

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patienten

Es wurden 20 Patienten mit aplastischer Anämie untersucht, die eine immunsuppressive Therapie erhielten. Die wichtigsten klinischen Daten fasst Tabelle 2.1 zusammen.

Die Diagnose der erworbenen aplastischen Anämie wurde anhand aktueller Kriterien (International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study, 1987) gestellt. Die Schweregrade der aplastischen Anämie wurden nach den modifizierten Kriterien von Camitta klassifiziert in: "non severe aplastic anemia" nSAA und "severe aplastic anemia" SAA (Camitta et al. 1983) und "very severe aplastic anemia" vSAA (Bacigalupo et al. 1988) .

Als SAA galt die herabgesetzte Zellzahl in mindestens zwei der drei Zellreihen im peripheren Blut:

neutrophile Granulozyten $< 0,5 \times 10^9 / l$

Thrombozyten $< 20 \times 10^9 / l$

Retikulozyten $< 1 \%$

und ein hypozelluläres Knochenmark: mit einer Zellularität $< 25 \%$ oder bei einer Zellularität $> 25\%$ und $< 50\%$ bei gleichzeitiger Anzahl hämatopoetischer Zellen $< 30\%$. Beim zusätzlichen Vorliegen einer Verminderung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten $< 0,2 \times 10^9 / l$ wurde die aplastische Anämie als vSAA klassifiziert.

Tabelle 2.1 Klinische und hämatologische Daten der untersuchten Patienten

Patient #	Alter	Geschl.	Schweregrad	Ansprechen	Granulozyten (x 10 ⁹ /l)	Thrombozyten (x 10 ⁹ /l)	Hb (g/dl)	Gewicht (kg)
1	65	W	SAA	PR	0,37	8	10,7	-
2	67	W	SAA	PR	-	0	9,5	-
3	24	M	SAA	PR	-	0	7,4	75
4	47	M	NSAA	CR	-	16	7,7	75
5	60	W	SAA	PR	0,1	36	9,0	69
6								
7	32	W	SAA	CR	0,1	46	7,2	50
8	32	M	SAA	PR (d60)	1,5	12	8,2	83
9	55	W	nSAA	PR	0,62	28	9,4	67
10	28	M	SAA	NR	0,1	8	6,2	62
11	60	M	SAA	CR	2,2	4	5,4	70
12	59	M	SAA	PR	0,3	10	11,0	92
13	68	M	vSAA	PR	0,1	16	8,1	68,5
14	28	W	SAA	PR	0,8	18	10,6	53,8
15	35	W	SAA	CR	0,2	53	7,9	83
16	28	M	nSAA	CR	0,8	31	7,7	78
17	67	M	vSAA	PR	0,1	4	9,4	84
18	65	W	SAA	PR	0,1	32	9,8	70
19	39	W	SAA	PR	0,4	14	9,4	63
20	20	W	vSAA	PR	0,1	0	8,9	60

2.1.1 Therapieprotokoll

Vor Therapiebeginn lag von den untersuchten Patienten das schriftliche Einverständnis vor. Die Behandlung der aplastischen Anämie enthielt: Antithymozytenglobulin (=ATG, Lymphoglobulin, Institute Mérieux, Leimen), Cyclosporin A (=CSA, Sandimmun optoral, Sandoz, Nürnberg), Prednison (Solu-Decortin, Decortin, Merck), Granulocyte-colony stimulating factor (=G-CSF, Filgrastim, Neupogen, Amgen, München, Deutschland) und Erythropoetin (=Erypo, Janssen-Cilag). ATG wurde intravenös in einer Dosierung von 0,75 ml pro kg Körpergewicht und Tag über 8-12 Stunden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen infundiert (Tag 1-5). Um mögliche allergische Reaktionen auf ATG vor-

zubeugen, wurde Prednison intravenös verabreicht: 1 mg pro kg Körpergewicht und Tag (mg/kg/d) in den ersten fünf Behandlungstagen (Tag 1-5), danach oral 1 mg/kg/d in den Tagen sechs bis 14. Im folgenden Behandlungszeitraum wurde die Prednisondosis alle drei Tage sukzessiv reduziert und am 28. Tag gestoppt. CSA wurde zweimal täglich in einer Dosis von 5 mg/kg/d oral verabreicht. Die Dosis wurde in Abhängigkeit vom individuellen CSA-Plasmaspiegel angepaßt. Zielkonzentration (Talspiegel, gemessen im monoklonalen Assay) war 150-250 ng/ml CSA. Die Therapiedauer mit CSA betrug mindestens vier Monate. G-CSF wurde subkutan appliziert in den Tagen 1 - 90, in einer Dosis von 10 µg pro kg Körpergewicht und Tag.

