

Simona Martin

Dr. med.

Charakterisierung der hämatopoetischen Stammzellausbeute bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren unter verschiedenen Mobilisierungsverfahren

Geboren am 17.10.1963 in Sibiu, Rumänien

Reifeprüfung am 24.6.1982 in Sibiu, Rumänien

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom 1982 bis 1988 an der Fakultät für allgemeine Medizin, Bukarest, Rumänien

Klinisches Studium an der Fakultät für allgemeine Medizin, Bukarest, Rumänien

Staatsexamen 17.9.1988 an der Fakultät für allgemeine Medizin, Bukarest, Rumänien

Praktisches Jahr im klinischen Krankenhaus Fundeni, Bukarest, Rumänien

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Rainer Haas

Die autologe Transplantation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut ist ein fest etabliertes Verfahren bei der Hochdosistherapie verschiedener hämatologischer Erkrankungen und solider Tumoren. Die Kinetik der hämatopoetischen Rekonstitution nach einer Hochdosistherapie ist von der Zahl der transplantierten Stammzellen anhängig: je größer die Menge der infundierten CD34+ Zellen, desto kürzer die Aplasie und niedriger die assoziierte Morbidität, im Endeffekt eine kürzere Hospitalisierung. Diese Beziehung begründet die Versuche, Mobilisierungsprotokolle zu entwickeln, die eine maximale Ausbeute an hämatopoetischen Stammzellen bei jedem einzelnen Patienten ermöglichen.

Die bevorzugte Modalität der Stammzellmobilisierung bei Patienten mit malignen Erkrankungen ist die Verabreichung des Granulozyten Kolonien-stimulierenden Faktors (G-CSF) im Anschluß an eine zytotoxische Chemotherapie. Offene Fragen im Rahmen

dieses Mobilisierungsverfahrens betrafen noch die benötigte Dosis, sowie das optimale G-CSF Verabreichungsschemata, die eine maximale Ausbeute an CD34+ Zellen bei einem Patienten bewirken können.

Ziel unserer Arbeit war, Faktoren für die Stammzellmobilisierung- und Gewinnung zu definieren, die es erlauben, eine möglichst hohe Ausbeute an CD34+ Zellen bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren zu erreichen.

Das in unseren Untersuchungen festgestellte Fehlen einer Dosis-Wirkung Beziehung weist darauf hin, daß Dosierungen höher als 300µg G-CSF/Tag für die Mehrheit der Patienten nicht nötig sind. Anders als während der 'steady-state' Mobilisierung, wirkt das nach einer Chemotherapie verabreichte G-CSF synergisch mit den endogen erzeugten Zytokinen, die als Reaktion auf die Chemotherapie-induzierte Aplasie produziert werden. Wir konnten in dieser Arbeit nachweisen, daß diese Tagesdosis ausreichend ist um CD34+ Zellen bei Krebspatienten zu mobilisieren, vorausgesetzt daß die hämatopoetische Reserve durch vorangegangene zytotoxische Therapie oder andere noch unbekanntes krankheitsassoziierte Faktoren nicht geschädigt ist. Aufgrund dieser Daten läßt sich schließen, daß Dosierungen über 300 µg G-CSF/Tag nach einer zytotoxischen Chemotherapie nicht in der Lage sind, die CD34+ Zellkonzentration im peripheren Blut zu erhöhen. Dies gilt besonders für Patienten mit Morbus Hodgkin, die häufig eine Vorgeschichte mit vorangegangenen Chemotherapie und Großfeldbestrahlung aufweisen. Ein signifikanter Anteil der Patienten mit akuter Leukämie sind ebenfalls schlecht mobilisierbar. Ein Grund dafür ist die verringerte Produktion normaler hämatopoetischen Zellen verursacht durch der malignen Stammzellerkrankung, ein weiterer die Sequelae der relativ myelotoxischen Induktions- und Konsolidierungstherapie.

Wir haben auch die Wirkung einer späten Gabe von G-CSF, beginnend am Tag 6 nach Beendigung der zytotoxischen Chemotherapie auf die Mobilisierung von CD34+ Zellen untersucht. Ausgehend von einem ohnehin erhöhten G-CSF Serumspiegel nach einer Chemotherapie, scheint die frühe Gabe des Wachstumsfaktors während der Aplasieperiode überflüssig zu sein. Die G-CSF Verabreichung kann auf die 'rebound'-Periode verschoben werden, wann der von der steigenden Zahl neutrophiler Granulozyten geübte negative 'feed-back' Mechanismus wirksam wird. Die Effizienz der Stammzellmobilisierung nach diesem Protokoll unterschied sich von den Mobilisierungsergebnissen bei Patienten, die das

G-CSF 24 Stunden nach Abschluß der Chemotherapie erhielten nicht. Eine solches Verabreichungsschema führt zu einer Kostenreduktion für die ansteigende Zahl von Patienten, die Kandidaten für eine Hochdosistherapie mit Blutstammzelltransplantation sind.

Die Gewinnung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut stellt für den Patient eine geringere Belastung als eine operative Knochenmarkentnahme dar. Neben der Zytokingabe, hat auch die Leukapherese selbst Einfluß auf das Separationserfolg. Unsere Daten zeigen, daß sich durch die 'large-volume' (20 l) Leukapherese eine durchschnittlich 2fach höhere Stammzellausbeute im Vergleich zur regulären Leukapherese (10 l) erreichen läßt. Dies ist insbesondere für solche Patienten von Bedeutung, die aufgrund einer eingeschränkten Hämatopoese nur über eine geringe Zahl an zirkulierenden Stammzellen verfügen und betrifft in erster Reihe Patienten mit einer extensiven zytotoxischen Vorbehandlung, die sich negativ auf der Mobilisierbarkeit hämatopoetischer Stammzellen bewirkt. Durch die 'large-volume' Leukapherese kann ein Transplantat mit mindestens $2,5 \times 10^6$ CD34+ Zellen/kg bei der Mehrheit der Patienten während einer einzigen Apherese gewonnen werden, ohne eine preferentielle Freisetzung von primitiven oder liniendeterminierten Vorläuferzellen und ohne ein erhöhtes Risiko Tumorzellen zu mobilisieren.

Für die durch Chemotherapie und G-CSF schwer mobilisierbare Patienten sind alternative Mobilisierungsverfahren denkbar. Solche Strategien erzielen eine Modulation der adhäsiven Wechselwirkungen zwischen den blutbildenden Stammzellen und das hämatopoetische Milieu. Eine derartige Mobilisierungsform böte die kompetitive Verdrängung der Stammzellen aus ihren Bindungsstellen im Knochenmark. Möglicherweise läßt sich durch humanisierte monoklonale Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle, durch synthetische Peptide mit Motivsequenzen der Bindungsstellen oder durch Kohlenhydrat-Komponente der extrazellulären Matrix eine Stammzellmobilisierung erreichen, um die Ausbeuten an CD34+ Zellen zu erhöhen.

Neue Methoden zur Bewertung der hämatopoetischen Qualität eines Stammzelltransplantates zeichnen sich ab. Die molekularbiologische Methode des 'southern blots' erlaubt es, die mittlere Telomerlänge von CD34+ Stammzellen zu bestimmen und daraus Rückschlüsse über deren 'Alterung' zu ziehen. Ausgehend von der Telomerlänge als

Indikator für die replikative Fähigkeit einer Zelle, haben wir die Hypothese der mittleren Telomerlänge der Blutzellen als potentieller molekularer Marker für die individuelle hämatopoetische Reserve untersucht. Aus unseren Daten läßt sich schließen, daß die mittlere Telomerlänge der CD34+ Zellen oder MNC kein Indikator für die proliferative Fähigkeit des hämatopoetischen Systems ist. Die Unfähigkeit ausreichende Mengen an Stammzellen bei den schlecht mobilisierbaren Patienten zu gewinnen stellt also ein quantitatives Problem, und nicht ein replikativer Defizit dar.

Die Optimierung der Stammzellmobilisierung ist eine Voraussetzung für den Einsatz neuer Formen von Zelltherapien. Um dieses zu erzielen sind verschiedene Methoden zur Anreicherung, Depletion, Stimulierung oder funktionellen Veränderung des originellen Stammzellharvest entwickelt worden. Darüber hinaus können Zytokine für eine *ex-vivo* Inkubation der Stammzellen verwendet werden, um Progenitorpopulationen unterschiedlicher Reife und Funktion entstehen zu lassen. Mit Hilfe der Zytokine ist es auch möglich geworden, bei den meisten gesunden Spendern und Patienten ausreichende Mengen an Blutstammzellen zu gewinnen, die in Zukunft als Zielzellen für eine somatische Gentherapie dienen können.