

3. ERGEBNISSE

Bei allen 20 Patienten, bei denen die im Methodenteil (2.1.1) vorgestellte immunsuppressive Therapie nach dem Therapieprotokoll durchgeführt wurde, sind im Laufe dieser Arbeit Untersuchungen am peripheren Blut vorgenommen worden.

An fünf unterschiedlichen Zeitpunkten (vor Therapie = Tag 1, Tag 8, Tag 28, Tag 42 und Tag 112 der Therapie) wurde das Blutbild untersucht (Leukozyten-, Granulozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl). Erythrozyten und Thrombozytenzahlen wurden in dieser Auswertung nicht berücksichtigt, weil sie abhängig von klinischer Situation transfundiert wurden und damit kein adäquates Maß für die aktuelle Hämpoese-Funktion darstellten.

Daneben wurden die CD34⁺ Zellen im Blut bestimmt (Durchflusszytometrie, FACS) und Kurzzeitkulturen für CFU-GM und BFU-E angesetzt. Diese Daten wurden für alle 20 Patienten erhoben. Bei einem Patienten (P8) wurde die Therapie am Tag 60 abgebrochen. Ein weiterer Patient (P6) wurde am 44. Therapietag knochenmarktransplantiert.

Darüber hinaus wurden für 11 Patienten anhand der Bildung von CAFC (cobblestone area forming cells) in Langzeitkulturen Daten über die Anwesenheit früher Progenitorzellen (LTC-IC, long term culture initiating cells) an den genannten Zeitpunkten gewonnen.

Parallel wurden an fünf Kontrollpersonen aus dem peripheren Blut die Anzahl von CD34⁺ Zellen, CFU-GM und BFU-E bestimmt, im Blut von vier Kontrollpersonen wurden in Langzeitkulturen CAFC untersucht.

Alle Werte für Therapietag 1 beziehen sich im Folgenden auf die Situation vor Therapiebeginn.

3.1 Regenerationskinetik und Remissionsrate

Der Verlauf von Leukozytenzahl und Granulozytenzahl ist in den Abb. 3.1 und 3.2 für die 20 Patienten dargestellt. Der klinische Normbereich ist jeweils angegeben. Das Blutbild für den Patienten P6 war nicht verfügbar, teilweise ist es nicht für alle Patienten vollständig über den gesamten Therapiezeitraum vorhanden.

3.1.1 Leukozyten

Ein Anstieg der Leukozytenzahl in den Normbereich ist für alle Patienten außer P5, P10, P17, P18 und P20 bereits am Tag 28 der Therapie zu verzeichnen, bei P17 wird der Normbereich erst später erreicht (Abb. 3.1). Der Anstieg setzt sich in der Regel bis zum Tag 42 der Therapie deutlich fort, lediglich P2 zeigte ein Abfallen der Leukozytenzahl. Fünf weitere Patienten ließen eine Abnahme der Leukozytenzahl zum Tag 112 gegenüber Therapietag 42 feststellen (P1, P3, P7, P11, P13, P16).

Der Patient P10 wies zu jedem Zeitpunkt leukopenische Werte auf. Bei fünf Patienten war der dokumentierte Leukozytenanstieg passager, am Tag 112 hatten diese (P1, P2, P3, P6, P13) erneut eine Leukozytopenie. Elf Patienten hatten am Tag 112 normale Leukozytenzahlen (P9, P16) oder eine deutliche Leukozytose (P4, P5, P12, P14, P15, P17, P18, P19, P20).

Messbereich und Medianwerte sind in Tabelle 3.1 zusammengestellt. Die statistische Prüfung im Wilcoxon-Test ergibt einen signifikanten Unterschied bei $p < 0,05$ für alle Messzeitpunkte der Therapie, bei $p < 0,005$ für alle Messzeitpunkte ab Therapietag 28 in Bezug auf den Zeitpunkt vor Therapie.

Tab. 3.1 Leukozytenzahlen ($\times 10^9/l$). Der Therapietag 1 stellt den prätherapeutischen Wert dar.

Therapietag	Median	Bereich	p
1	1,7	0,5 - 3,6	-
8	3,0	0,4 - 9,3	0,041
28	8,3	0,4 - 24,9	0,002
42	21,7	0,9 - 52,9	$1,5 \times 10^{-5}$
112	13,7	1,4 - 48,6	$1,0 \times 10^{-5}$