Die zusätzliche Gabe von Erythropoietin war für diejenigen Patienten vorgesehen, die bis zum 60. Behandlungstag kein Ansprechen auf die Therapie aufwiesen. Verabreicht wurden 150 U pro kg Körpergewicht und Tag, dreimal in der Woche subkutan. Die Therapiedauer erstreckte sich von Tag 61 bis Tag 90.

Zur Prophylaxe möglicher Infektionen wurde Ofloxacin (200 mg dreimal täglich, oral), sowie Amphotericin B (200 mg viermal täglich) bei Patienten mit weniger als $0,5 \times 10^9$ Granulozyten /l und bei allen Patienten unter der Therapie mit ATG verabreicht. Bei Auftreten von Fieber oder nachgewiesenen Infektionen wurden Breitspektrumantibiotika wie Penicillin und Aminoglykoside verabreicht.

Im Falle einer symptomatischen Anämie und bei Hämoglobinwerten von weniger als 8 g/dl wurden Erythrozytensedimente transfundiert. Eine prophylaktische Thrombozytensubstitution erfolgte unter der ATG-Therapie bei Patienten mit weniger als 30×10^9 /l. Behandelte Patientinnen erhielten zur Menstruationsprophylaxe Gestagenpräparate (Orgametril, Lynestrenol, Organon, zwei- bis dreimal 10 mg oral).

2.1.2 Remission

Als Therapieerfolg wurde die anhaltende Erholung des peripheren Blutbildes während des Beobachtungszeitraumes (Tag 112 der Therapie) definiert. Dies erfolgte in Anlehnung an bereits festgelegte Kriterien, die im Rahmen von Phase-II-Studien zur Behandlung der aplastischen Anämie mit Antilymphozytenglobulin mit der Verlängerung der Überlebenszeit korrelieren (Champlin und Gale 1979, Gale et al. 1981).

Eine komplette Remission (CR) wurde bei einem Hämoglobinspiegel > 12 g/dl, einem Granulozytenanstieg auf $> 1,5 \times 10^9/l$ und einem Thrombozytenanstieg auf $> 100 \times 10^9/l$ angenommen.

Eine partielle Remission (PR) wurde in Bezug auf die Blutbildwerte bei Therapiebeginn definiert als ein anhaltender Anstieg der Granulozyten um $> 0,5 \times 10^9 / l$, der Thrombozyten um $> 30 \times 10^9 / l$, der Retikulozyten um $> 30 \times 10^9 / l$, oder bei kompletter Transfusionsunabhängigkeit.

Kein Therapieansprechen (no response, NR) lag vor, wenn keine Blutbilderholung eingetreten war und eine weitere Transfusionsbedürftigkeit bestand. Das Ansprechen auf die Therapie wurde durch wöchentliche Bestimmung des Blutbildes überprüft.

2.2 Durchflusszytometrie

2.2.1 Immunologische Markierung der Zellen im peripheren Blut

Das periphere Blut wurde in Di-Na-EDTA-beschichteten (Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat) Röhrchen entnommen und mittels Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen humane Stammzellen durch Zwei-Farben-Durchflusszytometrie phänotypisiert. Dazu wurde 200 μ l EDTA-Blut mit 200 μ l PBP (PBS mit 0,1 % BSA und 5 % Pferdeserum) 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugierte IgG der Maus (Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien) verwendet. Fluorochrom-konjugierte monoklonale Antikörper, die direkt gegen menschliche Progenitorzellen gerichtet sind wurden für die Zwei-Farben-durchflusszytometrische Phänotypisierung gebraucht. Es wurden für jedes Röhrchen mit 400 μ l Gesamtvolumen adäquate Mengen an PE- und FITC-markierten Antikörpern hinzugefügt. Alle Antikörper wurden titriert und in gesättigter Konzentration eingesetzt. Für die Zwei-Farben Markierung (HLA-DR/CD34) wurden FITC-konjugierten HLA-DR (IgG1 Isotyp, Immunotech, Marseille, Frankreich) und PE-markierten CD34 HPCA-2 Antikörpern (Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien) verwendet. Zur (CD34/CD45) Markierung wurde eine Kombination von PE-markierten CD34 HPCA-2 Antikörpern (Becton Dickinson) und FITC-konjugierten CD45 Antikörpern (Becton Dickinson) verwendet. Nach 30 Minuten Inkubationszeit

