

1. EINLEITUNG

1.1. Aplastische Anämie

Die aplastische Anämie (AA) ist eine hämatologische Erkrankung, in der die blutbildende Funktion des Knochenmarkes stark eingeschränkt ist. Charakterisiert ist diese Erkrankung durch eine Bi- oder Panzytopenie im peripheren Blut und eine Aplasie oder Hypoplasie des Knochenmarkes (Gordon Smith 1989). Zur Diagnosestellung wird die Knochenmarkshistologie herangezogen: das normale hämatopoetische Gewebe ist durch Fettzellen ersetzt. Neben der Verminderung der hämatopoetischen Zellen, ist der Retikulingehalt des Knochenmarks ebenfalls reduziert. Maligne Zellen sind nicht nachweisbar.

Unterschieden werden angeborene und erworbene Formen von AA. In den meisten Fällen der erworbenen AA läßt sich eine Ursache für die Entstehung einer Knochenmarkaplasie nicht nachweisen, man spricht dann von einer idiopathischen AA. Bei manchen Patienten kann ein auslösender Mechanismus identifiziert werden:

- idiopathisch
- angeboren (Fanconianämie, Dyskeratosis congenita)
- Sekundäre Ursachen:
 - chemische und physikalische Mechanismen:
 - dosisabhängig: Benzol, ionisierende Strahlung, alkylierende Substanzen, Antimetabolite (Folsäureantagonisten, Purin- und Pyrimidinanaloga, Mitosehemmer, Anthracycline, Arsen)
 - nicht-dosisabhängig: nichtsteroidale Antiphlogistika, Sulfonamide, Thyreostatika, Penicillinamin, Allopurinol und Goldpräparate
 - Infektionen (Hepatitis, EBV, Parvovirus, CMV und Mycobacterium avium intracellulare bei HIV-Infektionen)
- immunologisch
 - Eosinophile Fasciitis
 - Hypoimmunoglobulinämie
 - Thymome und Thymuskarzinome
- Andere, z.B. Schwangerschaft

Von diesen Mechanismen werden die Aplasien abgegrenzt, die durch vorhersagbare Einflüsse (z.B. Bestrahlung oder Zytostatika) induziert werden (Gordon Smith 1989). Differentialdiagnostisch gibt es neben der AA weitere Ursachen für das Entstehen einer Trizytopenie mit Knochenmarkshypo- oder Aplasie:

- hypoplastische Myelodysplasie
- hypoplastische akute myeloische Leukämie
- hypoplastische akute lymphoblastische Leukämie
- Haarzelleukämie
- Lymphome
- solide Tumore mit Knochenmarkinfiltration

Eine Sondersituation stellt die Aplasie dar, die im Rahmen einer transfusions-assoziierten „graft-versus-host“-Erkrankung (Anderson und Weinstein 1990), oder nach Spenderlymphozytentherapie entsteht. Anstelle der beabsichtigten "graft-versus-leukemia"-Wirkung entsteht selten eine ausgeprägte Knochenmarkaplasie (Marmont 1993). Die Aplasie wird in diesen Syndromen durch alloreaktive T-Zellen induziert.

1.2 Die hämatopoetische Stammzelle

Das Knochenmark enthält die pluripotenten Stammzellen der Hämatopoese, aus denen sämtliche Zellen des Blutes entstehen. Ausgehend von den totipotenten Stammzellen differenzieren sich über die pluripotenten die determinierten Progenitorzellen (Abb. 1.1). Neben dieser Differenzierungsfähigkeit besitzen die Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, so dass weitere Stammzellen (mit dem kompletten Differenzierungs- und Klonogenitätspotential) auftreten. Die determinierten Progenitorzellen stehen am Anfang einer bestimmten (determinierten) Zellreihe und sind somit kommitiert für die Entstehung der entsprechenden spezifischen Blutzellreihe. Durch weitere Proliferation und Differenzierung entstehen morphologisch abgrenzbare Progenitorzellen. Diese erlangen durch entgeltige Reifung hochspezialisierte Funktionen und verlieren ihre Proliferationsfähigkeit.