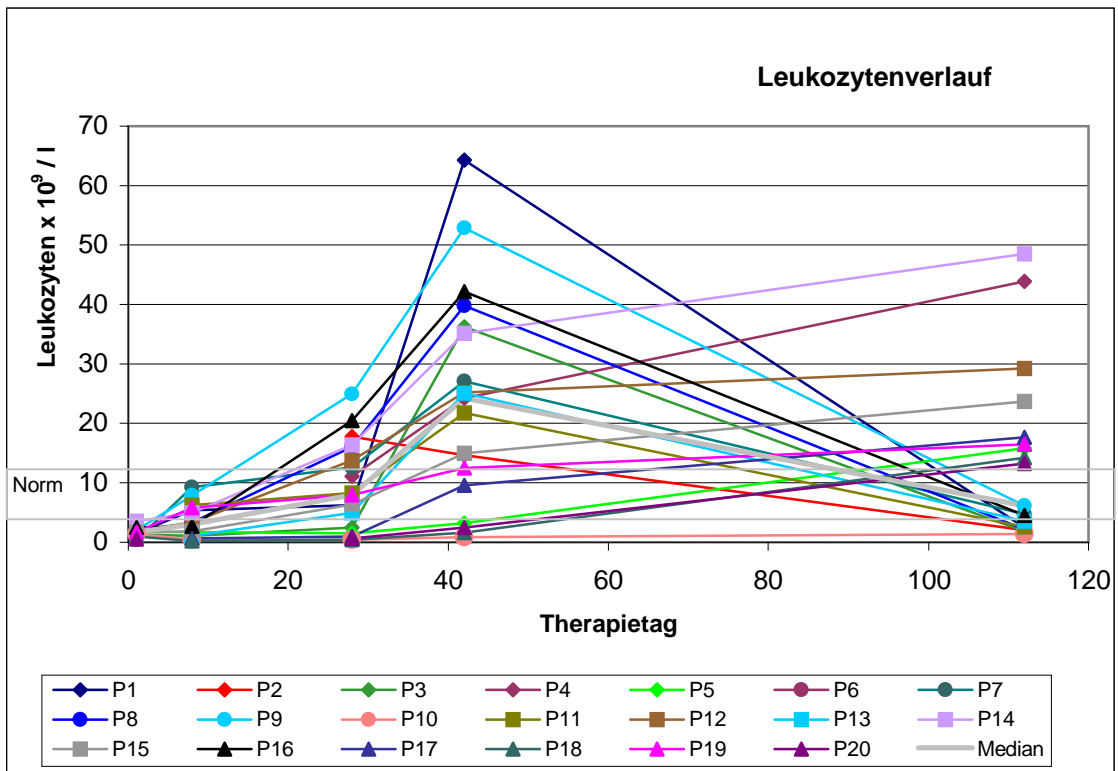
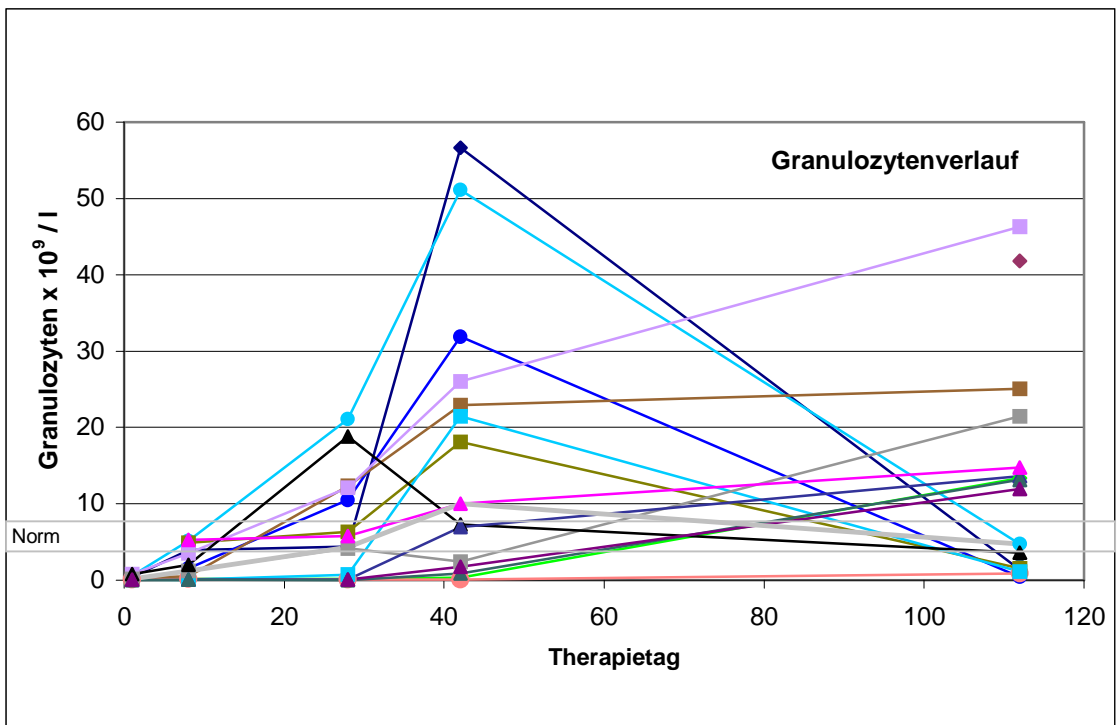


Abb. 3.1 (oben) Leukozytenanzahl im Therapieverlauf für 20 untersuchte Patienten (P1-P20). Der Verlauf der Medianwerte und der Normbereich ist angegeben.

Abb. 3.2 (unten) Granulozytenanzahl im Therapieverlauf für 20 untersuchte Patienten (P1-P20). Der Verlauf der Medianwerte und der Normbereich ist angegeben. Die Legende entspricht Abb. 3.1



3.1.2 Granulozyten

Der Granulozytenverlauf zeigt im wesentlichen ein dem Gesamtleukozytenbild ähnlichen Verlauf. Im Rahmen der Therapie wird ein passagerer Granulozytenanstieg bei sechs Patienten dokumentiert: der Patient P16 weist am Tag 28, die Patienten P1, P8, P9, P11, P13 am Tag 42 das Granulozytenmaximum auf. Der maximale Granulozytenanstieg war bei den Patienten P5, P9, P12, P14, P15, P17, P18, P19 und P20 nachgewiesen am Tag 112. Tabelle 3.2 gibt den Median und Bereich in der Granulozytenkinetik wieder. Die Messwerte aller Therapietage ab Tag 8 unterscheiden sich im Wilcoxon-Test bei $p < 0,005$ signifikant vom Wert vor Therapie, d.h. von Therapietag 1.

Tab. 3.2 Granulozytenzahlen ($\times 10^9/l$)

Therapietag	Median	Bereich	p
1	0,2	0 - 0,8	-
8	1,35	0 - 5,3	0,009
28	3,3	0 - 12,3	0,005
42	18,1	0,1 - 56,6	$1,8 \times 10^{-5}$
112	11,9	0,4 - 46,3	$2,7 \times 10^{-6}$

Vergleichbar mit den Leukozytenwerten liegt bei den Patienten P1, P2, P3, P10 und P11 am Therapietag 112 erneut eine deutliche Reduktion der Granulozyten vor.

