

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung der immunsuppressiven Therapie und intensiver G-CSF Gabe (10 µg/kg/d) (granulocyte-colony stimulating factor) auf die Mobilisation von Progenitorzellen ins periphere Blut von Patienten mit aplastischer Anämie untersucht und zeitlich erfasst werden. Darüberhinaus sollte die weitere Charakterisierung dieser Progenitorzellen vorgenommen werden.

4.1. Ansprechrate

In randomisierten Studien war ermittelt worden, dass die besten Therapieerfolge durch eine Kombination von Antithyozytenglobulin (ATG), Methylprednisolon (MP) und Cyclosporin A (CSA) erzielt werden (Frickhofen et al. 1995, Frickhofen et al. 1991). Weitere randomisierte Studien wiesen eine Modifikation dieses Therapiekonzeptes auf: In einer Pilotstudie der Severe Aplastic Anemia Working Party der European Bone Marrow Transplant (EBMT) Group wurden ATG, MP und CSA mit Granulozyten-koloniestimulierenden Faktor (G-CSF) kombiniert. Es wurden 5 µg G-CSF / kg Körpergewicht und Tag verabreicht. In dieser Pilotstudie wurde eine hohe Ansprechrate (82%) und eine Überlebenschance von 92% nach zwei Jahren ermittelt (Bacigalupo et al. 1995). In einer anderen Studie an 17 SAA Patienten (severe aplastic anemia) konnte ebenfalls eine Ansprechrate von 82% dokumentiert werden (Matsuo et al. 2000). Neben der immunsuppressiven Medikation (ALG (Antilymphozytenglobulin) oder ATG, MP, CSA) enthielt das Therapieprotokoll G-CSF (250 µg/d), dessen Verabreichungszeitraum jedoch nicht angegeben wurde.

Die deutsche Aplastische Anämie Studiengruppe verglich die Standardkombination ATG, Methylprednisolon, CSA mit einem Therapieschema aus CSA und G-CSF (5 µg / kg, 90 Tage). Unter der Standardtherapie war die Ansprechrate signifikant besser (Raghavachar et al. 1997).

Von den hier untersuchten Patienten sprachen 94,7 % auf die Therapie an. Dabei wurde Patient 6 nicht berücksichtigt, weil eine autologe Stammzelltransplantation im Beobachtungszeitraum vorgenommen wurde. Die leicht erhöhte Ansprechrate in der hier vorgelegten Arbeit im Vergleich zu den zitierten Studien ist vermutlich nicht signifikant und könnte zum einen auf die relativ

kleine Patientenzahl (19 Patienten), zum anderen auf einen kurzen Beobachtungszeitraum zurückzuführen sein. Die Ansprechrate wurde am Tag 112 der Therapie festgesetzt. Dagegen betrug das Intervall zwischen Behandlung und Ansprechrate in der Studie der Severe Aplastic Anemia Working Party der EBMT bis zu 441 Tagen. Es ist möglich, dass Patienten, die am Tag 112 der Therapie hinsichtlich des Therapieerfolges klassifiziert wurden, zu einem späteren Zeitpunkt eine erneute Veränderung der Hämatopoese aufweisen.

4.2. Mobilisierung von Progenitorzellen

Es wird angenommen, dass große Mengen an Stammzellen nach Hochdosis-Chemotherapie ins periphere Blut mobilisiert werden können (Bell et al. 1987, Juttner et al. 1989) und dass diese Mobilisierung unter Wachstumsfaktoren ausgeprägter sei (Siena et al. 1989, Siena et al. 1991). Bei den meisten Patienten mit erworbener AA lassen sich Stammzellen nachweisen, möglicherweise wird deren Menge durch die aktuellen *in vitro*-Kulturtechniken unterschätzt (Nissen C. 1989, Bacigalupo et al. 1991). Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich bei den meisten mit ALG behandelten AA-Patienten die Hämatopoese erholt (Frickhofen et al. 1991) und dass SCF (stem cell factor) das *in vitro* Wachstum von Stammzellen fördert (Bagnara et al. 1992).