Es wurden Methoden entwickelt, die *in vitro* das Wachstum und die Differenzierung der hämatopoetischen Progenitorzellen ermöglichen. Durch diese Methoden wurden hämatopoetische Kolonien von gemischten und einzelnen

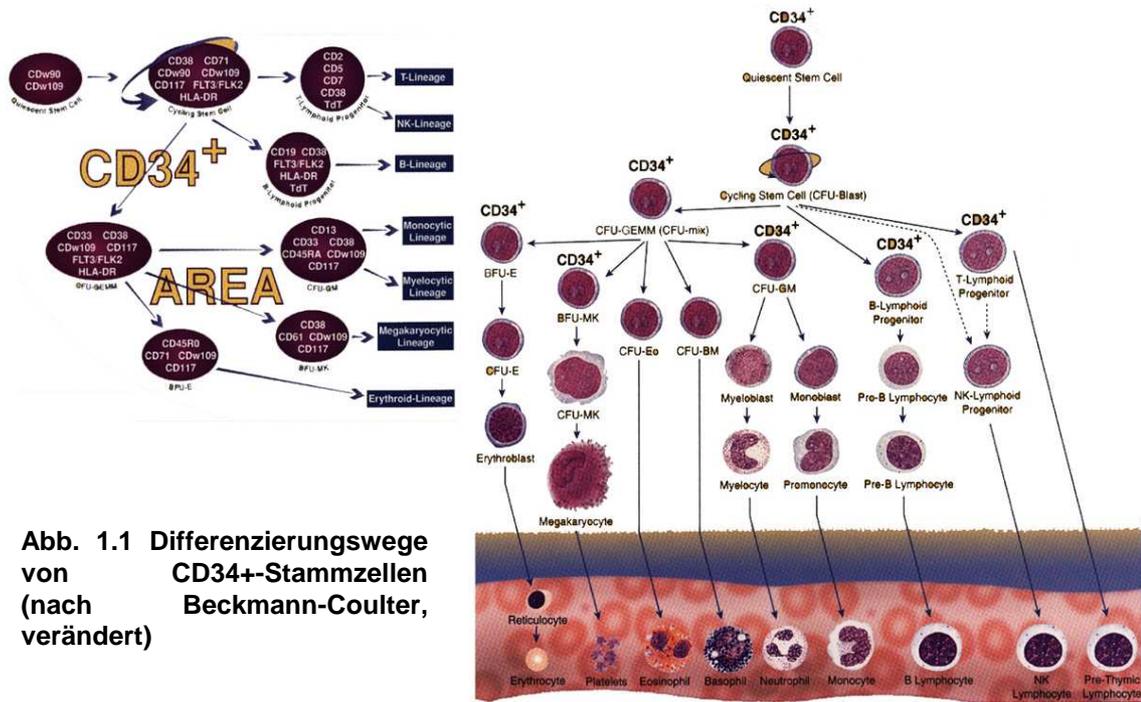


Abb. 1.1 Differenzierungswege von **CD34+**-Stammzellen (nach Beckmann-Coulter, verändert)

Zellreihen isoliert und mittels der jeweiligen Faktoren, die für ihr Wachstum notwendig sind, charakterisiert. Diese hämatopoetischen Kolonien werden *colony forming units* (CFU) oder *burst forming units* (BFU) genannt und durch ein Suffix spezifiziert, das die Zellreihe bezeichnet, aus der die Kolonie besteht.

Beim Menschen konnten die pluripotenten Stammzellen nicht exakt charakterisiert werden. Sie befinden sich, wie die weiter differenzierten Progenitorzellen, in der Zellpopulation, die das Oberflächenantigen CD34 exprimiert (Baum et al. 1992). Die CD34-positiven Zellen ($CD34^+$), deren Anteil an den mononukleären Zellen im Knochenmark 1 bis 2 %, im Blut 0,1 bis 0,2 % und im Nabelschnurblut 0,8 bis 1,2 % beträgt (Krause et al. 1996), können als indirekter Parameter für die Stammzellen verwendet werden (Bender et al. 1991). Mit Durchflusszytometrie und Mehrfachmarkierungen können sehr frühe Progenitor- bzw Stammzellen des Phänotyps CD34, CD38, HLA-DR, oder CD34 & CD90 (Thy-1) abgegrenzt werden (Andrews et al. 1986, Baum et al. 1992, Craig et al. 1993, Kurtzberg et al. 1996).

Nach Chemotherapie mit einem der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) oder GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) oder einer Kombination von beiden werden vermehrt $CD34^+$ Zellen aus dem Knochenmark in das Blut ausgeschwemmt (Siena et al. 1991, Bacigalupo et al. 1993), so dass

Konzentrationen von 1 bis 2 % der mononukleären Blutzellen erreicht werden (Krause et al. 1996). Diese Zellen können hinsichtlich ihrer Funktion und ihres Phänotypes *in vitro* untersucht werden durch Markierung mit Oberflächenantigenen, konventionellen Assays für Progenitorzellen (CFU-GM, BFU-E) und durch den assay für long-term culture-initiating cells (LTC-IC). Letztere sind primitive hämatopoetische Zellen, die auf einem Bett von bestrahlten Knochenmarksfibroblasten kultiviert werden und nach fünf Wochen Progenitorzellen produzieren (Eaves et al. 1991, Sutherland et al. 1989). Die long-term culture-initiating cells (LTC-IC) des Menschen besitzen ähnliche Merkmale wie die long-term culture-initiating cells (LTC-IC) der Maus, bei denen *in vivo* die Fähigkeit zur Knochenmarksrekonstitution nach myeloablativer Behandlung gezeigt wurde (Fraser et al. 1992, Sutherland et al. 1990).