3.2 Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting, FACS*) von CD34⁺-Zellen

Die Analyse der CD34⁺ Zellen im FACS erfolgte für 19 Patienten, Patient P6 (s.o.) wurde nicht einbezogen. Aus organisationstechnischen Gründen wurden für vier Patienten (P7, P8, P11, P13) die Werte vor Therapiebeginn nicht erhoben, für Patienten P20 liegt der Wert für Therapietag 8 nicht vor. Eine Originaldokumentation der FACS-Analyse auf CD34⁺ Zellen ist exemplarisch in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Übersicht über den Therapieverlauf zeigt Abbildung 3.4.

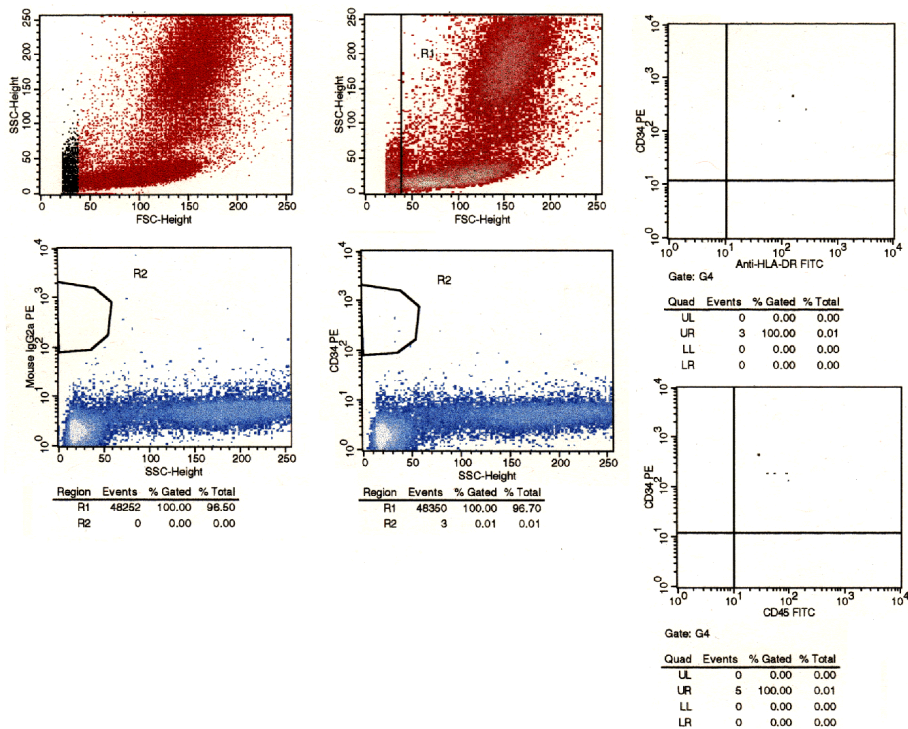
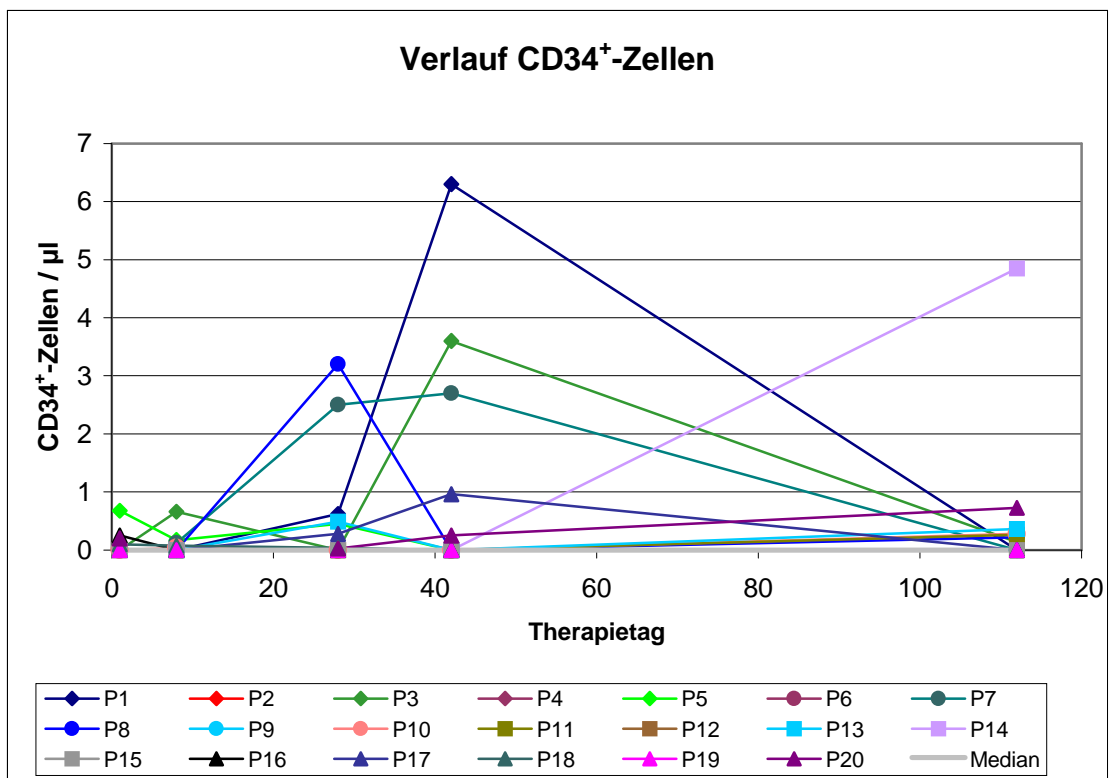


Abb. 3.3 (oben) Originaldokumentation zur Analyse auf CD34⁺-Zellen in der Durchflusssytometrie, exemplarisch (P 007).

Abb. 3.4 (unten) CD34⁺-Zellen im Therapieverlauf. Der Median für sämtliche Therapiezeitpunkte ist 0, der Median der Kontrollwerte ist 0,24/ul. Für alle Untersuchungszeitpunkte ergeben sich in Bezug auf den Zeitpunkt vor Therapie, hier als Tag 1 der Therapie aufgeführt, kein signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$ Wilcoxon-Test).



