Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

Untersuchung der Milzfunktion pädiatrisch-onkologischer Patienten nach intensiver Chemotherapie

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Julia Elsner (geb. Schmidt)

Leipzig

2019

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cario

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Stegelmann

Tag der Promotion: 15.07.2021

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1. Funktion der Milz 1
1.2. B-Zell Entwicklung 3
1.3. Beurteilung der Milzfunktion 4
1.4. Einfluss onkologischer Therapieverfahren auf die Milzfunktion 5
1.4.1. Strahlentherapie 5
1.4.2. Chemotherapie 6
1.4.3. Datenlage bei Kindern 6
1.5. Fragestellung 7
2. Material und Methoden 8
2.1. Patienten und Kontrollkollektiv 8
2.2. Nachweis von „pitted erythrocytes“ 10
2.3. Lymphozyten-Immunphänotypisierung (Durchflusszytometrie) 12
2.4. Auswertung der Daten 14
2.5. Ethikantrag 15
3. Ergebnisse 16
3.1. PE-Wert 16
3.2. Lymphozyten absolut und prozentual 18
3.3. Transitionale B-Zellen 20
3.4. MZ like B-Zellen 21
3.5. Plasmablasten: IgM und switched 22
3.6. Patientengruppe „ALL“ 24
3.7. Nachuntersuchung von 2 Patienten 31
3.8. Untersuchung bei kombinierter Radiochemotherapie 34
4. Diskussion 36
4.1. Milzszintigrafie 37
4.2. Retikuloendotheliale Funktion 37
4.3. Immunologische Funktion 39
4.3.1. Lymphozytenzahl 41

4.3.2. Transitionale B-Zellen 41
4.3.3. MZ like B-Zellen 43
4.3.4. Plasmablasten 44
4.4. Nachuntersuchungen 44
4.5. Schlussfolgerung 46
5. Zusammenfassung 48
6. Literaturverzeichnis 50
Danksagung 53
Lebenslauf 54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

^{99m}TC	Technetium-99m
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CVID	common variable immunodeficiency disorders
FACS	fluorescence-activated cell sorter
HIB	Haemophilus influenzae B
HJB	Howell Jolly Bodies / Körper
IC	Intensive Chemotherapie
IgM	Immunglobulin M
MAX	Maximalwert
MED	Median
MIN	Minimalwert
MW	Mittelwert
MZ	Marginalzone
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OPSI	overwhelming post splenectomy infection
PALS	Periarterielle Lymphscheide
PE	“pitted erythrocytes” = “löchrige” Erythrozyten (Umschreibung für Erythrozyten mit Membranvakuolen)
RC	Reduzierte Chemotherapie
SD	Standardabweichung
Z.n.	Zustand nach
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. FUNKTION DER MILZ

Histologisch wird die Milz in die rote und die weiße Pulpa sowie die Marginalzone unterteilt [16, 22].

Die rote Pulpa hat mit einem komplexen Gefäßsystem ihre vorrangige Bedeutung in der hämatologischen Funktion der Milz. Durch die 2µm großen Poren des Endothels werden gealterte und damit weniger verformbare Erythrozyten aussortiert [6, 12, 22]. Daneben werden Membraneinbuchtungen (sogenannte „pits“) sowie Howell-Jolly-Körper (Howell-Jolly-Bodies = HJB) und Heinz-Körper entfernt. Dies ist für die Ausdifferenzierung von Retikulozyten von Bedeutung [6, 22].

In der weißen Pulpa findet man die Immunzellen der Milz. In der periarteriellen Lymphscheide (PALS) befinden sich die T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten sind in den Follikeln der weißen Pulpa lokalisiert [22]. Durch Interaktion zwischen Pathogenen und Lymphozyten wird eine Immunantwort generiert. Die Lymphfollikel sind zudem Ort der Differenzierung der später beschriebenen Immunglobulin M (IgM) Memory B-Zellen [6, 16, 22]. Damit dient die Milz auch der Entwicklung und Speicherung von Lymphozyten [22].

Je nach Literatur wird die Marginalzone (MZ) als Teil der weißen Pulpa oder als Übergangszone zwischen der roten und der weißen Pulpa beschrieben. Die hier lokalisierten Makrophagen und B-Lymphozyten haben ihre besondere Bedeutung in der Abwehr bekapselter Bakterien [16, 17, 22]. Die Marginalzonen-B-Lymphozyten können sich nach Kontakt mit Antigenen T-Zell-unabhängig in Plasmazellen transformieren. Somit agieren sie schnell und im Rahmen des angeborenen Immunsystems [16, 17]. Sie opsonieren die Pathogene mittels IgM-Antikörpern und bewirken dadurch, dass Makrophagen der Marginalzone diese phagozytieren können [19].

Weiterhin sind sie Voraussetzung für eine Immunantwort auf Polysaccharid-Impfstoffe gegen bekapselte Bakterien. Da erst ab dem 2. Lebensjahr die Werte dieser B-Lymphozyten denen bei Erwachsenen entsprechen, muss deshalb bei Kleinkindern und Säuglingen ein Konjugat-Impfstoff verwendet werden [17]. Bei diesem Impfstoff sind die Polysaccharide an Proteine gekoppelt, um so eine T-Zell-abhängige Immunantwort hervorzurufen [10].

Patienten mit einer eingeschränkten Milzfunktion zeigen ein erhöhtes Risiko für Infektionen. Angeborene Anlagestörungen (Poly-/Hypo-/Asplenie) oder eine (Teil-) Splenektomie können eine organische Ursache sein. Zu einer funktionellen Hyposplenie können hämatologische und immunologische Grunderkrankungen führen (z.B. Sichelzell-Anämie, chronische entzündliche Darmerkrankungen (CED), Zöliakie, common variable immunodeficiency (CVID)). Aber auch iatrogen bedingt, z.B. durch Radiatio, kann es zu einer verminderten Milzfunktion kommen [19, 22].

Patienten nach Splenektomie zeigen ein erhöhtes Risiko, ein *overwhelming postsplenectomy syndrome infection (*OPSI) zu entwickeln. Dabei handelt es sich um eine von bekapselten Bakterien verursachte systemische Infektion, die gehäuft in den ersten zwei Jahren nach Splenektomie auftritt. In seltenen Fällen können auch Escherichia coli (E. coli) oder intraerythrozytäre Erreger, wie z.B. Malaria, nachgewiesen werden [5, 12, 18, 22]. Nicht immer ist ein Infektfokus ausfindig zu machen [12]. Ausgehend von einem grippe-ähnlichen Beginn kann sich innerhalb von Stunden eine fulminante Sepsis mit disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) und Multiorganversagen entwickeln [22]. In verschiedenen Quellen wird dabei eine Mortalität zwischen 70% und 80% berichtet [21, 22]. Auch danach besteht lebenslang ein erhöhtes Infektionsrisiko [5, 12, 22].

Als wichtigste Präventionsmaßnahme gegen Infektionen durch bekapselte Bakterien gelten Impfungen gegen diese Erreger [12, 16, 17, 22]. Eine Antibiotika-Prophylaxe mit Penicillin wird je nach Ursache in entsprechendem Ausmaß durchgeführt. Über die Dauer der Gabe findet man unterschiedliche Angaben in der Literatur. Im Falle einer angeborener Hypo-/Asplenie sollte diese mindestens bis zum zweiten Lebensjahr erfolgen [12]. Bei einer funktionellen Hyposplenie oder nach Splenektomie wird die Prophylaxe für zwei bis fünf Jahre empfohlen [22]. In einer aktuelleren Studie wird für Erwachsene eine lebenslange Antibiotika-Prophylaxe mit Penicillin bzw. Erythromycin empfohlen [16]. Unabhängig davon sollte im Falle einer Infektion frühzeitig eine Therapie mit einem Breitspektrumantibiotikum begonnen werden [22].

1.2. B-Zell Entwicklung

Nach der Reifung im Knochenmark migrieren als jüngste B-Zell-Population die transitionalen B-Zellen ins periphere Blut, um im Verlauf in die Milz und andere lymphatische Organe zu gelangen [1, 24]. In der Milz findet die weitere Differenzierung statt. Im Keimzentrum in der weißen Pulpa entwickeln sich follikuläre B-Zellen. Aus diesen gehen im Verlauf die switched Memory B-Zellen und die IgM-only Memory B-Zellen hervor. Deshalb spricht man bei diesen Zellen von Memory B-Zellen im klassischen Sinne [1]. In der Marginalzone werden die Marginalzonen (MZ) B-Zellen gebildet. Diese entsprechen aufgrund phänotypischer und genetischer Übereinstimmungen nach aktuellem Wissensstand den IgM Memory B-Zellen [10, 17, 30]. Im peripheren Blut spricht man auch von „MZ like B-Zellen".

Nach Differenzierung in der Milz gelangen die B-Zell-Populationen in das periphere Blut und zeigen sich dort zum einen als reife naive B-Lymphozyten und zum anderen als Gedächtnis- bzw. Memory B-Zellen. Unter letzteren findet man zu annähernd gleichen Anteilen IgM Memory B-Zellen und switched Memory B-Zellen [8, 17]. Ein kleiner Prozentsatz setzt sich aus den IgM-only Memory B-Zellen zusammen [1, 28].

Die folgende Grafik soll die Entwicklung der B-Zellen noch einmal verdeutlichen.

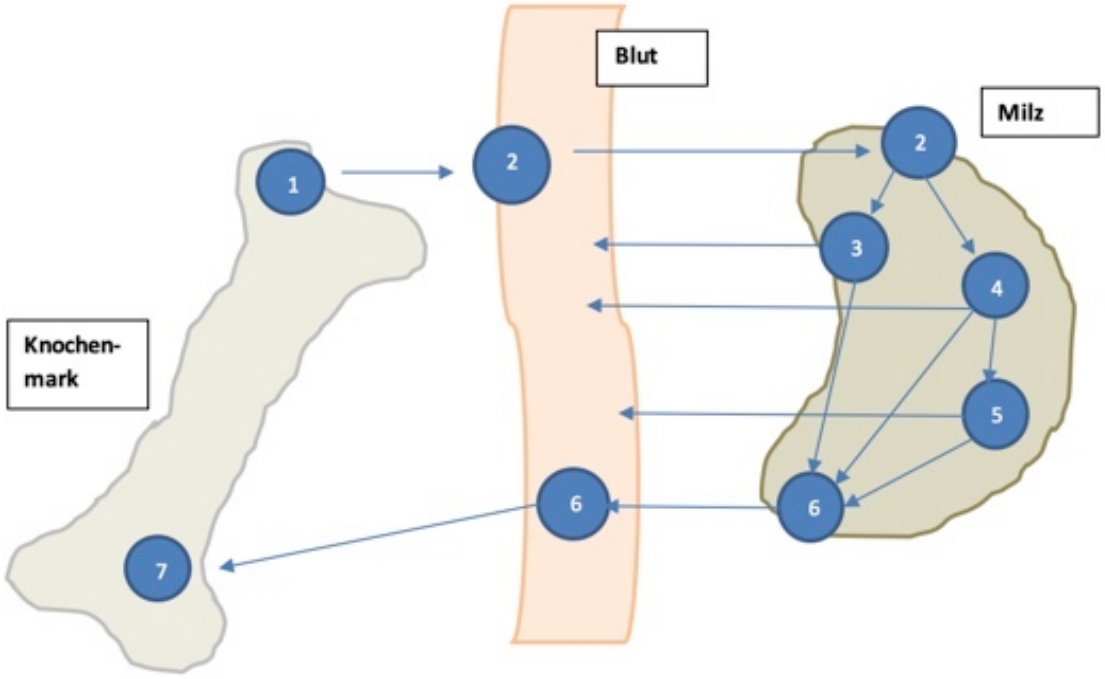


ABBILDUNG 1: ENTWICKLUNG DER B-ZELLEN UND DER SUBPOPULATIONEN, ADAPTIERT [NACH 28]: 1 = STAMMZELLE, 2 = TRANSITIONALE B-ZELLE, 3 = MARGINALZONEN B-ZELLE, 4 = FOLLIKULÄRE B-ZELLE, 5 = GEDÄCHTNIS-B-ZELLE, 6 = PLASMABLAST, 7 = PLASMAZELLE

Die jeweiligen B-Zell-Populationen lassen sich anhand von Oberflächenmarkern unterscheiden. Von großer Bedeutung sind dabei die Oberflächenantigene CD (cluster of differentiation) und die exprimierten B-Zellrezeptoren als membranständige Immunglobuline [28]. Im Abschnitt „Material und Methoden“ wird ausführlich auf die Expression der Marker bei den Zell-Populationen eingegangen.

1.3. Beurteilung der Milzfunktion

Zur Beurteilung der Funktion der Milz werden verschiedene Verfahren genutzt. Als Goldstandard gilt nach wie vor die Milz-Szintigrafie mit Technetium-99m (^{99m}Tc)-markierten, hitzegestressten Erythrozyten zur Beurteilung der Phagozytosekapazität [5, 19, 26]. Daher wird diese Methode oft als Referenz bei vergleichenden Studien zur Milzfunktion genutzt [5, 18, 19, 23].

Um die retikuloendotheliale Funktion der Milz darzustellen, d.h. den effektiven Abbau gealterter bzw. defekter Erythrozyten und anderer Blutbestandteile, kann man den Nachweis von sogenannten „löchrigen Erythrozyten“ (*englisch*: „pitted erythrocytes“ = PE) nutzen. Dabei handelt es sich um Erythrozyten mit Einschlussvakuolen innerhalb der Zellmembran, die unter dem Mikroskop dargestellt werden können und wie „Löcher“ (=“pits“) imponieren [14, 18, 19]. Diese Zellen werden von der gesunden Milz eliminiert. Bei einem erhöhten Anteil solcher „pitted erythrocytes“ kann man von einer erniedrigten Milzfunktion ausgehen.

Der Nachweis von HJB ist eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der retikuloendothelialen Funktion. Diese sind basophile DNA-Reste, die während der Entwicklung in Erythrozyten zurückbleiben können. Die Entfernung setzt eine intakte Milz voraus. Ist dies nicht der Fall, können die HJB lichtmikroskopisch im peripheren Blutausstrich nachgewiesen werden [12, 22].

Die verschiedenen B-Zell Populationen kann man in einer Analyse in der Durchflusszytometrie (Handelsname der Firma BD: FACS („fluorescence-activated cell sorter“)) anhand charakteristischer Oberflächenmarker unterscheiden. So lassen sich sowohl absolute als auch prozentuale Anteile jeder Subpopulation bestimmen [17, 28, 30].

1.4. Einfluss onkologischer Therapieverfahren auf die Milzfunktion

1.4.1. Strahlentherapie

In der Literatur findet man zu den strahleninduzierten Folgen auf die Milzfunktion ältere Arbeiten aus den 1980er Jahren, die sich der Milz-Szintigrafie und der Funktionsmessung über die PE bedienten. Dabei wurden sowohl eine Verkleinerung des Milzvolumens als auch erhöhte PE-Werte gemessen. Die Strahlentherapie zählt damit zu den Risikofaktoren für eine verminderte Funktion der Milz, wobei beide Studien keine einheitliche Aussage zu dem Einfluss einer zusätzlichen Chemotherapie treffen [7, 25]. Auch eine aktuellere Studie aus dem Jahr 2010 geht von einer Bestrahlung der Milz als mögliche Ursache einer Hyposplenie aus. Genauere Angaben zu deren Auswirkung werden allerdings nicht getroffen [22].

Bei dem Effekt der Strahlentherapie auf die Milzfunktion spielen verschiedene Parameter eine wichtige Rolle. Zum einen muss man das Bestrahlungsfeld betrachten. So ist ein negativer Effekt, das heißt eine funktionelle Hyposplenie, vor allem nach direkter Milzbestrahlung und weniger nach Ganzkörperbestrahlung festzustellen [7].

Außerdem kann man von einem dosisabhängigen Effekt ausgehen. Unterhalb von 22 Gy konnten keine signifikanten Langzeitveränderungen nachgewiesen werden, während eine Dosis über 40 Gy fast immer mit solchen einhergeht [7, 25]. Unterhalb dieser Strahlendosis ist es möglich, dass es zu einer passageren Funktionsminderung kommt, die mittels PE nicht nachweisbar ist [25]. Folglich ist es nicht möglich, eine Minimaldosis zu bestimmen, unter der eine Beeinflussung der Milzfunktion ausgeschlossen ist [7].

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass der Effekt auf die Milz offensichtlich verzögert nach vier bis fünf Jahren eintritt. Dadurch kann es passieren, dass sich trotz anfänglich normaler Kontrollwerte später eine funktionelle Hyposplenie ausbildet [7, 25].

1.4.2. Chemotherapie

Die Chemotherapie per se schwächt das Immunsystem durch die Myelotoxizität und eine konsekutive Lymphozytopenie und Granulozytopenie [11, 20, 21, 31]. Neben der reinen Reduktion der Zellzahl sind auch die Granulozytenfunktion und die Immunglobulinlevel vermindert [21].

Als mehrheitliche Kernaussage gilt, dass Chemotherapie, Strahlentherapie und Splenektomie synergistische Effekte in Hinblick ein erhöhtes Risiko für eine Septikämie bzw. bakterielle Infektionen zeigen [16, 18, 20, 21].

1.4.3. Datenlage bei Kindern

Insgesamt findet man wenig aktuelle Daten zu den direkten Auswirkungen einer intensiven Chemotherapie auf die Milzfunktion bei Kindern.

Bedingt durch den myelotoxischen Effekt und das geschwächte Immunsystem, steigt die Infektanfälligkeit [20, 21, 23, 24]. Dies zeigte sich z.B. schon in einer frühen Studie von 1978 von Donaldson et al., in welcher Therapiemöglichkeiten bei M. Hodgkin anhand des Infektionsrisikos verglichen wurden. Unter alleiniger Radiatio bzw. Splenektomie war dieses kaum erhöht, während eine zusätzliche Chemotherapie die Infektionsraten deutlich steigerte [11].

Bei pädiatrischen Patienten veröffentlichten Tilburg et al. 2011 eine Studie, in der sie die Veränderungen der einzelnen B-Lymphozyten Subsets vor, während und nach reduzierter und intensiver Chemotherapie beobachteten. Dabei zeigten sich vor allem die transitionalen und naiven B-Zellen sowie die IgM Memory B-Zellen nach intensiver Chemotherapie reduziert. Insbesondere die Subpopulationen der Memory B-Zellen benötigten längere Zeit zur Normalisierung [27].

Über den Nachweis der retikuloendothelialen Funktion findet man im Zusammenhang mit einer Chemotherapie wenig Daten. Eine ältere Studie von Buchanan et al. konnte erhöhte PE-Werte bei pädiatrischen Krebspatienten feststellen. Allerdings konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob dies in der Krankheit an sich oder in der Chemotherapie begründet liegt [3]. Lehmberg et al. konnten später keine erhöhten PE-Werte bei pädiatrischen Patienten nach Chemotherapie im Rahmen einer akuten Leukämie nachweisen [19].

1.5. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss einer intensiven Chemotherapie bei Kindern auf die hämatologische und immunologische Milzfunktion zu erfassen.

Bei der Untersuchung haben wir uns auf je einen Parameter für die phagozytäre und die immunologische Funktion beschränkt:

- Messung der PE (Marker für die phagozytäre Funktion)
- Durchflusszytometrie (Marker für die immunologische Funktion)

Beide Methoden sind im klinischen Alltag anwendbar und in der Literatur bereits beschrieben.

Aufgrund der geringen aktuellen Datenlage soll untersucht werden, ob man von einer generellen Beeinträchtigung der Milzfunktion nach einer Chemotherapie ausgehen kann. In Zusammenschau der Ergebnisse wäre eine Reevaluation der klinischen Nachsorge gegebenenfalls in Betracht zu ziehen.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Kontrollkollektiv

Die Datenerhebung im Rahmen der Studie erfolgte prospektiv im Zeitraum von November 2014 bis Februar 2018 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Ulm. Dabei wurden zwei Studienkollektive gebildet.

Die Patientengruppe setzte sich aus 33 pädiatrischen Patienten der onkologischen Tagesklinik im Alter zwischen 1 ½ und 18 Jahren zusammen (Durchschnittsalter 7,3 Jahre), von denen 19 männlich und 14 weiblich waren. Während der Studie verstarb eine Patientin. Ihre Ergebnisse wurden in die Auswertung inkludiert.

Unabhängig von der Grunderkrankung wurde als Erhebungszeitpunkt die Abschlussuntersuchung gewählt. Diese erfolgt innerhalb von 3 Monaten nach der letzten Gabe der jeweiligen Chemotherapie, jedoch noch vor Beginn einer oralen Erhaltungstherapie, sollte diese im Therapieregime vorgesehen sein. Die Verteilung der Grunderkrankungen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

TABELLE 1: VERTEILUNG DER GRUNDERKRANKUNGEN IM PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIV; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, NHL = NON-HODGKIN LYMPHOM, ZNS = ZENTRALES NERVENSYSTEM, AML = AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

Grunderkrankung		Patientenzahl
ALL		10
NHL		4
Morbus Hodgkin		3
Tumore des ZNS	Anaplastisches Ependymom	1
	Optikusgliom	2
Neuroblastom		3
AML		2
Nephroblastom		2
Osteoplastisches Osteosarkom		2
Retinoblastom		1
Hepatoblastom		1
Rhabdoidtumor der Niere		1
Angiosarkom		1

Innerhalb des Patientenkollektivs erhielt die Patientin mit dem Rhabdoidtumor der Niere eine zusätzliche Bestrahlung. Diese erfolgte ein Jahr vor dem Erhebungszeitpunkt und umfasste eine Gesamtstrahlendosis von 19,8 Gy.

Als Kontrollgruppe wurden Daten von 30 pädiatrischen Patienten der hämostaseologischen Ambulanz im Alter von drei bis 17 Jahren (Durchschnittsalter 8,3 Jahre) gesammelt. Das Geschlecht verteilte sich auf 17 männliche und 13 weibliche Probanden. Bei der Patientenwahl galten folgende Ausschlusskriterien:

- Zustand nach (Z.n.) Chemotherapie
- Grunderkrankung des hämatologischen oder lymphatischen Systems

Die Aufklärung wurde von den zuständigen Stationsärzten durchgeführt und von den Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten unterschrieben.

Die Blutabnahmen erfolgten durch das medizinische Personal der Kinderklinik auf der jeweiligen Station. Es wurden folgende Proben entnommen:

- 4,8ml Blut (Lithium-Heparin-Monovette)
- 1ml Vollblut (ohne gerinnungshemmende Reagenzien)
- 1,2 bzw. 2,7ml Blut (EDTA-Monovette)

2.2. Nachweis von „pitted erythrocytes“

Zunächst soll hier die Untersuchung der sogenannten „pitted erythrocytes“ aufgezeigt werden. Als „pit“ bezeichnet man submembranöse Vakuolen in den Erythrozyten, die während der Zellentwicklung entstehen. Erythrozyten mit solchen Vakuolen werden im gesunden Milzgewebe im Verlauf eliminiert. Bei einer Beeinträchtigung der Milzfunktion kann dieser Vorgang gestört und damit die Anzahl der „pitted“ Erythrozyten erhöht sein. Der Begriff „pitted erythrocytes“ (PE) wird im laufenden Text analog weiterverwendet, da es keinen gängigen deutschen Fachterminus dafür gibt.

Für die Untersuchung benötigt man einen 1%igen Glutaraldehydpuffer. Dieser wird aus folgenden Reagenzien hergestellt:

- 10ml Glutaraldehydlösung, EM Grade, 8% (Firma Polysciences Europe GmbH)
- 70ml 0,1 molaren KH_2PO_4 (Firma Roth)

Die Untersuchung der PE erfolgt mit der 1ml Vollblutprobe. Direkt nach Abnahme werden 250 µl Vollblut in 1250 µl Glutaraldehydpuffer pipettiert und danach kühl gelagert. Sowohl die hergestellten Proben als auch die Pufferlösung sind gekühlt drei Monate haltbar.

Für die mikroskopische Untersuchung werden nach vorsichtiger Resuspensierung 10 µl auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Es folgt die Auszählung von 500 intakten Erythrozyten unter dem Phasenkontrastmikroskop mit Nomarski-Optik (Firma Olympus AX70) bei 60facher Vergrößerung. Als PE zählen dabei die Erythrozyten, die eindeutige, lichtintensive Eindellungen der Membran unter ständiger Nachfokussierung aufweisen. Abbildung 2 und 3 zeigen Erythrozyten von Studienpatienten als Beispiel für die Darstellung der PE.

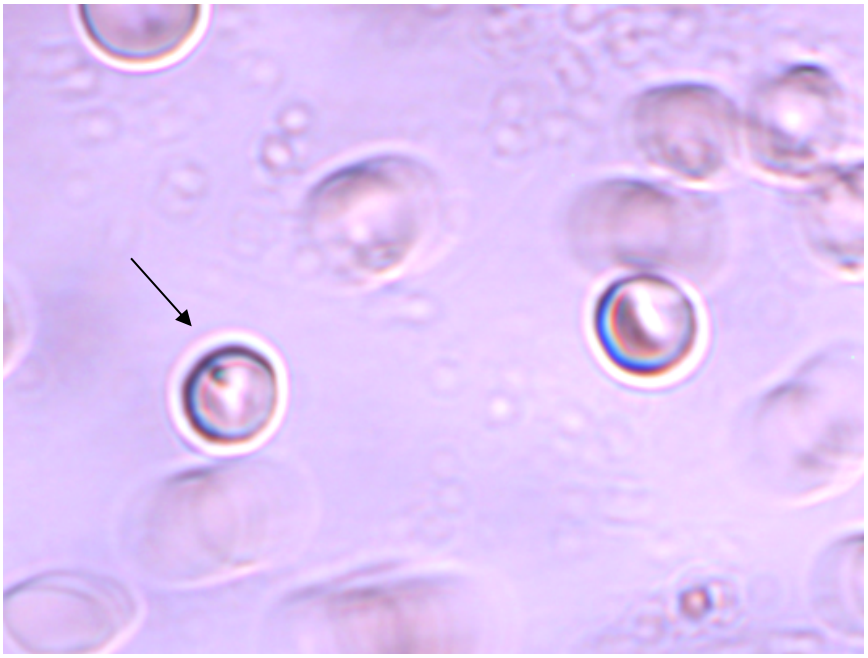


ABBILDUNG 2: PITTED ERYTHROCYTE UNTER DEM PHASENKONTRASTMIKROSKOP, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

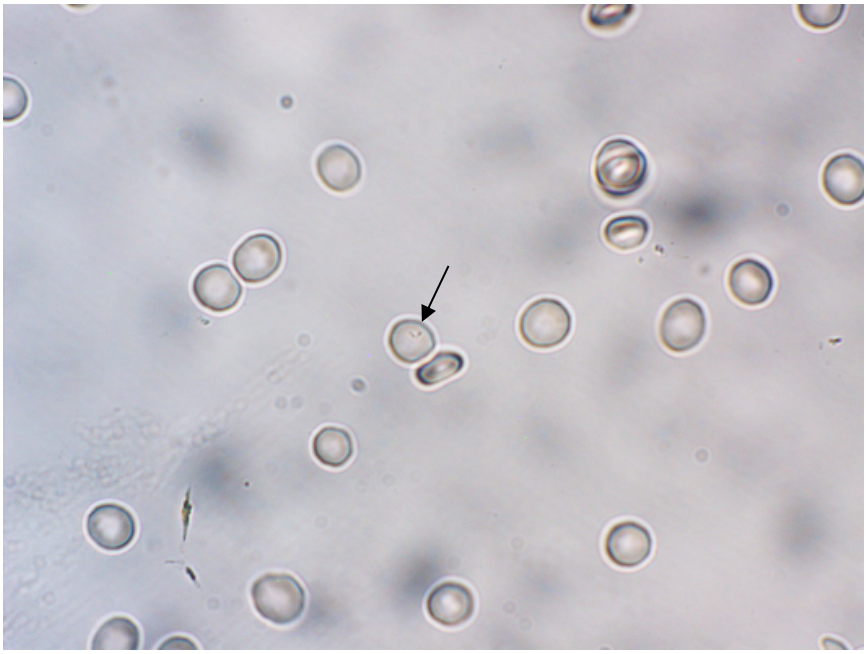


ABBILDUNG 3: PITTED ERYTHROCYTE UNTER DEM PHASENKONTRASTMIKROSKOP, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

Der Prozentsatz der PE an den ausgezählten Erythrozyten insgesamt dient mit Hilfe der in der Literatur angegebenen Grenzwerte als Auswertungskriterium. Da die Angaben in der Literatur [9, 10, 18, 19, 23, 26] differieren, haben wir uns für folgende Grenzen entschieden:

- $\leq$ 2% PE: normwertig
- 2 bis 4% PE: grenzwertig erhöht (Graubereich)
- $\geq$ 4% PE: eindeutig erhöht

2.3. Lymphozyten-Immunphänotypisierung (Durchflusszytometrie)

Im Rahmen der Blutabnahme wurde bei jedem Probanden ein maschinelles und manuelles Blutbild aus EDTA-Blut in der Abteilung „Klinische Chemie“ der Universitätsklinik Ulm erstellt. Die erhaltenen absoluten und prozentualen Leukozyten- und Lymphozytenwerte stellen die Grundlage für die Berechnung der absoluten Zahlen der Lymphozytensubpopulationen dar.

Für die Durchflusszytometrie wird eine Lithium-Heparin-Monovette mit 4,8ml Blut abgenommen. Die Untersuchung am Navios Durchflusszytometer (Firma Beckmann-

Coulter) und die Ergebnismitteilung erfolgten durch das Immunologische Labor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin.

Mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen spezielle Oberflächenmarker der B-Lymphozyten ist es möglich, den prozentualen Anteil der B-Zellen, aber auch der verschiedenen Subpopulationen, wie z.B. der MZ B-Zellen, der switched Memory B-Zellen oder der transitionalen B-Zellen, zu ermitteln. Die entsprechenden Oberflächenmarker sind im Folgenden dargestellt:

- ***CD19***: B-Zell-Marker
- ***CD20***: B-Zell-Marker bis Memory-B-Zellen, nicht auf Plasmablasten exprimiert
- ***CD27***: Memory-B-Zell-Marker
- ***CD38***: hoch exprimiert auf frühen Formen der B-Zellen (z.B. transitionale B-Zellen) und Plasmablasten
- ***IgM^+ + IgD^+***: naive B-Zellen (vor dem Antigenkontakt und Klassenwechsel (= class-switch))
- ***IgM^+ <u>oder</u> IgD^+***: IgM- / IgD-only-Zellen
- ***IgM^- + IgD^-***: switched B-Zellen

Die genaue Charakterisierung der B-Zell-Populationen erfolgt anhand der Analyse hoch exprimierter Marker. Zum Beispiel weisen sowohl transitionale B-Zellen als auch Plasmablasten eine hohe Exprimierung von CD38 auf. Allerdings findet man bei transitionalen B-Zellen zusätzlich eine hohe IgM-Exprimierung, welche bei Plasmablasten nur gering nachweisbar ist.

Von Bedeutung für die Genauigkeit der Durchflusszytometrie ist, dass das Blut nicht gekühlt gelagert und innerhalb von 24 Stunden untersucht wird. In Einzelfällen wäre es möglich, mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenseparation aus der Blutprobe zu isolieren und einzufrieren. Dadurch können die Zellen auch Jahre später noch analysiert werden. Das kann z.B. nötig sein, wenn Proben eingeschickt werden oder eine Analyse zum

Abnahmezeitpunkt nicht möglich ist. Allerdings kann dies die Auswertung erschweren und zu ungenauen Ergebnissen führen.

Für verwertbare Ergebnisse müssen mindestens 20 000 Lymphozyten und wenigstens 50 bis 200 Zellen pro differenzierter Lymphozytenpopulation im Blutbild gemessen werden. Andernfalls ist eine durchflusszytometrische Analyse nicht möglich.

2.4. Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Windows Excel. Betrachtet wurden folgende Variablen:

- **PE-Wert**: Prozentsatz der „pitted erythrocytes“ pro 500 Erythrozyten
- **Lymphozyten** (absoluter und prozentualer Wert)
- **Transitionale B-Zellen**:
    - B-Lymphozyt vor der Reifung in der Milz
    - Phänotyp: $CD19^{+}, CD38^{++}, IgM^{++}$
- **MZ like B-Zellen**:
    - B-Lymphozyten, die in der Marginalzone der Milz aus transitionalen B-Zellen entstehen und eine wichtige Rolle in der T-Zell-unabhängigen Immunantwort spielen
    - Phänotyp: $CD19^{+}, CD27^{+}, IgM^{+}, IgD^{+}$
- **Plasmablasten** (IgM spezifische und switched Plasmablasten):
    - spezialisierte B-Lymphozyten nach der Entwicklung in der Milz
    - Phänotyp: $CD20^{-}, CD27^{+}, IgM^{+/-}$

Dabei interessierten uns jeweils der Minimalwert (MIN), der Maximalwert (MAX), der Median (MED) sowie der Mittelwert (MW) mit zugehöriger Standardabweichung (SD).

Zur Überprüfung der Signifikanz dieser Werte, das heißt, wie stark sich die Stichproben der zwei Probandengruppen unterschieden, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Bei einem angenommenen Konfidenzniveau von 95% ergibt sich als Referenzwert $p < 0,05$ und ein Z-Wert von $|-1,96|$. Dieser Z-Wert wird gemeinsam mit dem errechneten Z-Score und p-Wert des Mann-Whitney-U-Test betrachtet. Bei $|Z\text{-Score}| > |-1,96|$ und einem p-Wert $< 0,05$ liegt ein signifikanter Unterschied der zwei Stichproben mit einem Konfidenzniveau von 95% vor.

Neben der Auswertung der gesamten Patientenpopulation erfolgte eine gesonderte Betrachtung der sogenannten „ALL-Gruppe“ (ALL = akute lymphatische Leukämie). Hierbei handelt es sich um eine bzgl. des Therapieregimes homogene Patientengruppe. Ziel der gesonderten Analyse war es, zu überprüfen, inwiefern Ergebnisse aus der Analyse der Gesamtgruppe der Patienten möglicherweise in einer solchen Subgruppe deutlicher zu tragen kommen. In die „ALL-Gruppe“ wurden folgende 11 Patienten inkludiert:

- Patienten mit ALL (dabei entfiel ein Patient, aufgrund einer reifen B-ALL mit einem anderen Therapieprotokoll);
  n=9
- Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) (bei einer Behandlung ähnlich einer ALL);
  n=2

2.5. Ethikantrag

Der Ethikantrag wurde am 30.09.2014 unter dem Antrag Nr. 225/14 – „Untersuchung der Milzfunktion pädiatrisch-onkologischer Patienten nach intensiver Chemotherapie“ von der Ethikkommission der Universität Ulm mit einem positiven Votum beschieden.

3. ERGEBNISSE

3.1. PE-WERT

Zur Beurteilung der retikuloendothelialen Funktion der Milz, diente die Untersuchung hinsichtlich der „pitted erythrocytes“ (PE).

Mikroskopisch wurden (sub-)membranöse Vakuolen in Erythrozyten untersucht und die Gesamtzahl der betroffenen Zellen pro 500 Erythrozyten als Prozentzahl ermittelt. Dabei konnten 30 Kontrollpersonen und 20 Patienten untersucht werden. Die Grenzwerte aus der Literatur übernahmen wir wie folgt:

- Physiologischer PE-Wert: < 2%
- Grenzbereich des PE-Werts: 2 – 4%
- Pathologischer PE-Wert > 4%

Danach ergab sich folgende Verteilung in beiden Gruppen.

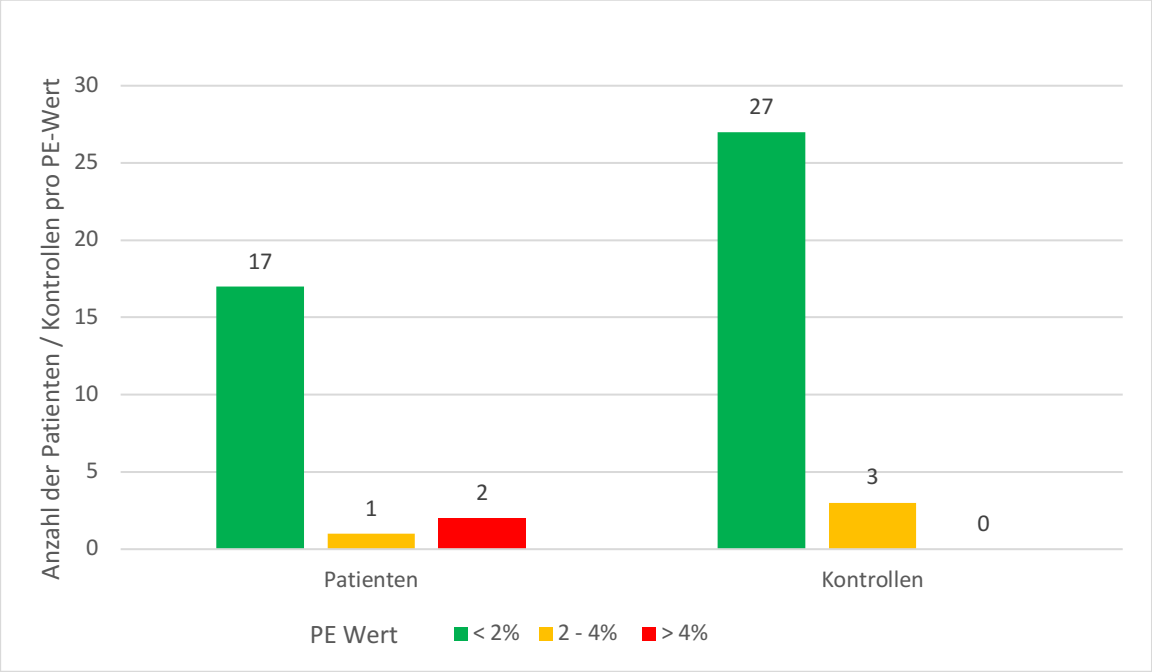


ABBILDUNG 4: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER „PITTED ERYTHROCYTES“(PE)-WERTE IM PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIV UND IM KONTROLLKOLLEKTIV, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

In der folgenden Tabelle sind die Probanden, die einen PE-Wert > 2% zeigten, noch einmal nach Diagnose und Zeitpunkt der Blutabnahme mit exakten Werten aufgeführt.

TABELLE 2: AUFSCHLÜSSELUNG DER AUFFÄLLIGEN „PITTED ERYTHROCYTES"(PE)-WERTE > 2% IM PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIV UND IM KONTROLLKOLLEKTIV; I.R. = IM RAHMEN, ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, NHL = NON-HODGKIN LYMPHOM, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Diagnose	Zeitpunkt Blutabnahme	PE-Wert
Kontrolle 1	Keine hämatologische Grunderkrankung	i. R. von Ambulanzbesuch	2,2 %
Kontrolle 2	Keine hämatologische Grunderkrankung	i. R. von Ambulanzbesuch	2,6 %
Kontrolle 3	Keine hämatologische Grunderkrankung	i. R. von Ambulanzbesuch	2,8 %
Patient 1	ALL	Nach intensiver Chemotherapie	4,09 %
Patient 2	NHL	Nach intensiver Chemotherapie	3,07 %
Patient 3	ALL	Nach intensiver Chemotherapie	4,54 %

Die weitere statistische Auswertung ergab erwartungsgemäß bei den Patienten tendenziell höhere Werte für den Median sowie den Mittelwert, die aber bei Ermittlung des Z-Scores nicht signifikant verändert waren.

TABELLE 3: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER „PITTED ERYTHROCYTES"-WERTE IM PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIV UND IM KONTROLLKOLLEKTIV; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n = 20)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN (%)	0,2	0,2
MAX (%)	4,5	2,8
MED (%)	1,2	1,0
MW ± SD (%)	1,5 ± 1,2	1,1 ± 0,7

Um die Signifikanz dieser Werte zu überprüfen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dabei ergab sich ein Z-Score von -0,39 und ein p = 0,7. Daher zeigte sich für den PE-Wert kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe.

3.2. LYMPHOZYTEN ABSOLUT UND PROZENTUAL

Die Lymphozytenzahl von 33 Patienten und 30 Kontrollen wurde durch die Klinische Chemie im Blutbild ermittelt.

Zunächst betrachteten wir in beiden Gruppen die absoluten Lymphozytenwerte.

TABELLE 4: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ABSOLUTEN LYMPHOZYTENWERTE IN EDTA-BLUTPROBEN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n = 33)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN (/µl)	460	1321
MAX (/µl)	3397	5656
MED (/µl)	1106	2907,5
MW ± SD (/µl)	1410,3 ± 805,2	3118,3 ± 1196,9

Insgesamt zeigten sich die Werte der Patientengruppe erniedrigt. Es ergab sich ein Z-Score = -5,11 mit einem $p < 0,00001$ und damit ein statistisch signifikanter Unterschied der Testergebnisse mit einem Signifikanzniveau von 95%.

Um den prozentualen Anteil der Leukozyten an den Lymphozyten im Kontext besser einschätzen zu können, sind in der folgenden Tabelle die absoluten Leukozytenwerte angegeben.

TABELLE 5: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ABSOLUTEN LEUKOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n = 33)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN (/µl)	1300	4300
MAX (/µl)	7600	10300
MED (/µl)	3900	6850
MW ± SD (/µl)	4100 ± 1700,3	7056,7 ± 1821,7

Ebenso wie die absolute Lymphozytenzahl waren im Patientenkollektiv die absoluten Werte der Leukozyten signifikant erniedrigt mit einem $p < 0,00001$ und einem Z-Score = 5,13.

In Hinblick auf den prozentualen Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten ergaben sich folgende Werte.

TABELLE 6: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LYMPHOZYTEN AN DEN LEUKOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n = 31)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN (%)	11	21,3
MAX (%)	97	67,6
MED (%)	32	43
MW ± SD (%)	37,5 ± 18,2	43,8 ± 11

Die Werte des Patientenkollektivs zeigte eine größere Streuung zwischen MIN und MAX. Statistisch überprüft ergibt sich für den relativen Anteil der Lymphozyten ein Z-Score = 0,31 (p = 0,76), womit es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen gibt.

3.3. Transitionale B-Zellen

Die Bestimmung der transitionalen B-Zellen erfolgte über die Durchflusszytometrie. Von den 33 Patienten konnte diese Untersuchung bei insgesamt 28 Patienten durchgeführt werden. Bei 5 Patienten war dies aufgrund zu niedriger Lymphozytenwerte oder zu niedriger Zellzahl in den Subpopulationen nicht möglich. In der Kontrollgruppe konnten alle Probanden inkludiert werden, wobei sich bei einer Probandin grenzwertig erhöhte Werte zeigten.

TABELLE 7: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER TRANSITIONALEN B-LYMPHOZYTEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n = 28)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	0,5 *1*	0,9 *2*
MAX: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	82 *813*	9,2 *113*
MED: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	36,5 *34,5*	4,8 *27*
MW ± SD: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	37,8 ± 25,5 *91,8 ± 154,1*	4,6 ± 2,1 *32,8 ± 26,2*

Die statistischen Werte sind aus Tabelle 7 zu entnehmen. Der prozentuale Anteil bezieht sich auf die Gesamtzahl der B-Lymphozyten. Zusätzlich sind die absoluten Werte eingefügt. Auch hier zeigt sich bei der Patientengruppe eine höhere Streuung der Werte mit gleichzeitig deutlich erhöhten Werten im Bereich den MED und MW. Bei der Ermittlung des Z-Scores ergab sich ein Wert = -4,87 ($p < 0,00001$). Das bedeutet, dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen zeigt und die transitionalen B-Lymphozyten in der Patientengruppe anteilig und absolut erhöht sind.

3.4. MZ LIKE B-ZELLEN

Für die Auswertung der MZ like B-Zellen, also der milzspezifischen B-Zellen, wurden dieselben Patienten wie für die transitionalen B-Zellen untersucht. Dadurch ergibt sich eine Probandenzahl bei den Patienten von n = 28 und bei den Kontrollen von n = 30. Bei der Probandin der Kontrollgruppe mit den erhöhten transitionalen B-Zellen waren die MZ like B-Zellen ebenfalls grenzwertig erniedrigt.

TABELLE 8: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER MARGINALZONEN LIKE B-ZELLEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n = 28)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	1,1 0	3,5 11
MAX: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	12,7 58	21,5 213
MED: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	2,65 4	8,2 43,5
MW ± SD: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	3,29 ± 2,3 10,39 ± 13,75	8,8 ± 3,58 60,4 ± 51,1

Es fällt auf, dass sowohl der MED als auch der MW in der Patientengruppe unter denen der Kontrollgruppe liegen. Mit der statistischen Überprüfung mittels des Mann-Whitney-U-Tests zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Z-Score = 4,78; $p < 0{,}00001$). Dies bedeutet, dass der prozentuale Anteil der MZ like B-Zellen in der Patientengruppe signifikant unter dem der Kontrollgruppe liegt.

3.5. PLASMABLASTEN: IGM UND SWITCHED

Als letzte Subpopulation wurde der prozentuale Anteil der Plasmablasten in beiden Gruppen untersucht. Auch hier konnten die Proben von 28 Patienten und 30 Kontrollen verwendet werden.

Zunächst betrachten wir die IgM Plasmablasten, deren statistische Auswertung in Tabelle 9 zu finden ist.

TABELLE 9: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER IMMUNGLOBULIN M PLASMABLASTEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n = 28)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	0 0	0 0
MAX: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	19 16	0,6 5
MED: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	0,7 1	0,2 1
MW ± SD: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	2 ± 4,3 2,3 ± 3,9	0,2 ± 0,2 1,4 ± 1,1

Mittels Mann-Whitney-U-Test konnte mit diesen Werten ein Z-Score = -2,23 und p = 0,03 ermittelt werden. Dies bedeutet, dass die IgM Plasmablasten in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht sind.

Die switched Plasmablasten, das heißt, die Plasmablasten, die IgM^- und IgD^- sind, zeigen folgende prozentuale Anteile.

TABELLE 10: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES PROZENTUALEN ANTEILS DER SWITCHED PLASMABLASTEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS UND DES KONTROLLKOLLEKTIVS; MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Patientengruppe (n =28)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual* (%) *absolut (/µl)*	0,1 0	0,1 1
MAX: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	66 72	4,7 16
MED: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	3,05 4	0,8 4
MW ± SD: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	7,8 ± 12,9 7,7 ± 13,4	1,04 ± 0,9 5,3 ± 4

In dieser Subpopulation fällt in der Patientengruppe wieder eine große Streuung der MIN und MAX auf, wodurch sich auch der MED und MW erhöht zeigt. Bei einem Z-Score = -3,25 und einem p = 0,0012 ist dies als signifikanter Unterschied und damit als nachgewiesene Erhöhung der switched Plasmablasten in der Patientengruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu deuten.

3.6. PATIENTENGRUPPE „ALL“

Zur genaueren Untersuchung einer Diagnosegruppe wurde zusätzlich eine Subgruppe (folgend bezeichnet als „ALL“) gebildet. Eingeschlossen wurden Patienten mit einer ALL oder einem NHL, die nach dem ALL-Protokoll (ALL-BFM 2009 bzw. NHL-BFM 2012) behandelt wurden. Trotz verschiedener Diagnosen war dadurch eine ähnliche Behandlung gewährleistet. Insgesamt wurden 9 ALL-Patienten und 2 NHL-Patienten eingeschlossen. Von den insgesamt 11 ALL-Patienten konnte nur bei 9 Personen die Analyse der PE-Werte durchgeführt werden. Die Durchflusszytometrie war aufgrund zum Teil zu geringer Zellwerte nur bei 8 Patienten möglich.

Die Ergebnisse der Subgruppe wurden denen der Hauptgruppe „Kontrollen“ gegenübergestellt und anschließend der Mann-Whitney-U-Test benutzt, um die Z-Scores der Hauptgruppe „Patienten“ und der Subgruppe „ALL“ zu vergleichen. Der Übersichtlichkeit wegen werden die Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

TABELLE 11: VERGLEICH PATIENTENGRUPPE ALL UND KONTROLLKOLLEKTIV BEZÜGLICH PITTED ERYTHROCYTES; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	ALL (n = 9)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN (%)	0,4	0,2
MAX (%)	4,54	2,8
MED (%)	1,6	1,0
MW ± SD (%)	2,1 ± 1,4	1,1 ± 0,7

Bei einem Z-Score = -0,78 und einem ermitteltem p = 0,44 ergibt sich in der ALL-Gruppe bezüglich der PE-Werte kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe.

TABELLE 12: VERGLEICH PATIENTENGRUPPE ALL UND KONTROLLKOLLEKTIV BEZÜGLICH ABSOLUTER LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	ALL (n = 11)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN (/µl)	460	1321
MAX (/µl)	3397	5656
MED (/µl)	1106	2907,5
MW ± SD (/µl)	1528,9 ± 918,4	3118,3 ± 1196,9

Mit einem berechneten Z-Score = 3,12 und einem p-Wert = 0,0018 zeigen sich signifikant verringerte absolute Lymphozytenwerte in der ALL-Gruppe.

TABELLE 13: VERGLEICH PATIENTENGRUPPE ALL UND KONTROLLKOLLEKTIV BEZÜGLICH PROZENTUALER LYMPHOZYTEN AN DEN GESAMTLEUKOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	ALL (n = 11)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN (%)	16	21,3
MAX (%)	97	67,6
MED (%)	32	43
MW ± SD (%)	36,7 ± 21,7	43,8 ± 11

Bei dem prozentualen Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der ALL-Gruppe und dem Kontroll-Kollektiv nachweisen (Z-Score = 0,8; p = 0,42).

TABELLE 14: VERGLEICH PATIENTENGRUPPE ALL UND KONTROLLKOLLEKTIV BEZÜGLICH PROZENTUALER TRANSITIONALER B-ZELLEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	ALL (n = 8)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	0,5 1	0,9 *2*
MAX: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	80 813	9,2 *113*
MED: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	58 51,5	4,8 *27*
MW ± SD: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	48,9 ± 25,6 154 ± 255	4,6 ± 2,1 *32,8 ± 26,2*

Im Vergleich der ALL-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergibt sich ein signifikanter Unterschied, d.h. die transitionalen B-Zellen sind in der ALL-Gruppe erhöht (Z-Score = -3,25; p = 0,0012).

TABELLE 15: VERGLEICH PATIENTENGRUPPE ALL UND KONTROLLKOLLEKTIV BEZÜGLICH PROZENTUALER MARGINALZONEN LIKE B-ZELLEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	ALL (n = 8)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual (%)*	1,6	3,5
absolut (/µl)	1	11
MAX: *prozentual (%)*	4,6	21,5
absolut (/µl)	33	213
MED: *prozentual (%)*	2,5	8,2
absolut (/µl)	2,5	43,5
MW ± SD: *prozentual (%)*	2,7 ± 1,1	8,8 ± 3,58
absolut (/µl)	8,3 ± 10,6	60,4 ± 51,1

Die MZ like B-Zellen zeigen sich im Vergleich der zwei Kollektive in der ALL-Gruppe signifikant erniedrigt bei einem Z-Score = 3,37 und einem p = 0,00076.

TABELLE 16: VERGLEICH PATIENTENGRUPPE ALL UND KONTROLLKOLLEKTIV BEZÜGLICH PROZENTUALER IMMUNGLOBULIN M PLASMABLASTEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	ALL (n = 8)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	0,1 0	0 0
MAX: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	15 16	0,6 5
MED: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	1 1	0,2 1
MW ± SD: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	2,7 ± 4,7 2,9 ± 5	0,2 ± 0,2 1,4 ± 1,1

Bei einem Z-Score = -1,75 und einem errechneten p = 0,08 bei den IgM-Plasmablasten erreicht der Unterschied zwischen der ALL-Gruppe und dem Kontrollkollektiv keine statistische Signifikanz.

TABELLE 17: VERGLEICH PATIENTENGRUPPE ALL UND KONTROLLKOLLEKTIV BEZÜGLICH PROZENTUALER SWITCHED PLASMABLASTEN AN DEN B-LYMPHOZYTEN IN EDTA-BLUTPROBEN; ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, MIN = MINIMALWERT, MAX = MAXIMALWERT, MED = MEDIAN, MW = MITTELWERT, SD = STANDARDABWEICHUNG, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	ALL (n = 8)	Kontrollgruppe (n = 30)
MIN: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	0,4 2	0,1 1
MAX: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	66 72	4,7 16
MED: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	6,9 4	0,8 4
MW ± SD: *prozentual (%)* *absolut (/µl)*	14,2 ± 20,4 14,4 ± 22,6	1,04 ± 0,9 5,3 ± 4

Im Vergleich der zwei Kollektive zeigte sich bei dem switched-Plasmablasten ein signifikanter Unterschied (Z-Score = -2,62; p = 0,0088).

Die Gegenüberstellung der mittels Mann-Whitney-U-Test errechneten Z-Scores und p-Werte in der Patientengruppe insgesamt und der ALL-Subgruppe sind in Tabelle 18 zu finden. Auch wenn es geringfügige Abweichungen zwischen beiden Kollektiven gibt, ist die Tendenz hinsichtlich der signifikanten Unterschiede für den Großteil der untersuchten Kriterien gleich. Lediglich bei den IgM Plasmablasten unterscheidet sich das Ergebnis.

TABELLE 18: Z-SCORE IM VERGLEICH VOM PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIV VERSUS KONTROLLKOLLEKTIV UND PATIENTENGRUPPE ALL VERSUS KONTROLLKOLLEKTIV (IM VERGLEICH ZU KONTROLLEN ERHÖHT (↑), ERNIEDRIGT (↓) ODER VERGLEICHBAR (=)); ALL = AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE, IGM = IMMUNGLOBULIN M, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

		Patientengruppe	ALL
„pitted erythrocytes“	Z-Score p-Wert	-0,39 0,7 *Nicht signifikant (=)*	-0,78 0,44 *Nicht signifikant (=)*
Lymphozyten absolut	Z-Score p-Wert	-5,11 < 0,00001 *Signifikant (↓)*	3,12 0,0018 *Signifikant (↓)*
Lymphozyten prozentual	Z-Score p-Wert	0,31 0,76 *Nicht signifikant (=)*	0,8 0,42 *Nicht signifikant (=)*
Transitionale B-Zellen	Z-Score p-Wert	-4,87 < 0,00001 *Signifikant (↑)*	-3,25 0,0012 *Signifikant (↑)*
Marginalzonen like B-Zellen	Z-Score p-Wert	4,78 < 0,00001 *Signifikant (↓)*	3,37 0,00076 *Signifikant (↓)*
IgM Plasmablasten	Z-Score p-Wert	-2,23 0,03 *Signifikant (↑)*	-1,75 0,08 *Nicht signifikant (=)*
Switched Plasmablasten	Z-Score p-Wert	-3,25 0,0012 *Signifikant (↑)*	-2,62 0,0088 *Signifikant (↑)*

In den Untersuchungen der folgenden Werte gab es signifikant unterschiedliche Ergebnisse sowohl zwischen Kontroll- und Patientengruppe, als auch zwischen Kontroll- und ALL-Gruppe:

- Lymphozyten absolut (erniedrigt)
- Transitionale B-Lymphozyten (erhöht)
- MZ like B-Lymphozyten (erniedrigt)
- Switched Plasmablasten (erhöht)

Die IgM-Plasmablasten waren in beiden Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Allerdings war dieser Unterschied nur im Vergleich des kompletten Patientenkollektivs mit der Kontrollgruppe signifikant.

3.7. Nachuntersuchung von 2 Patienten

Es war uns möglich, zwei Probanden aus dem Patientenkollektiv nach zwei Jahren erneut zu untersuchen, so dass wir die Entwicklung der zuvor auffälligen Werte beobachten konnten.

Es handelte sich dabei gleichzeitig um Patienten aus der ALL-Gruppe, wobei ein Patient aufgrund einer ALL und ein Patient aufgrund eines NHL therapiert wurde. Die Erstuntersuchung erfolgte bei beiden Patienten nach der intensiven Chemotherapie des ALL-Protokolls.

Patient A (ALL-Patient) zeigte in der ersten Untersuchung erhöhte Werte der PE. Die Lymphozyten absolut waren bei normwertigem prozentualem Anteil an den Leukozyten erniedrigt. Aufgrund dessen konnten die erforderlichen Zellzahlen nicht gewährleistet werden, weshalb eine Durchflusszytometrie der Subpopulationen nicht möglich war.

TABELLE 19: ERGEBNISSE PATIENT A DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS MIT AUFFÄLLIGEN PITTED ERYTHROCYTES UND LABORWERTEN IN DER ERSTEN UNTERSUCHUNG; IGM = IMMUNGLOBULIN M, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Nach Intensivierungstherapie	Nach 2 Jahren
„pitted erythrocytes“ (%)	4,09	0,2
Lymphozyten absolut (/µl)	460	1092
Lymphozyten prozentual (%)	20	28
Transitionale B-Zellen		
prozentual (%)	-	4,1
absolut (/µl)	-	10
Marginalzonen like B-Zellen		
prozentual (%)	-	4,9
absolut (/µl)	-	12
IgM Plasmablasten		
prozentual (%)	-	0,6
absolut (/µl)	-	1
Switched Plasmablasten		
prozentual (%)	-	1,9
absolut (/µl)	-	4

Zwei Jahre nach Ende der intensiven Chemotherapie zeigten sich bei erneuter Untersuchung normalisierte PE-Werte. Auch die absoluten Lymphozyten lagen prozentual im Normbereich. Bei der nun durchführbaren Durchflusszytometrie zeigten sich die MZ like B-Zellen grenzwertig erniedrigt und die switched Plasmablasten geringfügig erhöht. Alle weiteren Werte waren normwertig.

Bei Patient B (NHL-Patient) waren zu beiden Untersuchungszeitpunkten alle Untersuchungen möglich. Direkt nach der intensiven Chemotherapie waren die Werte der PE wie bei Patient A erhöht. Die Lymphozyten lagen sowohl absolut als auch prozentual im Normbereich, ebenso wie die transitionalen B-Zellen. In der Durchflusszytometrie zeigten sich die MZ like B-Zellen im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv erniedrigt und sowohl die IgM als auch die switched Plasmablasten deutlich erhöht.

TABELLE 20: ERGEBNISSE PATIENT B DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS MIT AUFFÄLLIGEN PITTED ERYTHROCYTES UND LABORWERTEN IN DER ERSTEN UNTERSUCHUNG; IGM = IMMUNGLOBULIN M, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Nach Intensivierungstherapie	Nach 2 Jahren
„pitted erythrocytes“ (%)	3,07	0,4
Lymphozyten absolut (/µl)	3397	1512
Lymphozyten prozentual (%)	97	14
Transitionale B-Zellen		
prozentual (%)	0,5	11
absolut (/µl)	1	37
Marginalzonen like B-Zellen		
prozentual (%)	2,7	3,6
absolut (/µl)	3	12
IgM Plasmablasten		
prozentual (%)	15	0,2
absolut (/µl)	16	1
Switched Plasmablasten		
prozentual (%)	66	0,7
absolut (/µl)	72	2

In der Verlaufskontrolle nach zwei Jahren zeigten sich wie bei Patient A die PE-Werte im Normbereich. Auch die Auswertung der Durchflusszytometrie ergab bis auf grenzwertig erniedrigte MZ like B-Zellen unauffällige Ergebnisse.

3.8. Untersuchung bei kombinierter Radiochemotherapie

Um zusätzlich zur Auswirkung der Chemotherapie den Effekt einer gleichzeitigen Radiatio zu evaluieren, haben wir eine Probandin aus dem Patientenkollektiv einzeln betrachtet. Die Patientin erhielt aufgrund eines Rhabdoidtumors der linken Niere eine Bestrahlungstherapie. Diese erfolgte ca. neun Monate vor unserer Untersuchung in mehreren Teilsitzungen mit einer Zieldosis von 19,8 Gy.

In der Durchflusszytometrie bei der Abschlussuntersuchung nach Chemotherapie zeigten sich dabei bis auf erhöhte transitionale B-Lymphozyten normwertige Anteile. Hervorzuheben ist, dass trotz der Strahlentherapie keine zusätzliche Erniedrigung der MZ like B-Zellen verursacht wurde.

Bei einer erneuten Kontrolle nach knapp drei Jahren zeigten sich im Verlauf bis auf weiterhin erhöhte transitionale B-Lymphozyten normwertige Ergebnisse in der Durchflusszytometrie. Auch die PE-Werte waren nicht erhöht.

TABELLE 21: STATISTSISCHE AUSWERTUNG DER PITTED ERYTHROCYTES UND DER LABORWERTE IN DER EDTA-BLUTPROBE DER PATIENTIN DES PÄDIATRISCH-ONKOLOGISCHEN PATIENTENKOLLEKTIVS MIT ZUSÄTZLICHER RADIATIO; IGM = IMMUNGLOBULIN M, UNIVERSITÄTSKLIKUM ULM, 2014-2019

	Nach Intensivierungstherapie	Nach 3 Jahren
„pitted erythrocytes“ (%)	-	1,33
Lymphozyten absolut	1989	2646
Lymphozyten prozentual (%)	51	42
Transitionale B-Zellen		
prozentual (%)	37	7,9
absolut (/µl)	184	31
Marginalzonen like B-Zellen		
prozentual (%)	4	12,4
absolut (/µl)	20	48
IgM Plasmablasten		
prozentual (%)	0,3	10,2
absolut (/µl)	1	40
Switched Plasmablasten		
prozentual (%)	0,8	4,8
absolut (/µl)	4	19

4. DISKUSSION

Durch ihre Bedeutung im Immunsystem sowie im hämatologischen System nimmt die Milz eine wichtige Stellung im Körper ein. Sie dient als Bildungs- und Speicherort für B-Lymphozyten. Dabei sind spezielle B-Lymphozyten, die sogenannten MZ B-Zellen, vor allem an der Abwehr von bekapselten Erregern beteiligt. Die Entfernung gealterter oder beschädigter Erythrozyten aus dem Blutkreislauf wird als retikuloendotheliale Funktion der Milz bezeichnet.

Eine Hyposplenie oder Asplenie kann zum einen durch die Grunderkrankung selbst verursacht werden und zum anderen durch die Therapie. Nach einer Splenektomie besteht eine organische Asplenie. Bei erhaltenem Milzgewebe mit verminderter Funktion spricht man dagegen von einer funktionellen Hypo-/Asplenie. Eine reduzierte Milzfunktion lässt sich nicht nur nach Splenektomie, sondern auch bei immunologischen Erkrankungen nachweisen [18].

Die Bedeutung der Milz zeigt sich vor allem beim OPSI. Durch die fehlende immunologische Funktion und der resultierenden verminderten Abwehr gegen bekapselte Erreger kommt es bei Patienten nach einer Splenektomie zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität durch systemische Infektionen. Aufgrund dessen sind bei prädisponierten Patienten strenge Prophylaxe Maßnahmen durchzuführen [16, 22] .

In der vorliegenden klinischen Studie untersuchten wir, inwieweit sich eine Einschränkung der Milzfunktion bei Kindern nach einer Chemotherapie beobachten lässt.

Dabei wurden zwei Probandengruppen gebildet. In die Patientengruppe wurden 33 Kinder zwischen dem 2. bis 18. Lebensjahr eingeschlossen, die aufgrund einer malignen onkologischen Grunderkrankung eine Chemotherapie erhielten. Als Kontrollgruppe dienten 30 Patienten, die im Rahmen einer Gerinnungsdiagnostik die hämostasiologische Ambulanz aufsuchten. Als Ausschlusskriterien für die Kontrollen galten dabei bekannte Vorerkrankungen des hämatologischen Systems oder eine Chemotherapie in der Vorgeschichte.

Um sowohl die retikuloendotheliale als auch die immunologische Funktion der Milz zu untersuchen, benutzten wir zwei verschiedene Verfahren. Die PE dienten als Marker für die

retikuloendotheliale Funktion. Mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmten wir den prozentualen Anteil verschiedener B-Zell-Subsets, um so die immunologische Funktion der Milz abzubilden.

In der Literatur findet man eine Vielzahl an Möglichkeiten für die Untersuchung der Milzfunktion. Wir wählten Parameter aus, die im klinischen Alltag ohne großen Aufwand untersucht werden können.

4.1. Milzszintigrafie

Als Goldstandard für die Untersuchung der Milzfunktion gilt die Milzszintigrafie. Dabei kann man mittels hitzegestresster und ^{99m}Tc-markierter Erythrozyten, die Phagozytosekapazität der Milz bestimmen [18]. Lammers et al. nutzten die Milzszintigrafie, um das funktionelle Milzvolumen als Grundlage zu bestimmen und die Aussagekraft anderer Untersuchungsmethoden damit zu validieren [18]. Auch de Porto et al. verglichen Marker für die retikuloendotheliale und immunologische Funktion mit den Ergebnissen der Milzszintigrafie [22]. In dieser Studie wird von früheren Milz-Scans Abstand genommen, bei denen ^{99m}Tc-markierte Sulfur-Kolloide intravenös injiziert wurden, um die phagozytäre Funktion von Leber und Milz zu beurteilen. Bei dieser Methodik sei die Aufnahme in der Leber meist so stark, dass eine Beurteilung der Milz ungenau sei. Eine Studie von Rogers et al. bedient sich noch dieser Methode, um die Ergebnisse als Grundlage für die Evaluation anderer Milz-Marker zu nehmen [23]. Wegen der Nachteile, die sich im hohen technischen Aufwand und der Strahlenbelastung für die Patienten zeigen, verzichteten wir in unserer Studie auf die Milzszintigrafie [5, 19].

4.2. Retikuloendotheliale Funktion

Zur Untersuchung der retikuloendothelialen Funktion haben sich der Nachweis von PE und HJB als am geeignetsten erwiesen, da sie als valide Marker mit den Szintigrafie-Ergebnissen korrelieren [5, 10, 12]. Allerdings zeigten sich die HJB in Studien als wenig sensitiv und

quantitativ aussagekräftig, da fehlende HJB nicht zuverlässig mit einer intakten Milzfunktion einhergingen [5, 18, 19, 22, 26]. Auch in einer neueren Studie von Angay et al. wird auf die geringe Sensitivität der HJB eingegangen. Aktuell werden verbesserte Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der HJB, wie z.B. die Durchflusszytometrie, betrachtet, so dass man die Aussagekraft der HJB in den kommenden Jahren erneut reevaluieren sollte [2]. Vorerst allerdings hat sich aus den genannten Gründen der semiquantitative PE-Test durchgesetzt, auch wenn dieser aufgrund der Notwendigkeit einer Nomarski Optik aufwändiger ist [23].

Mithilfe der PE wurde in zwei Studien die prognostische Aussagekraft für eine drohende Sepsis bzw. ein OPSI untersucht. 1976 beschrieben Casper et al. eine solche Korrelation ab einem PE-Wert > 15% [5]. Eine aktuellere Studie konnte diesen Zusammenhang allerdings nicht erneut bestätigen [18].

Während einige Autoren von einer sicheren Beeinträchtigung der Milzfunktion ab einem PE-Wert von >3,5% ausgehen, sehen andere diese erst ab >4% bzw. 4,5% [9, 18, 23]. Weitere Quellen nennen anstelle dessen eine Grenze, unterhalb derer die Milzfunktion als definitiv normal gilt. Diese schwankt wiederum zwischen ≤ 2 und <4 % [10, 18, 19, 23, 26]. Das heißt, man kann von einem gewissen Graubereich zwischen diesen Ober- und Untergrenzen ausgehen, innerhalb derer keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

Auch in Hinblick auf die Anzahl der ausgezählten Erythrozyten unterscheiden sich die Angaben in der Literatur. Während Kirkineska et al. 2000 Erythrozyten auszählten, beschränkte sich die Studie von Rogers et al. auf 500 Erythrozyten [16, 23].

In Zusammenschau aller Daten entschieden wir uns, insgesamt 500 Erythrozyten unter der Nomarski Optik auszuzählen. Bis zu einem PE-Anteil von 2% sahen wir das Ergebnis als normwertig an, bei > 4% gingen wir von einer eindeutig beeinträchtigten retikuloendothelialen Funktion aus. Der Bereich zwischen 2–4% wurde als Graubereich gewertet.

In unseren Untersuchungen zeigten sich in der Kontrollgruppe die PE-Werte von drei Patienten im Graubereich (2,18 – 2,8%). Die anderen 27 Kontrollpersonen lagen mit PE-Werten < 2% im Normbereich. Im Patientenkollektiv lag ein Patient im Graubereich (3,07%) und zwei Patienten im pathologischen Bereich (4,09% und 4,54%). Alle drei Patienten

gehörten zur ALL-Gruppe. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Patienten- und dem Kontrollkollektiv.

Auch im Vergleich der ALL-Gruppe mit den Kontrollen konnten wir keinen signifikanten Unterschied ermitteln.

Leider war es uns aufgrund organisatorischer Gründe nur möglich, die PE-Untersuchung bei 20 von 33 Patienten durchzuführen. Bei der Kontrollgruppe gelang das bei allen 30 Personen. Dadurch verringerte sich die Präzision der Ergebnisse zusätzlich zu der geringen Fallzahl von n=30 (Kontrollgruppe) bzw. n=33 (Patientengruppe).

Eine weitere Beeinflussung der Ergebnisse kann in der Zahl der ausgezählten Erythrozyten begründet liegen. Eine höhere Auszählung bedeutet eine höhere Aussagekraft und signifikantere Ergebnisse. In der Literatur zeigen jedoch sowohl Studien mit hohen Auszählungen (z.B. Kirkineska et al., Lammers et al.), als auch Studien mit Auszählungen von 500 Erythrozyten (z.B. Rogers et al.) signifikante Ergebnisse und einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten PE-Wert und einer verminderten Milzfunktion [16, 18, 23].

Durch die fehlende Verblindung in der Studie, die aufgrund des Studiendesigns nicht möglich war, besteht das Risiko für einen sogenannten detection bias. Das bedeutet, dass der Untersucher unbewusst die Ergebnisse an seine Erwartungen anpasst und die Ergebnisse dadurch verfälscht werden. Aufgrund der fehlenden Signifikanz der Ergebnisse, scheint dies hier nicht vorzuliegen.

In Zusammenschau der Literatur und unserer Ergebnisse, kann man sagen, dass die retikuloendotheliale Funktion und damit die Fähigkeit, beschädigte Zellen aus dem Blutkreislauf zu entfernen, bei unseren Patienten nach Chemotherapie nur in Ausnahmefällen, nicht aber insgesamt signifikant vermindert ist.

4.3. Immunologische Funktion

Um die immunologische Funktion der Milz zu messen, findet man in der Literatur größtenteils die Analyse von B-Zell Subsets mittels Durchflusszytometrie. Bei B-Zell Subsets handelt es sich um Subpopulationen von Lymphozyten, die als prozentualer Anteil der

Gesamtlymphozyten angegeben werden [28]. Sie repräsentieren die unterschiedlichen Entwicklungsstufen (vgl. Abbildung 1).

Von großer Bedeutung sind dabei die MZ B-Zellen, da diese T-Zell-unabhängig beinahe ausschließlich in der Marginalzone der Milz gebildet werden. Sie spielen eine besondere Bedeutung in der Abwehr bekapselter Erreger [17, 28]. Weller et al. konnten durch Phänotypisierung und Gen-Profiling nachweisen, dass IgM^+ IgD^+ $CD27^+$ Zellen (IgM Memory B-Zellen) im peripheren Blut den zirkulierenden Marginalzonen B-Zellen aus der Milz entsprechen [27].

Die Marginalzone ist nicht nur Bildungsort, sondern vor allem Speicherort für die MZ B-Zellen. Dies zeigt sich daran, dass nach Splenektomie besonders die Werte der MZ B-Zellen abfallen [10, 17, 18]. Die switched B-Zellen sind insgesamt weniger reduziert und normalisieren sich sogar nach kurzer Zeit, da sie auch in anderen lymphatischen Geweben gebildet werden können [17, 18].

Neben der Marginalzone gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass es weitere Speicherorte für die IgM Memory B-Zellen außerhalb der Milz gibt. Cameron et al. konnten zeigen, dass nach einer Splenektomie diese Zellen zunächst mit einer Latenz von 6 Monaten abfallen, dann aber auf einem niedrigem Level stabil bleiben [4]. Als Erklärung dafür wird in dieser Studie neben einem Speicherort außerhalb der Milz eine langsamere Umsatzrate und damit eine längere Lebensdauer in der Peripherie genannt. Das wird auch von Good-Jacobson et al. beschrieben [15].

In unserer Studie haben wir sowohl die Gesamtlymphozyten als auch die transitionalen B-Zellen, die MZ like B-Zellen und die Plasmablasten (IgM und switched) genauer betrachtet. Da es sich bei unserem Studienkollektiv um eine spezielle Gruppe handelt (Patienten aus der pädiatrischen Onkologie) gibt es wenig Literatur, die die Untersuchung der Milzfunktion bei Kindern speziell nach einer Chemotherapie abdeckt. Lediglich eine Studie aus 2011 von van Tilburg et al. untersuchte die Veränderungen der B-Zell-Subpopulationen nach intensiver bzw. reduzierter Chemotherapie bei ALL im Kindesalter [27]. Zusammenfassend kann man sagen, dass unabhängig von der Chemotherapie die transitionalen B-Zellen, MZ like B-Zellen und die Gesamtlymphozyten stark abgefallen sind. Die Plasmablasten blieben zunächst während der Induktionstherapie stabil, fielen im Laufe der Intensivierung jedoch

auch stark ab. Einzig der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten unter einer reduzierten Chemotherapie blieb dauerhaft stabil.

Unsere Ergebnisse lassen sich nicht uneingeschränkt übertragen, da wir eine sehr heterogene Therapiegruppe mit verschiedenen Grunderkrankungen hatten. Aufgrund dessen analysierten wir zusätzlich eine Subgruppe, mit Patienten, die alle ähnlich dem ALL-BFM-2009-Protokoll therapiert wurden. Darunter fielen 9 Patienten mit einer ALL und 2 Patienten mit einem NHL.

Wir konnten alle Probanden der Kontroll- und Patientengruppe mittels Durchflusszytometrie analysieren. Allerdings war bei 5 Patienten keine genauere Analyse der Subpopulationen aufgrund zu geringer Zellzahlen möglich. Von diesen 5 Patienten, hatte nur ein Patient einen erhöhten PE-Wert (PE = 4,09%). 3 dieser 5 Patienten befanden sich auch in der ALL-Gruppe, so dass eine genauere Untersuchung der B-Zell Subsets nur bei insgesamt 8 von 11 Patienten in dieser Gruppe möglich war.

4.3.1. Lymphozytenzahl

In unseren Untersuchungen zeigte sich in der Patientengruppe im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant verringerte absolute Gesamtzahl sowohl der Leukozyten als auch der Lymphozyten. Dies spiegelt die Ergebnisse von van Tilburg et al. wieder [27]. Allerdings waren im Gegensatz zu dieser Studie die Lymphozyten prozentual nicht signifikant erniedrigt. Das Ergebnis trat unabhängig von der Intensität der Chemotherapie auf. Das heißt, dass die Gesamtzellzahl der Patienten im Blut zwar erniedrigt war, der prozentuale Anteil der Blutkörperchen allerdings konstant blieb.

4.3.2. Transitionale B-Zellen

Die transitionalen B-Zellen sind die ersten B-Zellen, die man nach der Entwicklung im Knochenmark in Blutbahn finden kann. Sie zählen als naive B-Zellen und stellen sich

phänotypisch als $CD19^{+}$, $CD38^{++}$, IgM^{++} dar. In unserer Studie waren diese Zellen prozentual im Patientenkollektiv signifikant erhöht.

Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu denen von van Tilburg et al., in deren Studie die transitionalen B-Zellen sowohl unter reduzierter als auch intensiver Chemotherapie auf 0% abfielen. Die Autoren erklären dieses Phänomen durch eine allgemeine myelodepressive Wirkung der Chemotherapeutika. Nach einem Jahr erholten sich die transitionalen B-Zellen auf normalhohe Werte, was laut der Studie in einer erhöhten Produktivität des Knochenmarks begründet liegt [27]. Eine Studie von 2009 von Eyrich et al. untersuchte das Immunsystem bei 20 pädiatrischen ALL-Patienten unter Chemotherapie. Dabei konnte ein starker Abfall der B-Lymphozyten bis zum Ende der Erhaltungstherapie gezeigt werden. Gleichzeitig stiegen die Zahlen der naiven B-Zellen an. Die Autoren sehen diese de-novo B-Zell Bildung als Grund für die Rekonstruktion der B-Zellen [11]. Bei fast allen unseren Patienten waren unabhängig von der Art und Intensität der Chemotherapie die transitionalen B-Zellen stark erhöht. Auch in der ALL-Gruppe zeigten sich signifikant erhöhte transitionale B-Zellen.

Wehr et al. konnten bei Patienten mit bestimmten Subgruppen von CVID erhöhte transitionale B-Zellen feststellen. Diese gingen allerdings regelhaft mit einer Lymphadenopathie einher, welche wir in unserer Studie nicht berücksichtigten [29]. Auch Warnatz et al. konnten einen solchen Zusammenhang feststellen, ohne allerdings auf einen kausalen Zusammenhang zu schließen [28]. Im Falle einer Erhöhung der transitionalen B-Zellen ließ sich in der EUROclass Studie gleichzeitig eine signifikante Verringerung der MZ like B-Zellen nachweisen [29]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass durch die Beeinträchtigung der Milz eine weitere Reifung der transitionalen B-Zellen nicht möglich ist und diese somit in großer Zahl in diesem Stadium arretieren.

Diese Ergebnisse spiegeln sich in denen unserer Studie wieder. Allerdings untersuchten die beiden zuletzt genannten Arbeiten Patienten mit einem generellen Defekt des Immunsystems (CVID) und nicht Patienten, die in der Vergangenheit eine Chemotherapie erhielten.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen unserer Untersuchung und denen von van Tilburg et al. und Eyrich et al. können beispielsweise in dem Abnahmezeitpunkt begründet liegen. Unsere Blutentnahme fand zur Abschlussuntersuchung der jeweiligen

Chemotherapie statt, während van Tilburg et al. mehrere Zeitpunkte während und nach der Chemotherapie wählten. Außerdem untersuchten die Autoren 140 Patienten mit ALL, während unser gesamtes Patientenkollektiv aus 33 Patienten bestand und in die ALL-Gruppe nur 11 Patienten inkludiert werden konnten.

4.3.3. MZ LIKE B-ZELLEN

Als spezifischen Marker für die Milzfunktionen zogen wir die MZ like B-Zellen heran, die in der Marginalzone der Milz gebildet und gespeichert werden. Wie bereits oben beschrieben ließ sich eine spezifische Verminderung dieser Subpopulation vor allem bei Patienten nach einer Splenektomie nachweisen [10, 17, 18]. Auch van Tilburg et al. konnten einen starken Abfall der MZ like B-Zellen bereits bei Beginn der Induktionstherapie im ALL-Regime beobachten. Der prozentuale Anteil fiel unter reduzierter Chemotherapie auf 3% ab, unter der intensiven Chemotherapie auf 0% [27]. Eine Studie an Ratten von Zandvoort et al. zeigte in gleicher Weise, dass die MZ der Milz durch eine IC geschädigt wird. Zum einen, da sich histologisch eine volumenreduzierte weiße Pulpa darstellte. Zum anderen, da die MZ like B-Zellen stark reduziert waren und einen langen Zeitraum zur Erholung benötigten [31]. Wie bereits oben erwähnt, konnten flowcytometrische Untersuchungen von Patienten mit CVID zeigen, dass eine Erhöhung der transitionalen B-Zellen auch mit einer signifikanten Verringerung der MZ like B-Zellen einhergeht.

Wir wiesen ebenfalls einen statistisch signifikanten Abfall der MZ like B-Zellen in der Patientengruppe nach. Dieser zeigte sich unabhängig von der Art der Chemotherapie. In der ALL-Gruppe war die Reduzierung der MZ like B-Zellen noch deutlicher zu beobachten.

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten zu diesem Thema zeigen, dass verminderte MZ like B-Zellen mit einer verminderten Milzfunktion bzw. verringertem funktionellen Milzgewebe korrelieren, unabhängig der zu Grunde liegenden Ursachen [9, 10, 17, 24]. Weshalb man auch in unserer Arbeit davon ausgehen kann, dass zumindest eine verminderte immunologische Funktion der Milz zum Zeitpunkt direkt nach der Chemotherapie besteht.

4.3.4. PLASMABLASTEN

Als letzte Subpopulationen untersuchten wir die Plasmablasten. Während Plasmazellen in der Regel nicht im peripheren Blut zu finden sind, bilden Plasmablasten die Zwischenstufe zwischen den B-Lymphozyten der Milz und den Plasmazellen. Phänotypisch können die Plasmablasten IgM^+ oder class switched (IgM^-) sein [28]. Van Tilburg et al. zeigten in ihrer Studie, dass die switched Plasmablasten unabhängig von der Intensität der Chemotherapie zunächst stabil blieben, sich allerdings später während der Intensivierungs- und Erhaltungstherapie reduzierten. Die IgM^+ Plasmablasten wurden nicht speziell erwähnt [27]. In unseren Untersuchungen nach Abschluss der intensiven Chemotherapie waren die IgM^+ und die switched Plasmablasten in der Patientengruppe signifikant erhöht.

In der ALL-Gruppe galt dies ebenso für die switched Plasmablasten, während sich für die IgM^+ Plasmablasten keine signifikante Erhöhung nachweisen ließ.

Die fehlende Signifikanz der Erhöhung der IgM Plasmablasten in der ALL-Gruppe ist auch der einzige Unterschied in den Ergebnissen zwischen dem kompletten Patientenkollektiv und der ALL-Gruppe. Der p-Wert für die Signifikanz der Ergebnisse bei den IgM^+ Plasmablasten im Patientenkollektiv ist auch grenzwertig, so dass eine größere Fallzahl ein eindeutigeres Ergebnis hätte liefern können. Die relative Erhöhung der Plasmablasten erklären van Tilburg et al. in ihrer Studie mit der niedrigen Proliferationsrate der Plasmablasten, die diese gegenüber der Chemotherapie resistent macht [27].

Da wir die Patienten nur zu einem Zeitpunkt untersucht haben, können wir keine Aussage über den Anteil der Plasmablasten im Verlauf der Erhaltungs- bzw. Dauertherapie machen.

4.4. NACHUNTERSUCHUNGEN

Bei der Untersuchung der PE-Werte waren im Patientenkollektiv ein Patient im Graubereich (Grunderkrankung Non-Hodgkin-Lymphom) sowie zwei Patienten mit erhöhten Werten > 4% (Grunderkrankung ALL) aufgefallen. Alle drei Patienten waren auch Teil der ALL-Gruppe und erhielten somit die gleiche Chemotherapie. Die Untersuchung

erfolgte jeweils zur Abschlussuntersuchung nach der Intensivtherapie. Bei einem der Patienten konnte keine parallele B-Zell-Analyse durchgeführt werden, da die Zellzahlen zu gering waren. Bei zwei der Patienten war eine Kontrolle nach 2 Jahren möglich.

Die PE-Werte hatten sich bei beiden Patienten nach 2 Jahren vollständig normalisiert (Patient A= 0,2%, Patient B= 0,4%).

Die absoluten Lymphozytenzahlen von Patient A waren bei der initialen Untersuchung so stark erniedrigt, dass keine Flowcytometrie gemacht werden konnte. In der Nachkontrolle lagen die Lymphozyten bei beiden Patienten sowohl absolut als auch prozentual im Normbereich. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von van Tilburg et al., die eine Normalisierung nach einem Jahr beobachteten [27].

Die transitionalen B-Zellen waren bei Patient B initial im Normbereich und in der Nachkontrolle bei beiden Patient ebenfalls normwertig.

Die initial stark erniedrigten MZ like B-Zellen von Patient B hatten sich nach 2 Jahren erholt und zeigten sich ebenso wie die MZ like B-Zellen von Patient A nur noch geringfügig reduziert. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von van Tilburg et al. (s. Tabelle 21) [27]. Auch die Studie von Zandvoort et al. beobachtete eine verzögerte Erholung der MZ like B-Zellen [31].

Die Plasmablasten zeigten eine inhomogene Entwicklung. Die initial nicht messbaren Plasmablasten von Patient A waren in der Nachkontrolle für die switched Plasmablasten geringfügig erhöht. Bei Patient B erholten sich die primär stark erhöhten Plasmablasten auf Werte im Normbereich. In der Studie von van Tilburg et al. normalisierten sich die Werte der Plasmablasten nach einem Jahr [27]. Allerdings ging man dort von initial erniedrigten Werten aus, während in unserer Studie eine generelle Erhöhung zu beobachten war.

Bei bestimmten onkologischen Entitäten gehören sowohl eine Chemotherapie als auch eine Bestrahlung zum Therapieregime. Da die Milz auch durch Radiatio geschädigt werden kann, haben wir eine Patientin mit einer solchen Therapie ebenfalls nachkontrolliert. Aufgrund eines Rhabdoidtumors der linken Niere erhielt die Patientin eine Bestrahlung mit einer Zieldosis von 19,8 Gy, in deren Bestrahlungsfeld die Milz teilweise lag.

Sowohl die initiale Untersuchung als auch die Nachkontrolle nach 3 Jahren zeigte weder erhöhte PE-Werte noch erniedrigte MZ like B-Zellen, weshalb man davon ausgehen kann, dass bei dieser Patientin keine zusätzliche Schädigung der Milzfunktion durch die Bestrahlung vorliegt.

Zu der Wirkung einer kombinierten Radiochemotherapie auf Milz gibt es lediglich zwei Studien aus den 1980er Jahren. Zunächst konnte von Coleman et al. eine reduzierte Milzfunktion mit einem PE-Wert bis 13% durch eine Bestrahlung mit 40 Gy nachgewiesen werden [7]. Die jüngere Studie von 1986 von Stevens et al. geht allerdings von keiner zusätzlichen Schädigung der Milz bei einer Strahlendosis bis 22 Gy aus [25]. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit unserer Untersuchung, da die von uns untersuchte Patientin eine Strahlendosis < 22Gy erhielt.

4.5. Schlussfolgerung

Zusammenfassen ist festzustellen, dass wir hinsichtlich des Einflusses einer intensiven Chemotherapie auf die Milzfunktion bei pädiatrischen Patienten zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf die phagozytäre Funktion einerseits und die immunologische Funktion andererseits kommen.

Die in der Literatur ausführlich untersuchten „pitted erythrocytes“ zum Nachweis der Milzfunktion über ihre retikuloendotheliale Aktivität, erbrachten in unserer Studie nur bei einzelnen Patienten auffällige Befunde, in der Gesamtpopulation jedoch keinen signifikanten Hinweis auf eine Funktionsstörung der Milz nach einer Chemotherapie.

Andererseits konnten wir mittels Durchflusszytometrie eine signifikante Verminderung der milzspezifischen Immunzellen (die MZ B-Zellen) nachweisen. Diese haben ihre Bedeutung in der Abwehr bekapselter Erreger und einer dadurch drohenden systemischen Infektion.

Schlussfolgernd kann man davon ausgehen, dass nach Abschluss einer Chemotherapie zumindest eine passagere Hyposplenie in Hinsicht auf die immunologische Funktion besteht. Aufgrund dessen ist insbesondere in der Frühphase nach Ende der Chemotherapie eine konsequente, engmaschige Nachsorge von großer Bedeutung. Diese beinhaltet sowohl frühzeitige Impfungen sowie regelmäßige ambulante Untersuchungen und eine

sorgfältige Aufklärung von Patienten und Sorgeberechtigten, um eine frühzeitige Erkennung von Infektionen zu ermöglichen und rechtzeitig eine adäquate Therapie einleiten zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Milz nimmt mit ihren retikuloendothelialen und immunologischen Funktionen einen wichtigen Platz im Immunsystem ein. Besonders über die Marginalzonen (MZ) B-Zellen spielt die Milz eine wichtige Funktion bei der Abwehr von bekapselten Erregern. Eine angeborene oder erworbene Einschränkung der Milzfunktion birgt ein hohes Risiko für lebensbedrohliche Infektionen.

Das Ziel unserer Untersuchungen war es, anhand von im klinischen Alltag einfach einsetzbaren Methoden die mögliche Beeinträchtigung der Milzfunktion nach einer Chemotherapie zu erfassen.

Die Funktion der Milz kann man auf zwei Ebenen untersuchen. Da das retikuloendotheliale System gealterte und beschädigte Blutzellen aussortiert, kann eine Dysfunktion mit dem Nachweis von „pitted erythrocytes“ (PE) abgebildet werden. Der Prozentsatz der PE korreliert mit dem funktionellen Milzgewebe. In unseren Untersuchungen konnten wir abgesehen von zwei Patienten mit erhöhtem und einem Patienten mit grenzwertigem PE-Anteil keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe nachweisen. Demnach scheint die Milzfunktion auf dieser Ebene nicht bzw. nur in Einzelfällen geschädigt zu werden. Da die Untersuchung der PE zwar prinzipiell im Klinikalltag möglich, aber mit einem nicht unerheblichen Aufwand verbunden ist und da die Ergebnisse unserer Studie überwiegend unauffällig waren, ergibt sich keine Notwendigkeit, diese Methode in die Routinediagnostik zu integrieren.

Eine Möglichkeit zum Nachweis der immunologischen Funktion stellt die Durchflusszytometrie dar. Dabei werden die prozentualen Anteile der B-Zell-Subpopulationen gemessen. Spezifisch für die Milz sind dabei die MZ like B-Zellen, die in der Marginalzone der Milz gebildet und gespeichert werden. Sie werden T-Zell-unabhängig aktiviert. Wir konnten nachweisen, dass diese Zellen in der Patientengruppe am Ende der intensiven Chemotherapie signifikant reduziert sind

Zusätzlich zum Gesamtkollektiv untersuchten wir eine Subgruppe von Patienten, die nach dem sehr intensiven Therapieregime für die akute lymphatische Leukämie behandelt wurden. Der Erhebungszeitpunkt lag am Ende der intensiven Chemotherapie, aber noch in

der Anfangsphase der oralen Erhaltungschemotherapie. Auch in dieser Gruppe konnten die Ergebnisse der Untersuchungen des gesamten Patientenkollektivs reproduziert werden. Wir gehen daher davon aus, dass die Beeinträchtigung der Milzfunktion nach intensiver Chemotherapie bei pädiatrischen Patienten weitgehend unabhängig von der inhaltlichen Zusammensetzung der Chemotherapie entsteht.

Die MZ like B-Zellen sind in der Immunreaktion gegen bekapselte Erreger wichtig. Nach unseren Untersuchungen müssen wir davon ausgehen, dass diese Zellen bei vielen Patienten nach einer intensiven Chemotherapie unabhängig von der zugrundeliegenden Tumorentität und damit zusammenhängenden Therapiespezifika reduziert sind. Vor diesem Hintergrund erscheint es überlegenswert, bei allen pädiatrischen Patienten am Ende einer intensiven Chemotherapie eine Kontrolle der immunologischen Milzfunktion durch Analyse der MZ like B-Zellen vorzunehmen. Bei auffälligen Werten sollte die Vakzinierung gegen Meningokokken, Pneumokokken und Haemophilus influenzae B (HIB) für betroffene Patienten in die frühzeitige Basisimmunisierung eingeschlossen werden, sofern diese in Abhängigkeit vom Alter des Patienten nicht ohnehin Bestandteil der nach intensiver Chemotherapie anstehenden Basisimmunisierung ist. Bisher wird drei Monate nach Ende der intensiven Chemotherapie eine Immunisierung mit Totimpfstoffen sowie altersabhängig eine Impfung gegen Pneumokokken und HIB durchgeführt. Zudem scheint es sinnvoll bis zu einer Normalisierung der Milzfunktion nach ein bis zwei Jahren eine Penicillinprophylaxe in Erwägung zu ziehen. Patienten und Sorgeberechtigte müssen für Symptome einer beginnenden Infektion sensibilisiert werden, um die Patienten gegebenenfalls schnell einer fundierten medizinischen Versorgung zuführen zu können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allman D, Pillai S: Peripheral B cell subsets. Current Opinion in Immunology 20:149–157 (2008)

2. Angay O, Friedrich M, Pinnecker J, Hintzsche H, Stopper H, Hempel K, Heinze KG: Image-based modeling and scoring of Howell-Jolly Bodies in human erythrocytes: HJB in Human Erythrocytes. Cytometry Part A 93:305–313 (2018)

3. Buchanan GR, Holtkamp CA: Splenic reticuloendothelial function in children with cancer. The Journal of Pediatrics 106:239–242 (1985)

4. Cameron PU, Jones P, Gorniak M, Dunster K, Paul E, Lewin S, Woolley I, Spelman D: Splenectomy Associated Changes in IgM Memory B Cells in an Adult Spleen Registry Cohort. PLoS ONE 6:e23164 (2011)

5. Casper J, Koethe S, Rodey G, Thatcher L: A new method for studying splenic reticuloendothelial dysfunction in sickle cell disease patients and its clinical application: a brief report. Blood 47:183–188 (1976)

6. Cesta MF: Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. Toxicologic Pathology 34:455–465 (2006)

7. Coleman CN, McDougall IR, Dailey MO, Ager P, Bush S, Kaplan HS: Functional Hyposplenia After Splenic Irradiation fpr Hodgkin's Disease. Annals of Internal Medicine 96:44–47 (1982)

8. Di Sabatino A, Rosado MM, Cazzola P, Biancheri P, Tinozzi FP, Laera MR, Cantoro L, Vanoli A, Carsetti R, Corazza GR: Splenic function and IgM-memory B cells in Crohn's disease patients treated with infliximab: Inflammatory Bowel Diseases 14:591–596 (2008)

9. Di Sabatino A, Rosado MM, Ciccocioppo R, Cazzola P, Morera R, Corazza GR, Carsetti R: Depletion of Immunoglobulin M Memory B Cells is Associated with Splenic Hypofunction in Inflammatory Bowel Disease. The American Journal of Gastroenterology 100:1788–1795 (2005)

10. Di Sabatino A, Rosado MM, Miele L, Capolunghi F, Cazzola P, Biancheri P, Carsetti R, Gasbarrini G, Corazza GR: Impairment of splenic IgM-memory but not switched-memory B cells in a patient with celiac disease and splenic atrophy. Journal of Allergy and Clinical Immunology 120:1461–1463 (2007)

11. Donaldson SS, Glatstein E, Vosti KL: Bacterial Infections In Pediatric Hodgkin's Disease - Relationship to Radiotherapy, Chemotherapy and Splenectomy. Cancer 41:1949–1958 (1978)

12. Eichner M. D., Edward R.: Splenic Function: Normal, Too Much and Too Little. The American Journal of Medicine 66:311–320 (1979)

13. Eyrich M, Wiegering V, Lim A, Schrauder A, Winkler B, Schlegel PG: Immune function in children under chemotherapy for standard risk acute lymphoblastic leukaemia - a prospective study of 20 paediatric patients. British Journal of Haematology 147:360–370 (2009)

14. Falimirski M, Syed A, Prybilla D: Immunocompetence of the Severely Injured Spleen Verified by Differential Interference Contrast Microscopy: the Red Blood Cell Pit Test: The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care 63:1087–1092 (2007)

15. Good-Jacobson KL, Tarlinton DM: Multiple routes to B-cell memory. International Immunology 24:403–408 (2012)

16. Kirkineska L, Perifanis V, Vasiliadis T: Functional hyposplenism. Hippokratia 18:7–11 (2014)

17. Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter H-H, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R: Human Immunoglobulin M Memory B Cells Controlling Streptococcus pneumoniae Infections Are Generated in the Spleen. The Rockefeller University Press 197:939–945 (2003)

18. Lammers AJJ, de Porto APNA, Bennink RJ, van Leeuwen EMM, Biemond BJ, Goslings JC, van Marle J, ten Berge IJM, Speelman P, Hoekstra JBL: Hyposplenism: Comparison of different methods for determining splenic function. American Journal of Hematology 87:484–489 (2012)

19. Lehmberg K, Steinhausen B, Janka G: From Neonates to Adolescents - The Diagnostic Significance of Pitted Erythrocytes in Hyposplenic and Asplenic Children. Klinische Pädiatrie 219:339–342 (2007)

20. Nazir T, Islam A, Omer MO, Mustafa M: Lymphocytopenia; induced by vinorelbine, doxorubicin and cisplatin in human cancer patients. Breast Disease 35:1–4 (2015)

21. Pizzo PA: Infectious complications in the child with cancer. 1. Pathophysiology of the compromised host and the initial evaluation and managment of the febrile cancer patient. The Journal of Pediatrics 98:341–354 (1981)

22. Porto APNA, Lammers AJJ, Bennink RJ, Berge IJM, Speelman P, Hoekstra JBL: Assessment of splenic function. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 29:1465–1473 (2010)

23. Rogers ZR, Wang WC, Luo Z, Iyer RV, Shalaby-Rana E, Dertinger SD, Shulkin BL, Miller JH, Files B, Lane PA, Thompson BW, Miller ST, Ware RE, for the BABY HUG Investigators: Biomarkers of splenic function in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG Trial. Blood 117:2614–2617 (2011)

24. Schatorjé EJH, Gemen EFA, Driessen GJA, Leuvenink J, van Hout RWNM, van der Burg M, de Vries E: Age-matched Reference Values for B-lymphocyte Subpopulations and CVID Classifications in Children: B-lymphocyte Subpopulations in Children. Scandinavian Journal of Immunology 74:502–510 (2011)

25. Stevens M, Brown E, Zipursky A: The effect of abdominal radiation on spleen function: A Study in Children with Wilms' Tumor. Pediatric Hematology and Oncology 3:69–72 (1986)

26. Tham KT, Howard CA, Chen SY: A Simple Splenic Reticuloendothelial Function Test. American Journal of Clinical Pathology 105:548–552 (1996)

27. van Tilburg CM, van der Velden VHJ, Sanders EAM, Wolfs TFW, Gaiser JF, de Haas V, Pieters R, Bloem AC, Bierings MB: Reduced versus intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: Impact on lymphocyte compartment composition. Leukemia Research 35:484–491 (2011)

28. Warnatz K, Schlesier M: Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 74B:261–271 (2008)

29. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debre P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K: The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. Blood 111:77–85 (2008)

30. Weller S: Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. Blood 104:3647–3654 (2004)

31. Zandvoort A, Lodewijk ME, Klok PA, Timens W: Effects of multidose combination chemotherapy on the humoral immune system. Clinical Immunology 107:20–29 (2003)

DANKSAGUNG

Am Ende meiner Dissertation möchte ich mich bei all denjenigen Personen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle gebührt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Cario, der mit dem Vorschlag des Themas diese Doktorarbeit ins Rollen gebracht hat. Er stand mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und hat bei Widrigkeiten gemeinsam mit mir nach Lösungen gesucht.

Des Weiteren möchte ich Dr. Eva-Maria Jacobsen und ihrem gesamten Team des Immunologie Labors der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm für die Durchführung der Durchflusszytometrie und die Hilfe bei all meinen Fragen danken.

Für die Bereitstellung und ausführliche Erklärung des Phasenkontrastmikroskops gilt mein Dank Dr. Mike-Andrew Westhoff.

Frau Dr. Lisa Schiefele danke ich für die Einführung in das Thema und die Hilfe bei der Arbeit im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und meinem Ehemann danken. Sie haben mich in jedem Moment unterstützt und mir immer den Rücken freigehalten, damit ich meine Dissertation vollenden kann. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.