1.3 Hämatopoese in der aplastischen Anämie

Unabhängig davon, ob ein auslösender Faktor (Medikamente, Viren, Schwangerschaft) definiert werden kann, oder die Ursache unbekannt bleibt (idiopathische AA) resultiert eine Zerstörung des Knochenmarkes und eine ungenügende Hämatopoese. Es liegt eine ausgeprägte Reduktion von koloniebildenden Progenitorzellen reifer Granulozyten, Megakaryozyten und Erythrozyten (Kern et al. 1977), phänotypisch identifizierbaren, CD34-Antigen-tragenden Zellen und Stammzellen vor (Marsh et al. 1991, Scopes et al. 1994). In Zellkulturansätzen wurde ein Defizit primitiver Progenitorzellen nachgewiesen, sowohl zum Zeitpunkt der Panzytopenie, als auch bei Patienten in Remission (Maciejewski et al. 1995, Schrezenmeier et al. 1996).

Um den Verlust der Knochenmarksfunktion in jeglichem Differenzierungsstadium zu erklären, wurden mehrere pathogenetische Mechanismen postuliert:

- ein intrinsischer Defekt der hämatopoetischen Stammzelle (Marsh et al. 1990)
- eine strukturelle oder funktionelle Störung des „microenvironment“ (Gordon 1994)
- eine immunmedierte Suppression der Knochenmarksfunktion durch zirkulierende Zellen oder Zytokine (Nissen 1989).

1.4 Stroma und hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Die Lebens- und Proliferationsfähigkeit der hämatopoetischen Zellen ist von spezifischen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Zytokine) abhängig, die hauptsächlich in den Stromazellen des Knochenmarks synthetisiert werden. So setzt eine erfolgreiche Knochenmarkstransplantation bei einem Patienten mit aplastischer Anämie das Vorliegen einer intakten Stromafunktion voraus. In *in-vitro* Versuchen wurde in der AA eine normale Stromafunktion nachgewiesen.

In „*cross-over*“-Experimenten wurde die Proliferationsfähigkeit von CD34⁺ Zellen untersucht, die auf initial bestrahltem Langzeit-Knochenmark-Kulturen angeimpft wurden: normale CD34⁺ Zellen auf dem Stroma von Patienten mit AA weisen eine normale Anzahl an CFU-GM auf, wohingegen eine stark reduzierte Anzahl an CFU-GM vorliegt, wenn man CD34⁺ Zellen von Patienten mit AA auf einem normalen Stroma kultiviert (Marsh et al. 1991, Novitzky und Jacobs 1995).

Die *in-vitro* Produktion (G-CSF, GM-CSF, EPO, TPO, Flt-3-Ligand,) oder gemessenen Serumspiegel (SCF) fast aller Zytokine ist bei bei den meisten AA Patienten normal oder erhöht (Young und Maciejewski 1997).

1.5 Therapie der aplastischen Anämie

Für die Therapie der aplastischen Anämie sind sowohl die Knochenmarkstransplantation, als auch die Immunsuppression wirksam.

1.5.1 Allogene Transplantation

Steht bei einem jungen Patienten ein HLA-identischer (human leukocyte-antigen) Familienspender zur Verfügung, so hat die allogene Transplantation erste Priorität (Bacigalupo et al. 2000), wohingegen die Transplantation von einem Fremdspender wegen der hohen Morbidität und Letalität problematisch ist (Margolis et al. 1996, Passweg et al. 1997). Zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung wird eine intensive Immunsuppression durchgeführt (Storb et al. 1994). Bei einer Heilungsrate von 90% in einzelnen Studienzentren (Storb et al. 1994) und 77% in Multizentrenstudien (Bacigalupo et al. 2000) ist die Stammzellentransplantation bei Kindern und Jugendlichen die Therapie der Wahl. Die Therapieerfolge sind umso besser, je früher die Transplantation nach Diagnosestellung erfolgt.