In einer randomisierten Studie der EBMT Severe Aplastic Anemia Working Party wurden ATG, MP und CSA mit einem Therapieschema aus ATG, MP, CSA und G-CSF verglichen. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Begleituntersuchungen zeigen, dass es bei einem Teil der Patienten in dem Studienarm mit G-CSF zu einer Mobilisierung von Progenitorzellen ins periphere Blut kam. So wurden im Studienzeitraum zwischen Tag 33 und Tag 80 bei wiederholten Leukapheresen Stammzellen gewonnen. Die Menge der gewonnenen Stammzellen, gemessen anhand der koloniebildenden Einheiten (colony forming units-granulocyte/macrophage) (CFU-GM), lag bei einigen Patienten über dem Mindestwert, der für eine autologe Stammzelltransplantation gefordert wird (Bacigalupo et al. 1993).

4.2.1. CD34⁺ Zellen

Nach Gabe von Wachstumsfaktoren ließen sich bei AA-Patienten Stammzellen ins periphere Blut mobilisieren: nach Gabe von CSA und G-CSF im Anschluß an eine ALG-Behandlung wurden bei AA Patienten Stammzellen im peripheren Blut nachgewiesen (Bacigalupo et al. 1993). Diese Zellen waren in der Lage, *in vitro* große Mengen an CFU-GM und BFU-E (burst forming units-erythrocyte) zu bilden. Allerdings konnte in dieser Studie kein Anstieg von zirkulierenden Zellen mit dem CD34 Oberflächenmarker gezeigt werden.

In den Untersuchungen der hier vorgelegten Arbeit war der Anteil der CD34⁺ Zellen an den zirkulierenden Leukozyten zu Beginn der Therapie bei den AA Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant reduziert. Für die Patientengruppe als Ganzes konnte aber im Beobachtungszeitraum kein signifikanter Anstieg oder Abfall der CD34⁺ Zellen dokumentiert werden. Lediglich am Tag acht der Therapie imponierte ein CD34⁺ Zellverlust. Die an diesem Zeitpunkt gemessenen Zellzahlen waren gegenüber denen der Kontrollpersonen signifikant reduziert ($p < 0,012$). Bacigalupo und Kollegen (1997) beobachteten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Anteiles an CD34⁺ Zellen bei behandelten AA-Patienten und Kontrollpersonen unter G-CSF-Gabe. In der hier vorgelegten Arbeit wurde bei acht der 19 untersuchten Patienten ein passagerer Anstieg der CD34⁺ Zellen zu einzelnen Therapiezeitpunkten verzeichnet. Der Zeitraum, in dem diese passagere CD34⁺ Zellzahlerhöhung gesehen wurde, lag zwischen Tag 28 und 112 der Therapie. Die gemessenen Maximalwerte lagen dann deutlich über denen der Kontrollpersonen. Dieses Ergebnis weicht von Untersuchungen im Knochenmark von Patienten mit SAA ab, in denen gezeigt wurde, dass der Anteil der CD34⁺ Zellen dort signifikant erniedrigt war (Maciejewski et al. 1994). Dies wurde besonders vor Beginn der Therapie, oder in Patienten mit stark erniedrigten Granulozytenzahlen beobachtet. Die Beobachtung, dass sich im peripheren Blut von AA Patienten eine normale CD34⁺ Zellkonzentration findet, aber eine signifikant verminderte CFU-GM und BFU-E Bildung vorliegt, zeigt eine geringe Korrelation zwischen Phänotyp und Proliferationseigenschaft in der Kultur.

Grundsätzlich sollte angemerkt werden, dass die verwendeten Oberflächenmarker an gesunden Kontrollpersonen ermittelt werden, deren Hämato-

poese sich in einem steady-state befindet. AA-Patienten weisen eine gestörte oder supprimierte Hämatopoese auf, bei der sowohl funktionelle, wie auch phänotypische Unterschiede im Vergleich zu gesunden Personen bestehen können.