im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS die Erythrozyten lysiert (0,12 % Ameisensäure) und das Zellpellet in 500 µl 0,1 % PBS-BSA resuspendiert und fixiert (0,2 % Paraformaldehydlösung). Das Lysereagensystem und die Fixierlösung stammten aus dem Q-Prep-Reagensystem (Coulter, Miami, Florida, USA).

2.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchung

Die Proben wurden mit einem Becton Dickinson FACS untersucht. Mit Hilfe eines Argon-Lasers wurden FITC und PE bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Im einheitlich eingestellten Fenster wurden dann $2-5 \times 10^4$ positive Messereignisse gezählt. Die Daten wurden mit Hilfe der Cellquest-Software (Becton Dickinson) ausgewertet. Eine Originaldokumentation ist im Ergebnisteil als Abb. 3.3 wiedergegeben.

2.3 Untersuchungen zur Funktion der Stammzellen

Ausgangsmaterial für die Untersuchungen war 25 ml Vollblut, das in Di-Na-EDTA aufgenommen wurde. Nach 2:1 Verdünnung mit PBS erfolgte eine Dichtesedimentation mit Lymphoprep (Dichte: 1,077 g / ml; Nycomed, Oslo, Norwegen). Die so isolierten mononukleären Zellen (MNZ) wurden zweimal im PBS mit 10 % FCS (fötales Kälberserum, Gibco, Eggenstein, Deutschland) gewaschen und nach Färbung mit Türkischer Lösung in der Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

2.3.1. Kurzzeitkulturen (CFU-GM, BFU-E)

2.3.1.1 "Colony-forming unit-granulocyte-macrophage" CFU-GM

Nach Resuspension in Methylcellulose (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada), die 3 % (v/v) konditioniertes Medium (aus menschlicher Plazenta) enthielt, wurden 2×10^4 Zellen in drei Parallelansätzen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach zehn Tagen wurden die Kolonien pro Napf im Phasenkontrastmikroskop gezählt und der Mittelwert auf 10^5 Zellen umgerechnet.

2.3.1.2 "Burst-forming unit-erythrocyte" (BFU-E)

Für die BFU-E-Untersuchungen wurden die MNZ in Methylzellulose (Stem Cell Technologies) mit 3,0 I.U. / ml Erythropoietin resuspendiert. In drei Parallelansätzen wurden 2×10^4 MNZ 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Mittelwert der im Phasenkontrastmikroskop identifizierten Kulturen wurde auf 10^5 Zellen umgerechnet.

2.3.2 Langzeitkulturen

2.3.2.1 Herstellung der Stromaschicht

Das Knochenmark gesunder Spender wurde durch Biopsie aus der "spina iliaca posterior superior" gewonnen und in Di-Na-EDTA aufgenommen. Nach 1:2 Verdünnung mit PBS erfolgte die Dichteseparation mit Lymphoprep (Nycomed) und zweimaliges Waschen in PBS und 10 % FCS. Die so gewonnenen MNZ wurden mit Türkischer Lösung gefärbt und in der Zählkammer des Mikroskopes gezählt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml in LTMC-Medium (Stem Cell Technologies) mit 1 µM Hydrocortisonnatrium-succinat (Sigma, München, Deutschland) und 1,5 % Penicillin/ Streptomycin (10000 I.U. / ml Penicillin, 10000 µg / ml Streptomycin) suspendiert und jeweils 3 ml der Zellsuspension pro Napf auf 6-Loch-Platten (Nunc, Nürtlingen, Deutschland) angeimpft. Die Inkubation erfolgte über 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Überstand, der nicht adhärenente Zellen enthielt, wurde abgesaugt, die etablierte Stromakultur mit PBS gewaschen und mit 350 µl Trypsinlösung (0,125 % Trypsin, 0,5 mol EDTA, 1 µg / ml DNase), (Sigma) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten bei 37 °C befanden sich die Stromazellen in Lösung, der Trypsinierungsvorgang durch die Zugabe von PBS mit 10 % FCS gestoppt. Die Zellen wurden in PBS mit 10 % FCS aufgenommen und bestrahlt (15 Gy), um die hämatopoetische Aktivität im Stroma zu unterbinden, ohne die Stromafunktion einzuschränken (Bruhl et al. 1988). Die Zellen wurden in PBS mit 10 % FCS gewaschen und in LTMC-Medium resuspendiert. Auf 96-Loch-Platten mit flachem Boden (Nunc) wurde pro Napf 100 µl Zellsuspension bei 33 °C inkubiert. Nach zwei Tagen hatte sich erneut eine konfluierende Stromaschicht gebildet.