Insgesamt kam es zu einer deutlichen Mobilisation von CD34⁺ Zellen bei elf Patienten: vier Patienten hatten am Tag 42 das Maximum zu verzeichnen (P1, P3, P7, P17) zwei weitere Patienten (P8, P13) zeigten das Maximum am Therapietag 28, P12 bereits am Therapietag 8. Vier Patienten (P10, P11, P14 und P20) zeigten das Maximum von CD34⁺ Zellen erst am Therapietag 112.

Keine Mobilisation von CD34⁺ Zellen im Rahmen der Messgenauigkeit war für die sechs Patienten P2, P4, P9, P15, P18 und P19 festzustellen. Patienten P5 und P16 zeigten einen abweichenden Verlauf mit der Abnahme ursprünglich vorhandener CD34⁺ Zellen unter der Therapie.

3.3 Determinierte Progenitorzellen

Die Ergebnisse der Kurzzeitzellkulturen sind in Abbildung 3.6 (CFU-GM) und Abbildung 3.8 (BFU-E) dargestellt. Insgesamt sind die Daten von 19 Patienten aufgeführt. Für die Patienten P8, P11 und P13 liegen keine Zellkulturdaten für den Therapiebeginn (Tag 1) und für Patienten P7 und P20 keine Kulturergebnisse für Therapietag 8 vor.

3.3.1 Kurzzeitzellkulturen: Colony forming units granulocyte/macrophage (CFU-GM)

Auf Methylzellulose angeimpft, bilden sich nach zehn Tagen Inkubationszeit unter Zugabe von konditioniertem Medium CFU-GM. Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch eine solche Kolonie im mikroskopischen Bild.

Die CFU-GM im Therapieverlauf sind in Abb. 3.6 dargestellt. Bei zehn Patienten kam es zu einer Erhöhung der CFU-GM unter Therapie. Der maximale Anstieg wurde bereits am Tag 8 der Therapie bei den Patienten P11, P17 und P19 und am Tag 28 bei den Patienten P9 und P13 dokumentiert. Fünf Patienten wiesen einen passageren maximalen Anstieg der CFU-GM am Tag 42 der Therapie auf: P1, P3, P10, P14 und P15. Bei den restlichen neun Patienten traten zu keinem Zeitpunkt CFU-GM auf.

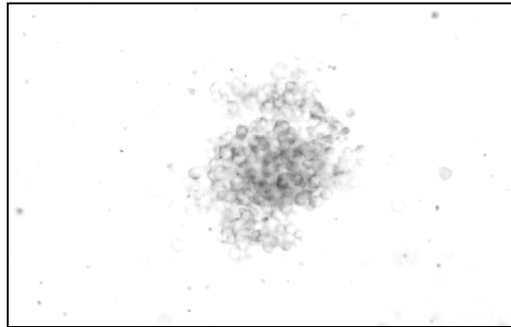


Abb. 3.5 CFU-GM (Colony-formig unit granulocyte/macrophage) im Phasenkontrast

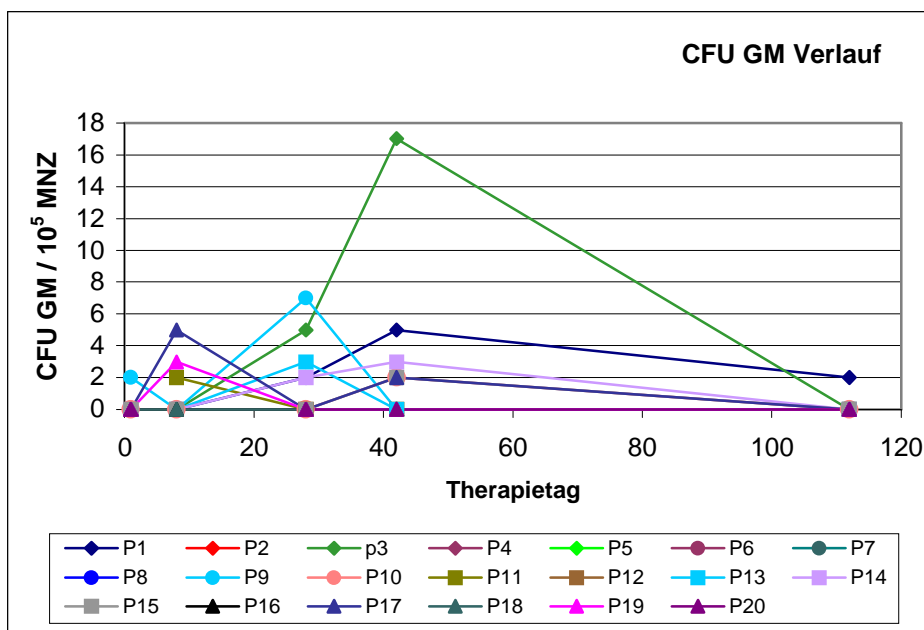


Abb. 3.6 CFU-GM – Anzahl im Therapieverlauf. Für die untersuchten Patienten beträgt der Median der CFU-GM-Werte zu jedem der untersuchten Zeitpunkte 0, der Median der Kontrollen ist $33 / 10^5$ MNZ. Im Vergleich zu den Werten vor Therapie ergibt sich zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test).

3.3.2 Burst forming unit-erythroid (BFU-E)

Unter Erythropoetin können sich aus dem peripheren Blut nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen BFU-E (burst-forming units erythroid) entwickeln. Abbildung 3.7 zeigt zwei solcher BFU-E eines Patienten mit aplastischer Anämie. Die Kolonien haben aufgrund des Hämoglobingehaltes des Zellverbandes bei geringer Vergrößerung eine dunkelbraune bis schwarze Farbe.