Es ist möglich, dass die CD34⁺ Zellpopulation bei AA-Patienten weniger frühe Stammzellen mit der Fähigkeit zur Wiederherstellung der Hämatopoese enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die auf eine immunsuppressive Therapie angesprochen haben, CD34⁺ Zellen mit einer reduzierten Proliferations- und Lebensfähigkeit aufwiesen, auch wenn diese auf normalen Stroma angeimpft wurden (Marsh et al. 1991). Darüber hinaus ist nachgewiesen worden, dass der Anteil an kleinen, blastenähnlichen Zellen in der CD34⁺ Zellfraktion erniedrigt ist. Es wird angenommen, dass diese Subpopulation für die Wiederherstellung der Hämatopoese nach Stromabestrahlung verantwortlich ist und den Phänotyp CD33⁻ / CD34⁺ aufweist (Andrews et al. 1989).

4.2.2. CFU-GM und BFU-E

Obwohl keine initiale quantitative Reduktion der CD34⁺ Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde in der hier vorgelegten Arbeit gezeigt, dass eine signifikant reduzierte Proliferationsfähigkeit (CFU-GM und BFU-E) *in vitro* vorliegt ($p < 0,04$ für CFU-GM und BFU-E zu sämtlichen Zeitpunkten) im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Zehn von 19 Patienten hatten eine nachweisbare Koloniebildung (CFU-GM) im peripheren Blut unter Therapie, diese ist jedoch stets nur transient. Hinsichtlich der BFU-E-Proliferation konnte man bei neun der 19 untersuchten Patienten ein Wachstum dokumentieren, das ebenfalls nur transient war.

Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die hier angewendete Therapie liefern. Der genaue Wirkmechanismus von ATG bei der Behandlung der AA ist bisher nicht bekannt. ATG enthält eine Vielzahl von Antikörpern gegen verschiedene Lymphozyten-Antigene (z.B. CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25, CD48, CD52, HLA-DR). Die Bedeutung dieser einzelnen Komponenten für die klinische Wirksamkeit ist unklar.

Es gelang bisher nicht, ATG durch einzelne monoklonale Antikörper zu ersetzen (Frickhofen et al. 1995). ATG zeigt zumindest *in vitro* eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkungen (Marsh et al. 1995): in Anwesenheit von Komplement wirkt es zytotoxisch auf T-Lymphozyten, es aktiviert T-Lymphozyten und stimuliert deren Proliferation und induziert auch die Produktion zahlreicher Zytokine in Lymphozyten, Stromazellen und Monozyten. Bei manchen AA Patienten findet sich eine erhöhte Anzahl an aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten. Diese Zellen produzieren Zytokine wie γ -Interferon (γ -INF) und Tumor-Nekrose-Factor- α (TNF- α), die die Hämatopoese inhibieren können (Tong et al. 1991). *In vitro* können diese Zytokine die Fas-Antigen Expression (Fas Ag) auf AA Progenitorzellen verstärken, was einerseits zu einer hämatopoetischen Suppression (Maciejewski et al. 1995a) und andererseits zu einer verstärkten Apoptose normaler CD34⁺ Zellen (Maciejewski et al. 1995b) führt. Es wurde gezeigt, dass CD34⁺ Knochenmarkzellen von AA Patienten eine verstärkte Apoptose aufweisen (Philpott et al. 1995).

ATG induziert die Apoptose normaler peripherer Lymphozyten durch eine Fas-Ag/ Fas-Ligand (Fas-L) Interaktion (Genestier et al. 1998). Bisher gelang es nicht, eine Korrelation zwischen der klinischen Wirksamkeit von ATG und Anzahl der T-Lymphozyten und γ -INT/TNF- α zu finden. Unter der Therapie mit ATG entwickelt sich eine ausgeprägte Lymphopenie, die einige Wochen persistiert (Genestier et al. 1998). Die Pathogenese dieser Lymphopenie ist multifaktoriell. Bei normalen Kontrollpersonen führt ATG zu einer Komplement-vermittelten Lymphotoxizität. Die hierfür erforderliche Dosis lag oberhalb der Konzentration, die Mitosen induzieren kann (maximal bei 1 mg/ml) (Genestier et al. 1998). Bei einer sub-mitogenen Konzentration (10 μ g/ml), die deutlich unter der Konzentration liegt, die während einer ATG Infusion erreicht wird, führt ATG zur Apoptose von aktivierten peripheren Lymphozyten. Diese exprimieren das Fas-Ag und sind dadurch sensibel für die Fas-vermittelte Apoptose. Diese ATG-induzierte Apoptose kann vollständig durch einen monoklonalen Antikörper (anti-Fas) gehemmt werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass ATG die mRNA Expression für Fas-L in peripheren Lymphozyten induzieren kann (Genestier et al. 1998).