1.5.2 Immunosuppressive Therapie

Für Patienten, die älter als 40 Jahre sind, bietet eine immunsuppressive Therapie (Antilymphozytenglobulin, Cyclosporin, Methylprednisolon) mittelfristig vergleichbare Ergebnisse (Frickhofen et al. 1991, Bacigalupo et al. 2000). 35 bis 38% der Patienten entwickeln jedoch ein Rezidiv (Rosenfeld et al. 1995, Young und Barrett 1995). Bei 18,8% der Patienten nach Immunsuppression und 3,1% nach Transplantation treten maligne Erkrankungen auf (Socie et al. 1993). Auch über Übergänge in eine paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie wurden bei 9 bis 53% der Patienten berichtet (Young und Barrett 1995).

In den effektivsten Therapiekonzepten werden Antilymphozytenglobulin und Cyclosporin kombiniert. Der Therapieerfolg, definiert durch eine Transfusionsunabhängigkeit und eine ausreichenden Granulozytenanzahl, um Infektionen zu verhindern, wird in den aktuellen Studien mit 70 bis 80% angegeben (Brodsky et al. 1996, Bacigalupo et al. 1995).

Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren in Kombination mit der immunsuppressiven Therapie zu einem Anstieg der Granulozyten geführt haben (Sonoda et al. 1992, Champlin et al. 1989, Ganser et al. 1992, Kojima und Matsuyama 1994). In einer nicht randomisierten Studie konnte neben einer hohen Ansprechrate eine Überlebenszeit von 92% nach zwei Jahren dokumentiert werden (Bacigalupo 1995).

Im Gegensatz dazu konnte in einer prospektiven Studie (Gordon Smith et al. 1991) keine Verbesserung des Therapieerfolges oder Überlebenszeit bei den Patienten nachgewiesen werden, die mit (GM-CSF) behandelt wurden. In einer aktuellen Studie, die die Standardtherapie (ATG, Methylprednisolon, Cyclosporin A) mit einer Kombinationstherapie aus Cyclosporin und G-CSF verglich, wurde ein signifikant schlechteres Therapieergebnis unter Cyclosporin und G-CSF gezeigt im Vergleich zur konventionellen immunsuppressiven Therapie (Rhagavachar et al. 1997).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Beobachtung, dass es im Rahmen der immunsuppressiven Therapie der aplastischen Anämie unter dem Einfluß von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren zu einer Mobilisation von Stammzellen ins periphere Blut kommt, führte

zu der Annahme, diese Mobilisation könnte den Therapieerfolg determinieren (Bacigalupo 1993). So könnte die Mobilisation hinsichtlich der Ansprechrate und Überlebenszeit relevant sein: eine Hochdosistherapie (dosisintensive immunsuppressive Therapie) hat eine hohe Ansprechrate (Brodsky 1996), führt jedoch zu einer verlängerten Knochenmarkssuppression. In dieser Phase sind die Patienten aufgrund der Zytopenie durch mögliche Infektionen oder Blutungen gefährdet. Eine Verkürzung dieser therapiebedingten Suppressionsphase könnte durch eine autologe Stammzellentransfusion erzielt werden. Die Stammzellen, durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren, oder ATG selbst (Torok Storb 1984) mobilisiert und in Leukapheresen gewonnen, könnten so nach einer Hochdosistherapie reinfundiert werden, um die Hämatopoese wiederherzustellen.

Bei der aplastischen Anämie fehlen bislang systematische Untersuchungen zur Erfassung des Ausmaßes und der Kinetik der Mobilisation von Stammzellen unter der immunsuppressiven Therapie und gleichzeitiger Gabe von Wachstumsfaktoren in eskalierter Form. Diese ließen die Bestimmung eines optimalen Zeitpunktes für die Durchführung von Leukapheresen zur Gewinnung von Stammzellen zu. Ebenfalls fehlen ausführliche Untersuchungen zur immunphänotypischen Charakterisierung und zur funktionellen Kapazität der mobilisierten Zellen im Hinblick auf ihre Pluripotenz in Knochenmarklangzeitkulturen.

In der vorliegenden Arbeit sollten Ausmaß und Kinetik der Mobilisation von Stammzellen, sowie Qualität (Immunphänotyp und *in vitro* Proliferationsfähigkeit) der mobilisierten Zellen untersucht werden. Dazu wurde aus Blutproben, die zu bestimmten Zeitpunkten im Verlauf der Therapie entnommen wurden, eine Immunphänotypisierung zur Bestimmung von CD34⁺ Zellen vorgenommen und unterschiedliche Differenzierungsstadien (CAFC, CFU-GM und BFU-E) der Stammzellen über Zellkulturen charakterisiert.