In Analogie zu den CFU-GM sind die BFU-E im Therapieverlauf in Abbildung 3.8 dargestellt. Neun von den 19 untersuchten Patienten wiesen einen Anstieg der BFU-E auf. Die Patienten P3, P5, P9 und P17 hatten den maximalen BFU-E-Anstieg am Tag 28, die Patienten P1, P11, P13 und P15 am Tag 42, und der Patient P7 am Tag 112 der Therapie. Zehn Patienten entwickelten zu keinem Zeitpunkt BFU-E.

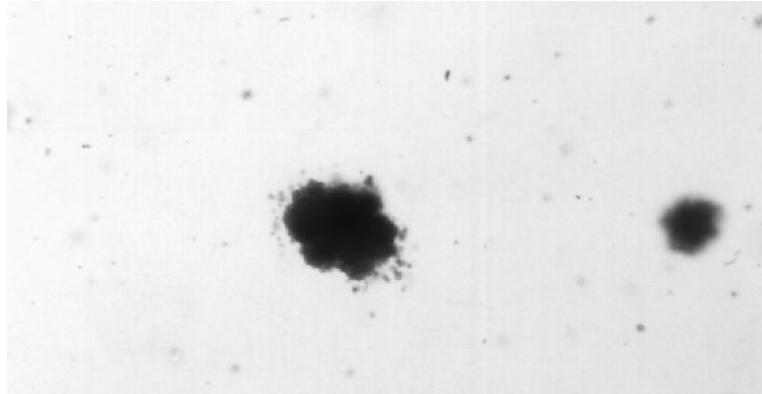


Abb. 3.7 BFU-E (Burst forming unit-erythroid) im Phasenkontrast

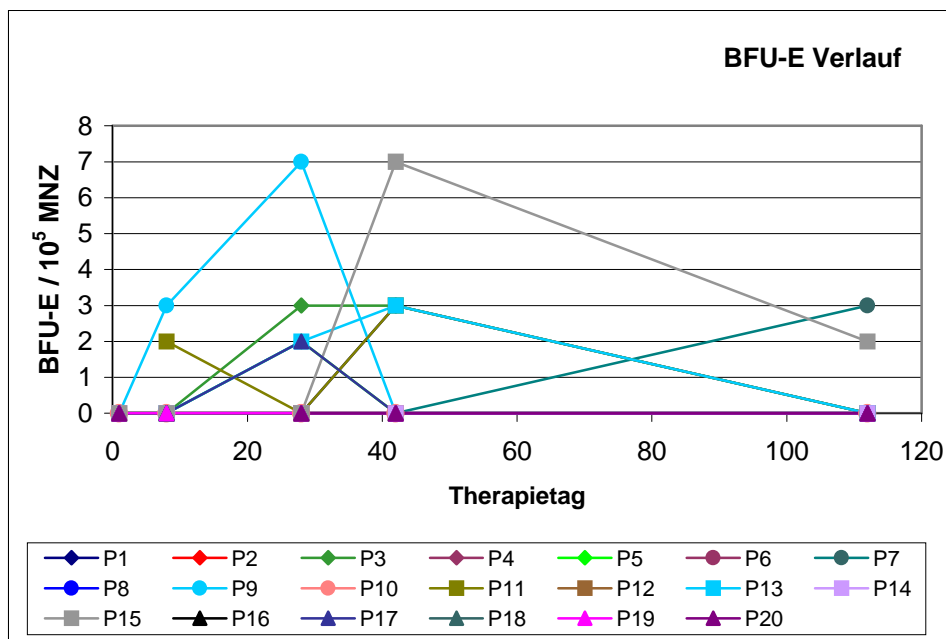


Abb. 3.8 BFU-E / 10⁵ MNZ (mononukleäre Zellen) im Therapieverlauf. Der Median für die untersuchten Patienten beträgt zu jedem Zeitpunkt 0. Der Median der Kontrollen beträgt 98 / 10⁵ MNZ. Zu keinem Therapiezeitpunkt ergibt sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Wert vor Therapie (Wilcoxon-Test).

3.4 Analyse Pluripotenter Progenitorzellen in der Langzeitkultur durch Limiting Dilution Analysis (LDA)

In der Langzeitkultur wurden auf dem ausgebildeten Stroma gesunder Spender mononukleäre Zellen (MNZ) aus dem Blut von Patienten mit aplastischer Anämie angeimpft. Nach 5 Wochen wurden die cobblestone areas unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt und so der Anteil an Progenitorzellen (CAFC = cobblestone area forming cells) festgestellt. Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch das mikroskopische Bild einer solchen cobblestone area (CA).