Bei Patienten mit AA vermag ATG Granulozytenvorläufer zu stimulieren (Faille et al. 1979). Da in dieser Studie ungereinigte Knochenmarkszellen untersucht wurden, konnte die Frage nicht geklärt werden, ob eine direkte Stammzellstimulation oder ob ein indirekter Effekt vorlag, der durch den Wegfall inhibierender Faktoren aus verschiedenen Knochenmarkszellen eine verstärkte Koloniebildung zur Folge hatte.

Die Wirkung von ATG auf gereinigte CD34⁺ Knochenmarkszellen ist dosisabhängig (Killick et al 2000): in hohen Dosen (100 µg - 1 mg/ml) wirkt ATG toxisch auf normale und AA CD34⁺ Zellen, während es in niedrigen Konzentrationen (0,1 - 10 µg/ml) zu einer Zunahme der Koloniebildungsfähigkeit führt. Während der Therapie mit ATG sind die Serum-ATG-Spiegel hoch, äquivalent den Dosen, die *in vitro* stammzelltoxisch (100 µg - 1 mg/ml) wirken. Die Serum-ATG-Spiegel fallen und erreichen in ein bis zwei Monaten nach der Infusion Konzentrationen, die *in vitro* (0,1-10 µg/ml) stammzellstimulierend wirken (Killick et al. 2000). Ein solcher, direkt toxischer Effekt auf hämatopoetische Stammzellen könnte den CD34⁺ Zellabfall am Tag acht der Therapie erklären. Dass der optimale Serum-ATG-Spiegel für ein maximales Koloniewachstum erst Wochen nach der ATG-Infusion erreicht ist, erklärt möglicherweise die Spanne zwischen Therapiezeitpunkt und Regeneration der Hämatopoese.

In dieser Arbeit kommt es unter der Therapie mit ATG, CSA und G-CSF zu einer Erholung der Hämatopoese, die sich an Hand der Anzahl von Leukozyten und Granulozyten zeigte. Die Anzahl der ins periphere Blut mobilisierten CD34⁺ Zellen erhöhte sich bei elf von 19 Patienten unter Therapie, sechs dieser Patienten wiesen diese Erhöhung zwischen dem Therapietag 28 und 42 auf. Bei den AA Patienten war die absolute Zahl der gebildeten Kolonien zu jedem Zeitpunkt signifikant reduziert. Unter Therapie bildeten zehn (CFU-GM) bzw. neun (BFU-E) von 19 untersuchten Patienten mehr Kolonien als zu Therapiebeginn. Verglichen mit Normalpersonen wurden jedoch zu keinem Zeitpunkt Normalwerte erreicht. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen ebenfalls eine signifikant erniedrigte CFU-GM Bildung bei AA Patienten nachgewiesen wurde (Bacigalupo et al. 1997). Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass der

Nachweis erhöhter Werte an CD34⁺ Zellen im peripheren Blut (z.B. Patient P1 Zeitpunkt d 42), mit dem Auftreten von CFU-GM und BFU-E korreliert. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich bei diesem Patienten die höchsten Leukozyten- und Granulozytenzahlen nachweisen. Ob das Ausmaß der mobilisierten Progenitorzellen eine Vorhersage oder Quantifizierung des Therapieerfolges zulässt, ist in dem hier angewendeten Zeitfenster nicht sicher zu klären.

Ähnlich ausgeprägte Erhöhungen der Anzahl peripherer CD34⁺ Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen kommen während der Regenerationsphase nach myelosuppressiver Chemotherapie mit (Richman et al. 1976) oder ohne gleichzeitiger G-CSF (Demuyne et al. 1992) oder GM-CSF-Gabe (Elias et al. 1992), oder während der isolierten GM-CSF Gabe vor (Gianni et al. 1989).