2.3.2.2 Grenzverdünnungsanalyse in der Langzeitkultur aus peripheren Blutzellen

Zwei Tage nach der Bestrahlung wurden auf der präformierten Stromaschicht die Patientenzellen in sieben Konzentrationen mit je zehn Parallelansätzen pro gegebener Konzentration angeimpft. Bei ausreichender Zellzahl war die Anfangskonzentration 4×10^4 Zellen pro Napf in den ersten zehn Nöpfen. Durch 1:1 Verdünnung waren pro Napf 2×10^4 Zellen im ersten, 1×10^4 Zellen im zweiten, 5×10^3 Zellen im dritten, $2,5 \times 10^3$ Zellen im vierten, $1,25 \times 10^3$ Zellen im fünften und 625 Zellen im letzten Verdünnungsschritt vorhanden. Bei den Kontrollpersonen betrug die Anfangskonzentration 2×10^4 Zellen pro Napf. Die Kulturen wurden fünf Wochen bei 33 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 7 und 21 Tagen wurde 50 µl LTCM pro Napf hinzupipettiert, nach 14 und 28 Tagen das Medium abgesaugt und durch 100 µl frisches LTCM ersetzt. Nach fünf Wochen erfolgte die Auszählung der Kulturen im Phasenkontrastmikroskop: ein Zellverband von mehr als sechs kleinen, traubenförmig angeordneten Zellen wurde als "cobblestone area" definiert und der Napf als "positiv" gewertet.

2.3.2.3 Frequenzberechnung der CAFC

Sowohl für Stammzellen aus dem Knochenmark (Sutherland et al. 1990, Pettengell et al. 1994, Schrezenmeier et al. 1996), wie auch aus dem peripheren Blut (Udomsakdi et al. 1992, Pettengell et al. 1994) ist gezeigt worden, dass die Methode der Grenzverdünnungsanalyse für die Quantifizierung der LTC-IC (bzw. CAFC) verwendet werden kann. Da die Voraussetzungen der Titrierbarkeit (Zellsuspension) und der "single-hit"-Kinetik (einzige Determinante für das Entstehen einer CA ist die Progenitorzelle und nicht kulturimmanente Variablen) erfüllt sind, kann in der Versuchsanordnung durch die qualitative Beurteilung allein die Häufigkeit der CAFC errechnet werden. Dies geschieht mit Hilfe von statistischen Methoden nach Taswell (1981) und gibt die Frequenz wieder, bei der 37% aller Nöpfe keine Sekundärkolonien (cobblestone area, CA) beinhalten.

Gelingt es die Anzahl der sekundären Kolonien-bildenden Zellen (nach fünf Wochen in Kultur) in die Anzahl der "long-term culture-initiating cells" (LTC-IC) zu konvertieren, so wird mittels Grenzverdünnungsanalyse die Anzahl der Kolonien errechnet, die aus LTC-IC hervorgehen. Im Einzelnen gilt für die

Wahrscheinlichkeit p , dass in einer Kultur k mal ein Ereignis, (hier eine CA) eintritt, folgende Gleichung:

$$p_k = a^k \times e^{-a} / k! \quad (1)$$

a entspricht der Anzahl der vorhandenen CAFCs, d.h. dem Anteil der CAFCs an der Gesamtmenge f multipliziert mit der Gesamtzellzahl pro Napf ZZ , also: $a = f \times ZZ$.