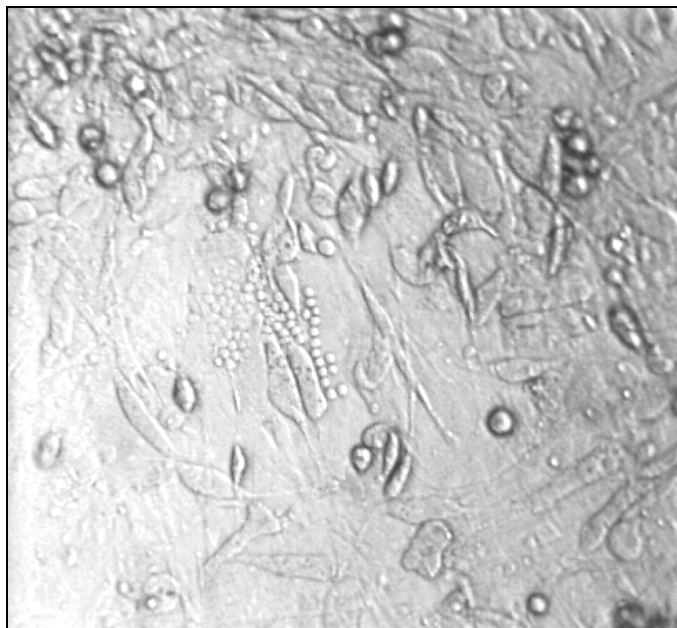
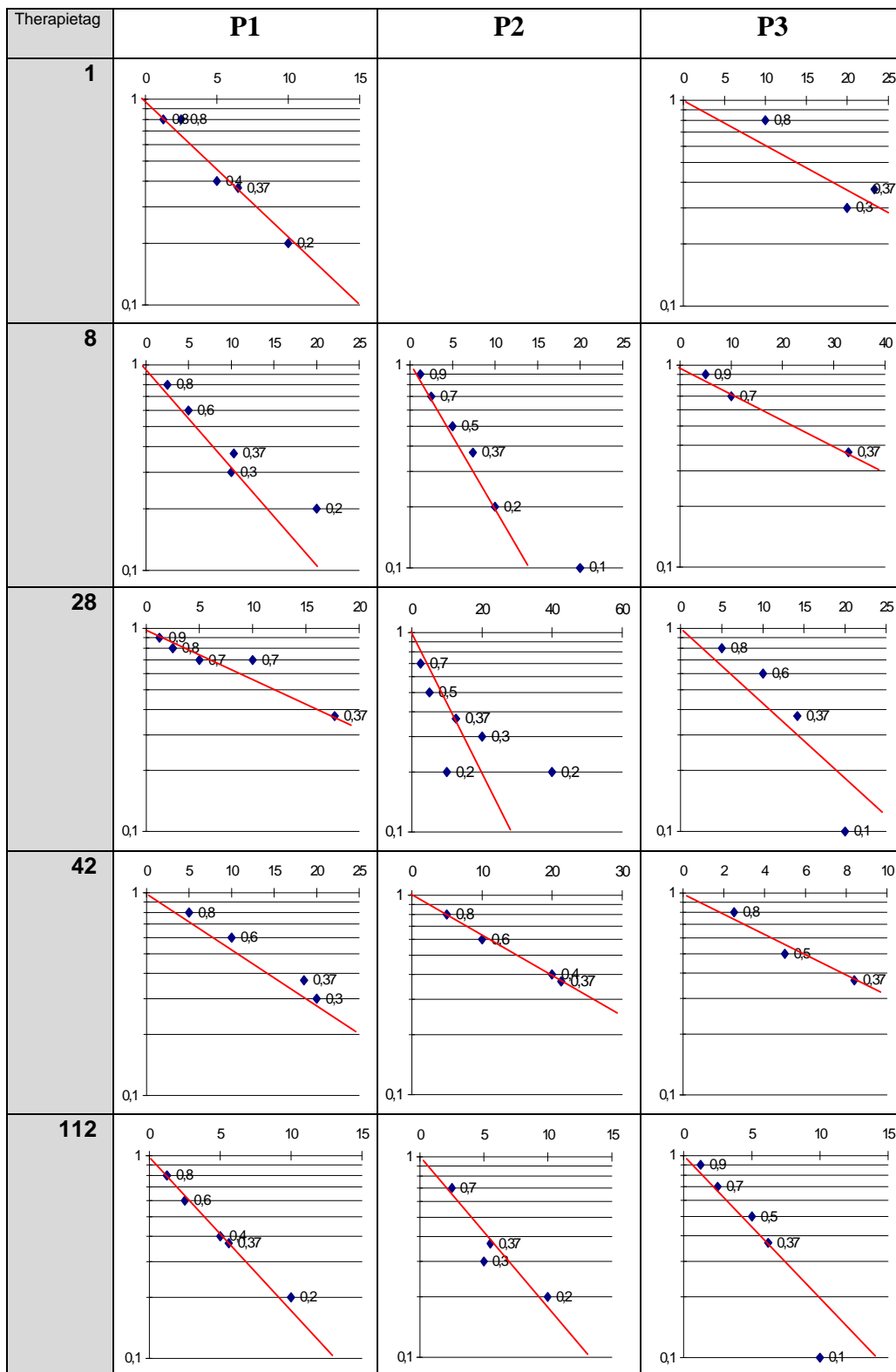


Abb. 3.9 CAFC (cobblestone area forming cells) im Phasenkontrast. Die cobblestone area imponiert als ein Zellverband von traubenförmig angeordneten Zellen in der Stromaschicht. Rechts daneben befinden sich runde, helle, aus der Bildebene hervortretende Zellen: es handelt sich um weiter differenzierte Zellen, die keinen Kontakt mehr zum Stroma haben und sich im Medium befinden.