In manchen Untersuchungen kommt es zu einer Knochenmarkssuppression, während in anderen eine Erhöhung der Leukozytenzahlen und Knochenmarkszellularität beobachtet wird. Je nach Untersuchungsprotokoll wird die Mobilisation nach einer Woche oder nach mehreren Wochen dokumentiert. Die Mobilisation, das heisst der Eintritt großer Zahlen von Vorläuferzellen ins periphere Blut, erfolgt nicht während der steady-state Hämatopoese. Frühe Untersuchungen an Mäusen und an Menschen hatten gezeigt, dass es sehr wenige Zellen im peripheren Blut gibt, die im steady-state eine Langzeit-Regenerationsfähigkeit des Knochenmarkes besitzen (Micklem et al. 1975, Abrams et al. 1980). Nach CSA- und G-CSF-Gaben gelang an Mäusen der Nachweis dieser Zellen im peripheren Blut (Moulinex et al. 1990, Craddock et al. 1992). Auch bei Menschen konnten im normalen peripheren Blut Zellen nachgewiesen werden, die eine Langzeit-Kolonie-induzierende (LTC-IC) Kapazität haben (Dooley & Law 1992, Udomsakdi et al. 1992).

4.2.3. Cobblestone area forming cells (CAFC)

In der hier vorgelegten Arbeit fand sich bei den AA Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen keine signifikante Reduktion der CAFC. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes konnte kein signifikanter Anstieg der CAFCs im Vergleich zu Therapiebeginn beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den bislang publizierten Untersuchungen. Studien zur Unter-

suchung der CAFC-Frequenz im menschlichen peripheren Blut finden sich in der Literatur bislang nicht. Im peripheren Blut wurde mit einem vergleichbaren Ansatz, (long-term culture-initiating cell, LTC-IC) jedoch gezeigt (Bacigalupo et al. 1997), dass die LTC-IC Frequenz von SAA Patienten signifikant reduziert war im Vergleich zu Kontrollpersonen, die mit G-CSF behandelt wurden. In einer weiteren LTC-IC Untersuchung wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den AA Patienten und den nicht behandelten Kontrollpersonen dokumentiert (Maciejewski et al. 2000).

In der hier vorgelegten Arbeit beträgt der Median der errechneten CAFC-Frequenz im peripheren Blut von vier gesunden Kontrollpersonen $62,7 / 10^5$ MNZ. In den bislang publizierten Studien variieren die Angaben zu den LTC-IC von gesunden Kontrollpersonen zwischen $0,34/10^5$ (Maciejewski et al. 1996) und $2,4/10^5$ (Bacigalupo et al. 1997). Selbst unter der Annahme auf das Vorliegen einer großen Varianz für zirkulierende LTC-ICs erscheint der in dieser Arbeit ermittelte Wert zu hoch. Möglicherweise spielen methodische Fehler eine Rolle. Ein eventuell nicht ausreichend bestrahltes Stroma könnte zu einer Kontamination mit gesunden Knochenmarkstammzellen geführt haben. In der Folge wären die ermittelten CAFC-Frequenzen sowohl für das gesunde Blut der Kontrollpersonen, wie auch der AA-Patienten falsch hoch.

Diese Annahme wird durch CAFC-Untersuchungen am Knochenmark gestützt (Jenal, 1995). An 28 gesunden Spendern wurde eine CAFC-Frequenz von $70 / 10^5$ MNZ nachweisen. Die Kulturbedingungen waren in beiden Untersuchungen gleich. Der Nachweis gleich hoher CAFC-Frequenzen im Knochenmark und im peripheren Blut normaler Kontrollpersonen erscheint nicht plausibel. Es konnte gezeigt werden, dass das LTC-IC Verhältnis im Knochenmark : peripherem Blut = $9,2 : 1$ (Maciejewski et al. 2000) bzw. $6,8 : 1$ (Maciejewski et al. 1996) beträgt.

Die ermittelten CAFC-Frequenzen für die AA Patienten unterscheiden sich ebenfalls von bislang veröffentlichten vergleichbaren Untersuchungen. Es wurden Werte von $7,7$ bis $17,5 / 10^5$ MNZ dokumentiert. Basierend auf den LTC-IC Ansatz konnte bislang im peripheren Blut von AA-Patienten LTC-ICs von 0 (Bacigalupo et al. 1997) bis $0,23 / 10^5$ MNZ (Maciejewski et al. 2000) nachgewiesen werden. Neben der potentiellen Stammzellkontamination des Stromas, wäre es denkbar, dass eine andere methodische Unsicherheit zu

falsch hohen CAFC-Werten geführt hat. Da die weißen Blutkörperchen in der AA stark erniedrigt sind, würde die Verwendung der MNZ als Nenner zu einer Überschätzung der CD34⁺ Zellen, der CFU-GM, BFU-E und CAFC führen.

Bei der Darstellung der hier verwendeten Daten sind daher stets auch die Absolutzahlen verglichen worden. Dies führte jedoch nicht zu einer anderen Interpretation der Ergebnisse.

Bislang ist mehrfach gezeigt worden, dass das klonogene Potential der LTC-IC konstant und bei der AA reduziert ist (Maciejewski et al. 1996). In Bezug auf den CD34⁺ Zellgehalt im peripheren Blut von AA Patienten gibt es hingegen kontroverse Daten: signifikanter Unterschied zwischen AA Patienten und Kontrollgruppe einerseits (Maciejewski et al. 1996), kein Unterschied (Bacigalupo et al. 1997) andererseits. Über diese Befunde hinaus konnte gezeigt werden, dass das klonogene Potential von CD34⁺ Zellen in der AA auf 20% des Potentials normaler CD34⁺ Knochenmarkszellen reduziert ist (Marsh et al. 1991). Gegen eine rein numerische Reduktion von "Stammzellen" spricht die Tatsache, dass das Zelldefizit auf dem Niveau der determinierten klonogenen Progenitoren deutlich ausgeprägter ist als auf der Ebene der CAFC. In der hier vorgelegten Arbeit weisen die untersuchten Patienten eine Reduktion um den Faktor 33 für CFU-GM und um den Faktor 98 für BFU-E auf. Andererseits finden sich bei Patienten trotz deutlich reduzierter Progenitoren weitgehend normale Zellzahlen. Beide Beobachtungen weisen auf Regulationsmechanismen der Proliferation und Differenzierung hin, deren Veränderungen und Störungen bei Patienten mit AA noch nicht ausreichend bekannt sind.

Weshalb *in vitro* die CAFCs im Knochenmark erniedrigt, im peripheren Blut hingegen normal sind und welche Bedeutung diese Beobachtung für die *in vivo* Situation hat, ist offen. Die CA ist zwar morphologisch eindeutig als ein im Stromazellverband liegender Klon einer sehr frühen Progenitorzelle definiert, genaue zytologisch-morphologische Untersuchungen dieser Zellen gibt es jedoch nicht. Es bleibt unklar, in welchem Ausmaß sich die CA-Zellen bei den unterschiedlichen Störungen der Hämatopoese verändern.

In den hier untersuchten Patienten konnten CAFC in Abwesenheit von CFU-GM und BFU-E nachgewiesen werden. Demnach könnten sehr frühe Progenitorzellen vorhanden sein, ohne dass determinierte Progenitorzellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stimmt mit der Feststellung

überein, dass bei den meisten AA-Patienten eine Erholung der Hämatopoese einsetzt, ohne dass eine Koloniebildung im Knochenmark vorliegt (Bacigalupo et al. 1980).

Obwohl einige Unsicherheiten in der Interpretation der CAFC-Reduktion nicht ausgeschlossen werden können, eignet sich die angewandte Methode jedoch sicher zum Nachweis einer sehr frühen, funktionell definierten Vorläuferpopulation. Ob ein primärer Stammzelldefekt bei der AA vorliegt, lässt sich mit dieser Methode nicht eindeutig klären. Die Beobachtung, dass die CAFCs im Knochenmark reduziert sind, sich im peripheren Blut hingegen nicht von den Kontrollpersonen unterscheiden, könnte auf lokale inhibierende Mechanismen auf die ersten Differenzierungsschritte einer primär intakten Stammzelle hinweisen.

4.3. Kinetik der Regeneration

Es wurde gezeigt, dass bei der AA eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit eines deutlich reduzierten Stammzellpools vorliegt. Trotz dieser Tatsache ist die Anzahl dieser Zellen ausreichend, um langfristig ausreichend reife Blutzellen zu produzieren. In dieser Arbeit weisen die determinierten Vorläuferzellen zu keinem Zeitpunkt eine quantitative Erholung auf. Trotzdem lassen sich unter der Therapie ab dem Therapietag 28 im Blutbild normale Zellzahlen nachweisen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Studie von Maciejewski (2000). Mittels des LTC-IC Ansatzes konnte an Knochenmark und peripheren Blutzellen von AA Patienten gezeigt werden, dass zu Beginn der Erkrankung eine signifikante Verminderung der Progenitorzellen vorlag. Unter der Therapie mit ATG und CSA kam es zu einer Erhöhung dieser Progenitorzellen: im Knochenmark um das sechsfache nach drei Jahren, im peripheren Blut um das vierfache nach zwei Jahren. Trotz einer Normalisierung des Blutbildes lag weiterhin eine Reduktion der Progenitorzellen vor. Verglichen mit der Anzahl von Progenitorzellen im Knochenmark von Kontrollpersonen wurde nur 10%, im peripheren Blut 15%, erreicht.

In der hier vorgelegten Arbeit ist gezeigt worden, dass im peripheren Blut bei der AA die Anzahl der determinierten Progenitoren deutlich erniedrigt ist. Dieses erfolgte an Hand funktioneller Untersuchungen (CFU-GM, BFU). Diese

Ergebnisse unterscheiden sich von funktionellen Untersuchungen an peripherem Blut (Maciejewski et al. 2000) und stimmen mit Untersuchungen zur Immunphänotypisierung überein (Bacigalupo et al. 1997).

Neben der quantitativen Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit die Frage nach der Regenerationskinetik unter Therapie und hochdosierter G-CSF-Gabe untersucht. Theoretisch sollte die Unterbrechung des pathophysiologischen Weges, der die Zerstörung der Hämatopoese ausgelöst hatte, zu einer erneuten Expansion der Stammzellreserve führen. Dieser Ansatz wird durch die Beobachtung gestützt, dass einige Patienten unter immunsuppressiver Therapie eine vollständige hämatopoetische Remission erreichen. Die Tatsache, dass die meisten Patienten jedoch nur eine inkomplette Remission erreichen, suggeriert, dass der zugrunde liegende, quantitative Defekt nicht einfach korrigiert wird.

Die Anzahl von CAFC (oder auch von LTC-IC) variieren selbst in gesunden Kontrollpersonen stark. Um klare Aussagen zur Regenerationskinetik machen zu können, bedarf es einer genauen Beobachtung in einem konkreten Zeitfenster. Die hier vorgelegten longitudinalen Ergebnisse unterscheiden sich von bislang publizierten Studien, in denen ein stark erniedrigter Stammzellpool (Maciejewski et al. 1996) gezeigt wurde. Im Hinblick auf die reduzierte Koloniebildungsfähigkeit (Bacigalupo et al. 1997) stimmen die hier dokumentierten Ergebnisse überein. Vor dem Hintergrund normaler Blutbildwerte konnten weder eine Erholung der Koloniebildungsfähigkeit, noch eine Veränderung der CAFCs nachgewiesen werden. Patienten, deren Blutbild sich normalisierte, wiesen somit keine Veränderung ihres Stammzellkompartimentes im Blut auf. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, in denen AA-Patienten mit kompletter Remission nach Knochenmarktransplantation oder immunsuppressiver Therapie untersucht wurden (Bacigalupo et al 1992, Podesta et al. 1998).

Um zu erklären, weshalb trotz Remission weiterhin erniedrigte determinierte Progenitorzellen in der AA nachgewiesen werden, ließen sich folgende Thesen formulieren: erstens, das Regenerationspotential der hämatopoetischen Stammzelle ist durch eine immanente Störung limitiert. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung der Telomerverkürzung in der Aplasie (Ball et al. 1988) und knochenmarktransplantierten Patienten (Notaro et al.

1997) unterstützt. Im Vergleich zu ihren Spendern wiesen Knochenmarksempfänger, die nicht an einer Transplantatabstoßung litten, signifikant kürzere Telomere auf (Notaro et al. 1997), das Ausmaß der Telomerverkürzung nach der Transplantation war invers korrelierend mit der Menge der infundierten Stammzellen (Ball et al. 1988). Diese Beobachtung ließe die Schlussfolgerung zu, dass die Rekrutierung der Stammzellen von der Größe des Stammzellenpools abhängt. Durch Zytokine (z.B. G-CSF) wird die Telomeraseaktivität verstärkt. Dies führt zu einer geringeren Telomerverkürzung, verhindert wird diese jedoch nicht (Moore, 1997).

Zweitens könnte ein reduzierter Stammzellenpool bei AA Patienten in Remission auf eine "Erschöpfung" der Stammzellen hinweisen. Die Telomerverkürzung bei AA Patienten in Remission und nach Knochenmarkstransplantation könnte durch eine höhere Teilungsrate der verbliebenen Stammzellen erklärt werden (Ball et al. 1988). Die normalen Blutbildwerte gingen somit zu Lasten einer Stammzelldepletion. Die Theorie, dass eine normale hämatopoetische Funktion, die durch einen reduzierten Stammzellenpool aufrecht erhalten wird, zu einer "Erschöpfung" der Stammzellen führt, wird durch die Beobachtung widerlegt, dass bei Erreichen normaler Blutbildwerte die Telomere stabil sind (Ball et al. 1988).

Drittens könnte das Fehlen eines normalen Stammzellenpools bei AA-Patienten in Remission oder nach Knochenmarkstransplantation einen Schutzmechanismus des hämatopoetischen Systems darstellen, eine komplette "Erschöpfung" der Stammzellen zu verhindern. Alternativ könnte der persistierende Defekt im Stammzellenpool das weitere Bestehen des pathophysiologischen Prozesses anzeigen, der das Knochenmarkversagen ausgelöst hatte und nun weiterhin eine vollständige Erholung verhindert. Eine relativ stabile Remission würde einen ausgeglichenen Zustand zwischen Zerstörung und Regeneration der hämatopoetischen Zellen darstellen. Wenn jedoch Ziel der immunmedierten Stammzellzerstörung sehr frühe hämatopoetische Zellen sind, würde der Nachweis normaler Blutbildwerte gegen das Bestehen dieses immunmedierten Prozesses sprechen, der die Blutbildung inhibiert.

Unabhängig von der Ursache, weshalb ein normaler Stammzellenpool nicht gebildet werden kann, stellt der Nachweis normaler Blutbildwerte bei diesen Patienten eine ausgeprägte Kompensationsfähigkeit der verbliebenen

Stammzellen dar, die trotz ihres quantitativen Mangels ausreichend Blutzellen generieren können. Die Frage, ob unter diesen Umständen eine "Erschöpfung" der Stammzellreserve eintreten könnte, müsste in Untersuchungen mit längeren Beobachtungsintervallen und an Patienten nach Langzeitremission geklärt werden.

Die Bedeutung dieser Stammzellenreserve wurde erneut in der Arbeit von Tisdale und Kollegen herausgestellt (2000). Hier wurde gezeigt, dass die Therapie mit hochdosiertem Cyclophosphamid zwar wirksam ist, aber ohne Stammzellsupport auf Grund der erhöhten Morbidiät und Mortalität zu gefährlich ist. Diese Beobachtung bestätigt die Wichtigkeit des Ansatzes, autologe Stammzellen zu gewinnen, um die Aplasiephase nach einer Hochdosis-Cyclophosphamidtherapie zu reduzieren.

Es ist daher sinnvoll, neben G-CSF weitere Zytokine (z.B. Stammzellfaktor, FL-T3-Ligand) hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Stammzellmobilisierung zu untersuchen. Neben der Mobilisierung von Stammzellen ins periphere Blut sind moderne Verfahren, die *in vitro* eine Expansion von Stammzellen erlauben, eine attraktive Ergänzung, um ausreichende Mengen an Stammzellen zu erhalten.