

Aus der Medizinischen Klinik III  
der Freien Universität Berlin  
Universitätsklinikum Benjamin Franklin  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Thiel  
Abteilung: Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin

**Die immunsuppressive Therapie der aplastischen Anämie:  
Untersuchungen zur Mobilisation von Progenitorzellen  
ins periphere Blut**

Quantitative Untersuchungen durch Durchflußzytometrie  
und Grenzverdünnungsanalyse in der Knochenmarklangzeitkultur

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Corina Knoop

aus: Baia-Mare

Referent: Prof. Dr. H. Schrezenmeier

Korreferent: Prof. Dr. E. Thiel

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien  
Universität Berlin

Promoviert am: 14.12.2001

# INHALTSVERZEICHNIS

Liste der verwendeten Abkürzungen.....	5
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1. APLASTISCHE ANÄMIE .....	7
1.2 DIE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLE .....	8
1.3 HÄMATOPOESE IN DER APLASTISCHEN ANÄMIE.....	10
1.4 STROMA UND HÄMATOPOETISCHE WACHSTUMSFAKTOREN.....	11
1.5 THERAPIE DER APLASTISCHEN ANÄMIE .....	11
1.5.1 <i>Allogene Transplantation</i> .....	11
1.5.2 <i>Immunosuppressive Therapie</i> .....	12
1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	12
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
2.1. PATIENTEN .....	14
2.1.1 <i>Therapieprotokoll</i> .....	15
2.1.2 <i>Remission</i> .....	16
2.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	17
2.2.1 <i>Immunologische Markierung der Zellen im peripheren Blut</i> .....	17
2.2.2 <i>Durchflusszytometrische Untersuchung</i> .....	18
2.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DER STAMMZELLEN .....	18
2.3.1. <i>Kurzzeitkulturen (CFU-GM, BFU-E)</i> .....	18
2.3.1.1 "Colony-forming unit-granulocyte-macrophage" CFU-GM.....	18
2.3.1.2 "Burst-forming unit-erythrocyte" (BFU-E).....	19
2.3.2 <i>Langzeitkulturen</i> .....	19
2.3.2.1 Herstellung der Stromaschicht .....	19
2.3.2.2 Grenzverdünnungsanalyse in der Langzeitkultur aus peripheren Blutzellen .....	20
2.3.2.3 Frequenzberechnung der CAFC.....	20
2.4 STATISTISCHE METHODEN.....	22
2.4.1 <i>Berechnung der CAFC-Frequenz</i> .....	22
2.4.2 <i>Mittelwerte und statistische Tests</i> .....	22

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
3.1 REGENERATIONSKINETIK UND REMISSIONSRATE .....	23
3.1.1 <i>Leukozyten</i> .....	24
3.1.2 <i>Granulozyten</i> .....	26
3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING, FACS) VON CD34 <sup>+</sup> -ZELLEN.....	26
3.3 DETERMINIERTE PROGENITORZELLEN.....	28
3.3.1 <i>Kurzzeitzellturen: Colony forming units granulocyte/macrophage (CFU-GM)</i> .....	28
3.3.2 <i>Burst forming unit-erythroid (BFU-E)</i> .....	29
3.4 ANALYSE PLURIPOTENTER PROGENITORZELLEN IN DER LANGZEITKULTUR DURCH LIMITING DILUTION ANALYSIS (LDA).....	31
3.4.3. <i>Frequenz der CAFC im Rahmen der Therapie der aplastischen Anämie</i> ...	38
3.5. FUNKTIONELLE KAPAZITÄT DER MOBILISIERTEN ZELLEN .....	39
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>40</b>
4.1. ANSPRECHRATE .....	40
4.2. MOBILISIERUNG VON PROGENITORZELLEN .....	41
4.2.1. <i>CD34<sup>+</sup> Zellen</i> .....	42
4.2.2. <i>CFU-GM und BFU-E</i> .....	43
4.2.3. <i>Cobblestone area forming cells (CAFC)</i> .....	46
4.3. KINETIK DER REGENERATION .....	49
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>53</b>
<b>6. LITERATUR .....</b>	<b>54</b>

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen am peripheren Blutbild von 20 Patienten mit aplastischer Anämie vorgenommen, die sich einer immunsuppressiven Therapie unter gleichzeitiger Gabe einer eskalierten Dosis von G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) unterzogen. Ziel der Studie war, zu ermitteln, ob es unter diesem Therapieansatz zu einer Mobilisierung von Stammzellen kommt, die zur Leukapherese und Reinfusion autologer Stammzellen ausreichen könnte. An fünf Zeitpunkten, vor Therapiebeginn und bis zum Tag 112 der Therapie wurden Blutbilder für Leukozyten, Granulozyten und für Progenitorzellen der Hämatopoese (CD34<sup>+</sup> Zellen, BFU-E (burst forming unit – erythroid) und CFU-GM (colony forming unit – granulocyte/macrophage) durch Durchflusszytometrie und Kurzzeitzellkulturen gewonnen. Zusätzlich wurden für 11 der Patienten mit Langzeitzellkulturen Daten über die Anwesenheit von CAFC (cobblestone area forming cells) im peripheren Blut unter der Therapie gewonnen. Ausgehend von stark erniedrigten Werten vor Therapie, wurde ein deutlicher Anstieg der Leukozyten- und Granulozytenzahlen weit über die Normwerte um den Tag 42 der Therapie beobachtet. Die Anzahl der CD34<sup>+</sup> Zellen und der Progenitorzellen (CFU-GM und BFU-E) hat sich unter der Therapie für die Gesamtgruppe nicht statistisch signifikant verändert. Nur in Einzelfällen wurde zwischen dem Therapietag 28 und 112 eine Mobilisation von Stammzellen, zum Teil weit über den Normalbereich hinaus, beobachtet. Eine Prognostizierbarkeit, die beispielsweise zur Gewinnung von Stammzellen via Leukapherese nutzbar wäre, ist daher unter dem gegebenen Therapieansatz noch nicht möglich. Um die Stammzellmobilisierung zu verbessern, wäre die Untersuchung weiterer Zytokine sinnvoll.