Die gesuchte Variable ist die Frequenz f . Im Versuch bestimmt man den Anteil der negativen Kulturen, also P_0 . Da eine positive Kultur keinen Rückschluß erlaubt, wieviele CAFCs ursprünglich vorlagen, kann P_1 , P_2 oder P_3 nicht unterschieden und damit nicht berechnet werden. Mit $k = 0$ und $a = f \times ZZ$ ergibt sich aus obiger Gleichung (1):

$$P_0 = (f \times ZZ)^0 \times e^{-f \times ZZ} / 0! \quad (2)$$

$$P_0 = 1 \times e^{-f \times ZZ} / 1 \quad (3)$$

$$P_0 = e^{-f \times ZZ} \quad (4)$$

$$-\ln P_0 = f \times ZZ \quad (5)$$

Da f eine Konstante darstellt, ist dies eine Geradengleichung. Der Anteil der negativen Kulturen (P_0) wird logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen (Abbildung 2.1).

Setzt man in Gleichung (5) die Zellzahl $ZZ = 1 / f$, so ergibt sich:

$$-\ln P_0 = f \times 1 / f \quad (6)$$

$$-\ln P_0 = 1 \quad (7)$$

$$-\ln P_0 = e^{-1} \quad (8)$$

$$P_0 = 1 / e \quad (9)$$

$$P_0 = 0,37 \quad (10)$$

Die errechnete Zellzahl, bei der 37 % der Kulturen negativ ausfallen würden, entspricht somit der Zellzahl, in der genau eine CAFc enthalten ist bzw. dem Kehrwert der CAFc-Frequenz. Der in der Berechnung angegebene Wert p gilt als Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass zwischen der eingesetzten Zellzahl und dem Logarithmus des Anteils negativer Kulturen eine lineare Beziehung besteht. Er ist somit ein Indikator für die Anwendbarkeit der LDA für jeden einzelnen Kulturansatz. Die Berechnungen erfolgten mit speziellen Rechenprogrammen nach Taswell (1981).

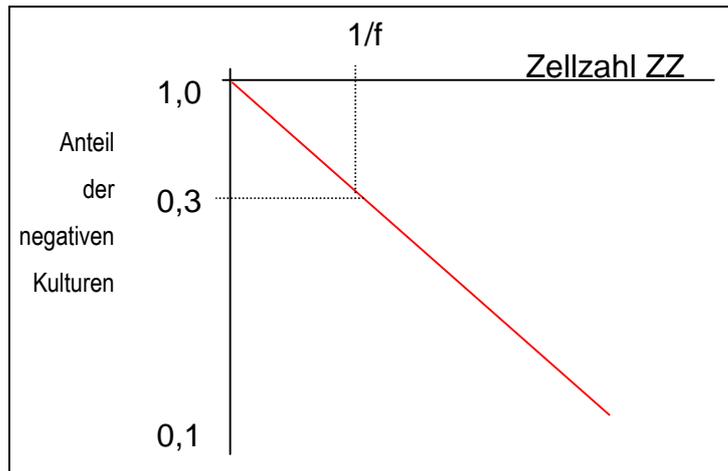


Abb. 2.1.: graphische Darstellung der Geradengleichung $-\ln P_0 = f \times ZZ$ (ZZ = eingesetzte Zellzahl der auf CAFCs untersuchten Zellpopulation, negative Kulturen = Näpfe ohne cobblestone-area)

2.4 Statistische Methoden

2.4.1 Berechnung der CAFc-Frequenz

Ausgehend von der Anzahl der negativen Kulturen (Kulturen ohne cobblestone-area) in den Parallelansätzen einer Verdünnungsstufe wurde die Frequenz der CAFcs errechnet. Dies erfolgte nach fünf Wochen Kulturrzeit unter Anwendung eines Rechenprogrammes nach Taswell (Taswell 1981). Für die Berechnung gingen mindestens drei Verdünnungsstufen ein.

2.4.2 Mittelwerte und statistische Tests

Da die Frequenz der CAFcs keiner Normalverteilung unterliegen, wurde für die Angabe der Mittelwerte der Median ermittelt. Für den Vergleich der CD34-Untersuchungen, den Zellkulturansätzen und den Frequenzen der CAFcs wurde der U-Test (Wilcoxon, Mann und Whitney) angewendet. Dieser Test untersucht den Unterschied zweier nicht normalverteilten unabhängigen Stichproben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant erachtet. Falls nicht anders vermerkt, beziehen sich die angegebenen p-Werte auf den U-Test.