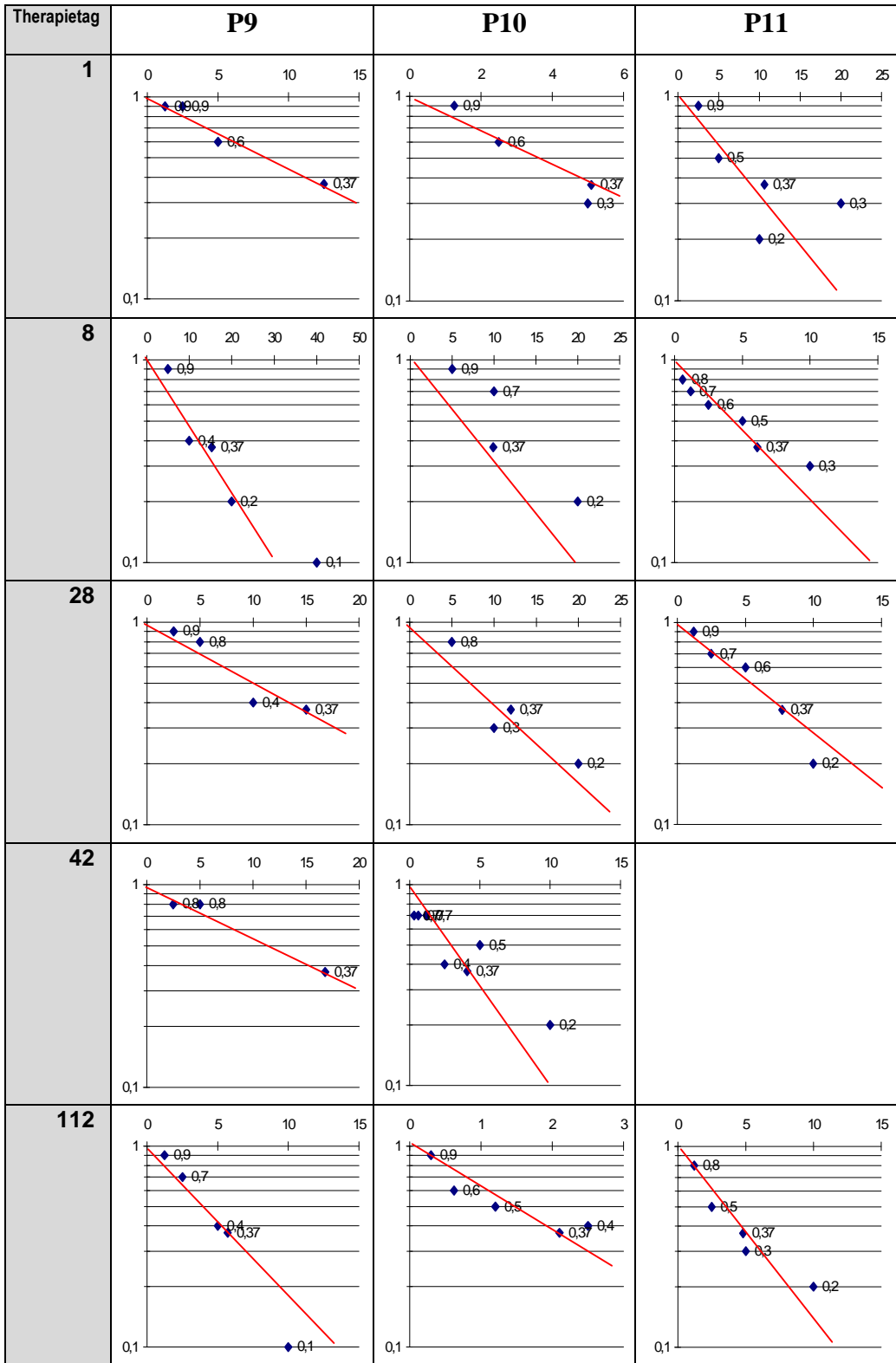
Zur Quantifizierung wurde das Prinzip der Grenzverdünnungsanalyse (Limiting Dilution Analysis) angewendet. Dieser Ansatz entspricht demjenigen, der zuvor bereits für Langzeitkulturen von Knochenmarkszellen (Jenal 1995) und von peripheren Blutzellen (Maciejewski et al. 1996) eingesetzt worden war. Zur Quantifizierung der CAFCs (oder long term culture initiating cells, LTC-IC) wurden für jede Kultur mindestens drei Konzentrationen von Blutzellen in jeweils zehn Ansätzen (replicats) angeimpft. Die Anzahl der negativen Näpfe unter den zehn Parallelansätzen wurde mittels mikroskopischer Identifikation der

CAFCs ermittelt. Die Auswertung erfolgte nach Taswell (1981) durch logarithmische Auftragung der Anzahl negativer Kulturen (keine sichtbaren CAs) gegen die eingesetzte Zellzahl. In der Abbildung 3.10 sind die so ermittelten Daten für jede Langzeitkultur dargestellt.

Abb. 3.10 (folgende Seiten) Grenzverdünnungsanalyse in der Langzeitkultur zur Bestimmung von CAFC. Absteigende Zahlen (jeweils 1:2 Verdünnungen) von mononukleären Blutzellen wurden auf eine bestrahlte Stromaschicht angeimpft und die Anzahl der Progenitorzellen fünf Wochen später ermittelt. Der Anteil negativer Kulturen (von 10) wurde auf der Ordinate logarithmisch gegen die eingesetzte Zellzahl aufgetragen. Die Regressionsgerade geht durch den Punkt $[0,1]$ und $[1/\text{CAFC-Frequenz}, 1/e (=0,37)]$. dargestellt sind die Extrapolationen aus den verfügbaren Daten für die Patienten P1-P13 and den fünf Therapieterminen und vier Kontrollbestimmungen an gesunden Individuen.



Therapietag	P4	P5	P7
1			
8			
28			
42			
112			



Therapietag	P12	P13	Kontrollen
1			
8			
28			
42			
112			

Die Frequenz der CAFCs ergibt sich aus der Extrapolation der Daten und entspricht dem Kehrwert des Abszissenwertes bei einem Ordinatenwert von 0,37 (1/e). Dieser Wert wurde mit Hilfe des LD-Programms (Taswell 1981) ermittelt. Die berechneten CAFC-Frequenzen sind gemeinsam mit dem 95% Konfidenzintervall und dem p-Wert, der die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer linearen Beziehung zwischen der eingesetzten Zellzahl und dem Logarithmus des Anteils negativer Kulturen angibt, in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Die Werte wurden für 11 Patienten (P1 – P5, P7, P9 – P13) an den fünf unterschiedlichen Therapiezeitpunkten und für vier gesunde Kontrollpersonen errechnet. Nicht verfügbar sind die Ergebnisse am Therapietag 42 für die Patienten P11, am Therapietag 112 für den Patienten P12 und P13 die Messung vor Therapiebeginn für P13 und die ersten drei Therapiezeitpunkte für P7.

