlow, J., & McKenzie, A. (2013). Innate lymphoid cells—how did we miss them? . *Nature Reviews Immunology*, 13, 75-87. doi:10.1038/nri3349
- Weisdorf, D., Hakke, R., Blazar, B., Miller, W., McGlave, P., Ramsay, N., . . . Filipovich, A. (1991). Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation*, 91, 1197- 1203.
- Wolff, D., Bertz, H., Greinix, H., Lawitschka, A., Halter, J., & Holler, E. (2011). Klinische Versorgung der chronischen Graft-versus-Host-Krankheit. *Deutsches Ärzteblatt*, 108(43), 732-740. doi:10.3238/arztebl.2011.0732
- Yakoup-Agha, I., Mesnil, F., Kuentz, M., Boiron, J. M., Ifrah, N., Milpied, N., . . . Jouet, J. P. (2006). Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors in patients with standard-risk hematologic malignancy: A prospective study from the french society of bone marrow transplantation and cell therapy. *J Clin Oncol*, 24, 5695-5702. doi:10.1200/JCO.2006.08.0952
- Young, K. J., DuTemple, B., Phillips, M., & Zhang, L. (2003). Inhibition of Graft-Versus-Host Disease by Double-Negative Regulatory T Cells. *J Immunol*, 171, 134-141. doi:10.4049/jimmunol.171.1.134

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die mich beim Verfassen meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert für die Vergabe des Themas der Arbeit und dafür, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in Regensburg zu promovieren.

Desweiteren möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. med. Daniel Wolff für die vielen konstruktiven Anregungen in fachlicher Hinsicht, seinem Engagement und seiner Geduld bedanken.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Dr. Johannes Meier meinen großen Dank aussprechen, der mich auf meinem Weg mit Enthusiasmus, strukturierter Betreuung und vor allem durch ständiges Motivieren weiterzumachen unterstützt hat.

Nicht zuletzt möchte ich allen meinen Freunden danken, die mir in statistischen, konstruktiven und sonstigen Belangen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meiner Familie danke ich für all die liebevollen Zusprüche, ihren Bemühungen um ein angenehmes Umfeld und wertvolle Gedanken allgemeiner Art, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation geprägt und begleitet haben.