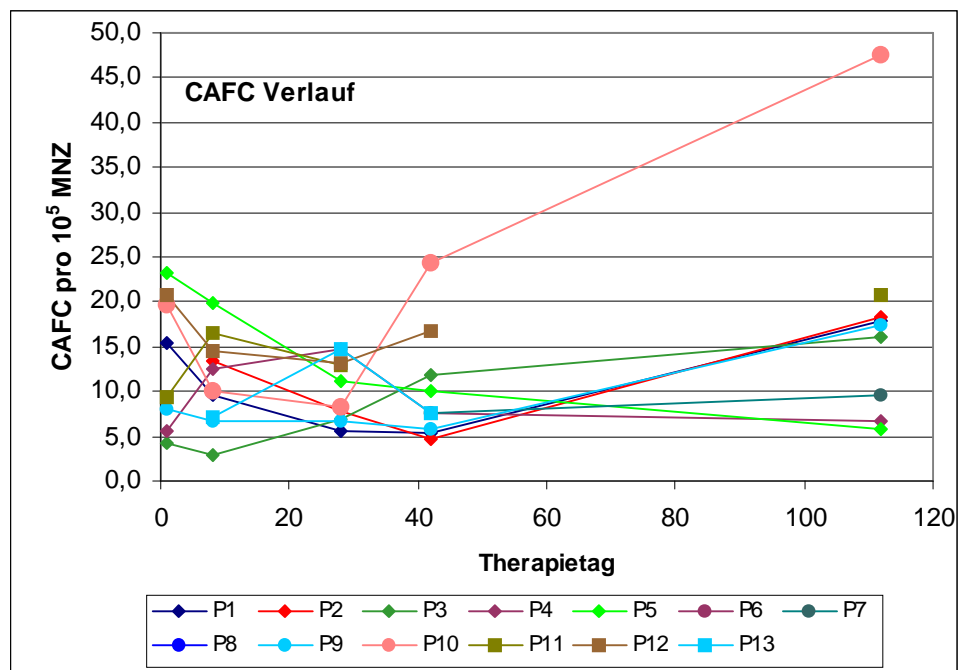


Abb. 3.11 CAFC-Frequenz im Therapieverlauf

Tabelle 3.3

Patient	Therapietag	Frequenz CAFC	95% Konfidenzintervall	P
1	1	6487	4365-12619	1
	8	10316	7074-19042	1
	28	17778	10729-51837	0,96
	42	18511	11866-42074	0,99
2	112	5619	3834-10512	1
	8	7472	5227-13102	0,96
	28	17645	9080-20820	0,03
	42	21157	13406-50162	1
3	112	5522	3691-10955	0,81
	1	23261	13928-70523	0,2
	8	32899	16590-∞	0,15
	28	14118	9201-30324	0,37
4	42	8376	4788-33431	0,61
	112	6233	4183-12224	0,98
	1	17882	11636-38597	0,25
	8	8027	5398-15644	0,16
5	28	6785	4579-13091	1
	42	13226	8715-27423	0,76
	112	15229	10083-31104	1
	1	4311	2996-7679	0,98
7	8	5015	2775-26044	0,25
	28	8917	5870-18541	1
	42	9911	6259-23792	0,3
	112	16752	9575-66862	0,61
9	42	12957	9179-22021	0,52
	112	10453	6388-28743	0,86
10	1	12486	6921-63708	0,83
	8	15262	10524-27756	0,58
	28	15013	9032-44436	0,65
	42	16772	8461-45836	0,51
11	112	5692	3842-10974	0,99
	1	5995	3223-12162	0,66
	8	9911	6260-23792	0,3
	28	11974	7946-24282	0,59
12	42	4125	2950-6854	0,02
	112	2062	1371-4155	0,87
	1	10637	7311-19495	0,21
	8	6071	4197-10968	0,54
13	28	7715	5111-15726	1
	112	4820	3323-8770	0,99
	1	4820	3323-8770	1
	8	6870	4852-11760	0,84
K1	28	7634	5350-13322	0,92
	42	5992	4060-11427	1
	8	14079	9950-24061	0,99
K2	28	6744	4550-13020	0,98
	64	13078	8891-24715	
K3		731	484-1493	0,79
K4		3475	2319-6926	0,95
		1085	749-1965	0,34
		2999	2097-5260	0,55

3.4.3. Frequenz der CAFC im Rahmen der Therapie der aplastischen Anämie

Die errechneten Frequenzen der CAFCs wurde auf eine Zellzahl mononukleärer Blutzellen (MNZ) von 10^5 umgerechnet. Die so errechneten absoluten CAFC-Zahlen in 10^5 MNZ im Therapieverlauf sind für die 11 Patienten in

Abbildung 3.11 dargestellt. Die Tabelle 3.4 dokumentiert die Frequenz der CAFCs, den Median und den Bereich für die einzelnen Therapiezeitpunkte neben den Normalkontrollen.

Weil die CAFC-Frequenzen, einschließlich derer für die Kontrollen ermittelten, deutlich zu hoch erscheinen wurde hier auf eine statistische Betrachtung verzichtet. Die Ergebnisse und mögliche methodische Unzulänglichkeiten werden in der Diskussion im Literaturkontext behandelt.

Tabelle 3.4 CAFC-Frequenzen (Absolutwerte) unter Therapie

Therapietag	Median	Bereich	n
1	252700	55900-394400	6
8	408400	33000-2659800	8
28	536200	33200-1807800	10
42	1993350	219600-4307800	10
112	538200	289800-2897400	9
Kontrolle	4702500	2100000-10252500	4

3.5. Funktionelle Kapazität der mobilisierten Zellen

Aufgrund der Untersuchungen des peripheren Blutbildes liegt eine signifikante Erhöhung der Leukozyten und Granulozyten ab Tag acht der Therapie im Vergleich zur Anzahl dieser Zellen vor Therapie vor ($p < 0,05$).

Für die CD34⁺ Zellen konnte in der Gesamtgruppe kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Zeitpunkt vor Therapie gezeigt werden.

Die reiferen Progenitorzellen, CFU-GM und BFU-E, sind über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant erniedrigt ($p < 0,05$ für CFU-GM und BFU-E). Auch hier kommt es in dem Beobachtungszeitraum zu keiner signifikanten Veränderung im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapie.