

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie  
(Prof. Dr. med. L. Trümper)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Progenitorzeleigenschaften  
bei  
myelodysplastischen Syndromen (MDS) mit Eisenüberladung

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Julia Hartmann  
aus Quakenbrück

Göttingen 2010

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Haase

II. Berichterstatter: Prof. Dr.med. Legeler

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dressel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2011

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Myelodysplastische Syndrome (MDS).....	2
1.2	Eisen .....	5
1.2.1	Grundlagen und Metabolismus .....	5
1.2.2	Reaktionsweise des Eisens und seine potentielle Toxizität: Oxyradical overload disease .....	6
1.3	Sekundäre Eisenüberladung bei MDS – Ursachen, Folgen und Therapie ....	6
1.3.1	Ätiologie der sekundären Eisenüberladung.....	6
1.3.1.1	Erythrozytenkonzentrate .....	7
1.3.1.2	Transfusionstherapie bei MDS.....	7
1.3.2	Folgen der Eisenüberladung bei MDS und betroffene Organsysteme ..	8
1.3.3	Therapie der transfusionsbedingten Eisenüberladung .....	9
1.4	Grundlagen zu hämatopoetischen Stammzellen und verwendeten Methoden .....	10
1.4.1	Definition und Nomenklatur hämatopoetischer Stammzellen .....	10
1.4.2	In-vitro-Wachstum hämatopoetischer Zellen – Colony Assay .....	11
1.4.2.1	Besonderheiten des Colony Assay bei MDS.....	11
1.4.3	Immunozytologie und das CD34-Epitop.....	12
1.4.4	Klinisches Monitoring des Eisenhaushaltes durch Ferritin .....	12
1.5	Grundlagen, Thema und Ziele dieser Arbeit.....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1	Material.....	15
2.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.2	Chemikalien .....	15
2.1.3	Medien, Lösungen.....	16
2.1.4	Antikörper, Zytokine, Fluoreszenzfarbstoffe.....	16
2.1.5	Geräte und Software .....	17
2.1.6	Patienten und Einschlusskriterien .....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Colony Assay .....	18
2.2.1.1	Dichtegradienten-Zentrifugation und Reinigungsschritte .....	19
2.2.1.2	Ermittlung der Zellzahl .....	19
2.2.1.3	Zytokinzusätze und Kulturbedingungen .....	21
2.2.1.4	Auszählung der Kolonien .....	21

---

2.2.1.5	Statistische Auswertung.....	23
2.3	Immunomagnetische Zellanreicherung und Durchflusszytometrie .....	23
2.3.1	Immunomagnetische Zellanreicherung .....	24
2.3.1.1	Dichtegradienten-Zentrifugation und immunomagnetische Trennung der Zellpopulationen .....	24
2.3.2	Durchflusszytometrische Messung von Apoptose und Nekroseparametern an CD34-positiven Zellen .....	26
2.3.2.1	Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie und Immunozytochemie .....	26
2.3.2.2	Immunozytochemische Bestimmung von Apoptose und Nekrose	26
2.3.2.3	Durchflusszytometrische Analyse der immunomagnetisch separierten CD34-positiven Zellen.....	27
2.3.2.4	Bestimmung der prozentualen Zellverteilung .....	28
2.3.2.5	Statistische Auswertung.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	Vorstellung der verwendeten statistischen Tests.....	30
3.2	Colony Assay.....	31
3.2.1	Patientenkollektiv .....	31
3.2.1.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	31
3.2.1.2	Blutparameter .....	31
3.2.1.3	Transfusionsbedarf .....	32
3.2.1.4	Anzahl der BFU-E und CFU-GM.....	32
3.2.2	Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin < 250 µg/l.....	36
3.2.2.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	36
3.2.2.2	Blutparameter .....	36
3.2.2.3	Transfusionsbedarf .....	36
3.2.2.4	Anzahl der BFU-E und CFU-GM.....	37
3.2.3	Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin > 250 µg/l.....	38
3.2.3.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	38
3.2.3.2	Blutparameter .....	38
3.2.3.3	Transfusionsbedarf .....	39
3.2.3.4	Anzahl der BFU-E und CFU-GM.....	39
3.2.4	Vergleichende Darstellung der Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin.....	41

---

3.2.4.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	41
3.2.4.2	Blutparameter .....	43
3.2.4.3	Transfusionsbedarf .....	43
3.2.5	Statistischer Vergleich des Kolonienwachstums bei normalem und erhöhtem Ferritin.....	44
3.2.5.1	Deskriptive Angaben der statistischen Auswertung .....	44
3.2.5.2	Wilcoxon-Test .....	44
3.3	Sequenzielle Analysen des BFU-E-Wachstums .....	47
3.4	Durchflusszytometrie .....	57
3.4.1	Patientenkollektiv .....	57
3.4.1.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	57
3.4.1.2	Blutparameter .....	57
3.4.1.3	Transfusionsbedarf .....	58
3.4.1.4	Apoptose/Nekrose .....	58
3.4.2	Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin < 250 µg/l.....	61
3.4.2.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	61
3.4.2.2	Blutparameter .....	61
3.4.2.3	Transfusionsbedarf .....	61
3.4.2.4	Apoptose/Nekrose .....	62
3.4.3	Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin > 250 µg/l.....	62
3.4.3.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	62
3.4.3.2	Blutparameter .....	62
3.4.3.3	Transfusionsbedarf .....	62
3.4.3.4	Apoptose/Nekrose .....	63
3.4.4	Vergleichende Darstellung der Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin.....	63
3.4.4.1	WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore.....	63
3.4.4.2	Blutparameter .....	66
3.4.4.3	Transfusionsbedarf .....	66
3.4.5	Statistischer Vergleich des Anteils der Apoptose CD34-positiver Zellen bei normalem und erhöhtem Ferritin .....	67
3.4.5.1	Deskriptive Angaben der statistischen Auswertung der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen und der Kontrolle .....	67
3.4.5.2	Wilcoxon-Test .....	68

---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>70</b>
4.1	Signifikante Unterschiede des BFU-E-Wachstums bei Patienten mit und ohne Eisenüberladung .....	70
4.1.1	Rahmenbedingungen und Validität der Methodik des Colony Assay ...	70
4.1.2	Homogene Verteilung der Krankheitscharakteristika innerhalb des Patientenkollektivs .....	71
4.1.3	Genotoxizität und „oxyradical overload disease“ als Ursache des reduzierten Kolonienwachstums bei Eisenüberladung? .....	72
4.1.4	Signifikante Beeinflussung des Kolonienwachstums schon unterhalb des Serum-Ferritin-Schwellenwertes .....	73
4.1.5	Fazit und Ausblick .....	74
4.2	Keine Unterschiede im Wachstum der CFU- GM bei Patienten mit und ohne Eisenüberladung – notwendige Änderung der Auswahlkriterien und Zukunftsperspektiven .....	75
4.3	Stammzellfunktion als Korrelat der abnehmenden Ferritinwerte bei Chelattherapie - Interpretation der sequenziellen BFU-E-Untersuchungen .	75
4.3.1	Fazit .....	78
4.4	Kein signifikanter Unterschied bezüglich der Apoptose/Nekrose CD34-positiver Zellen bei Patienten mit und ohne Eisenüberladung .....	79
4.4.1	Verteilung von Krankheitscharakteristika und Apoptose- Nekroseanteil innerhalb des Patientenkollektivs .....	80
4.4.2	Krankheitsspezifische Eigenschaften CD34-positiver Zellen bei MDS .	80
4.4.2.1	Anzahl CD34-positiver Zellen .....	80
4.4.2.2	Apoptose CD34-positiver Zellen .....	81
4.4.3	Fazit .....	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
ANC	absolute neutrophil count
BFU-E	burst forming units-erythroid
CA	colony assay
CD	cluster of differentiation
CFU-GM	colony forming units granulocyte-macrophage
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
EK	Erythrozytenkonzentrate
EPO	Erythropoetin
FAB	French-American-British
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	forward scatter
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
IL 3	Interleukin 3
IPSS	International Prognostic Scoring System
KM	Knochenmark
LL	lower left
LR	lower right
MACS	magnetic cell separation
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MNZ	Mononukleäre Zellen
NTBI	non-transferrin-bound iron (Nicht-Transferringebundenes Eisen)
PB	Peripheres Blut
PI	Propidiumiodid
RA	Refraktäre Anämie mit unilineären Dysplasien
RAEB I	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess I
RAEB II	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess II
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien
ROS	reactive oxygen species

---

SCF	stem cell factor
S-Ferritin	Serum-Ferritin
SSC	side scatter
TK	Thrombozytenkonzentrate
UL	upper left
UR	upper right
WHO	World Health Organisation
WPSS	WHO adapted prognostic scoring system

# 1 Einleitung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine der häufigsten hämatologischen malignen Erkrankungen älterer Menschen in westlichen Ländern und vier bis fünfmal frequenter als noch vor einigen Jahren angenommen (Goldberg et al. 2010).

Die Patienten sind bei Diagnosestellung im siebten bis achten Lebensjahrzehnt (Sekeres 2010). Sie zeigen typischerweise chronische Anämien, wodurch 40-80 Prozent der Patienten dauerhaft von Transfusionen abhängig werden, mit der Folge der Eisenüberladung (Brechignac et al. 2004). Bei MDS ist Eisenüberladung verbunden mit erhöhter Morbidität durch kardiale und hepatische Schäden, erhöhte Mortalitätsraten bei polytransfundierten Patienten sind bekannt (Malcovati et al. 2005). Therapeutische Möglichkeiten bietet die Chelattherapie, für die ein Überlebensvorteil für Patienten mit low-risk-MDS von zwei unabhängigen Gruppen gezeigt wurde (Leitch 2007, Rose et al. 2007).

Jensen et al. demonstrierten 1996, dass eine adäquate Chelattherapie den Anstieg der Hämoglobinwerte und eine Abnahme des Transfusionsbedarfes bewirkt, eine weitere Arbeit bestätigt diese Erkenntnis in jüngerer Zeit (Messa et al. 2008).

Dies führt zu der Hypothese, dass nicht nur hepatische und kardiale Zellen durch Eisenüberladung geschädigt werden, sondern auch die Progenitorzellen im Knochenmark, wo sich ebenfalls überschüssiges Eisen ablagert. Als weitere Hypothese aus den Untersuchungen von Jensen folgt, dass adäquater und ausreichend lang durchgeführter Eisentzug die Funktion der Progenitorzellen verbessert.

In dieser Arbeit wurde die Proliferation der Progenitorzellen bezogen auf das Serum-Ferritin als Referenzwert anhand von Colony Assays punktuell und sequenziell bestimmt. Ob Eisen einen direkt Apoptose-induzierenden Effekt hat, wurde an Progenitorzellen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

## 1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

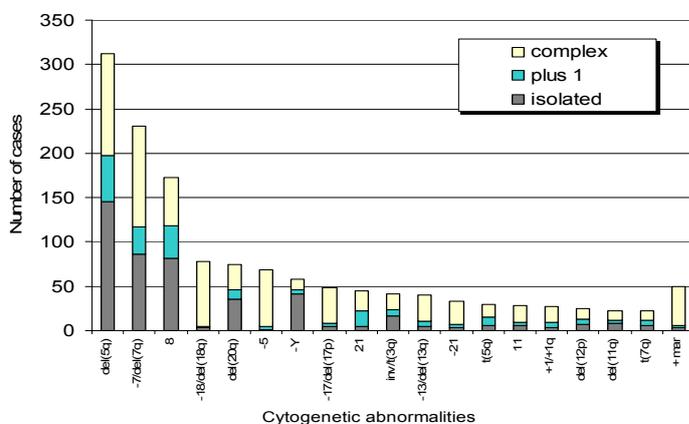
Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind heterogene klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzellen (Janssen et al. 1989). Sowohl Hyperzellularität und Zeldysplasie im Knochenmark als auch Mono-, Bi- oder Panzytopenien im peripheren Blut spiegeln die qualitativen und quantitativen Veränderungen der Hämatopoese wider.

Eine Stammzelle mit Differenzierungsfähigkeit zu Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten scheint ursächlich betroffen zu sein, wobei die gesteigerte Apoptose reifer Zellen im Knochenmark für die ineffektive Hämatopoese verantwortlich gemacht wird (Pecci et al. 2003).

MDS gelten als Vorstufe zur akuten myeloischen Leukämie (AML), ein erhöhter Blastenanteil kann sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark vorliegen. Das Risiko für den Progress liegt je nach errechnetem Wert des International Prognostic Scoring System (IPSS) zwischen 20 und 45 Prozent.

Die durchschnittliche Inzidenz für MDS liegt bei 5/100000/Jahr (Hasle et al. 1995) und steigt bei über 65-Jährigen auf 162/100.000/Jahr (Goldberg et al. 2010). Männer sind, mit Ausnahme des 5q-Syndroms, häufiger betroffen. Die Überlebenszeit der betroffenen Patienten reicht je nach Subtyp und Therapie von wenigen Monaten bis hin zu mehr als 13 Jahren (Greenberg et al. 1997, Rose et al. 2007).

In 90 Prozent der Fälle treten MDS primär auf. Sekundär sind sie gehäuft nach Radio-, Chemo-, kombinierter Radiochemo- und Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation zu beobachten. (Sekeris 2010). Die Inzidenz der häufigsten Chromosomenaberrationen bei MDS ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Inzidenz der häufigsten zytogenetischen Aberrationen unterteilt in isolierte Anomalien, Fälle mit einer zusätzlichen Anomalie und komplexe Anomalien (nach Haase et al. 2007, S.4387)**

Als Folge der Zytopenien zeigen sich klinisch unspezifische Allgemeinsymptome wie Zeichen der Anämie (Blässe, Luftnot, verminderte Belastbarkeit), Blutungsneigung und Infektanfälligkeit. Etwa die Hälfte der Patienten fällt durch Blutbildveränderungen im Rahmen von Routineuntersuchungen auf.

Die Diagnose und Einteilung nach den Kriterien der World Health Organization (WHO) (s.u.) kann gestellt werden bei Vorliegen der MDS-typischen Veränderungen im Differentialblutbild und im Knochenmark. Eine Chromosomenanalyse ist zur Diagnosestellung unerlässlich und erfolgt weiterhin zur Bestimmung der Prognosescores. Bei spezifischer Indikation stehen spezielle Methoden wie Histologie und molekulargenetische Analysen zur weiteren Diagnostik zur Verfügung. Die 1999 verfasste WHO-Klassifikation der MDS ersetzte die bis dahin valide FAB (**F**rench-**A**merican-**B**ritish)-Klassifikation weitgehend und ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Einteilung in die MDS-Subtypen ist prognostisch für das Gesamtüberleben und für die Entwicklung einer AML relevant (Cazzola et al. 2008). Sie erfolgt anhand des Blastenanteiles in peripherem Blut und Knochenmark, Anzahl der Zytopenien im peripheren Blut und Ausprägung der Dysplasien im Knochenmarksbefund. Eine AML liegt per WHO-Definition ab einem medullären Blastenanteil von 20 Prozent vor.

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Myelodysplastischen Syndrome 2008 (modifiziert nach Brunning et al. 2008, S.88-107)**

Kategorie	Abkürzung	Blastenanteil peripher	Blastenanteil KM	Dysplasien / sonstige Merkmale
Refraktäre Zytopenie mit unilineären Dysplasien	RCUD *	<1 %	<5 %	unilineäre Dysplasie
Refraktäre Zytopenie mit multilineären Dysplasien	RCMD	<1 %	<5 %	Dysplasien >10 % der Zellen in 2-3 Linien, keine Auerstäbchen, </> 15 % Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten	RARS	<1 %	<5 %	Dyserythropoese, >15 % Ringsideroblasten
MDS mit del (5q)	MDS mit del (5q)	<1 %	<5 %	isolierte del(5q)
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess I	RAEB I	<5 %	<10 %	uni- oder multilineäre Dysplasie
Refraktäre Anämie mit Blastenexzess II	RAEB II	<20 %	<20 %	uni- oder multilineäre Dysplasie
Unklassifizierte MDS	MDS-U	<1 %	<5 %	unilineäre Dysplasie

\*RCUD wird unterschieden in refraktäre Anämie (RA), refraktäre Thrombozytopenie (RT) und refraktäre Neutropenie (RN)

Des Weiteren existiert seit 1997 für MDS das in Tabelle 2 dargestellte International Prognostic Scoring System (IPSS), durch das MDS-Patienten abhängig vom Karyotyp, dem Blastenanteil im Knochenmark und der Anzahl der Zytopenien in vier

Risikogruppen eingeteilt werden: low, intermediate I, intermediate II und high, dargestellt in Tabelle 3. Der IPSS-Score wird herangezogen zur Abschätzung der Prognose, der medianen Überlebenszeit, der AML-Transformationsrate und damit zu Entscheidungen über mögliche Therapiestrategien. Das WHO adapted prognostic scoring system (WPSS) (Malcovati et al. 2007), welches neben WHO-Kriterien und Karyotyp auch dem Transfusionsbedarf des Patienten Bedeutung beimisst, scheint dem IPSS in Bezug auf Prognosekalkulation überlegen zu sein (Wei et al. 2009; Park et al. 2008).

**Tabelle 2: Erhebung des IPSS-Score für MDS (Greenberg et al. 1997, S. 2085)**

Prognostische Variable	0	0,5	1	1,5	2
<b>KM-Blasten in %</b>	< 5	5-10	-	11-20	21-30
<b>Karyotyp</b>	Günstig	intermediär	ungünstig	-	-
<b>Zytopenien</b>	0/1	2/3	-	-	-

Zytopenie: Hb <10 g/dl, Granulozyten <1.800/µl, Thrombozyten <100.000/µl

Karyotyp: günstig: normal, -Y\*, 5q-\*, 20q-\* (\*=isoliert) intermediär: andere Anomalien ungünstig: komplexe (> 3 Anomalien) und Chromosom-7-Anomalien

**Tabelle 3: Abschätzung der Prognose neu diagnostizierter MDS-Patienten nach IPSS-Score (Greenberg et al. 1997, S. 2086)**

Risikogruppe	Score	Medianes Überleben in Jahren	Transformation in AML in %
<b>Low</b>	0	5,7	19
<b>Intermediate I</b>	0,5 – 1	3,5	30
<b>Intermediate II</b>	1,5 – 2	1,2	33
<b>High</b>	> 2,5	4 Monate	45

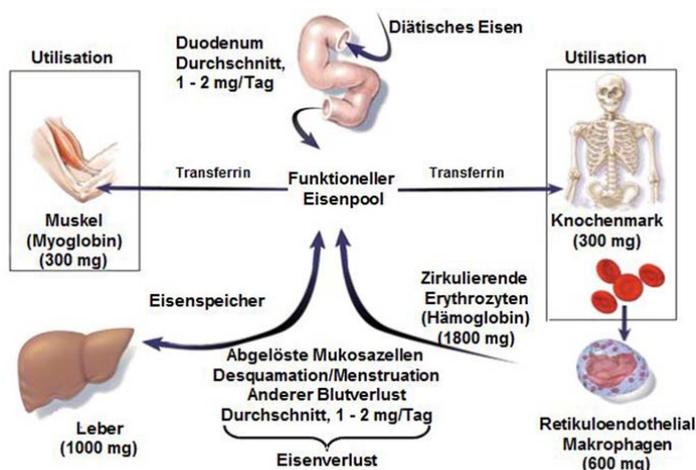
Die Wahl des Therapieregimes orientiert sich sowohl an WHO-Subtyp und Prognosescore als auch an Faktoren wie Lebensalter, Karnofsky-Index und Begleiterkrankungen. Supportiv werden je nach klinischer Symptomatik Erythrozytenkonzentrate (EK) und Thrombozytenkonzentrate (TK) transfundiert. Weiterhin sind frühzeitige Antibiotikatherapie und Vermeiden von Blutungskomplikationen bedeutsam. Bei entstehender oder manifester sekundärer Siderose durch EK-Transfusionen wird die Therapie mit Eisenchelatoren empfohlen. Hämatopoetische Wachstumsfaktoren, immunmodulatorische Therapien (Revlimid, Thalidomid), palliative und intensive Chemotherapien und weitere Substanzen wie Valproinsäure und demethylisierende Wirkstoffe werden je nach Stadium und Prognose eingesetzt. Einziger kurativer Ansatz ist die myeloablative Chemotherapie mit allogener Stammzelltransplantation.

## 1.2 Eisen

### 1.2.1 Grundlagen und Metabolismus

Eisen ist ein essenzieller Mineralstoff für den menschlichen Körper (Müller und Bosy-Westphal 2008). Auf Grund seiner Elektronenkonfiguration reagiert es als Elektronendonator und -akzeptor (Andrews 1999) und ist daher Bestandteil vieler Redoxreaktionen des Körpers. Der Körper eines gesunden 70 kg schweren Mannes enthält durchschnittlich 3,5 g Eisen (50 mg/kg Körpergewicht), der einer 60 kg schweren Frau 2,1 g (35 mg/kg Körpergewicht) (Herold 2009). Über die Duodenalschleimhaut werden 1-2 mg Eisen pro Tag aus der Nahrung aufgenommen. Die Ausscheidung erfolgt über die Abschilferung von Duodenalzellen und die Menses und entspricht mit 1-2 mg/d der Einfuhr (Pietrangelo 2004). Da der Körper keinen aktiven Ausscheidungsmechanismus für Eisen besitzt, hängt die Eisenhomöostase maßgeblich von der ausgeglichenen Aufnahme und Abgabe des Eisens ab.

Zu den bedeutsamen Proteinen im Eisenstoffwechsel gehört Ferritin, welches in Zytoplasma und Lysosomen vorliegt (Ramm und Ruddell 2005) und bis zu 4500 Eisenmoleküle als Eisenhydroxidphosphatkern speichert (Purich 2002). Transferrin ist ein Eisentransportprotein mit einer Sättigung von ca. 30 Prozent. Ist die Sättigung überschritten, liegt nicht-transferringebundenes Eisen (NTBI) im Plasma vor und bindet an andere Proteine oder niedermolekulare organische Moleküle (Andrews 1999). Hepcidin inhibiert die intestinale Eisenresorption und Eisenfreisetzung aus Makrophagen und ist bei Eisenüberladung und chronischen Entzündungen kompensatorisch erhöht (Ganz 2006). Abbildung 2 veranschaulicht den Eisenkreislauf des menschlichen Körpers.

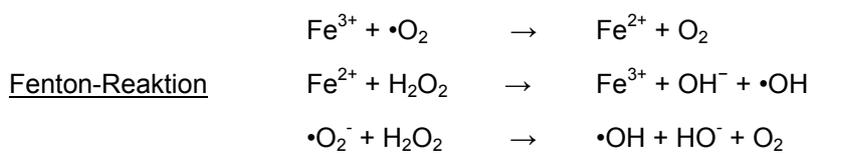


**Abbildung 2: Physiologische Eisenresorption und Verteilung (modifiziert nach Andrews 1999, S. 1986)**

### 1.2.2 Reaktionsweise des Eisens und seine potentielle Toxizität: Oxyradical overload disease

Ist die Kapazität der Eisenbindungsproteine überschritten, liegen ungebundene  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen vor. In diesem Fall läuft die sogenannte Haber-Weiss-Reaktion ab. Dabei entstehen freie, reaktive Hydroxyl-Radikale ( $\bullet\text{OH}$ ), die den reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS - reactive oxygen species, alte Bezeichnung: Sauerstoffradikale) zugeordnet werden.

#### Formel 1: Haber-Weiss-Reaktion



ROS sind auf Grund von ungepaarten Elektronen sehr reaktionsfreudig, reagieren exergon (spontan) und oxidieren zur Bildung eines Elektronenpaares andere Moleküle. Das führt zu Peroxidation von Phospholipiden in Zellorganellen und Membranen, Oxidation von Aminosäuren, DNA-Strang-Brüchen und Proteinfragmentation (Ramm und Ruddell 2005) und darüber zu Organfibrose und Zirrhose. Ein Beispiel für die Bedeutung der ROS ist das gehäufte Auftreten von Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 bei Hämochromatosepatienten mit erhöhtem Lebereisengehalt (Hussain et al. 2000).

## 1.3 Sekundäre Eisenüberladung bei MDS – Ursachen, Folgen und Therapie

Zur Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase ist die regulierte Eisenaufnahme über den Verdauungstrakt entscheidend, da der menschliche Körper keinen aktiven Ausscheidungsmechanismus für Eisen besitzt. Wird diese Regulation, z.B. durch intravenöse Verabreichung von Erythrozytenkonzentraten außer Kraft gesetzt, folgt eine Eisenanreicherung im Körper mit weit reichenden Folgen für den Organismus. Dies soll im Zusammenhang mit der Ätiologie der sekundären Eisenüberladung, den Folgen für MDS-Patienten und den Therapiemöglichkeiten erläutert werden.

### 1.3.1 Ätiologie der sekundären Eisenüberladung

Die Ursachen sekundärer Eisenüberladung sind Störungen der Erythropoese unterschiedlicher Genese und daraus resultierende chronische Anämien. Durch kompensatorisch erniedrigtes Heparin mit vermehrter intestinaler Eisenabsorption

und therapeutische Gabe von EK folgt die Eisenanreicherung im Körper. Durch den erhöhten Erythrozytenmetabolismus akkumuliert das Eisen in den Zellen des retikuloendothelialen Systems (Makrophagen im Knochenmark, Kupffer-Zellen in der Leber). Im Verlauf wird es in Parenchymzellen von Leber, Herz und endokrinen Organen eingelagert (Andrews 1999). Als Beispiel für transfusionspflichtige Anämien seien MDS, Sichelzellanämie, Thalassämie und aplastische Anämien genannt.

### 1.3.1.1 Erythrozytenkonzentrate

Zur Herstellung von Erythrozytenkonzentraten (EK) werden Plasma, Thrombozyten und Leukozyten aus Spenderblut eliminiert und die verbliebenen Erythrozyten in ein Plasmastabilisatorgemisch aufgenommen. Durch EK transfundiertes Blut enthält ca. 0,47 mg Eisen pro ml Spenderblut (Porter 2001). Das macht bei einer Spendermenge von 420 ml Vollblut ca. 200 mg Eisen pro EK.

### 1.3.1.2 Transfusionstherapie bei MDS

Bei Diagnosestellung ist die therapierefraktäre Anämie das Leitsymptom bei 80 Prozent der Patienten mit MDS (Gupta et al. 1999). Sie spricht nicht auf eine Behandlung mit Eisen, Vitamin B12 oder Folsäure an und äußert sich durch Müdigkeit, Adynamie und Konzentrationsschwäche. Der Therapiestandard sind supportive Bluttransfusionen, bei einem Fünftel der Patienten kann eine zusätzliche Erythropoetin-Therapie den Hämoglobinwert heben. Da der Hb-Wert mit einer positiven Beeinflussung der Lebensqualität korreliert (Jansen et al. 2003), sollte er über der individuellen kritischen Hb-Grenze gehalten werden, über welcher der Patient symptomlos ist. Als Richtwert dient, dass ein EK den Hb bei Normovolämie um 1-2 g/dl anhebt (Dietrich 2003).

80-90 Prozent der MDS-Patienten erhalten im Laufe ihrer Erkrankung EK (Hellström-Lindberg 2005), je nach IPSS werden 40–80 Prozent der Erkrankten dauerhaft transfusionsabhängig (Tabelle 4). Der Ferritin-Schwellenwert von 1000 µg/l wird bei MDS-Patienten nach ca. 21 EK bzw. 10,8 Monaten erreicht (Malcovati et al. 2005).

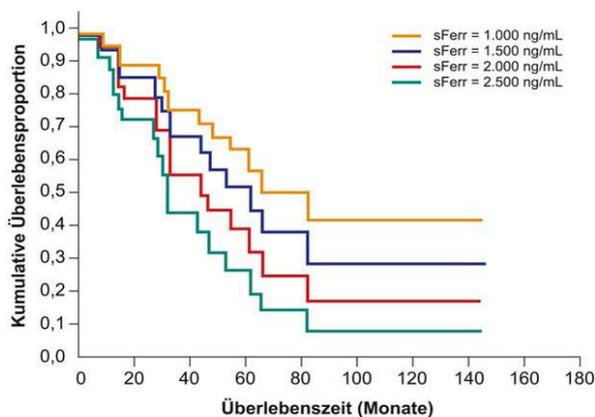
**Tabelle 4: Prozentsatz der transfusionsabhängigen Patienten mit MDS nach IPSS-Risikoscore (nach Brechignac et al. 2004)**

<b>IPSS-Score</b>	<b>Mittelwert</b>
Low	39 %
Intermediate 1	50 %
Intermediate 2	63 %
High	79 %

### 1.3.2 Folgen der Eisenüberladung bei MDS und betroffene Organsysteme

Delea et al. (2009) zeigten signifikante Zusammenhänge von Eisenüberladung mit potenziellen Komplikationen. Am häufigsten ist das Herz betroffen, wo sich Eisen in den intrazellulären Komponenten der Myozyten ablagert. Der Strukturverlust von Muskelfasern (Kolnagou et al. 2008) und Leitungssystem manifestiert sich durch fortschreitende Herzinsuffizienz mit ihren Komplikationen. Die Leber ist der wichtigste Ort der Eisenspeicherung, bei Eisenüberladung häufen sich Fibrose, Zirrhose und hepatozelluläres Karzinom, gehäuft treten auch extrahepatische Tumore auf (Hsing et al. 1995). Endokrine Funktionsstörungen können Folge einer Eisenanreicherung in Pankreas, Hypophysenvorderlappen, Nebenschilddrüse und Gonaden sein.

Vor allem Patienten der MDS-Stadien mit langer Überlebenszeit (WHO: RA, RARS, isoliertes 5q-) haben ein erhöhtes Risiko, an Folgen der Eisenüberladung zu erkranken und zu versterben (Cazzola et al. 2008). In einer Studie von Goldberg et al. (2008) zeigten MDS-Patienten häufiger kardiale Ereignisse als eine Kontrollgruppe (74% vs. 42%), und MDS-Patienten, die Transfusionen erhalten hatten, waren häufiger betroffen als transfusionsfreie MDS-Patienten (80% vs. 69%). Sowohl Transfusionsabhängigkeit als auch die Entwicklung einer Eisenüberladung beeinflussen signifikant das Gesamt- und leukämiefreie Überleben der Patienten (Sanz et al. 2008). Cazzola und Malcovati (2005) zeigten dies ebenfalls. Bei einer Kohorte von 374 MDS-Patienten lag das Gesamtüberleben transfusionsabhängiger MDS-Patienten unter dem von nicht transfusionsabhängigen MDS-Patienten. Wie in Abbildung 3 gezeigt, führt ab einem Serum-Ferritin über 1000 µg/l jede weitere Erhöhung um 500 µg/l zu einer Zunahme des Sterberisikos um 30 Prozent (Malcovati et al. 2006).



**Abbildung 3: Überlebenszeit abhängig vom Grad der Eisenüberladung (Malcovati et al. 2006, S.1589)**

### 1.3.3 Therapie der transfusionsbedingten Eisenüberladung

Auf dem "9th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes" in Florenz/Italien im Mai 2007 wurden Empfehlungen bezüglich einer Eisenentzugstherapie formuliert (Bennett 2008).

Bei folgenden Patienten wird eine Therapie empfohlen:

- Serum-Ferritin Wert > 1000 µg/l
- Transfusion von zwei oder mehr EK/Monat über ein Jahr
- Kein Ansprechen auf eine primäre Therapie, bzw. Undurchführbarkeit einer solchen Therapie
- Zur Sicherung einer Organfunktion.

Mindestens alle drei Monate sollte ein Monitoring des Eisenhaushaltes bei MDS erfolgen. Die Behandlungsdauer ist empfohlen, solange der Patient Transfusionen erhält und/oder die Eisenüberladung klinisch relevant ist. Sinkt der Serum-Ferritin-Wert unter die Grenze von 1000 µg/l, kann die Behandlung gestoppt werden, falls keine weiteren Transfusionen gegeben werden.

Eisenchelatoren werden zum Eisenentzug bei Hämosiderosen eingesetzt. Ihr Wirkprinzip beruht auf der Eigenschaft, stabile ringförmige Komplexe mit mehrwertigen Ionen zu bilden, die dann renal oder biliär ausgeschieden werden. Die kontinuierliche Therapie ist wichtig, da nur das Eisen aus dem Abbau der Erythrozyten und dem Ferritinabbau mit den Chelatbildnern reagieren kann (Gattermann 2009). Im klinischen Gebrauch sind Deferoxamin, Deferipron und Deferasirox. Ihre unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften werden in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Eisenchelatbildner (modifiziert nach Gattermann 2009, S.17-19)**

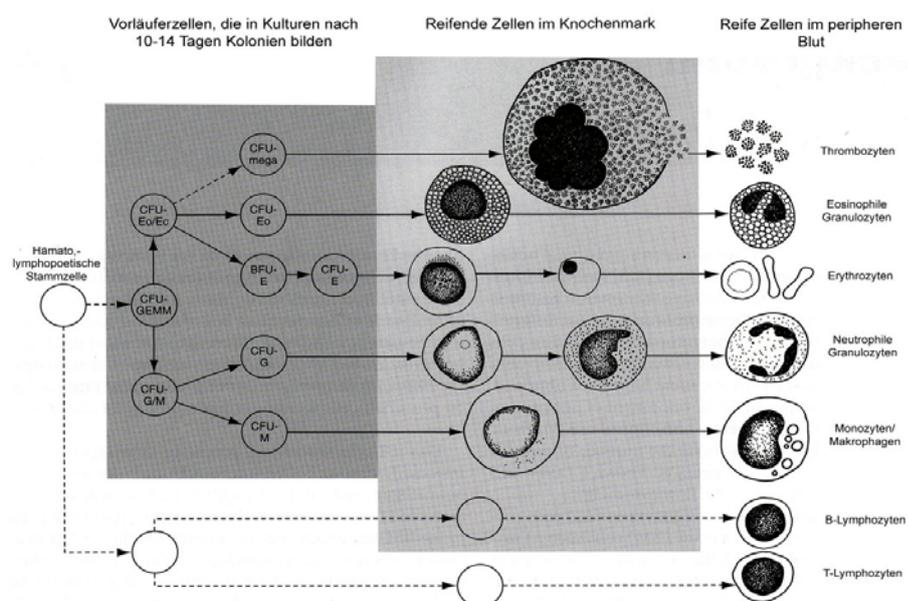
Substanz	Deferoxamin (Novartis)	Deferipron (Apotex)	Deferasirox (Novartis)
Applikation	Subkutan oder i.v.	oral	Oral
T ½ h	0,5	2-3	12-16
Einnahme	8-24 h/d an 5-7 Tagen der Woche, 25-40 mg/kg	3 x/d, 75-90 mg/kg	1 x/d, 20-30 mg/kg
Elimination	Renal und biliär	Renal	Hepatobiliär
Nebenwirkungen	Lokale Hautreaktionen, allergische Reaktionen, Hör-/Sehstörungen	Übelkeit/Erbrechen Arthro-, Neuropathien Agranulozytose	Übelkeit, Diarrhöen, Hautauschlag Kreatininanstieg
EU-Zulassung	Seit über 40 Jahren (2010)	1999	2006

## 1.4 Grundlagen zu hämatopoetischen Stammzellen und verwendeten Methoden

Hauptgegenstand dieser Dissertation ist die hämatopoetische Stammzelle. Im Folgenden sollen hierzu Grundlagen, Kultivierungsmöglichkeiten und Oberflächenmerkmale dieser Zellen erläutert werden. Abschließend wird die Bedeutung des Serum-Ferritins als Referenzwert des Eisenhaushaltes angesprochen.

### 1.4.1 Definition und Nomenklatur hämatopoetischer Stammzellen

Stammzellen des menschlichen Körpers besitzen das Potential, sich in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können. Man teilt sie erstens nach ihrer ontogenetischen Herkunft in embryonale und adulte Stammzellen und zweitens nach ihrem Differenzierungsgrad in totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent und unipotent. Die Hämatopoese lässt sich mit Hilfe eines Stammbaumes in Abbildung 4 darstellen. Ausgehend von einer pluripotenten undeterminierten Stammzelle entwickeln sich zunächst oligopotent myeloide und lymphatische Progenitorzellen (Vorläuferzellen), die dann weiter differenzieren. Die Nomenklatur der einzelnen Differenzierungsstufen der myeloischen Reihe erfolgt nach ihrer Fähigkeit zur Bildung spezifischer hämatopoetischer Kolonien *in vitro*. Die Kolonien werden als *colony forming unit* (CFU) bezeichnet, die Kolonien der frühen Erythropoese nennt man *burst forming unit* (BFU).



**Abbildung 4: Die Position kolonienbildender Zellen im hämatopoetischen Stammbaum (modifiziert nach Nissen-Druey et al. 2005, S.8)**

### 1.4.2 In-vitro-Wachstum hämatopoetischer Zellen – Colony Assay

Hämatopoetische Progenitorzellen aus Knochenmark und peripherem Blut können im Colony Assay kultiviert werden. Die Methode beruht auf der Stimulierbarkeit des Progenitorzellwachstums durch bestimmte Zytokine in einem semi-soliden Medium und erfasst myeloische und erythrozytäre Vorläufer qualitativ und quantitativ (Nissen-Druey et al. 2005). Hierbei ist der 14. Tag optimal für die Auswertung der Colony Assay (Nissen-Druey et al. 2005). Kolonien enthalten zwischen fünfzig und mehreren hunderte Zellen, Zellformationen unter 50 Zellen werden Cluster genannt (Nissen-Druey et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden Colony Assays aus peripherem Blut und Knochenmarkblut angefertigt. Das Wachstum der *burst forming units-erythroid* (BFU-E) und *colony forming units granulocyte-macrophage* (CFU-GM) wurde beurteilt.

BFU-E beschreibt die frühesten Vorläuferzellen, aus denen sich Erythrozyten entwickeln können. Nach 10-15 Tagen Kultivierung entstehen große Kolonien erythroider Zellen, die in kleinere Zellgruppen zerfallen (Öhler et al. 1999). Die Kolonien enthalten Hämoglobin und sind durch ihre rötliche Färbung zu erkennen (Nissen-Druey et al. 2005). Zur Wachstumsstimulation wurden *stem cell factor* (SCF) und *Erythropoietin* (EPO) verwendet. CFU-GM beschreibt einen pluripotenten Progenitorzelltypus, der sich zu Granulozyten und Makrophagen differenziert. In dieser Arbeit wurde ihr Wachstum durch SCF, *Interleukin 3* (IL 3), *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) und *granulocyte macrophage colony stimulation factor* (GM-CSF) angeregt.

#### 1.4.2.1 Besonderheiten des Colony Assay bei MDS

Verändertes und dysplastisches Kolonienwachstum ist ein charakteristischer Befund bei MDS, der sich sowohl in Kulturen aus Knochenmark als auch in Kulturen aus peripherem Blut widerspiegelt (Nissen-Druey et al. 2005). Der prognostische Wert des CFU-GM-Wachstums wurde von vielen Autoren untersucht (Ruutu et al. 1984, Oscier et al. 1989, Öhler et al. 2003). Ihr Wachstum kann sehr variieren (Öhler et al. 2003, Ruutu et al. 1984), dabei korreliert eine erhöhte CFU-GM-Anzahl mit verkürztem Gesamtüberleben (Öhler et al. 2003).

Die BFU-E-Anzahl ist vermindert im Vergleich zur Norm (Juvonen et al. 1999, Öhler et al. 2003), wobei Patienten des FAB-Stadiums RA signifikant höheres BFU-E-Wachstum als Patienten anderer Stadien zeigten (Oscier et al. 1989). Aus einer

finnischen Studie resultiert, dass den erythroiden Progenitoren nicht derselbe prognostische Wert wie den CFU-GM zukommt (Juvonen et al. 1999).

#### **1.4.3 Immunozytologie und das CD34-Epitop**

Hämatopoetische Zellen können durch immunzytologische Eigenschaften, basierend auf dem Nachweis von cluster-of-differentiation (CD)-Antigenen auf Zellen mittels monoklonaler Antikörper, unterschieden werden. Klinische Bedeutung hat dies bei Diagnostik und Klassifikation von Leukämien, Lymphomen und zunehmend bei MDS. In der vorliegenden Arbeit wurden magnetische Antikörper gegen CD34 verwendet. Dies ist ein Oberflächenantigen auf 1 bis 4 Prozent der Zellen im Knochenmark, mit noch unbekannter Funktion. Es befindet sich auf pluripotenten Stammzellen und determinierten Progenitorzellen einer jeden hämatopoetischen Zelllinie (Burn et al. 1992) wie unter anderem BFU-E und CFU-GM. Im Laufe ihrer Differenzierung verlieren die Zellen das CD34-Epitop. Weiterhin findet man CD34 auf Endothelzellen kleiner Blutgefäße. Der Anteil CD34-positiver Zellen unter physiologischen Bedingungen beträgt im Knochenmark 1 bis 4 Prozent (Burn et al. 1992) und im peripheren Blut 0,5 Prozent (Krause et al. 1996). Bräulke et al. (2010) zeigten bei MDS, dass 0,2-1,5 Prozent der kernhaltigen Zellen im peripheren Blut CD34-positiv sind, abhängig vom MDS-Subtyp und der Ausprägung der Leukopenie. Auch Fuchigami et al. (1999) belegten einen signifikanten Unterschied in der Anzahl zirkulierender CD34-positiver Zellen zwischen verschiedenen WHO-Subtypen, wobei eine erhöhte Anzahl mit verkürzter Überlebenszeit korrelierte. Ebenso variiert die Gesamtzahl CD34-positiver Zellen und der Anteil apoptotischer CD34-positiver Zellen im Knochenmark mit dem Krankheitsstadium (Parker et al. 1998, Pecci et al. 2003, Suárez et al. 2004).

#### **1.4.4 Klinisches Monitoring des Eisenhaushaltes durch Ferritin**

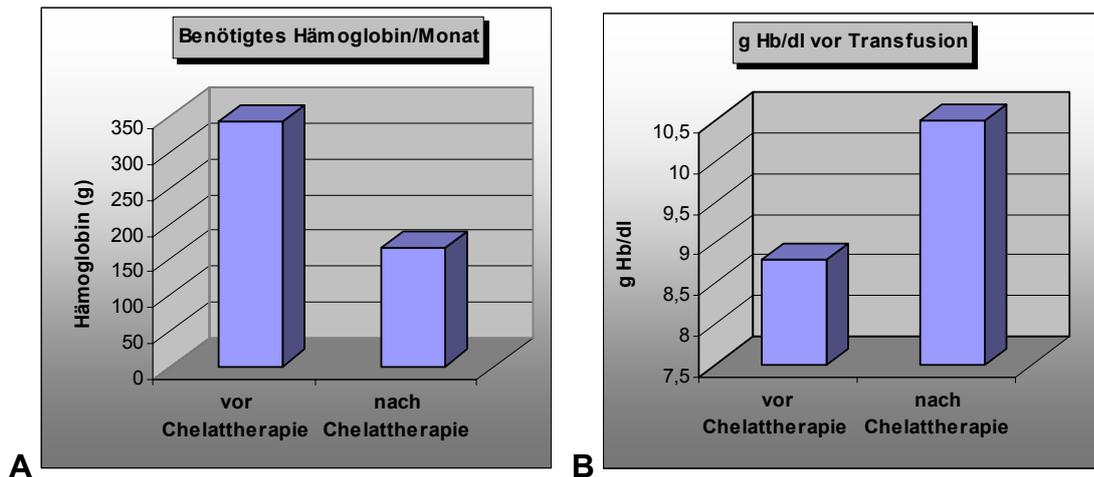
Die Korrelation zwischen Ferritin und dem Körpereisen ist etabliert und eine Ferritin-Quantifizierung ist einfach durchzuführen (Porter 2001). Die Messung ist bis auf eine venöse Blutentnahme nicht invasiv, kostengünstig, ermöglicht regelmäßige Kontrollen und gibt wichtige klinische Hinweise auf den Eisenhaushalt. Störfaktoren, wie u.a. Infektionen, sollten ausgeschlossen werden, daher sind Serienmessungen und/oder die Kombination mit anderen Indikatoren des Eisenhaushaltes nötig.

Als Richtwerte für Serum-Ferritin gelten in dieser Arbeit die Normwerte der Universität Göttingen, als Referenzbereich für Erwachsene gilt 20-250 µg/l.

## 1.5 Grundlagen, Thema und Ziele dieser Arbeit

Jensen et al. zeigten 1996, dass eine adäquate und ausreichend lange durchgeführte Eisenentzugstherapie den Transfusionsbedarf bei MDS-Patienten signifikant verbessern kann. Dabei war die maximale Verbesserung der Erythropoese nach mindestens 1,5 Jahren Chelattherapie zu beobachten.

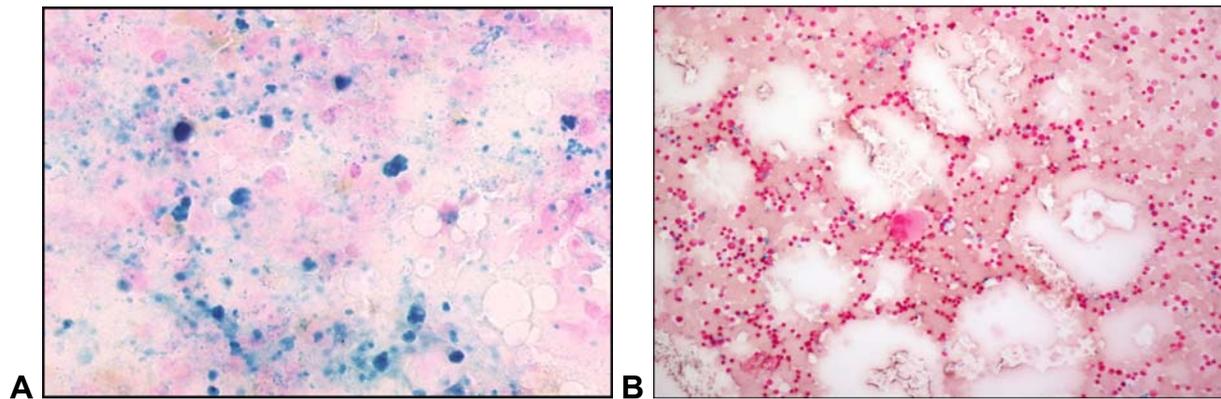
In Abbildung 5 ist eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 5: Bei elf Patienten mit MDS sank der mittlere Hb Bedarf von 434 g Hb/Monat vor Chelattherapie auf 166 g Hb/Monat nach Chelattherapie (A). Der Hb in g/dl stieg von 8,8 vor Chelattherapie auf 10,5 nach Chelattherapie (B) (modifiziert nach Jensen et al. 1996, S. 291)**

2008 wurden die Ergebnisse von Jensen durch Messa et al. (2008) bestätigt. Die Arbeitsgruppe beobachtete einen Anstieg der Hämoglobinwerte und eine Abnahme des Transfusionsbedarfes unter Eisenentzugstherapie mit dem Eisenchelator Deferasirox bei drei MDS-Patienten und einem Patienten mit primärer Myelofibrose (Messa et al. 2008).

Die Verbesserung des Transfusionsbedarfes unter adäquater und ausreichend langem Eisenentzug führt zu der Hypothese, dass nicht nur Hepatozyten und Myozyten durch zu hohe Eisenwerte geschädigt werden könnten. Durch die Ablagerungen des toxischen Eisens im Knochenmark, wie in Abbildung 6 verdeutlicht, könnte ein „second hit“ entstehen. Dieses würde zur weiteren Schädigung der durch die Grunderkrankung MDS schon beeinträchtigten Progenitorzellen des Knochenmarks führen.



**Abbildung 6: Berliner-Blau-Färbung von Knochenmarksproben. A: polytransfundierter Patient mit MDS-RARS. B: Patient mit MDS-RARS ohne Eisenüberladung. Berliner Blau färbt dreiwertige Eisenionen blau. Im Vergleich zeigt sich deutlich die Mehranreicherung an Berliner Blau bei Eisenüberladung im Knochenmark**

Diese Arbeit vergleicht erstens durch punktuelle Colony Assays aus peripherem Blut und Knochenmark anhand der Proliferation von BFU-E und CFU-GM die Stammzellfunktion von MDS-Patienten ohne und mit Eisenüberladung. Die Serum-Ferritinwerte werden als Referenzwerte einbezogen.

Durch zeitlich versetzte, wiederholte Messungen von Proben der Patienten kann zweitens die Stammzellfunktion im Verlauf beurteilt werden. Ziel ist die Erfassung eines möglichen Effektes einer Chelattherapie auf funktionellem Stammzellniveau.

Ob Eisen einen induzierenden Effekt auf die Apoptose und Nekrose von Stammzellen hat, soll drittens durch den Vergleich durchflusszytometrischer Messungen von Apoptose und Nekrose in angereicherten CD34-positiven Zellen (pluripotente Stammzellen und Progenitoren) von MDS-Patienten ohne und mit Eisenüberladung analysiert werden. Die Ergebnisse werden wiederum auf die Höhe des Ferritins als Referenzwert bezogen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma	Firmensitz	Cat-N°
BD Falcon™ 14 ml, Round Bottom Tube	Becton Dickinson S.A.	Saint Péray, Frankreich	352059
BD Falcon™ 50ml, Conical Tubes	Becton Dickinson S.A.	Saint Péray, Frankreich	352070
CellStar Tissue Culture Dishes	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland	627160
Centrifuge Tube 11 ml, conical	Nunc A/S	Roskilde, Dänemark	347856
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland	130-042-401
Reagent and centrifuge tube 15 ml, conical	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland	62.554001
Röhrchen, 50 ml, PP, Konischer Boden	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland	352058
Tube for FACScan flow cytometer 5 ml, round base	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland	551578
Zählkammer Neubauer improved	Brandt	Wertheim, Deutschland	717805

#### 2.1.2 Chemikalien

Produkt	Firma	Firmensitz	Cat N°
Acridinorange	Serva Feinbiochemica	Heidelberg, Deutschland	10665
Ampuwa	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland	1636065
BIOCOLL-Separation Solution	Biochrom AG	Berlin, Deutschland	L6115
Bovine Albumin, BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland	A7906-100G
DPBS without CA <sup>++</sup> , without Mg <sup>++</sup>	Biotec	Aidenbach, Deutschland	P04-36500
Lymphoprep	Axis Shield	Oslo, Norwegen	NYC-1114544
MethoCult® H4230 Methylcellulose without cytokines	StemCell Technologies	Grenoble, Frankreich	H 4230
RPMI Medium 1640+Glutamax	Invitrogen™ life technologies	Karlsruhe, Deutschland	72400

### 2.1.3 Medien, Lösungen

Produkt	Chemikalien	Menge
Acridinorange	Acridinorange	→ 0,007 %
Erythropoetin	PBS Epoetin beta Ampuwa	→ 104 I.E./ml
G-CSF	Filgrastim DPBS <sup>without Ca Mg + 0,1 % BSA</sup>	→ 5 µg/ml
GM-CSF	Recombinant Human GM-CSF DPBS <sup>without Ca Mg + 0,1 % BSA</sup>	→ 5 µg/ml
IL 3	Recombinant Human IL-3 DPBS <sup>without Ca Mg + 0,1 % BSA</sup>	→ 5 µg/ml
MACS-Puffer	DPBS <sup>without Ca Mg</sup> EDTA-Stammlösung BSA	500 ml 2 ml 2,5 g → gekühlt lagern
Methylzellulose	Methocult H 4230 IMDM Zellsuspension	80 ml 16 ml max 4 ml → 1 %
Propidiumiodid	Propidiumiodid-Stammlösung RPMI	→ 0,5 %
SCF	Recombinant Human SCF DPBS <sup>without Ca Mg + 0,1 % BSA</sup>	→ 5 µg/ml

### 2.1.4 Antikörper, Zytokine, Fluoreszenzfarbstoffe

Reagenz	Firma	Firmensitz	Bestell-Nr.
Annexin-V-Fluos	Roche	Mannheim, Deutschland	11828681001
CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch-Gladbach, Deutschland	130-046-703
IMDM, with L- Glutamine, 25 mM Hepes	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland	21980-056
NeoRecormon 2000 IE, Epoetin beta	Roche	Mannheim, Deutschland	
Neupogen Amgen 30 mio E, Filgrastim (G-CSF)	Amgen Switzerland AG	Luzern, Schweiz	
Propidium iodide	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland	P4170-25 MG
Recombinant Human GM-CSF	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland	215-GM-050
Recombinant Human IL-3	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland	203-IL-050
Recombinant Human SCF	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland	255-SC-010

### 2.1.5 Geräte und Software

Gerät/Software	Firma	Firmensitz	Bestell-Nr.
Cell Quest Version 3.3	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland	
FACScan Flowcytometer	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland	
Fluoreszenzmikroskop Orthoplan	Ernst Leitz Wetzlar GmbH	Wetzlar, Deutschland	
Heraeus Cytoperm 8080 Begasungsbrutschrank	Heraeus GmbH	Hanau, Deutschland	
Labofuge 400	Kendro Laboratory Products	Osterode, Deutschland	75008150
Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products	Osterode, Deutschland	75003060
Multifuge 1S	Thermo electron LED GmbH	Osterode, Deutschland	75004311
Multifuge 3L-R Heraeus	Kendro Laboratory Products	Osterode, Deutschland	75004370
QuadroMACS separation unit	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland	130-090-976
Stereomikroskop Stemi SV11	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland	83864-19
Sterilbank LaminAir HA 2448 GS	Heraeus	Hanau, Deutschland	
WIN MDI 2.9 for Windows	Joseph Trotter	The Scripps Research Institute	

### 2.1.6 Patienten und Einschlusskriterien

Um die Hypothese der negativen Auswirkung der Eisenüberladung auf die Proliferationsfähigkeit der Progenitorzellen zu testen und um zu prüfen, ob ein direkter Zusammenhang der Eisenüberladung mit Apoptose und Nekrose besteht, wurden Colony Assays (CA) und durchflusszytometrische Analysen von MDS-Patienten mit normalen Ferritinwerten und von MDS-Patienten mit erhöhten Ferritinwerten angefertigt. Die verwendeten Proben stammten sowohl aus dem peripheren Blut als auch aus dem Knochenmark. Insgesamt sind von 113 Patienten 375 Colony Assays angefertigt worden, 52 Patienten erfüllten zu einem Messzeitpunkt x die Kriterien (s.u.) für die Kurzzeitkultivierung im Colony Assay. Pro Patient wurde ein Versuchsergebnis gewertet. Bei zehn Patienten wurden BFU-E und Ferritin im Verlauf beobachtet. Hierfür waren mindestens drei BFU-E Messungen an unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt. Dabei erfüllten die Patienten zu allen Messzeitpunkten die Einschlusskriterien.

Von 55 Patienten wurden 114 durchflusszytometrische Untersuchungen angefertigt, 25 Patienten erfüllten zum jeweiligen Messzeitpunkt die Kriterien für die Auswertung. Pro Patient wurde ein Versuchsergebnis gewertet.

Die Einschlusskriterien waren:

- Gesicherte Diagnose MDS
- Keine Chemotherapie in den letzten sechs Monaten vor CA/Durchflusszytometrie
- Keine epigenetische Therapie in den letzten sechs Monaten vor CA/Durchflusszytometrie
- Keine Einnahme von Zytokinen und / oder Kortikosteroiden in den letzten drei Monaten vor CA/Durchflusszytometrie
- Keine infektiösen Hepatitiden
- CRP < 8 mg/dl oder bestätigte Höhe des Ferritinwertes durch Verlaufswerte.

Die Diagnose MDS und das Stadium der Erkrankung wurden anhand der aktuellen WHO-Kriterien für MDS gestellt. Das individuelle Risiko wurde nach dem IPSS-Risikoscore bestimmt. Alle untersuchten Patienten gaben ihr Einverständnis, an wissenschaftlichen Untersuchungen teilzunehmen, die Probenentnahme fand ausschließlich im Rahmen von Routinepunktionen statt. Die Patienten wurden in der onkologischen Ambulanz der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Göttingen betreut.

## **2.2 Methoden**

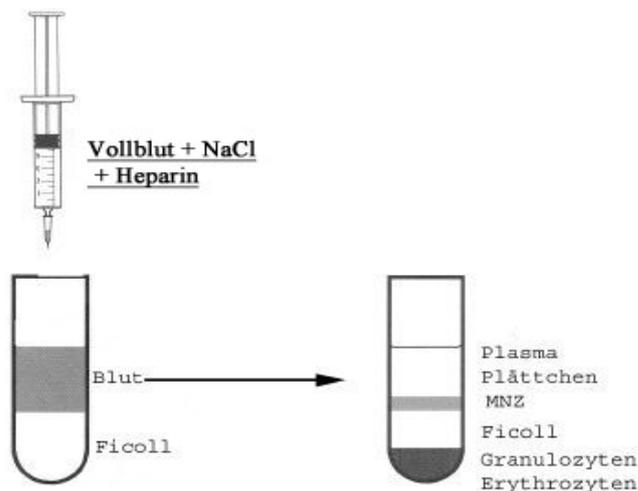
### **2.2.1 Colony Assay**

Für den Ansatz im CA wurde 20 ml heparinisiertes, peripheres Blut (PB) bzw. 5-10 ml heparinisiertes Knochenmarksblut (KM) von Patienten mit MDS innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme bearbeitet. An jedem Versuchstag wurde ein Kontrollansatz (Stammzellen aus Leukozytenaphärese, Transfusionsmedizin, Universität Göttingen) mitgeführt, dessen Richtwert bei 110 +/- 52 CFU-GM und 347 +/- 198 BFU-E pro  $1 \times 10^5$  Zellen lag (Richtwert Universität Göttingen). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und mit Zentrifugenbremsfunktion, bei Ausnahme wird dies im Folgenden gesondert aufgeführt.

### 2.2.1.1 Dichtegradienten-Zentrifugation und Reinigungsschritte

Das Patientenmaterial wurde in 50-ml-Falcon Tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit dem Puffer PBS (Biotec, Aidenbach, Deutschland) 2:1 verdünnt, sorgfältig auf 10 ml Lymphoprep (Axis Shield, Oslo, Norwegen) geschichtet und 20 Minuten (min) bei 2000 rounds per minute (rpm) ohne Bremse ficollisiert (Multifuge 3L-R, Heraeus, Hanau, Germany).

Viskosität, Dichte und osmotische Eigenschaften der Ficoll-Lösung führen bei Zentrifugation ohne Bremse zur Ausbildung von Schichten verschiedener Zelltypen, wie in Abbildung 7 veranschaulicht. Hämatopoetische Stammzellen sind Teil der Lymphozyten und Monozytenfraktion (mononukleäre Zellen, MNZ) (Nissen-Druey et al. 2005). Diese finden sich nach der Dichtegradienten Zentrifugation an der Grenze zwischen Plasma/Thrombozyten und der Ficoll-Schicht.



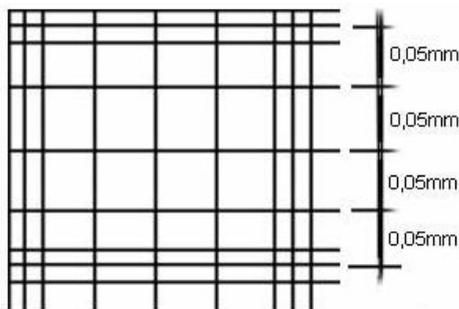
**Abbildung 7: Dichtegradienten-Zentrifugation**

Nach Verwerfen des Plasmas wurde die Schicht mononukleärer Zellen abpipettiert, in 50 ml PBS aufgenommen und durch Zentrifugation gereinigt (1600 rpm, 10 min). Nach einem weiteren Waschschrift in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) mit 10 ml PBS (1200 rpm, 10 min) wurde der Überstand dekantiert und das herunter zentrifugierte Pellet in 1 ml RPMI Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert.

### 2.2.1.2 Ermittlung der Zellzahl

20 µl der Suspension aus RPMI und MNZ wurden mit 180 µl Acridinorange (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland) angefärbt und auf eine Neubauer-Kammer (Brandt, Wertheim, Deutschland) gebracht. Neubauer-Kammern dienen zur

Bestimmung der Zellzahl pro Volumeneinheit. Acridinorange ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA und RNA lebender Zellen anfärbt und grün bis gelbgrün fluoresziert. Nach Reinigen der Neubauer-Kammer mit 70 % Ethanol wurde ein Deckglas auf die Kammer gelegt und die Zellsuspension mit RPMI bis zur vollständigen Benetzung zwischen Kammer und Deckglas gebracht. Die Zellauszählung erfolgte in 40-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland). Es wurden mindestens zwei Gruppenquadrate á 16 Felder der Neubauer-Kammer ausgezählt, wobei alle fluoreszierenden Zellen jeweils bis zur mittleren Linie der Gruppenquadrate gewertet wurden. Abbildung 8 zeigt eine Neubauer-Kammer.



**Abbildung 8: Gruppenquadrat einer Neubauer-Kammer bestehend aus 16 Einzelfeldern**

Durch Berechnung des Mittelwertes wurde die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension  $\times 10^5$  /ml ermittelt.

Da sich das Wachstum von Progenitorzellen in Methylzellulose durch Zytokine stimulieren lässt, ist es das Medium der Wahl, um hämatopoetische Progenitoren zu kultivieren (Nissen-Druey et al. 2005). Die Menge der Suspension aus RPMI und MNZ in  $\mu$ l, die zu 5 ml Methylzellulose (StemCell Technologies, Grenoble, Frankreich) hinzugefügt wurde, berechnet sich nach Formel 2.

Aus peripherem Blut wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml, aus Knochenmarksblut  $0,5 \times 10^5$  Zellen/ml und aus dem Kontrollmaterial  $0,3 \times 10^5$  Zellen/ml der Methylzellulose zugesetzt. Methylzellulose und die zugesetzten Zellen wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen sorgfältig gevortext.

**Formel 2: Berechnung der Suspensionsmenge, die der Methylzellulose zugesetzt wurde**

PB	$5\text{ml (Methyl)} \times 1,5 \times 10^5 \text{ Zellen} / \text{Anzahl der gezählten Zellen}$
KM	$5\text{ml (Methyl)} \times 0,5 \times 10^5 \text{ Zellen} / \text{Anzahl der gezählten Zellen}$
Kontrolle	$5\text{ml (Methyl)} \times 0,3 \times 10^5 \text{ Zellen} / \text{Anzahl der gezählten Zellen}$

### 2.2.1.3 Zytokinzusätze und Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in zwei Parallelansätzen. Die spezifische Wachstumsstimulation unterschiedlicher Vorläuferzelltypen durch verschiedene Wachstumsfaktoren (siehe Tabelle 6) wurde bei der Wahl der Zytokine berücksichtigt. Zweimal wurden jeweils 25 ng/ml SCF (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und 50 ng/ml Erythropoetin (Roche, Mannheim, Deutschland) zur Stimulation der BFU-E und zweimal jeweils 25 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL 3 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), 50 ng/ml GM-CSF (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und 50 ng/ml G-CSF (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) zur Stimulation der CFU-GM auf Zellkulturgefäße aufgetragen. Dazu wurde 1 ml der Suspension aus Zellen und Methylzellulose aufgetragen und durch vorsichtiges Schwenken mit den Zytokinen vermischt.

**Tabelle 6: Stimulierender (+) Effekt verschiedener Zytokine auf hämatopoetische Vorläuferzellen (modifiziert nach Nissen-Druey et al. 2005)**

Progenitorotyp	Epo	SCF	GM-CSF	G-CSF	IL 3
<b>BFU-E</b>	++	+++	++	+	+
<b>CFU-GM</b>	kein Effekt	++	+++	+	+

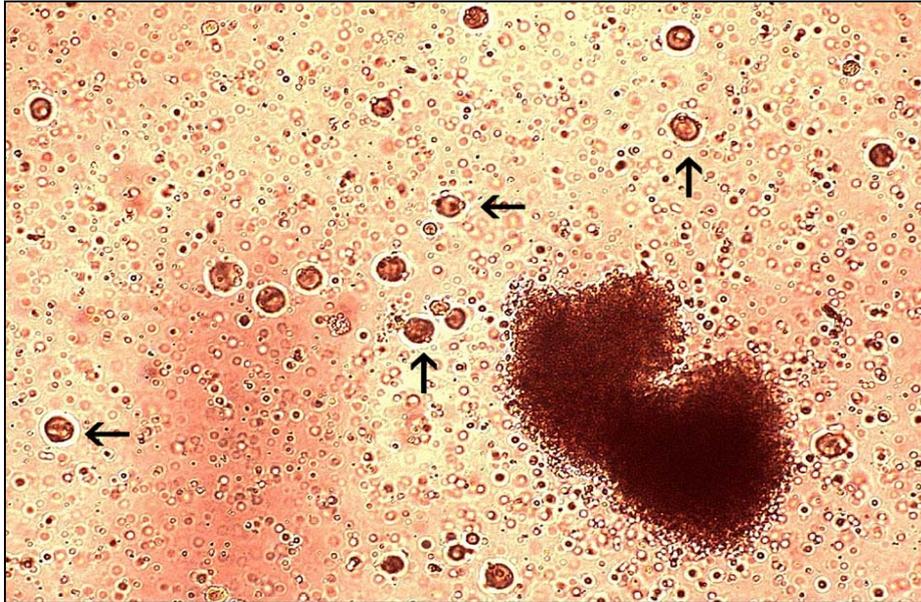
Die Inkubation erfolgte 12-16 Tage im Brutschrank (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) bei 37 Grad Celsius und fünf Prozent Kohlenstoffdioxid Gehalt.

### 2.2.1.4 Auszählung der Kolonien

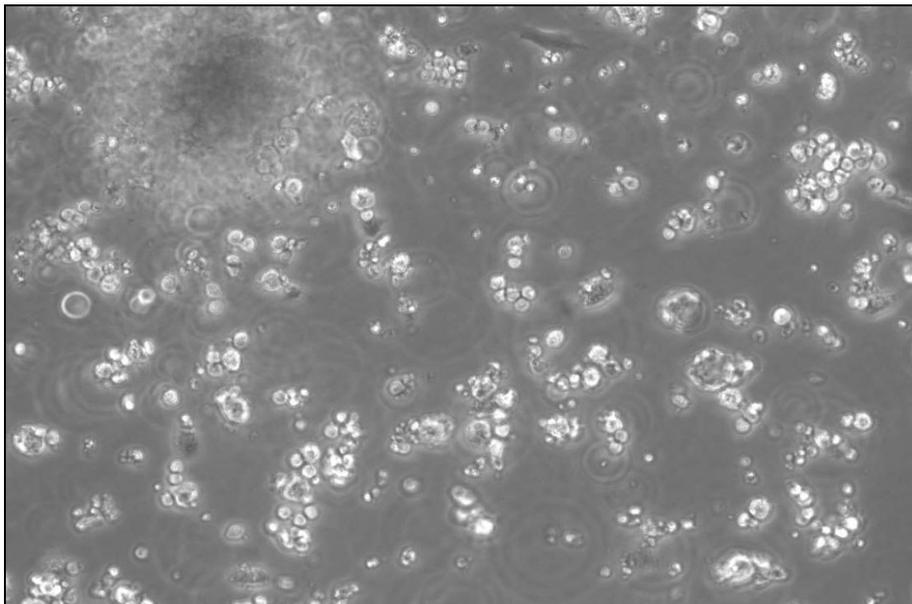
BFU-E und CFU-GM wurden bei allen Auswertungen von derselben Person am 12.-16. Tag der Kultur analysiert. Die Auszählung der Kolonien erfolgte am Stereomikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland).

In Kulturen enthalten Kolonien nach 10 bis 14 Tagen mehr als 50 Zellen im Verbund. Sind es weniger, werden die Zellverbände als Cluster bezeichnet. Diese sind umgeben von größeren Kolonien als myeloische Cluster im Knochenmark physiologisch. Cluster in Kulturen aus peripherem Blut sowie in der erythrozytären Reihe gelten, ebenso wie diffuses Wachstum der Zellen, hingegen immer als pathologisch und als Hinweis auf einen Krankheitsprogress (Nissen-Druey et al. 2005). Daher wurden Patienten, die diffuses Wachstum oder Clusterwachstum in den BFU-E zeigten, aus der Auswertung ausgeschlossen. Folgendes Wachstum ist im Colony Assay möglich und in den Abbildungen 9 - 11 dargestellt:

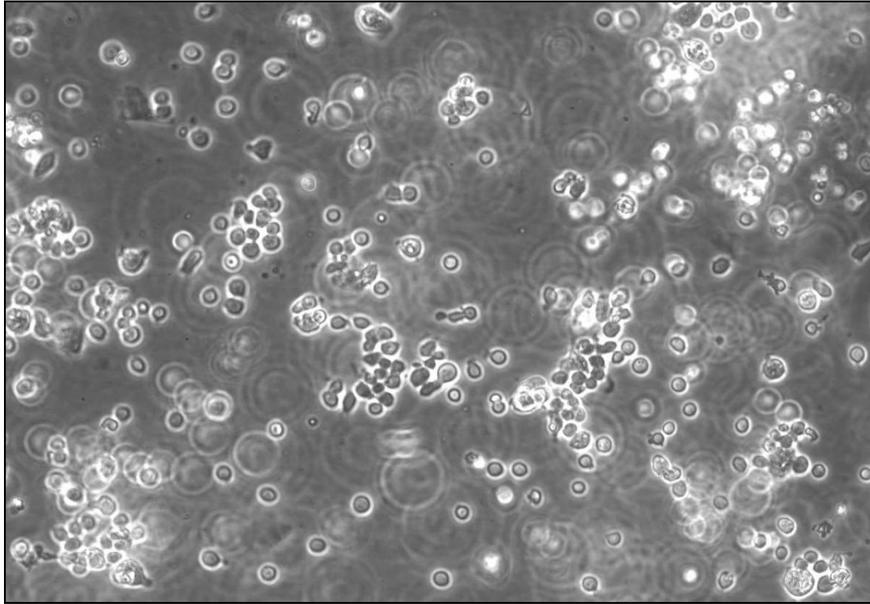
kein Wachstum, Wachstum in Kolonien, Wachstum in Clustern, diffuses Wachstum.



**Abbildung 9:** Diese Abbildung zeigt eine große BFU-E im rechten unteren Bildabschnitt. Mit Pfeilen sind parallel wachsende Cluster markiert. Bei der Patientin wurde 09/2006 die Diagnose eines MDS vom Typ RCMD gestellt



**Abbildung 10:** Die Abbildung zeigt in der oberen linken Ecke eine CFU-GM und parallel wachsende Cluster. Bei dem Patienten wurde 11/2005 die Diagnose eines MDS vom Typ RAEB I gestellt



**Abbildung 11:** Die Abbildung zeigt das Bild des diffusen Wachstums. Bei dem Patienten wurde 05/2007 die Diagnose eines MDS vom Typ CMML gestellt

### **2.2.1.5 Statistische Auswertung**

Die Kolonienanzahl von 14 (BFU-E) und 12 (CFU-GM) Patienten mit normalen Ferritinwerten (Normwert 20-250  $\mu\text{g/l}$ ) gingen im Vergleich zu 38 (BFU-E) und 32 (CFU-GM) Patienten mit Ferritinwerten über 250  $\mu\text{g/l}$  in die statistische Auswertung ein.

Die Statistische Auswertung wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test und SAS 9.1 Software (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) durchgeführt. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei einem p-Wert unter 5 Prozent. Die statistischen Analysen wurden mit Unterstützung der Abteilung medizinische Statistik (Dr. F. Konietzschke) der Universität Göttingen durchgeführt. Die Patientengruppen mit Ferritinwerten  $< 250 \mu\text{g/l}$  und  $> 250 \mu\text{g/l}$  wurden nach WHO-Subtyp, Zytogenetik, IPSS-Risikoscore, Alter, Geschlecht und Blutwerten klassifiziert und statistisch verglichen. Die Fallzahl zur Auswertung der BFU-E und CFU-GM aus Knochenmarksblut war bei insgesamt  $n=6$  verwertbaren Ergebnissen zu klein.

### **2.3 Immunomagnetische Zellanreicherung und Durchflusszytometrie**

Die Apoptoserate von CD34-positiven (+) und CD34-negativen (-) Zellen als weiterer möglicher Parameter einer myelosuppressiven Eisenüberladung, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Für die Unterscheidung der Fraktionen voneinander waren zwei Arbeitsschritte nötig:

1. Magnetic cell separation (MACS): Auftrennung der Patientenproben in CD34+ - und CD34- -Zellen
2. Durchflusszytometrische Messung spezifischer Apoptose und Nekrosemarker der CD34+ - und CD34- -Zellen

Es wurden 10 ml heparinisiertes PB Es ist der früheste Marker für Kolonien-bildende Zellen wie BFU-E und CFU-GM. Zellsuspensionen können mit CD34-spezifischen Beads inkubiert werden. und 5 ml KM innerhalb von 8 h nach Entnahme bearbeitet. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und mit Bremse, bei Ausnahme wird dies im Folgenden aufgeführt. Der MACS Puffer wurde bei 4° Celcius gekühlt gelagert und bei dieser Temperatur verwendet.

### **2.3.1 Immunomagnetische Zellanreicherung**

Die magnetische Zellanreicherung ist eine Methode, bei der Zellen anhand von Oberflächenmerkmalen aus einem Zellgemisch getrennt werden können. Die Zellsuspension wird mit einem spezifischen Antikörper (AK) gemischt, der mit eisenhaltigen Beads konjugiert ist. Der AK bindet an das Antigen, Zielzellen können so über einen Magneten aus der Zellsuspension getrennt werden (Stewart et al. 2000). CD34 ist ein Antigen, das von hämatopoetischen Vorläuferzellen (und Endothelzellen) exprimiert wird. Die markierten Zellen werden beim Fluss durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, zurückgehalten und können dann beim Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld gewonnen werden. So ist es möglich, bei einer Anreicherungsreinheit von über 90 Prozent (Miltenyi Biotec 2009/2010) Zellmaterial in CD34+ - und CD34- -Zellen zu teilen. Im Rahmen einer anderen Studie wurden bei 26 Patienten mit gesichertem MDS oder MDS-spezifischen Aberrationen aus 20 ml Blut durch immunomagnetische Anreicherung 70.000 bis 1.000.000 Zellen gewonnen (Median 700.000), dies entsprach 0,02 – 4,3 % aller MNZ (Median 1,1 %).

#### **2.3.1.1 Dichtegradienten-Zentrifugation und immunomagnetische Trennung der Zellpopulationen**

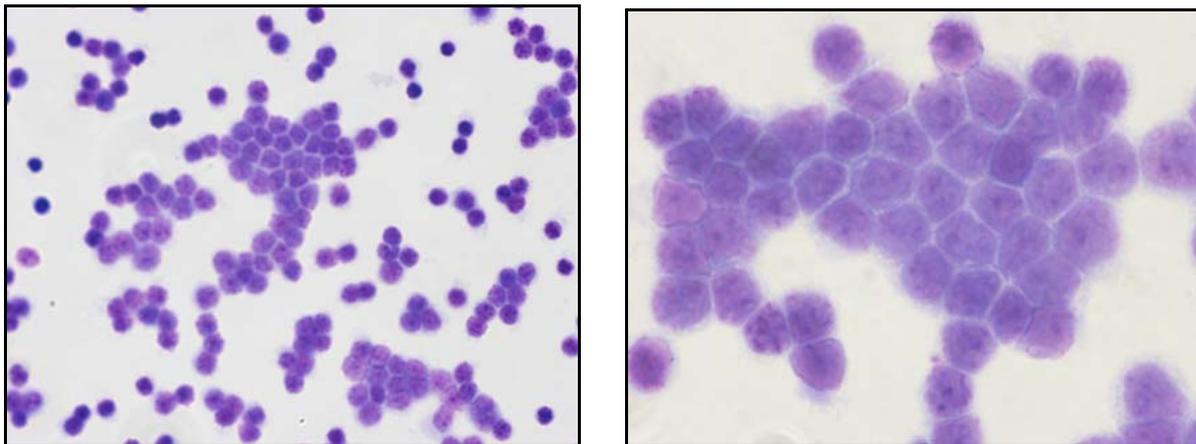
Zuerst wurden die Proben in einem 50-ml-Falcon (Becton Dickinson S.A. Saint P ray, Frankreich) mit PBS (Biotec, Aidenbach, Deutschland) 1:1 verdünnt, auf 10 ml Biocoll separation solution (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) geschichtet und 10 min bei 3000 rpm ohne Bremse ficollisiert (Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland).

Nach Entnahme der Schicht mit den MNZ wurden diese in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen aufgenommen, mit 4°C gekühltem MACS Puffer auf 50 ml aufgefüllt und bei 1400 rpm für 7 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in ca. 300 µl MACS Puffer resuspendiert und mit 100 µl CD34-Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) und 100 µl FcR Blocking reagent (ebd) für mindestens 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden der Probe 6 ml MACS Puffer zugegeben, 7 min bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 3 ml MACS Puffer aufgenommen.

Eine MACS Säule (MACS Separation Columns LS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) wurde in dem Magneten (QuadroMACS Separator, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland) angebracht und darunter ein 14-ml-Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson S.A. Saint Péray, Frankreich) positioniert. Die Säule wurde mit 3 ml MACS Puffer eluiert und dann mit dem in 3 ml MACS Puffer resuspendierten Pellet gespült. Dieser Vorgang wurde wiederholt und die Säule mit 3 ml Puffer nachgespült.

Dann wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und über einem weiteren 14-ml-Probenröhrchen positioniert. Es wurden 3 ml MACS Puffer hinzugegeben und diese mit einem Stempel zügig über die Säule eluiert, um so die CD34-positiven Zellen zu gewinnen. Die lichtmikroskopische Untersuchung der angereicherten Zellen zeigte eine homogene, unreife Zellpopulation (Abbildung 12).

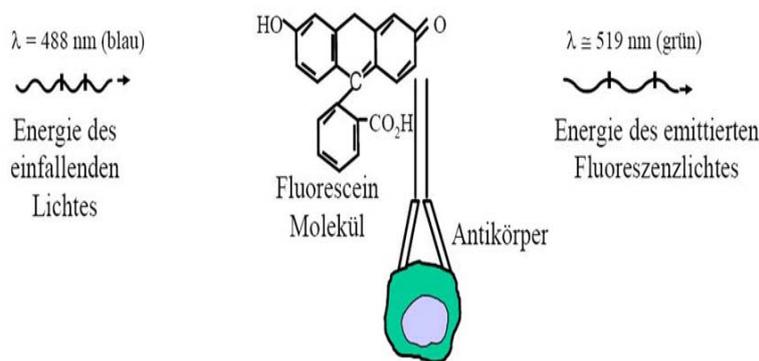


**Abbildung 12:** Die mikroskopische Analyse der angereicherten Zellen eines MDS-Patienten nach immunomagnetischer Zellseparation zeigt eine homogene und reine Zellpopulation mit der Morphologie unreifer Vorstufen

## 2.3.2 Durchflusszytometrische Messung von Apoptose und Nekroseparametern an CD34-positiven Zellen

### 2.3.2.1 Theoretische Grundlagen der Durchflusszytometrie und Immunozytochemie

In der Durchflusszytometrie (Zyto=Zelle, Metrie=Messung) werden Zellen in einer Trägerflüssigkeit hintereinander durch eine Messküvette geführt und von einem Laser angestrahlt, welcher Zellen bzw. Partikel in der Messkammer anregt. Auf Grund von relativer Größe (forward scatter-FSC), relativer Granularität (side scatter-SSC) und relativer Fluoreszenzintensität wird ein Fluoreszenz- bzw. Streulicht verursacht, welches durch verschiedene Detektoren quantifiziert werden kann. Zellen lassen sich unter anderem durch das bekannte Emissionsspektrum von Fluorochromen unterscheiden, die entweder selbst an Bestandteile der Zellen binden oder mit spezifischen Antikörpern konjugiert sind, siehe hierzu Abbildung 13.



**Abbildung 13: Das Fluorochrom absorbiert das Licht und gibt Energie mit anderer Wellenlänge frei (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland, S.10)**

In dieser Arbeit wurden das Gerät FACScan (Becton Dickinson S.A. Saint P ray, Frankreich) verwendet, welches mit einem 488 nm Argonlaser ausgestattet ist. Die verwendeten Fluochrome waren Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Propidiumiodid (PI), deren Emissionsmaxima bei 520-530 nm und 590 nm liegen.

### 2.3.2.2 Immunozytochemische Bestimmung von Apoptose und Nekrose

Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches sich physiologisch an der Innenseite der Zellmembran befindet. Bei der frühen Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellen verlagert, dort bindet Annexin V und detektiert über das gekoppelte Fluorochrom die Zellen als apoptotisch. Allerdings wird bei dem pathologischen Zelltod (Nekrose) die Zellmembran durchlässig und Annexin V bindet

an Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran. So kann bei alleiniger Anfärbung mit Annexin V nicht zwischen früher Apoptose und später Apoptose/Nekrose unterschieden werden (Roche 1999). Annexin V wurde an FITC gekoppelt verwendet, welches grün fluoresziert.

Propidiumiodid interkaliert DNA und fluoresziert gelbrot. Es dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran ein (Sigma-Aldrich 1997) und färbt daher nekrotische Zellen. Durch die parallele Verwendung von Annexin V und PI ist so die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich.

### 2.3.2.3 Durchflusszytometrische Analyse der immunomagnetisch separierten CD34-positiven Zellen

Der MACS-Vorgang erbringt pro Patientenprobe eine Suspension mit CD34+ - und eine Suspension mit CD34- -Zellen. Diese Proben wurden zentrifugiert (1400 rpm, 7 min) (Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland), der Überstand dekantiert, das Pellet jeweils in 500 µl PBS aufgenommen und wie folgt auf 5-ml-Tubes (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) aufgeteilt:

- 1-4: jeweils 100 µl CD34-negative Zellen
- 5: alles Material mit CD34-positiven Zellen

Den Röhrcchen wurde jeweils 1 ml PBS hinzugefügt, nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1400 rpm, 7 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Nach Hinzufügen von 100 µl Annexin V zu den Proben 2, 4, 5 wurden diese 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Proben in 1 ml PBS aufgenommen, 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben 1 und 3 wurden in 200 µl PBS resuspendiert, Proben 2, 4, 5 in 100 µl PBS und 100 µl PI. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen. Tabelle 7 verdeutlicht die Zusammensetzung der Proben und Fluoreszenzfarbstoffe. Die Proben 1-3 dienen der Versuchskontrolle und wurden bei jeder Analyse mitgeführt.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Proben zur durchflusszytometrischen Messung**

Probenröhrchen	1	2	3	4	5
<b>Zellpopulation</b>	CD34-negativ	CD34-Negativ	CD34-negativ	CD34-negativ	CD34-positiv
<b>Zusätze</b>	keine Zusätze	Annexin V	Propidiumiodid	Annexin V Propidiumiodid	Annexin V Propidiumiodid

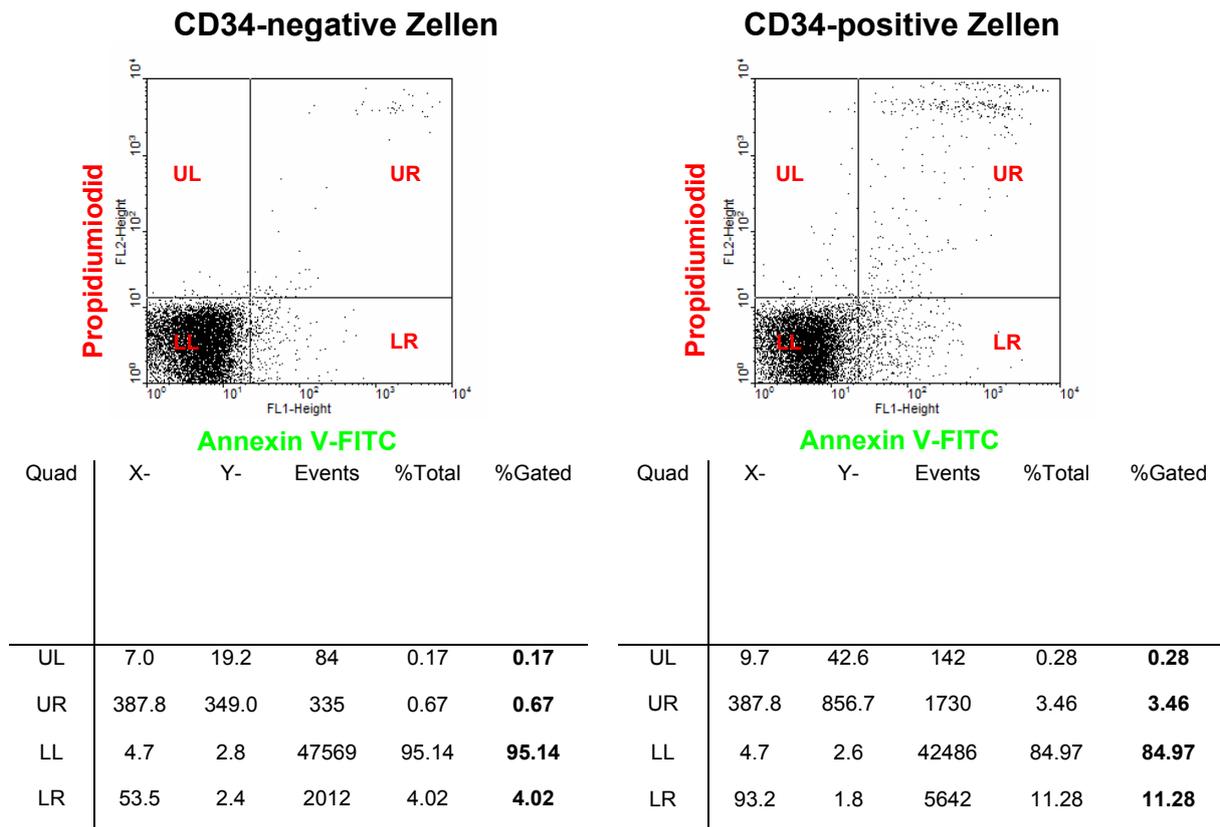
Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde der FACSScan (Becton Dickinson) und das Programm Cellquest (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet, es wurden an allen 5 Proben 50.000 Zellen gemessen. Als Fluoreszenz 1 (FL 1) wurde Annexin-FITC entlang der x-Achse, als Fluoreszenz 2 (FL 2) PI entlang der y-Achse dargestellt, siehe hierzu auch Abbildung 14. SSC und FSC wurden linear, FL1 und FL2 logarithmisch eingestellt, die Kompensation von FL1 zu FL2 betrug 0,9 %, von FL2 zu FL1 65,3 %, der Schwellenwert für FSC war bei 114 festgelegt.

#### 2.3.2.4 Bestimmung der prozentualen Zellverteilung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.9 (**Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry**) (J. Trotter, The Scripps Research Institute). Eine Darstellung der prozentualen Verteilung aller gemessenen Zellen ist mit Hilfe eines Quadrantenkreuzes möglich, welches die Zellpopulationen in vier Quadranten einteilt. Die Quadranten werden in der Auswertung als lower left (LL), lower right (LR), upper left (UL) und upper right (UR) bezeichnet. In LL befinden sich Zellen die Annexin und PI negativ sind, in LR sind Annexin-positive/PI-negative Zellen aufgeführt, in UR liegen Annexin-positive/PI-positive Zellen und in UL die Annexin-negativen/PI-positiven Zellen. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 8. Die Summe der Zellen aus LR und UR ergeben somit den Anteil der apoptotisch und nekrotischen Zellen. Das Quadrantenkreuz wurde anhand der Probe N° 4 (CD34<sup>-</sup> -Zellen mit Annexin und PI inkubiert) so festgesetzt, dass sich der Grossteil der CD34<sup>-</sup> -Zellen im linken unteren Quadranten befand. Dies geschah bei jeder Auswertung erneut. Dieses Quadrantenkreuzes wurde auf die Probe N° 5 übertragen und so die prozentuale Verteilung der CD34<sup>+</sup> -Zellen ermittelt. Abbildung 14 zeigt die prozentuale Verteilung von CD34<sup>-</sup> - und CD34<sup>+</sup> -Zellen im Dot Plot. Hier befinden sich nach entsprechender Festsetzung des Quadrantenkreuzes 95,14 % aller CD 34<sup>-</sup> -Zellen im LL, 0,17 % in UL, 0,67 % in UR und 4,02 % in LR. Überträgt man dieses Quadrantenkreuz auf die im MACS angereicherten Zellen, so findet man 84,97 % in LL, 0,28 in UL, 3,46 % in UR und 11,28 % in LR.

**Tabelle 8: Verteilung der Zellen in Quadranten bezüglich ihrer Anfärbarkeit**

	Annexin positive	PI positiv	Frühe Apoptose	Späte Apoptose
LL	-	-	-	-
LR	+	-	+	-
UL	-	+	-	+
UR	+	+	+	+



**Abbildung 14:** Dotplot CD34-negativer und CD34-positiver Zellen. Das Quadrantenkreuz wird anhand der CD34-negativen Probe so festgesetzt, dass sich der Grossteil der Zellen im LL befindet, im Beispiel 95,14 %. Dieses Quadrantenkreuz wird anschließend für die Messung der CD34-positiven Zellen verwendet.

### 2.3.2.5 Statistische Auswertung

Der Anteil der Annexin/PI-positiven CD34-positiven und somit apoptotisch/nekrotischen Zellen von neun Patienten mit normalen Ferritinwerten (Normwert 20-250 µg/l) gingen im Vergleich zu 16 Patienten mit Ferritinwerten über 250 µg/l in die statistische Auswertung ein.

Die Statistische Auswertung wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test und SAS 9.1 software (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) durchgeführt. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen bei einem p-Wert unter 5 Prozent. Die statistischen Analysen wurden mit Unterstützung der Abteilung medizinische Statistik (Dr. F. Konietschke) der Universität Göttingen durchgeführt. Beide Patientengruppen mit Ferritin < 250 µg/l und > 250 µg/l wurden nach WHO-Subtyp, Zytogenetik, IPSS-Risikoscore, Alter, Geschlecht und Blutwerten klassifiziert und statistisch verglichen. Die Fallzahl zur Auswertung der Apoptose und Nekrose aus Knochenmarksblut war bei insgesamt n=5 verwertbaren Ergebnissen zu klein.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vorstellung der verwendeten statistischen Tests

In dieser Arbeit wurden t-Test, Chi-Quadrat-Test und Wilcoxon-Test verwendet und sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

#### t-Test

Als theoretische Voraussetzung für den t-Test seien zwei unabhängige normalverteilte Stichproben  $X_i$ ,  $i=1,2$  mit Erwartungswert  $\mu_i$  und Varianz  $\sigma_i^2$  gegeben. Beim t-Test handelt es sich um einen parametrischen Test, mit dem die Hypothese, ob die beiden Erwartungswerte der Verteilungen gleich sind, statistisch getestet werden kann (Weiß 2008). Mit Hilfe des t-Tests kann die Hypothese  $H_0: \mu_1=\mu_2$ , sprich die beiden Erwartungswerte sind gleich bzw. es liegt kein zu erwartender Unterschied vor, überprüft werden.

Beispielsweise können Altersangaben als normalverteilt angesehen werden.

#### Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test)

Der Chi-Quadrat-Test dient zur Analyse von Häufigkeitsunterschieden (Weiß 2008). Als Voraussetzung für den  $\chi^2$ -Test seien zwei bernoulliverteilte Stichproben  $X_i$ ,  $i=1,2$  mit  $P(X_i=1)=P_i$  gegeben. Hierbei bezeichnet  $P_i$  die Erfolgswahrscheinlichkeit. Mit Hilfe des  $\chi^2$  Test kann schließlich die Hypothese  $H_0: P_1=P_2$ , sprich die beiden Erfolgswahrscheinlichkeiten sind gleich, statistisch getestet werden. Beispielsweise sind Geschlechtsangaben (männlich/weiblich) bernoulliverteilt.

#### Wilcoxon-Mann-Whitney Test

Können die Daten als nicht normalverteilt angesehen werden, sondern nur durch eine beliebige Verteilung  $F_i$  modelliert werden, so bietet sich der Wilcoxon-Mann-Whitney Test als so genannter verteilungsfreier (nicht-parametrischer) Test an. Die Prüfgrößen werden nicht anhand der Messwerte, sondern anhand von Rangzahlen berechnet (Weiß 2008). Getestet wird die Hypothese  $H_0: F_1=F_2$ .

## 3.2 Colony Assay

### 3.2.1 Patientenkollektiv

52 Patienten mit MDS (22 Frauen, 30 Männer) wurden in dieser Studie untersucht. Von diesen wurde jeweils ein Ergebnis des Colony Assay gewertet. Das Alter lag zwischen 39 und 86 Jahren, Mittelwert und Median bei 69 Jahren. In Tabelle 10 sind die Patienten mit Klassifizierung der MDS-Erkrankung und klinischen Informationen zum jeweiligen Messzeitpunkt dargestellt.

#### 3.2.1.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore

WHO-Subtyp, die zytogenetische Risikogruppe nach IPSS und der IPSS-Risikoscore wurden bei 47 von 52 Patienten bestimmt, bei zwei Patienten lag kein WHO-Subtyp vor, bei 5 Patienten kein IPSS und zytogenetischer Risikoscore. Die Diagnosen (WHO) waren: RA/RARS: n=17, RCMD/RS: n=15, RAEB I/II: n=11, 5q-Syndrom: n=4, AML: n=0 und andere n=5.

Die Verteilung des IPSS-Risikoscore war: low: n=15, int I: n=21, int II: n=9, high: n=3, andere: n=5. Die Verteilung des zytogenetische Risikoscore lag bei low: n=39, intermediate: n=2, high: n=6 und andere: n=5.

#### 3.2.1.2 Blutparameter

Am Tag der Blutentnahme für den Colony Assay erfolgte ebenfalls die Bestimmung von Ferritin, Hämoglobin, Leukozytenanzahl, absoluter Neutrophilenanzahl und Thrombozyten. Die Blutentnahme fand vor eventueller EK - oder TK - Gabe statt.

Mittelwerte und Median der Blutwerte waren: Hb 9,5/9,1 g/dl (53 Patienten), Leukozytenzahl 3,8/2,9  $10^3$  / $\mu$ l (53 Patienten), Thrombozytenzahl 145/78  $10^3$  / $\mu$ l (52 Patienten), ANC 42/43 Prozent (44 Patienten).

Das Serum-Ferritin lag zwischen 11 und 6267  $\mu$ g/l, Median und Mittelwert waren 998/683  $\mu$ g/l.

Das C reaktive Protein (CRP) wurde bei 11 Patienten bestimmt, davon zeigten 8 einen Wert unter 8 mg/l, einer 8,4 mg/l, einer 15,6 mg/l und ein Patient 26,8 mg/l. Bei erhöhtem CRP wurde der Ferritinwert mit Werten im entzündungsfreien Intervall verglichen und bestätigt. Bei 9 Patienten wurde Procalcitonin bestimmt, der Wert lag bei allen Proben < 0,2  $\mu$ g/l.

### 3.2.1.3 Transfusionsbedarf

Zum Zeitpunkt des Colony Assay waren von 44 der 52 Patienten Daten bezüglich des monatlichen Transfusionsbedarfes zu erheben. Von diesen 44 Patienten erhielten 18 monatlich unterschiedliche Mengen an EK, der mittlere EK-Bedarf lag bei 3,3 pro Monat.

Daten zum gesamten EK bzw. TK-Verbrauch bis zum Zeitpunkt des jeweiligen Colony Assay lagen von 37 (EK) bzw. 42 (TK) Patienten vor. 18 der 37 Patienten haben EK erhalten, ihr gesamter EK-Verbrauch lag bei einem Mittelwert von 23 EK und einem Median von 6 EK. Der gesamte TK-Verbrauch von 8 der 42 Patienten lag bei einem Mittelwert von 3,5 und einem Median von 2 TK. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 9.

**Tabelle 9: Angaben zur Datenerhebung und Auswertung der Transfusionen der im Colony Assay untersuchten Patienten**

	Zahl der Patienten mit bekannten Daten			Zahl der Patienten mit unbekannten Daten	
	transfundiert	Range	MW		
EK/Monat	44	18	1 - 7	3,3	8
EK total	37	18	2 - 162	23	15
TK total	42	8	1 - 9	3,5	10

### 3.2.1.4 Anzahl der BFU-E und CFU-GM

Bei 52 Patienten lagen Mittelwert/Median der BFU-E bei 9,4/1,5, von 48 Patienten wurden CFU-GM ausgewertet (16,7/5,5). Um mögliche Auswirkungen einer Eisenüberladung auf die koloniebildende Kapazität zu zeigen, wurden zwei Gruppen verglichen: Patienten mit Ferritin < 250 µg/l und Patienten mit Ferritin >250 µg/l.

In der folgenden Tabelle 10 werden die im Colony Assay untersuchten Patienten mit klinischen Daten aufgeführt.

**Tabelle 10: Colony Assays von 52 Patienten wurden ausgewertet. WHO-Subtyp, IPSS-Score und zytogenetische Risikogruppe wurden bei Erstdiagnose evaluiert. Alter, S - Ferritin, Hb, Leukozytenanzahl, ANC, Thrombozytenanzahl, CRP, Procalcitonin, EK-Bedarf/Monat, insgesamt erhaltenen EK und TK wurden am Messzeitpunkt evaluiert**

ID	WHO-Subtyp	IPSS-Score	Zytopogen Risikogr	Geschl	Alter	MW BFU-E	MW CFU-GM	S- Ferritin µg/l	Hb g/dl	Leuko 10 <sup>3</sup> /µl	ANC	Thrombo 10 <sup>3</sup> /µl	CRP mg/l	Procalc µg/l	EK-Bedarf/Monat	EK total	TK total
2	RCMD	0,5	Low	f	67	3,5	5,5	68	10,6	2,51	28	105	/	< 0,1	/	/	/
4	RCMD	1,5-2	High	m	73	2	36	316	9	2,23	53	73	/	< 0,1	/	/	/
5	RA	0,5	Low	m	70	2,5	3	285	8,5	1,53	22	84,2	/	< 0,1	/	/	/
6	RAEB II /AML	3,5	High	m	81	2	2	664	9,3	0,73	/	78	/	/	/	/	/
13	RA/RAEB I	0,5-1	Low	f	59	0	Cluster	1087	7,3	2,56	/	110	/	/	2 - 3	n.b.	n.b.
15	RAEB II	1,5	Low	m	67	6	1,5	157	12,7	2,53	41	151	/	< 0,1	/	/	/
17	RCMD	0	Low	m	71	0	0	4606	8,3	4,08	35,7	114	/	/	2 - 3	90	9
18	RARS	0,5	Low	f	70	2	1	1157	9	3,93	18	29,6	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
19	RAEB II	2,5	High	f	62	0,5	Cluster	1566	7,9	2,4	/	32,6	8,4	/	/	3	/
25	5 q -	0	Low	f	81	0	68	631	10,3	4,71	59,6	252	/	/	2	n.b.	n.b.
28	RA	1	Low	f	56	0	0	775	7,9	3,52	14	15,8	/	< 0,1	4	4	5
34	RCMD	0	Low	m	55	0	Cluster	854	10,1	2,81	66	84,7	<2	/	2 - 4	20	/
37	RA	0	Low	f	70	76	38,5	45	12,3	6,28	43	53,3	/	< 0,1	/	/	/
38	RARS	0	Low	m	79	27	16	1218	9,4	5,51	62,4	242	/	/	2	23	/
40	RAEB II	2	Low	m	64	0	/	152	12,9	1,08	55,8	52,5	/	/	/	/	/
42	RARS	0	Low	m	67	3,5	0,5	1961	5,8	2,55	/	228	/	/	6	162	/
44	RA	0,5	Low	m	86	0,5	0,5	333	8,8	3	44	57,6	/	/	n.b.	n.b.	2

ID	WHO-Subtyp	IPSS-Score	Zytogen Risikogr	Geschl	Alter	MW BFU-E	MW CFU-GM	S- Ferritin µg/l	Hb g/dl	Leuko 10 <sup>3</sup> /µl	ANC	Thrombo 10 <sup>3</sup> /µl	CRP mg/l	Procalc µg/l	EK-Bedarf/ Monat	EK total	TK total
45	RAEB II	2	Low	m	66	0	0	6267	10	4,01	48	13,5	/	0,2	n.b.	n.b.	n.b.
46	RA/RAEB I	1-1,5	Intermediate	f	67	3,5	1	78	11	2,23	30	25,8	/	/	/	/	/
47	5 q -	0	Low	m	59	3,5	30	208	8,1	2,61	50,5	237	/	/	/	/	/
51	RCMD	1-1,5	High	m	67	0,5	61	702	8,2	2,87	/	10,8	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
52	RAEB I	0,5	low	m	79	10	69,5	2387	9	3,28	37	11	/	/	4-6	34	1
53	RAEB I	1	low	m	72	0	Cluster	862	10,1	3,49	15	18,5	/	/	2	4	/
57	RAEB II	1	low	f	80	3	15	204	6,9	1,49	19	47,8	4	/	/	/	/
58	RA	0,5	low	m	76	0,5	2	4070	8,8	1,13	24	27,8	/	< 0,1	n.b.	n.b.	n.b.
59	5 q -	0	low	m	71	0,5	13	273	9,1	6,94	66	470	/	< 0,1	/	2	/
60	RA	0,5	low	m	80	7	5,5	23	9,1	5,24	55,5	19,2	/	/	/	2	/
61	RA/ICUS	0,5	low	f	50	3	2,5	134	8,4	2,69	33	45,6	/	/	/	/	/
64	RCMD-RS	1,5	high	m	68	0	15	763	7,6	2,01	27	65,2	/	/	/	4	/
66	CMML	/	/	f	61	0	Cluster	1087	8,2	29,7	58	336	/	/	1	n.b.	n.b.
75	RARS	0-0,5	low	f	52	2	3	2274	8,1	4,04	43	316	/	/	2	n.b.	/
76	/	/	low	m	75	1,5	1	1961	8,9	1,18	7	7,25	/	/	4	6	7
77	RCMD	0-0,5	low	f	71	0	1,5	962	8,6	10,8	72	432	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
79	RCMD	1,5	high	m	39	0,5	0,5	213	9,1	2,1	13	24,9	/	/	/	6	2
80	RAEB I	0,5	low	m	69	0	6,5	437	12,5	2,81	54,1	328	/	/	/	/	/
81	RCMD	0,5	low	m	67	11,5	41,5	1111	9	3,31	60,9	112	/	/	/	8	1
82	RCMD mit 5q-	0	low	f	74	1,5	120	767	9,4	2,73	71,4	256	2,9	/	2 alle 3 Monate	n.b.	/

ID	WHO-Subtyp	IPSS-Score	Zytogen Risikogr	Geschl	Alter	MW BFU-E	MW CFU-GM	S- Ferritin µg/l	Hb g/dl	Leuko 10 <sup>3</sup> /µl	ANC	Thrombo 10 <sup>3</sup> /µl	CRP mg/l	Procalc µg/l	EK-Bedarf/ Monat	EK total	TK total
84	RCMD	0,5-1	low	f	76	0	3	2751	10,3	3,08	/	/	/	/	6	n.b.	n.b.
86	RARS	0,5	intermediate	f	51	0	2	607	10,1	3,36	34	289	/	/	/	4	/
89	RA	0,5	low	f	81	4	13	405	10,3	3,78	57,2	23,6	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
91	/	0,5	low	m	75	5	/	38	13,2	3,07	/	69,8	/	/	/	/	/
93	RAEB II	/	/	m	85	0,5	2	615	8,5	2,61	36	50,5	/	/	1,5	n.b.	/
99	RCMD	1,5	/	m	69	0	Cluster	1757	10	1,08	5	72,7	26,8	/	4	12	/
100	RA	0	low	f	82	0,5	0,5	336	10,6	4,41	43,2	24,6	/	/	4	4	1
103	RA/RCMD	0	low	m	68	1	2	966	8,6	1,65	33	10,9	<2	/	n.b.	n.b.	/
104	RARS	0,5	low	f	63	3	11,5	377	9,2	3,24	/	529	2,4	/	/	/	/
105	RCMD	0,5	low	f	67	22	24	52	11,3	3,46	55,9	288	/	/	/	/	/
106	RARS	/	/	m	66	8,5	73	1329	10,9	6,69	58,4	444,9	<2	/	/	/	/
108	RCMD	0	low	m	48	250	33	875	10,1	2,53	61	139	<2	/	/	/	/
109	5 q -	0	low	f	61	3,5	26,5	106	11,3	2,88	<2	444	/	/	/	/	/
111	RAEB I	/	/	f	52	13,5	6	11	10	8,44	59,9	397	15,6	/	/	/	/
112	RCMD	0,5	low	m	74	0,5	0	1021	8,9	0,44	/	80,3	6,7	/	6-8	30	/

ID: Identifikationsnummer, Zytogen Risikogr: zytogenetische Risikogruppe, Geschl: Geschlecht, MW: Mittelwert, Leuko: Leukozytenanzahl, ANC: absolute neutrophil count, Thrombo: Thrombozytenanzahl, CRP: C-reaktives Protein, Procalc: Procalcitonin, TK: Thrombozytenkonzentrat, EK: Erythrozytenkonzentrat, n.b.: nicht bekannt

### **3.2.2 Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin < 250 µg/l**

Von 14 Patienten (43 % weiblich/57 % männlich) mit normalen Ferritinwerten wurden BFU-E und CFU-GM analysiert. Das Alter lag zwischen 39 und 80 Jahren, der Altersmedian war 67 Jahre.

#### **3.2.2.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore**

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose fand sich bei 14 % der WHO-Subtyp 5q-Syndrom, bei 29 % RA/RARS, bei 21 % RCMD/RCMD-RS, und bei 29 % RAEB I/II. Bei einem Patienten (7 %) lag kein WHO-Stadium vor.

Der IPSS-Risikoscore war für 21 % low, 43 % int I, 29 % int II, 0 % high, bei einem Patienten (7 %) konnte kein Score bestimmt werden. Der zytogenetische Risikoscore von 79 % der Patienten war low und bei jeweils 7 % intermediate und high. Bei einem Patienten (7 %) konnte kein Score bestimmt werden.

#### **3.2.2.2 Blutparameter**

Die Auswertung der Blutwerte ergab folgende Mittelwerte und Mediane:

Hb 10,5/10,8 g/dl (14 Patienten), Leukozytenzahl 3,3/2,65  $10^3$  /µl (14 Patienten), Thrombozytenzahl 140/62  $10^3$  /µl (14 Patienten) und ANC 40,4/42 Prozent (13 Patienten). Der Ferritinwert wurde zwischen 11 und 213 µg/l bestimmt, Mittelwerte und Median waren 106/92 µg/l.

#### **3.2.2.3 Transfusionsbedarf**

Zum Zeitpunkt des Colony Assay waren von allen 14 Patienten mit Ferritin < 250 µg/l Daten bezüglich des Transfusionsbedarfes zu erheben. Von diesen 14 Patienten wurden keiner monatlich transfundiert.

Daten zum gesamten EK- bzw. TK-Verbrauch bis zum Zeitpunkt des jeweiligen Colony Assay lagen von 14 (EK) bzw. 14 (TK) Patienten vor. Zwei Patient wurden einmalig mit EK transfundiert (MW 4 EK), ein Patient erhielt bis zum Messzeitpunkt 2 TK. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 11.

**Tabelle 11: Angaben zur Datenerhebung und Auswertung der Transfusionen bei im Colony Assay untersuchten Patienten mit Ferritin > 250 µg/l**

	Zahl der Patienten mit bekannten Daten				Zahl der Patienten mit unbekanntem Daten
		transfundierte	Range	MW	
EK/Monat	14	0	-	0	0
EK total	14	2	2 - 6	4	0
TK total	14	1	2	2	0

### 3.2.2.4 Anzahl der BFU-E und CFU-GM

Von 14 Patienten wurden BFU-E und von 12 Patienten CFU-GM ausgewertet. Die Anzahl der BFU-E/CFU-GM lag zwischen 0-76/0,5-38,5. Mittelwert und Median der BFU-E lagen bei 10,7/3,5, der CFU-GM bei 13,2/6,75. Deskriptive Angaben zur Auswertung zeigt Tabelle 12.

**Tabelle 12: Deskriptive Angaben zur Auswertung des BFU-E-/CFU-GM-Wachstums bei 14/12 Patienten mit normalem Ferritin**

	Ferritin < 250 µg/l					
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
<b>BFU-E</b>	14	10,71	3,50	0,00	76,00	19,64
<b>CFU-GM</b>	12	13,21	6,75	0,50	38,50	13,23

Die Anzahl der BFU-E-/CFU-GM-Kolonien der jeweiligen Patient ist in Tabelle 13 und Abbildung 15 dargestellt.

**Tabelle 13: Anzahl der BFU-E und CFU-GM bei 14/12 Patienten mit Ferritin < 250 µg/l**

Pat N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>ID</b>	40	79	61	57	2	46	109	47	91	15	60	111	105	37
<b>BFU-E</b>	0	0,5	3	3	3,5	3,5	3,5	3,5	5	6	7	13,5	22	76
<b>CFU-GM</b>	/	6,5	2,5	15	5,5	1	26,5	30	/	1,5	5,5	8	24	38,5

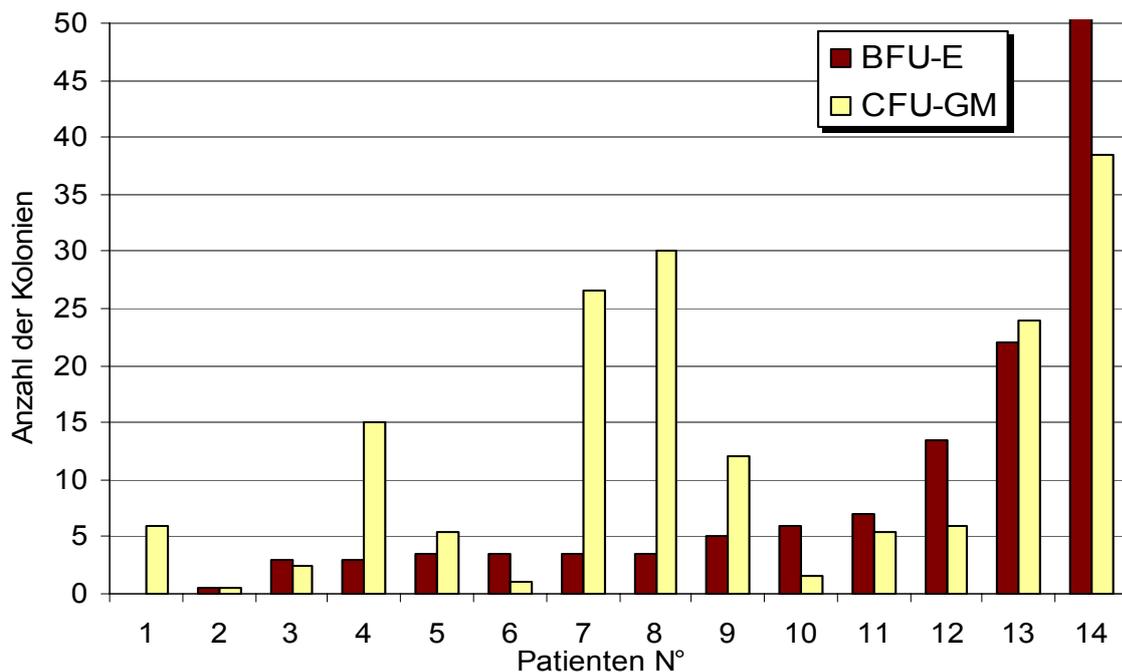


Abbildung 15: Darstellung des BFU-E- und CFU-GM-Wachstums von 14/12 Patienten mit Ferritin < 250 µg/l

### 3.2.3 Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin > 250 µg/l

Von 38 Patienten (37 % weiblich / 63 % männlich) mit erhöhten Ferritinwerten wurden BFU-E analysiert, von 32 Patienten CFU-GM.

Das Alter lag zwischen 48-86 Jahren, der Altersmedian war 70 Jahre.

#### 3.2.3.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose fand sich bei 5 % der WHO-Subtyp 5q- Syndrom, bei 34 % RA/RARS, bei 32 % RCMD/RCMD-RS und bei 18 % RAEB I/II. Bei vier Patienten (11 %) lag kein WHO-Stadium vor.

Der IPSS-Risikoscore war für 39 % low, 39 % int I, 13 % int II, 5 % high, bei vier Patienten (11 %) konnte kein Score bestimmt werden. Der zytogenetische Risikoscore von 74 % der Patienten war low, 3 % intermediate, 13 % high. Bei vier Patienten (11 %) konnte kein Score bestimmt werden.

#### 3.2.3.2 Blutparameter

Die Auswertung der Blutwerte ergab folgende Mittelwerte und Median: Hb 9,1/9 g/dl (38 Patienten), Leukozytenzahl 4/3,1  $10^3$  /µl (38 Patienten), Thrombozytenzahl 148/80  $10^3$  /µl (37 Patienten) und ANC 42,9/43,6 Prozent (30 Patienten).

Der Ferritinwert wurde zwischen 273-6267 µg/l bestimmt, Mittelwerte und Median waren 1326/918 µg/l.

### 3.2.3.3 Transfusionsbedarf

Zum Zeitpunkt des Colony Assay waren von 30 der 38 Patienten mit Ferritin > 250 µg/l Daten bezüglich des monatlichen Transfusionsbedarfes zu erheben. Von diesen 30 Patienten erhielten 18 monatlich unterschiedliche Mengen an EK, der mittlere EK-Bedarf lag bei 3,3 pro Monat.

Daten zum gesamten EK- bzw. TK-Verbrauch lagen von 23 (EK) bzw. 28 (TK) Patienten vor. Von 16 transfundierten Patienten lag der mittlere EK-Verbrauch bei 26 EK, der Median bei 7 EK. Von 7 mit TK transfundierten Patienten lag der mittlere TK-Verbrauch bei 3,7, der Median bei 2. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 14.

**Tabelle 14: Angaben zur Datenerhebung und Auswertung der Transfusionen bei im Colony Assay untersuchten Patienten mit Ferritin > 250 µg/l**

	Zahl der Patienten mit bekannten Daten			Zahl der Patienten mit unbekanntem Daten	
	transfundiert	Range	MW		
EK/Monat	30	18	1 - 7	3,3	8
EK total	23	16	2 - 162	26	15
TK total	28	7	1 - 9	3,7	10

### 3.2.3.4 Anzahl der BFU-E und CFU-GM

Von 38 Patienten wurden BFU-E und von 32 Patienten CFU-GM ausgewertet. Die Anzahl der BFU-E/CFU-GM lag zwischen 0-250 / 0-120. Mittelwert und Median der BFU-E lagen bei 8,9/0,5, Mittelwert und Median der CFU-GM bei 18,9/3. Deskriptive Angaben zur Auswertung zeigt Tabelle 15.

**Tabelle 15: Deskriptive Angaben zur Auswertung des BFU-E-/CFU-GM-Wachstums bei 38/32 Patienten mit normalem Ferritin**

	Ferritin > 250 µg/l					
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
<b>BFU-E</b>	38	8,87	0,50	0,00	250,00	40,48
<b>CFU-GM</b>	32	18,94	3,00	0,00	120,00	29,63

Die Anzahl der BFU-E-/CFU-GM-Kolonien der jeweiligen Patienten ist in Tabelle 16 und Abbildung 16 dargestellt.

**Tabelle 16: Anzahl der BFU-E und CFU-GM bei 38/32 Patienten mit Ferritin > 250 µg/l, cl:Cluster**

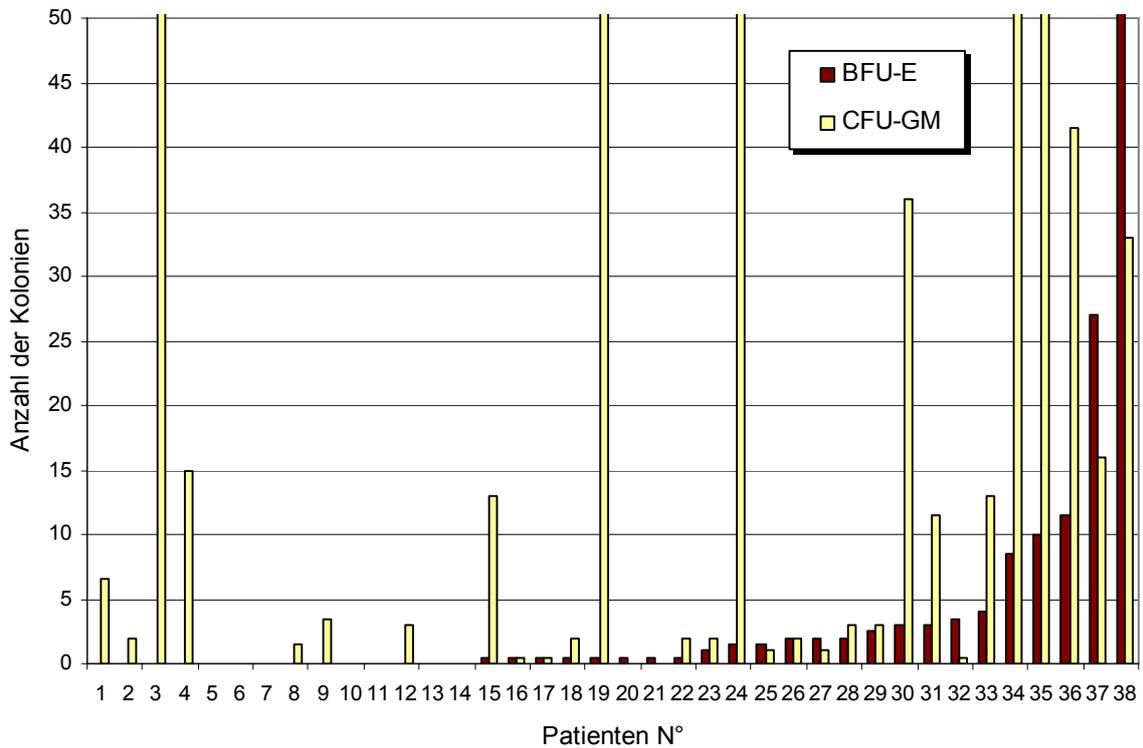
Pat N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ID	80	86	25	64	28	34	53	77	13	66	99	84	17
BFU-E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CFU-GM	6,5	2	68	15	0	cl	cl	1,5	cl	cl	cl	3	0

Pat N°	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
ID	45	59	44	100	93	51	112	19	58	103	82	76	6
BFU-E	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1,5	1,5	2
CFU-GM	0	13	0,5	0,5	2	66	0	cl	2	2	120	1	2

Pat N°	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
ID	18	75	5	4	104	42	89	106	52	81	38	108
BFU-E	2	2	2,5	3	3	3,5	4	8,5	10	11,5	27	250
CFU-GM	1	3	3	36	11,5	0,5	13	73	69,5	41,5	16	33



**Abbildung 16: Darstellung des BFU-E- und CFU-GM-Wachstums von 38/32 Patienten mit Ferritin > 250 µg/l**

### 3.2.4 Vergleichende Darstellung der Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin

Die Zahl der Patienten mit Ferritin > 250 µg/l lag bei 38 und entsprach dem 2,7-fachen der Patientenzahl mit Ferritinwerten < 250 µg/l (14 Patienten), der Altersmedian lag bei 67 vs. 70 Jahre. Das Geschlechterverhältnis war 43 % weiblich / 57 % männlich bei normwertigem Ferritin im Vergleich zu 37 % weiblich / 63 % männlich bei erhöhtem Ferritin. Eine graphische Anschauung der beschriebenen Verteilung bietet Abbildung 19. Die Geschlechterverteilung wurde mit dem Chi-Quadrat-Vierfelder-Test verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden ( $p=0,19$ ). Ebenso ließ sich beim Vergleich des Alters der beiden Gruppen mittels t-Test kein Unterschied nachweisen ( $p=0,1$ ).

#### 3.2.4.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore

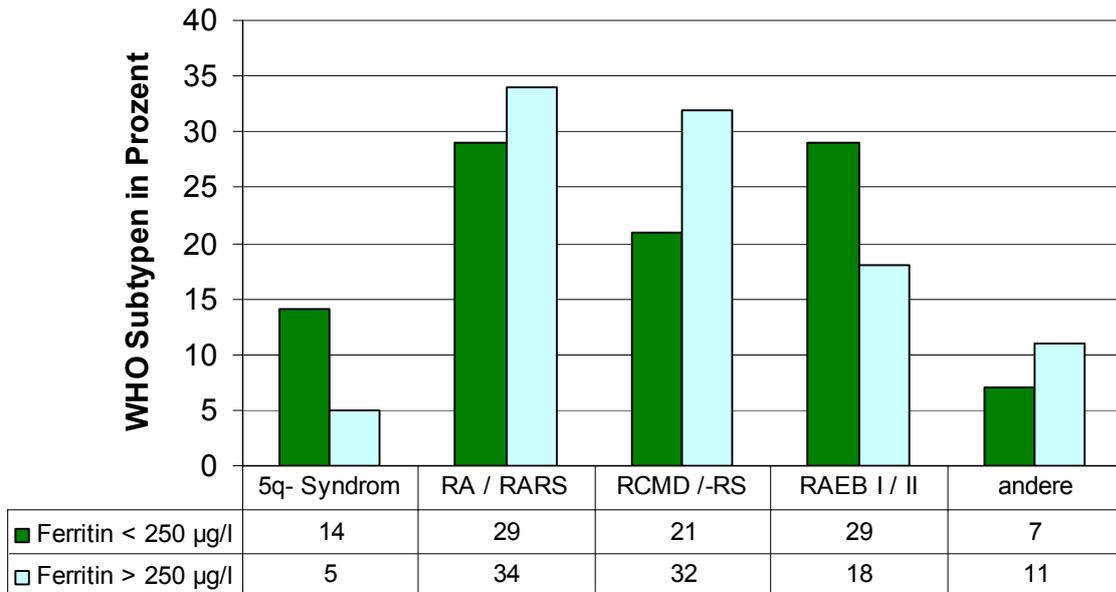
Details zur prozentualen Verteilung der WHO-Subtypen, des zytogenetischen Risikoscores nach IPSS und des IPSS-Risikoscore ist in Tabelle 17 und in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. Die WHO-Stadien, der IPSS-Risikoscore und der zytogenetische Risikoscore nach IPSS wurden mit Chi-Quadrat-Mehrfeldertest verglichen. Signifikante Unterschiede wurden nicht nachgewiesen (siehe hierzu Tabelle 18), somit sind die Gruppen gut miteinander vergleichbar.

**Tabelle 17: Vergleich der prozentualen Anteile an WHO-Subtypen, IPSS-Risikoscore und zytogenetischer Risikogruppe bei Patienten mit normalem und erhöhtem Ferritin**

Ferritin <250 µg/l n=14			Ferritin > 250 µg/l n=38		
<b>WHO-Subtyp</b>	<b>5q- Syndrom</b>	14 %	5 %	<b>5q- Syndrom</b>	<b>WHO-Subtyp</b>
	<b>RA/RARS</b>	29 %	32 %	<b>RA/RARS</b>	
	<b>RCMD/-RS</b>	21 %	34 %	<b>RCMD/-RS</b>	
	<b>RAEB I/II</b>	29 %	18 %	<b>RAEB I/II</b>	
	<b>andere</b>	7 %	11 %	<b>andere</b>	
<b>IPSS-Karyotyp</b>	<b>low</b>	79 %	74 %	<b>low</b>	<b>IPSS-Karyotyp</b>
	<b>intermediate</b>	7 %	3 %	<b>intermediate</b>	
	<b>high</b>	7 %	13 %	<b>high</b>	
	<b>andere</b>	7 %	10 %	<b>andere</b>	
<b>IPSS-Score</b>	<b>low</b>	21 %	32 %	<b>low</b>	<b>IPSS-Score</b>
	<b>int I</b>	43 %	39 %	<b>int I</b>	
	<b>int II</b>	29 %	13 %	<b>int II</b>	
	<b>high</b>	0 %	5 %	<b>high</b>	
	<b>andere</b>	7 %	11 %	<b>andere</b>	

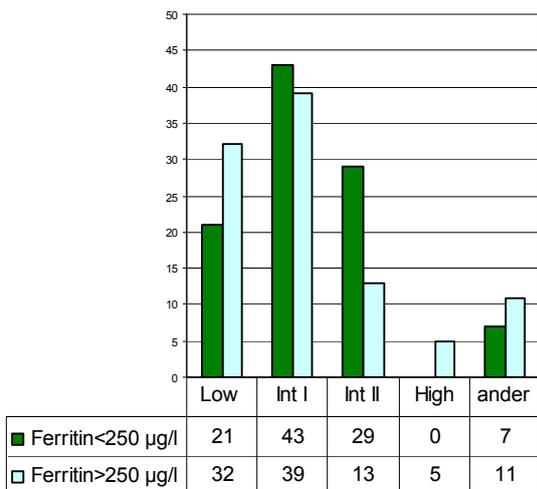
**Tabelle 18: WHO-Subtypen, IPSS-Risikoscore und zytogenetischer Risikoscore wurden mittels Chi-Quadrat-Mehrfeldertest zwischen der Gruppe mit Ferritin < 250 µg/l und > 250 µg/l verglichen. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden**

	WHO-Stadium	IPSS-Score	Zytogenetischer Risikoscore nach IPSS
p-Wert	0,71	0,8	0,61

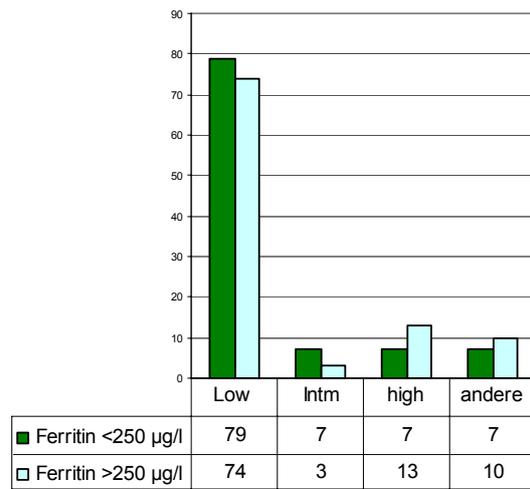


**Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der WHO-Subtypen in den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin**

**A**



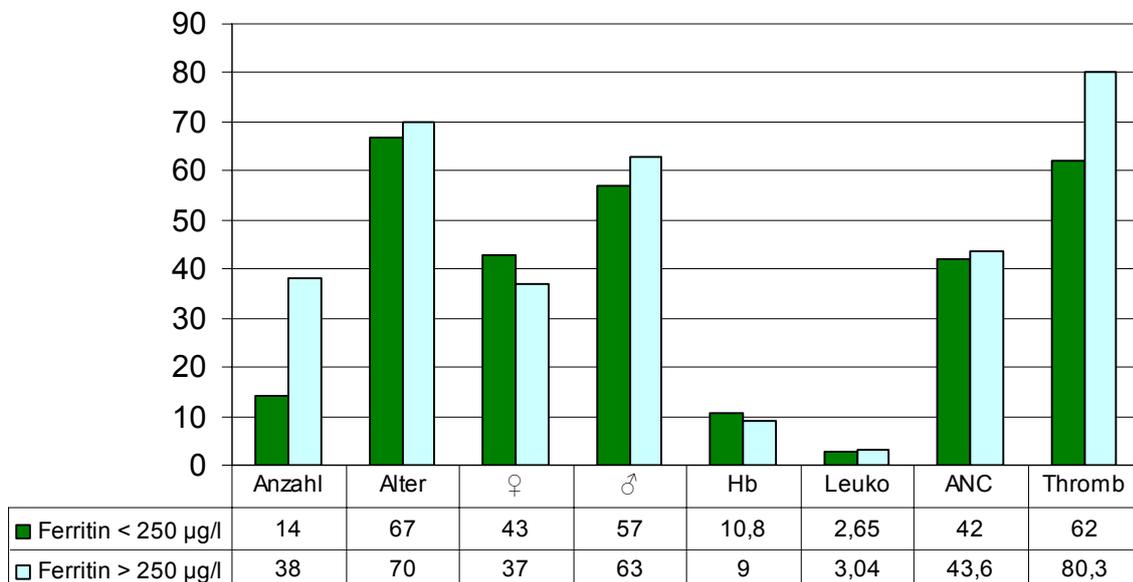
**B**



**Abbildung 18: Vergleichende Darstellung des IPSS-Risikoscores (A) und der zytogenetischen Risikogruppe (B) der im Colony Assay untersuchten Patienten mit normalem Ferritin und erhöhtem Ferritin.**

### 3.2.4.2 Blutparameter

Beim Vergleich der Blutwerte fanden sich ein medianer Hb 10,8 vs. 9 g/dl, Leukozytenanzahl 2,65 vs. 3,04  $10^3/\mu\text{l}$ , ANC 42 vs. 43,6 Prozent, Thrombozytenanzahl 62 vs. 80,3  $10^3/\mu\text{l}$ . Der Vergleich des medianen Ferritinwertes ergab 92 vs. 918  $\mu\text{g/l}$ . Abbildung 19 vergleicht Blutwerte, Patientenzahl, Alter und Geschlecht der untersuchten Gruppen. Mittels t-Test wurden Ferritin, Hb, Leukozytenanzahl, ANC und Thrombozytenanzahl zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Ferritin und des Hb. Kein signifikanter Unterschied war zwischen Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und ANC festzustellen.



**Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin nach Patientenzahl, Median Alter in Jahren, Geschlecht (♂, ♀) in Prozent, Median Hb g/dl, Leukozytenanzahl (Leuko)  $10^3/\mu\text{l}$ , ANC und Thrombozytenanzahl (Thromb)  $10^3/\mu\text{l}$ .**

### 3.2.4.3 Transfusionsbedarf

Bei 44 von 52 Patienten (84 Prozent) konnten Daten zum Transfusionsbedarf erhoben werden. Von 16 Prozent (8 Patienten) lagen keine Daten vor, dies waren ausschließlich Patienten mit erhöhtem Ferritin.

Von den 44 Patienten wurden 40 Prozent (18 Patienten) monatlich mit unterschiedlichen EK-Mengen transfundiert. Der Vergleich der Daten zum Transfusionsbedarf von Patienten mit normalem Ferritin vs. Patienten mit erhöhtem Ferritin zeigte einen monatlichen Verbrauch von 0 vs. 3,3 EK/ Monat. Während der

Beobachtungszeit lag der gesamte EK-Verbrauch im Mittel bei 4 vs. 26 EK und der gesamte TK-Bedarf bei 2 vs. 3,7 TK.

### 3.2.5 Statistischer Vergleich des Kolonienwachstums bei normalem und erhöhtem Ferritin

#### 3.2.5.1 Deskriptive Angaben der statistischen Auswertung

Die Zahl der BFU-E und CFU-GM Kolonien wurden zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin verglichen.

BFU-E wurden bei 52 Patienten ausgewertet, von denen 14 normales und 38 erhöhtes Ferritin zeigten. CFU-GM wurden bei 44 Patienten ausgewertet, von denen 12 normale und 32 erhöhte Ferritinwerte hatten.

Deskriptive Angaben zur statistischen Auswertung sind in Tabelle 19 dargestellt. Die mediane Anzahl der BFU-E für normale Ferritinwerte vs. erhöhte Ferritinwerte war 3,5 vs. 0,5 Kolonien bei einer Standard Abweichung von 19,6 vs. 40,7. Die mediane Anzahl der CFU-GM war 6,8 vs. 3 Kolonien bei einer Standard Abweichung von 13,2 vs. 29,6. Der Mittelwert lag bei 10,7 vs. 8,9 Kolonien für BFU-E und 13,2 vs. 18,9 Kolonien für CFU-GM. Der minimale Kolonienwert der BFU-E lag in beiden Gruppen bei 0, für CFU-GM 0,5 vs. 0. Der maximale Kolonienwert der BFU-E lag bei 76 vs. 250, für CFU-GM 38,5 vs. 120.

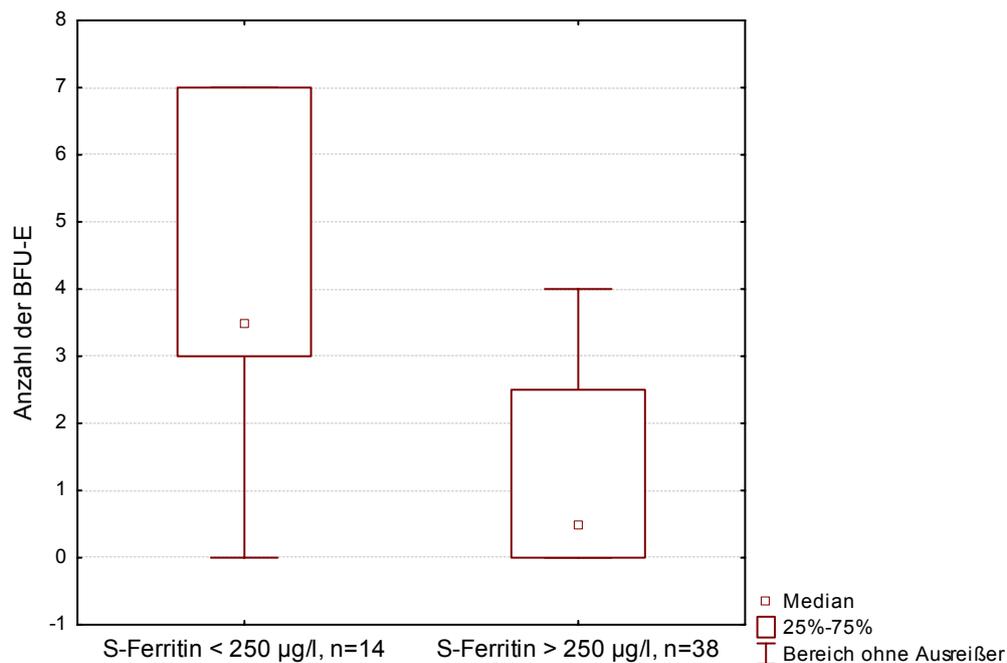
**Tabelle 19: Deskriptive Angaben zum Vergleich des BFU-E- und CFU-GM-Wachstums bei Patienten mit normalem und erhöhtem Ferritin**

Ferritin < 250 µg/l						
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
<b>BFU-E</b>	14	10,7	3,5	0	76	19,6
<b>CFU-GM</b>	12	13,2	6,8	0,5	38,5	13,2
Ferritin > 250 µg/l						
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
<b>BFU-E</b>	38	8,9	0,5	0	250	40,5
<b>CFU-GM</b>	32	18,9	3	0	120	29,6

#### 3.2.5.2 Wilcoxon-Test

Der statistische Vergleich der BFU-E-Anzahl zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin erfolgte mittels Wilcoxon-Test. Der Wilcoxon-Test überprüft, ob die Verteilungsfunktionen der beiden unabhängigen Variablen X und Y in zwei

Gruppen gleich sind. Dieser Test wurde gewählt da bei den Daten nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann und es sich bei dem Wilcoxon-Test um einen verteilungsfreien Test handelt. Der Test zeigte bei einem p-Wert  $p=0,0013$  einen signifikanten Unterschied für das Wachstum der BFU-E zwischen den Gruppen mit normalem ( $n=14$ ) und erhöhtem ( $n=38$ ) Ferritin. Die Auswertung ist in Abbildung 20 dargestellt.

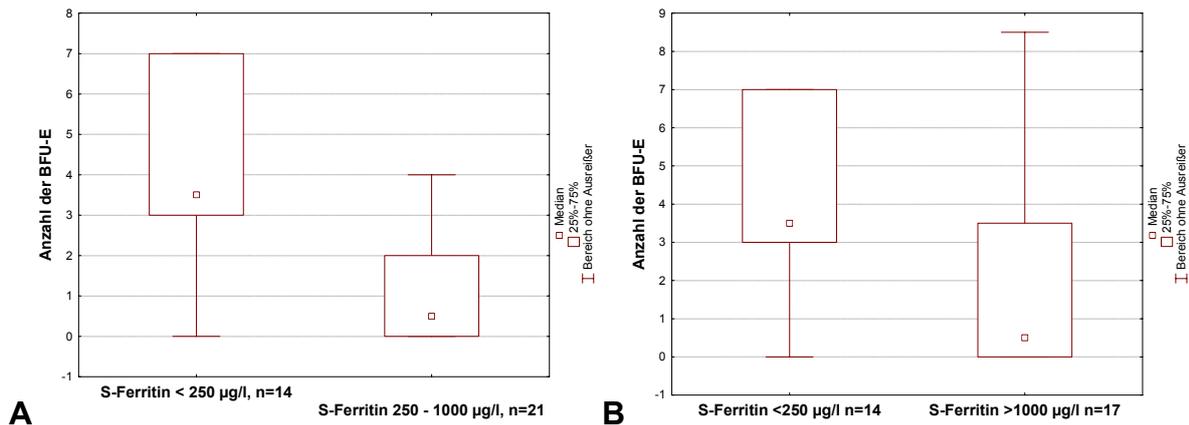


**Abbildung 20: Vergleichende Darstellung des BFU-E-Wachstums bei Patienten mit normwertigem ( $n=14$ ) und erhöhtem Ferritin ( $n=38$ ) im Box Plot. Dies zeigt bei einem  $p=0,001348$  einen signifikanten Unterschied.**

Von 38 Patienten mit Ferritinwerten über 250 µg/l, lag bei 45 % ( $n=17$ ) der Patienten ein Ferritinwert über 1000 µg/l vor. 55 % ( $n=21$ ) zeigten Ferritinwerte zwischen 250 µg/l und 1000 µg/l, ein Bereich der über der Normgrenze liegt, in dem aber noch keine zwingende Therapieindikation besteht. Der Vergleich von Patienten mit den beiden verschiedenen Stufen der Eisenüberladung und Patienten mit normalen Ferritinwerten ergab signifikante Unterschiede:

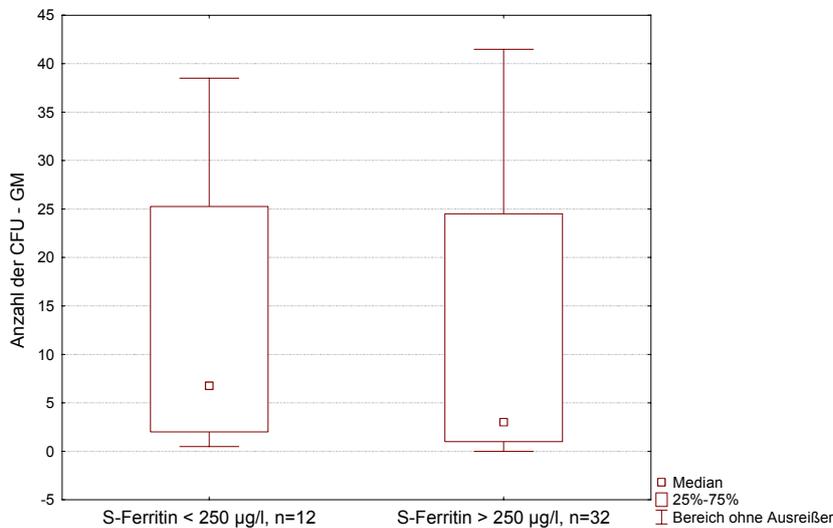
1. Ferritin < 250 µg/l ( $n=14$ ) vs. Ferritin 250 - 1000 µg/l ( $n=21$ )  $p= 0,0008$
2. Ferritin < 250 µg/l ( $n=14$ ) vs. Ferritin > 1000 µg/l ( $n=17$ )  $p= 0,0354$

Graphisch sind die Auswertungen in den Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: A: Vergleichende Darstellung der BFU-E-Anzahl Ferritin < 250 µg/l vs. Ferritin 250-1000 µg/l (p=0,0008) B: Vergleichende Darstellung der BFU-E-Anzahl Ferritin < 250 µg/l vs. Ferritin > 1000 µg/l (p=0,0354)**

Der statistische Vergleich der CFU-GM-Anzahl zwischen den Gruppen mit normalem (n=12) und erhöhtem (n=32) Ferritin zeigte bei einem p-Wert  $p=0,57$  keinen signifikanten Unterschied für das Wachstum der Kolonien zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin. Die Auswertung ist in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 22: Vergleichende Darstellung des CFU-GM-Wachstums bei Patienten mit normwertigem (n=12) und erhöhtem Ferritin (n=32) im Box Plot. Dies zeigt bei einem  $p=0,570$  keinen signifikanten Unterschied**

### 3.3 Sequenzielle Analysen des BFU-E-Wachstums

Von 10 Patienten wurden drei oder mehr BFU-E Messungen ausgewertet. Die sequenziellen Analysen wurden bei Patienten untersucht, die zu allen Messzeitpunkten folgende Bedingungen erfüllten:

- Gesicherte Diagnose MDS
- Keine Chemotherapie in den letzten 6 Monaten vor Colony Assay
- Keine epigenetische Therapie in den letzten 6 Monaten vor Colony Assay
- Keine Einnahme von Zytokinen und/oder Kortikosteroiden in den letzten 3 Monaten vor Colony Assay
- Keine infektiösen Hepatitiden
- CRP < 8 mg/dl oder bestätigter Ferritinwert durch Verlaufswerte.

Zum ersten Messzeitpunkt lag das Alter zwischen 54 und 76 Jahren, 40 Prozent waren weiblich, 60 Prozent männlich.

Die WHO-Diagnosen waren: RA/RARS: n=2, RCMD/RS: n=5, RAEB I/II: n=2, 5q-Syndrom: n=1, AML: n=0 und andere n=0. Der IPSS-Risikoscore war: low: n=4, int I: n=4, int II: n=2, high: n=0. Der zytogenetische Risikoscore war bei allen Patienten (n=10) low.

Der Beobachtungszeitraum lag zwischen 7 und 47 Monaten, die Anzahl der Untersuchungen pro Patient zwischen drei und 16 Colony Assays.

Zum ersten Messzeitpunkt zeigten 4 Patienten normale (ID 2, 15, 105, 109) und 6 Patienten (ID 17, 34, 42, 45, 58, 75) erhöhte Ferritinwerte.

#### Ferritinverlauf:

Ein Anstieg oder Abfall des Ferritins wurde gewertet ab einer Änderung von mehr als 200 µg/l. Während der Beobachtungen zeigten 4 von 10 Patienten keine signifikante Veränderung der Serum-Ferritin-Werte. Dies waren ausnahmslos Patienten mit normwertigem Ferritin zum Beobachtungsbeginn (ID 2, 15, 105, 109). Ein Patient zeigte einen Anstieg des Serum-Ferritins um mehr als 200 µg/l (ID 58), drei Patienten einen Ferritin Abfall um mehr als 200 µg/l (ID 34, 45, 75), 2 Patienten wechselnd fallende und steigende Ferritinwerte (ID 17, 42).

#### BFU-E Verlauf:

Ein Anstieg oder Abfall der BFU-E wurde gewertet ab einer Änderung um 100 Prozent. Im Verlauf blieb bei einem Patienten die Anzahl der BFU-E gleich (ID 45),

dieser Patient hatte durchgehend erhöhte Ferritinwerte. Bei einem Patienten mit normalem Ferritin (ID 15) und einem mit erhöhtem Ferritin (34) fiel die Anzahl der BFU-E. Bei einem Patienten mit gleich bleibend normalem Ferritin (ID 109) und einem mit wechselnd fallendem und steigendem Ferritin (ID 17) nahm die BFU-E-Anzahl zu. Bei zwei Patienten mit normalem Ferritin (ID 105, 2) und einem mit erhöhtem Ferritin (ID 58) stiegen und fielen die BFU-E im Verlauf. Ein variabler Verlauf der BFU-E-Anzahl war bei zwei Patienten mit fallendem (ID 75) und wechselnd fallend, steigendem Ferritin (ID 42) zu beobachten. Siehe hierzu Tabelle 20.

#### Ferritin-, BFU-E- und Transfusionsverlauf bei Chelattherapie:

5 Patienten (ID 17, 34, 42, 45, 75) erhielten bis zum letzten Messzeitpunkt länger als 3 Monate eine Eisenentzugstherapie, darunter zeigten alle initial fallende Ferritinwerte.

Unter Eisenentzugsbehandlung fand sich bei zwei Patienten (ID 34, 45) keine Veränderung der BFU-E-Anzahl, bei einem intermittierend ansteigende BFU-E (ID 42), bei zwei Patienten steigende BFU-E Zahlen (ID 17, 75), bei keinem eine abnehmende BFU-E-Anzahl.

Von vier dieser fünf Patienten lagen Daten zum Transfusionsverlauf vor (ID 17, 34, 42, 75). Zwei Patienten zeigten im Jahresdurchschnitt ein Jahr nach Beginn der Chelattherapie einen abnehmenden EK-Bedarf (ID 34, 42) und ein Patient abnehmenden Transfusionsbedarf zwei bis drei Jahre nach Beginn der Deferasiroxtherapie (ID 17). Eine Patientin zeigte ein Jahr nach Beginn der Chelattherapie keine Veränderungen des EK-Bedarfes (ID 75).

Zum Ferritinwert zeitlich versetzt zeigte ein Patient mit hochgradiger Eisenüberladung (ID 17) ca. 2 Jahre nach Unterschreiten des Ferritingrenzwertes (1000µg/l) steigende BFU-E Zahlen, bei einer weiteren Patientin (ID 75) stiegen BFU-E Zahlen 6 Monate nach Therapiebeginn deutlich an. Ein weiterer Patient (ID 42) zeigte einen variablen BFU-E Verlauf. Bei einem Patienten (ID 34) fiel die BFU-E-Anzahl vor Beginn der Chelattherapie auf 0 und stieg bis zur letzten Messung, die 11 Monate nach Beginn der Chelattherapie erfolgte, nicht wieder an. Dieser Patient war 10 Monate nach Beginn der Chelattherapie (bis dato unverändert) transfusionsfrei.

Im Folgenden werden die Verläufe der Patienten vorgestellt.

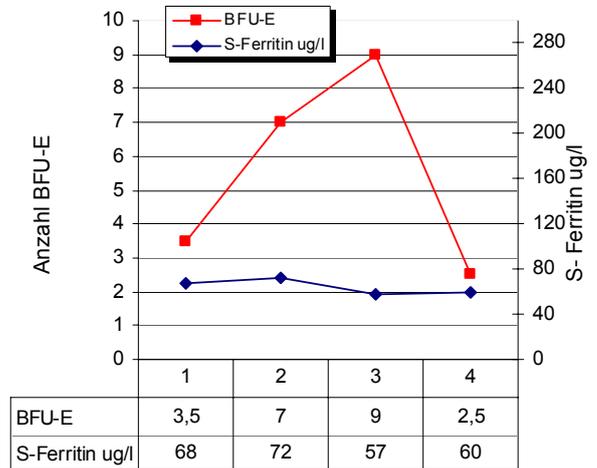
**Tabelle 20: Patienten, die im Verlauf beobachtet wurden; es erfolgten mindestens drei Messungen. Anstieg oder Abfall des Ferritins wurde gewertet ab einer Änderung von mehr als 200 µg/l, Anstieg oder Abfall der BFU-E ab einer Änderung um 100 Prozent. Gesch=Geschlecht**

ID	Alter	WHO	IPSS	Karyotyp- IPSS	Gesch	Anzahl BFU- E-Messungen	Zeitraum in Monaten	Range Ferritin	Ferritin im Verlauf	Range BFU-E	BFU-E im Verlauf	Chelat- therapie
2	67	RCMD	0,5	low	f	4	10	57 - 72	stabil	2,5 - 9	steigend und fallend	nein
15	67	RAEB II	1,5	low	m	4	12	157 - 280	steigend	0 - 6	fallend	nein
17	71	RCMD	0	low	m	6	47	569 - 4606	fallend und steigend	0 - 3	steigend	ja
34	55	RCMD	0	low	m	3	22	306 - 854	steigend und fallend	0 - 4	fallend	ja
42	67	RARS	0	low	m	16	28	178 - 1961	fallend und steigend	0 - 18	variabel	ja
45	66	RAEB II	2	low	m	4	14	3501 - 6267	fallend	0 – 0,5	stabil	ja
58	76	RCMD	0,5	low	m	3	7	4070 - 5431	steigend	0 – 1,5	steigend und fallend	nein
75	52	RARS	0-0,5	low	f	6	15	743 - 2274	fallend	1,5 - 9,5	variabel	ja
105	67	RCMD	0,5	low	f	3	11	40 - 74	stabil	22 - 46,5	steigend und fallend	nein
109	61	5 q-	0	low	f	4	8	51 – 106	stabil	51 – 106	steigend	nein

**ID 2, ED 01/2007 MDS/RCMD, 46 XX del(20)(q11.2), IPSS 0,5**

Ferritin: normwertig Eisenüberladung: nein  
Ferritinverlauf: stabil BFU- E Verlauf: steigend/fallend  
Transfusionsbedarf: nein  
Chelattherapie: nein

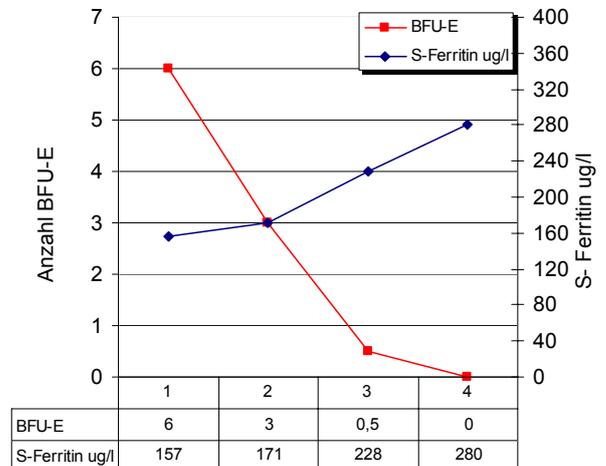
Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	05.03.2007	68	3,5	5,5
2	04.06.2007	72	7	4
3	03.09.2007	57	9	1
4	18.01.2008	60	2,5	2,5



**ID 15, ED 03/2006 MDS/RAEB II, 46 XY, IPSS 1,5**

Ferritin: normwertig Eisenüberladung: nein (beginnend)  
Ferritinverlauf: steigend (< 200 µg/l) BFU- E Verlauf: fallend  
Transfusionsbedarf: nein  
Chelattherapie: nein

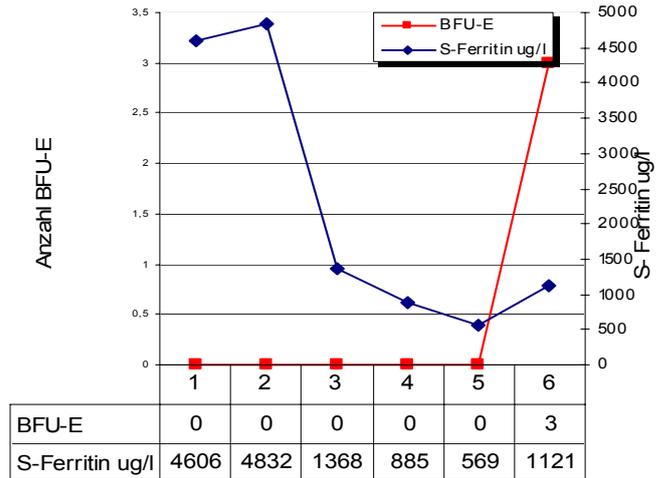
Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	27.11.2006	157	6	1,5
2	21.05.2007	171	3	8
3	27.08.2007	228	0,5	4,5
4	12.11.2007	280	0	1,5



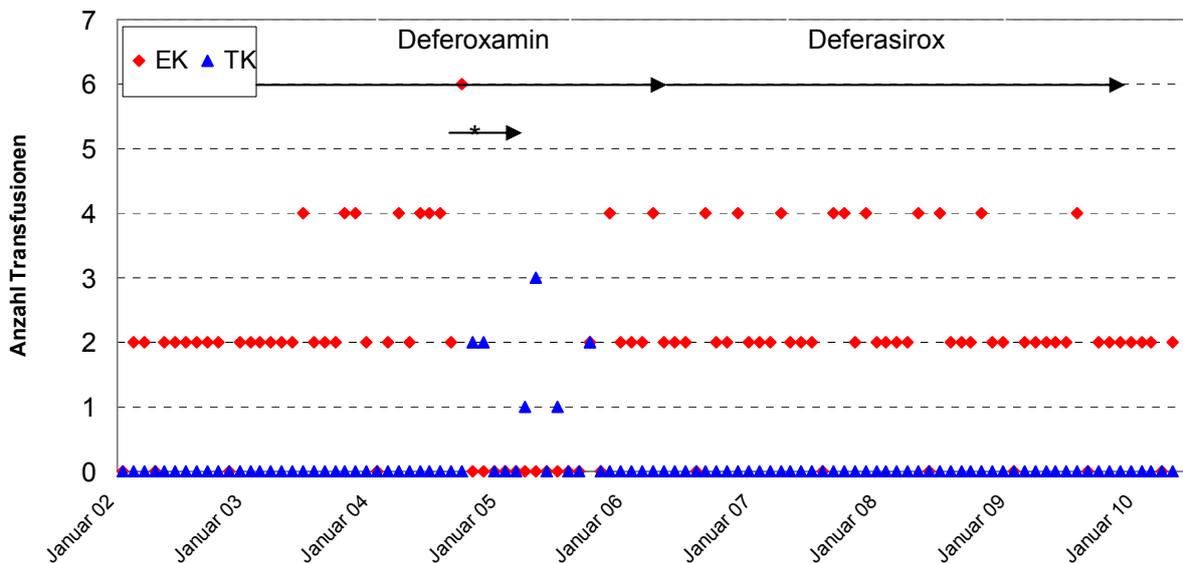
**ID 17, ED 08/2001 MDS/RCMD, 46 XY, IPSS 0**

Ferritin: erhöht Eisenüberladung: ja  
Ferritinverlauf: fallend und steigend BFU- E Verlauf: steigend  
Transfusionsbedarf: bis 1. Messung 90 EK, 9 TK; bis 6. Messung 196 EK, 9TK  
 seit 2008 abnehmend  
Chelattherapie: Ab Februar 2003: Deferoxamin, ab März 2006 Deferipron, ab  
 September 2006 Deferasirox 2500 mg/d

Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	20.03.2006	4606	0	0
2	02.10.2006	4832	0	Cl
3	19.11.2007	1368	0	0
4	25.02.2008	885	0	0
5	08.06.2009	569	0	0
6	01.02.2010	1121	3	7,5



Verlauf EK- und TK-Transfusionen



\* 30 d Melphalan, Induktionsschema nach TAD-Schema, Konsolidierungsschema nach HAM Protokoll

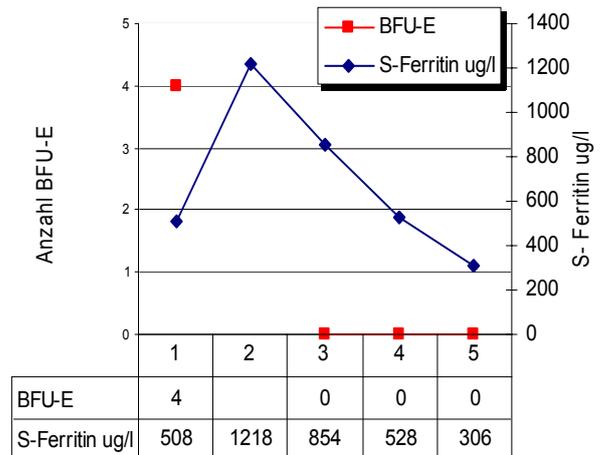
Summe EK/Jahr

2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
18	30	28	8	28	30	28	22

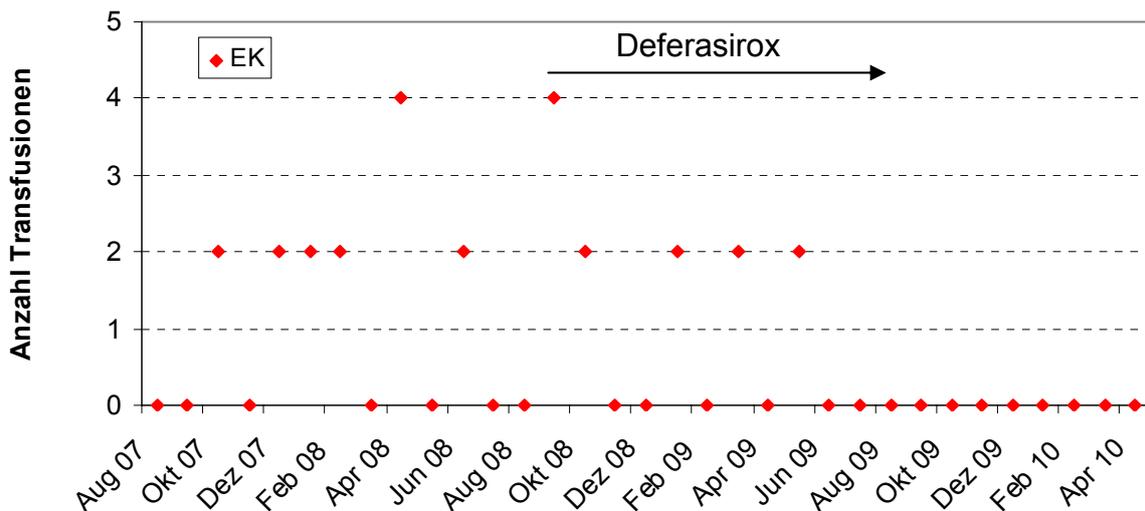
**ID 34, ED 08/2007 MDS/RCMD, 46 XY, IPSS 0**

Ferritin: erhöht Eisenüberladung: ja  
Ferritinverlauf: steigend / fallend BFU- E Verlauf: fallend  
Transfusionsbedarf: bis 1. Messung 0 EK, bis 4. Messung 26 EK, seit Juni 2009 transfusionsfrei  
Chelattherapie: August 2008 bis Juni 2009 Deferasirox 1625 mg/d

Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	07.09.2007	508	4	10,5
2	11.02.2008	1218	/	/
3	10.11.2008	854	0	Cl
4	02.03.2009	528	0	42,5
5	27.07.2009	306	0	90



Verlauf EK-Transfusionen



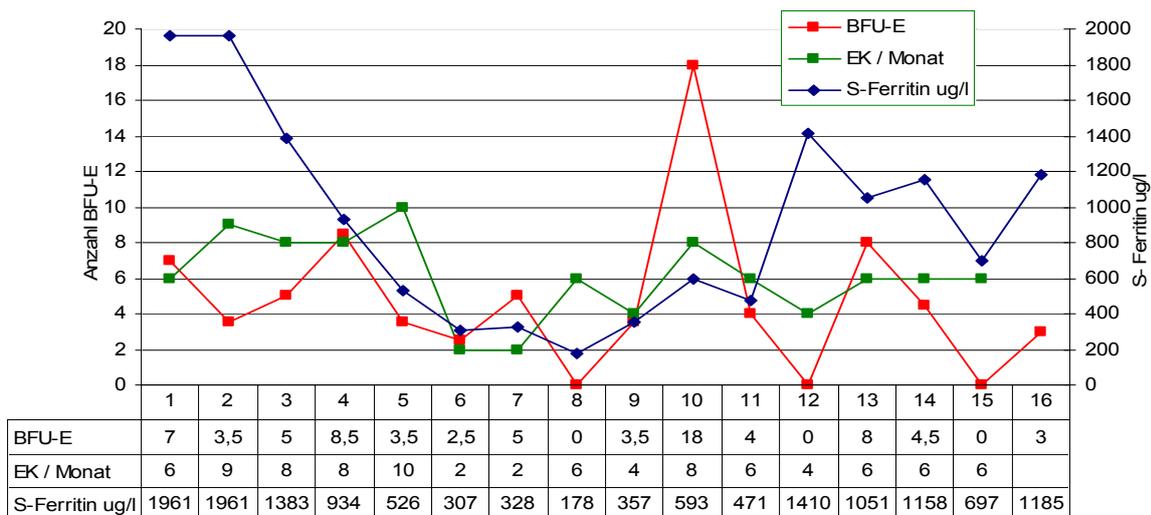
Summe EK/Jahr

2007	2008	2009
4	16	6

**ID 42, ED 02/2000 MDS / RARS, 46 XY, IPSS 0**

Ferritin: erhöht Eisenüberladung: ja  
Ferritinverlauf: fallend / steigend BFU- E Verlauf: variabel  
Transfusionsbedarf: bis 1. Messung 156 EK, bis 17. Messung 342 EK, seit 2007 abnehmend  
Chelattherapie: Ab 05/2003 Deferoxamin und Deferipron, ab 03/2006 bis 02/2007 Deferasirox 3000 mg/d; 10/2007 und 02-03/2008 kurzzeitig Deferasirox (2000mg/d); ab 09/2008 1000 mg/d

Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	15.05.2006	1961	7	6
2	12.06.2006	1961	3,5	0,5
3	10.07.2006	1383	5	7,5
4	04.09.2006	934	8,5	5,5
5	20.11.2006	526	3,5	6
6	08.01.2007	307	2,5	11,5
7	22.01.2007	328	5	16
8	05.02.2007	178	0	4,5
9	05.03.2007	357	3,5	4,5
10	30.04.2007	593	18	34
12	19.11.2007	471	4	4,5
13	07.01.2008	1410	0	3
14	22.02.2008	1051	8	5
15	03.03.2008	1158	4,5	7,5
16	09.05.2008	697	0	2,5
17	15.09.2008	1185	3	18

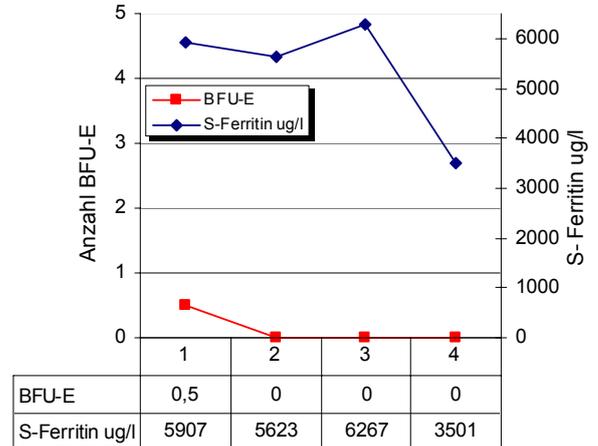


Summe EK/Jahr

2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
10	26	44	60	83	71	64	54

**ID 45, ED 09/2004 MDS / RAEB II, 46 XY, IPSS 2,0**Ferritin: erhöhtEisenüberladung: jaFerritinverlauf: fallendBFU- E Verlauf: stabilTransfusionsbedarf: keine Daten vorliegendChelattherapie: Ab 10 / 2006 Deferasirox 2500 mg/d

Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU- GM
1	13.11.2006	5907	0,5	0
2	27.11.2006	5623	0	0
3	08.01.2007	6267	0	0
4	14.01.2008	3501	0	Cl



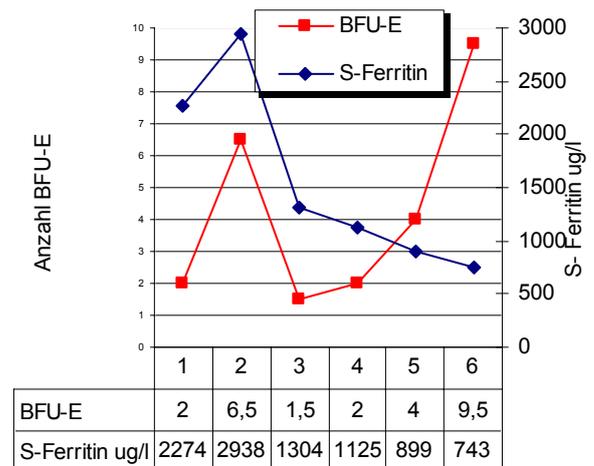
**ID 75, ED 08/2002 MDS / RARS, 46 XX, IPSS 0 – 0,5**

Ferritin: erhöht Eisenüberladung: ja  
Ferritinverlauf: fallend BFU- E Verlauf: steigend

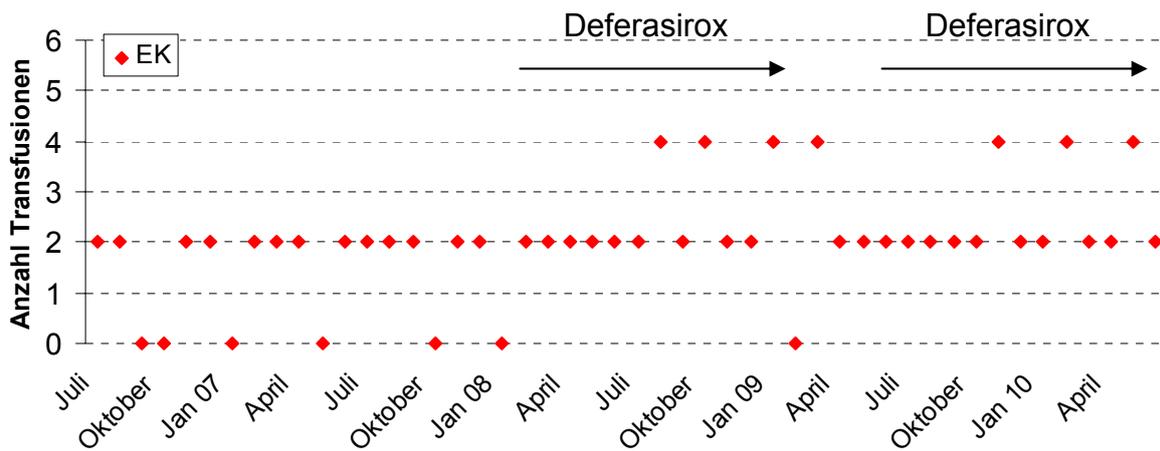
Transfusionsbedarf: bis 1. Messung 22 EK, bis 6. Messung 56 EK, keine Veränderung seit Start Chelattherapie

Chelattherapie: 01/2008 bis 07/2008 Deferasirox 1375 mg/die, 07/2008 bis 10/2008 1750 mg/d, 10/2008 bis 01/2009 1375 mg/d. Ab 06/2009 erneuter Start Deferasirox.

Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	12.11.2007	2274	2	3
2	22.02.2008	2938	6,5	0,5
3	18.04.2008	1304	1,5	5
4	16.05.2008	1125	2	4
5	28.11.2008	899	4	11
6	27.02.2009	743	9,5	9



Verlauf EK-Transfusionen



Summe EK/Jahr

2006	2007	2008	2009
8	18	26	28

**ID 105, ED 11/08 MDS / RCMD, 46 XX, IPSS 0,5**

Ferritin: normwertig

Eisenüberladung: nein

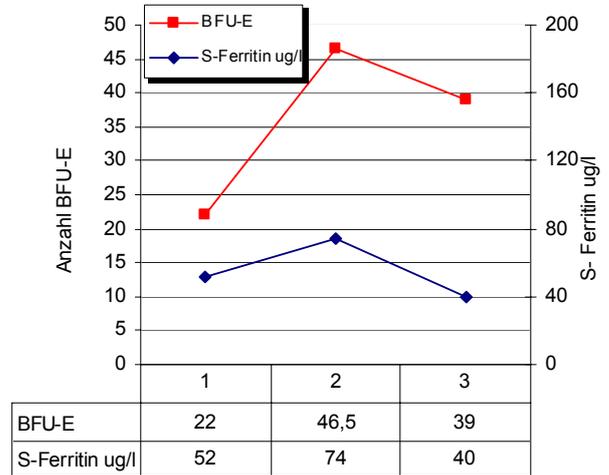
Ferritinverlauf: stabil

BFU- E Verlauf: steigend / fallend

Transfusionsbedarf: nein

Chelattherapie: nein

Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	24.11.2008	52	22	24
2	20.04.2009	74	46,5	4
3	26.10.2009	40	39	5



**ID 109, ED 10/2008 MDS / RA, 46 XX, del(5)(q13q33) / 46 XX, IPSS 0**

Ferritin: normwertig

Eisenüberladung: nein

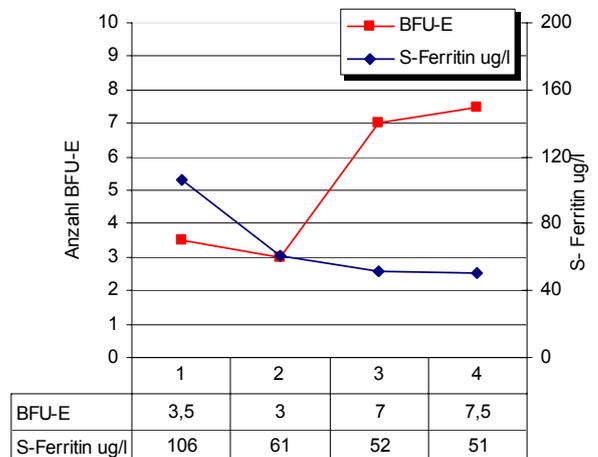
Ferritinverlauf: stabil

BFU- E Verlauf: steigend

Transfusionsbedarf: nein

Chelattherapie: nein

Nr	Messzeitpunkt	Serum-Ferritin µg/l	Anzahl BFU-E	Anzahl CFU-GM
1	09.03.2009	106	3,5	26,5
2	11.05.2009	61	3	1
3	06.07.2009	52	7	4,5
4	23.11.2009	51	7,5	51,5



## 3.4 Durchflusszytometrie

### 3.4.1 Patientenkollektiv

Von 25 Patienten mit MDS (11 Frauen, 14 Männer) wurden CD34-positive Zellen mit Annexin und PI behandelt, um so den Apoptoseanteil zu bestimmen. Es wurde jeweils eine Untersuchung gewertet. Das Alter lag zwischen 40 und 81 Jahren, der Mittelwert und Median waren bei 65/67 Jahren. Die Klassifizierung der MDS-Erkrankung und klinischen Informationen der einzelnen Patienten zum Messzeitpunkt werden in Tabelle 22 dargestellt.

#### 3.4.1.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore

Der WHO-Subtyp wurde bei 20 Patienten bestimmt, bei 5 Patienten war dies nicht möglich. Die Diagnosen (WHO) waren: RA/RARS: n=6, RCMD/RS: n=7, RAEB I/II: n=5, 5q-Syndrom: n=2, AML: n=0 und andere n=5. Die Verteilung des IPSS-Risikoscore lag bei: low: n=7, intermediate I: n=10, intermediate II: n=4, high: n=2, andere: n=2. Die Verteilung des zytogenetische Risikoscore war: low: n=19, intermediate: n=1, high: n=4 und andere: n=1.

#### 3.4.1.2 Blutparameter

Am Tag der Blutentnahme für die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgte auch die Bestimmung von Ferritin, Hämoglobin, Leukozytenanzahl, absoluter Neutrophilenanzahl und Thrombozyten. Die Blutentnahme fand vor eventueller EK- oder TK-Gabe statt.

Mittelwerte und Median der Blutwerte waren: Hb 9,3/8,9 g/dl (25 Patienten), Leukozytenzahl 5,5/2,8  $10^3$  / $\mu$ l (25 Patienten), Thrombozytenzahl 169/118  $10^3$  / $\mu$ l (25 Patienten), ANC 46,6/45,8 Prozent (14 Patienten).

Das Serum-Ferritin lag zwischen 3 und 4070  $\mu$ g/l, Median und Mittelwerte waren 760/472,5  $\mu$ g/l.

Das C-reaktive Protein wurde bei zwei Patienten bestimmt, davon zeigte einer einen Wert unter 8 mg/l, einer 9,3 mg/l. Bei erhöhten CRP wurde der Ferritinwert mit Werten im entzündungsfreien Intervall verglichen und bestätigt. Bei 3 Patienten wurde Procalcitonin bestimmt, der Wert lag < 0,2  $\mu$ g/l.

### 3.4.1.3 Transfusionsbedarf

Zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie waren von 17 der 25 Patienten Daten bezüglich des Transfusionsbedarfes zu erheben. Von diesen 17 Patienten erhielten 6 monatlich unterschiedliche Mengen an EK, der mittlere EK-Bedarf lag bei 4,6 pro Monat.

Daten zum gesamten EK- bzw. TK-Verbrauch bis zum Messzeitpunkt lagen von 14 (EK) bzw. 16 (TK) Patienten vor. Der gesamte EK-Verbrauch von 5 der 14 Patienten lag bei einem Mittelwert von 56 und einem Median von 8 EK. Der gesamte TK-Verbrauch von 3 der 16 Patienten lag bei einem Mittelwert von 4 und einem Median von 5 TK. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 21.

**Tabelle 21: Angaben zur Datenerhebung und Auswertung der Transfusionen im Patientenkollektiv der durchflusszytometrischen Auswertung**

	Zahl der Patienten mit bekannten Daten				Zahl der Patienten mit unbekanntem Daten
	transfundierte	Range	MW		
EK/Monat	17	6	1 - 8	4,6	8
EK total	14	5	2 - 255	56,2	11
TK total	16	3	1 - 6	4	9

### 3.4.1.4 Apoptose/Nekrose

Zur Bestimmung der Apoptose CD34-positiver Zellen wurde die Summe aller CD34-positiver Zellen in UR und LR (Annexin und PI positiv) bestimmt. Bei 25 Patienten lag der prozentuale Anteil der CD34-positiven und Annexin/PI-positiven Zellen zwischen 0,1-77,9 %, Mittelwert und Median lagen bei 22,8 und 18,5 %.

Zur Kontrolle der Färbung wurde der Anteil der CD34-negativen und Annexin/PI-negativen Zellen bestimmt, dieser lag zwischen 74,4–97,8 %, Mittelwert und Median lagen bei 90,4 und 91,5 %.

In der folgenden Tabelle 22 werden die durchflusszytometrisch untersuchten Patienten mit klinischen Daten aufgeführt.

**Tabelle 22: WHO-Subtyp, IPSS-Score und zytogenetische Risikogruppe wurden evaluiert bei Erstdiagnose. Alter, S-Ferritin, Hb, Leukozytenanzahl, ANC, Thrombozytenanzahl, CRP, Procalcitonin, EK-Bedarf/Monat, insgesamt erhaltenen EK und TK wurden zum Messzeitpunkt evaluiert.**

ID	WHO-Subtyp	Score IPSS	Zytogen Risikogr	Geschl	Alter	1 in %	2 in %	3 in %	S-Ferritin µg/l	Hb g/dl	Leuko 10 <sup>3</sup> /µl	ANC	Thrombo 10 <sup>3</sup> /µl	CRP mg/l	Procalc µg/l	EK-Bedarf/ Monat	EK total	TK total
2	RCMD	0,5	low	f	67	40,11	52,11	97,38	57	10,9	1,87	/	87,5	/	/	/	/	/
5	RA	0,5	low	m	70	10,67	89,09	93,34	285	8,5	1,53	22	84,2	/	< 0,1	/	/	/
10	RCMD	0	low	m	46	52,11	46,16	93,15	85	12,5	7,41	47	143	/	/	/	/	/
13	RA/RAEB I	0,5-1	low	f	59	25,52	73,69	74,38	863	8,7	2,46	/	118	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
14	RCMD	0	low	f	40	17,99	80,9	88,88	3	10,4	4,14	55,5	237	/	/	n.b.	n.b.	/
15	RAEB II	1,5	low	m	68	77,93	21,88	95,64	171	12	2,14	/	135	/	/	/	/	/
22	/	> 2,5	high	m	63	19,14	80,56	79,29	2719	7,7	1,51	35	12,5	/	/	8	12	6
24	RAEB II	> 2,5	high	f	62	11,46	82,11	94,15	150	9,1	1,91	/	136	/	/	/	/	/
25	5 q -	0	low	f	81	32,2	66,42	86,85	291	8,7	3,81	63	345	/	/	/	/	/
28	RA	1	low	f	56	16,25	83,52	94,61	775	775	7,9	3,52	14	15,8	< 0,1	4	4	5
40	RAEB II	2	low	M	64	20,77	76,63	79,13	44	14,9	2,6	68,4	114	/	/	/	/	/
42	RARS	0	low	m	65	0,09	96,68	81,3	716	8,5	3,96	/	260	/	/	6	255	/
46	RA/RAEB I	1-1,5	intermediate	f	68	22,89	76,61	89,56	156	10,8	2,06	/	27,1	/	/	/	2	/
50	RA	1	high	m	71	26,18	73,02	95,12	695	0,7	3,17	/	397	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
51	RCMD	1-1,5	high	m	67	18,44	80,88	97,81	68	8,2	2,87	/	10,8	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
58	RA	0,5	low	m	76	41,63	57,98	90,22	4070	8,8	1,13	24	27,8	/	< 0,1	4	n.b.	n.b.
59	5 q -	0	low	m	71	0,96	95,48	92,94	408	9,2	7,67	/	495	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
61	RA/ICUS	0,5	low	f	50	6,23	93,61	90,68	75	8,4	2,69	/	45,6	/	/	/	/	/

ID	WHO-Subtyp	Score IPSS	Zytogen Risikogr	Geschl	Alter	1 in %	2 in %	3 in %	S-Ferritin µg/l	Hb g/dl	Leuko 10 <sup>3</sup> /µl	ANC	Thrombo 10 <sup>3</sup> /µl	CRP mg/l	Procalc µg/l	EK-Bedarf/ Monat	EK total	TK total
66	CMML	/	/	f	61	8,02	91,07	89,12	1087	8,2	29,7	58	336	/	/	1	n.b.	n.b.
76	/	/	low	m	75	16,92	81,84	94,78	1961	8,9	1,18	7	7,25	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
77	RCMD	0-0,5	low	f	71	5,95	93,43	91,68	962	8,6	10,8	72	432	/	/	n.b.	n.b.	n.b.
80	RAEB I	0,5	low	m	69	19,98	78,04	91,44	437	12,5	2,81	54,1	328	/	/	/	/	/
81	RCMD	0,5	low	m	67	6,74	78,06	96,51	1111	9	3,31	60,9	112	/	/	/	8	1
82	RCMD	0	low	f	74	57,42	41,1	90,85	767	9,4	2,73	71,4	256	2,9	/	2 alle 3 Monate	n.b.	/
85	RAEB I	1	low	m	62	13,99	85,16	90,62	1310	10,8	29,5	/	73,1	9,3	/	n.b.	n.b.	n.b.

1: Anteil der Annexin/PI-positiven(apoptotische und/oder nekrotische) CD34-positiven Zellen an Gesamtmenge der CD34-positiven Zellen

2: Anteil der Annexin/PI-negativen CD34-positiven Zellen an Gesamtmenge der CD34-positiven Zellen

3: Anteil der Annexin/PI-negativen CD34-negativen Zellen an Gesamtmenge der CD34-negativen Zellen

ID: Identifikationsnummer, Zytogen Risikogr: zytogenetische Risikogruppe, Geschl: Geschlecht, MW: Mittelwert, Leuko: Leukozytenanzahl, ANC: absolute neutrophil count, Thrombo: Thrombozytenanzahl, CRP: C-reaktives Protein, Procalc: Procalcitonin, TK: Thrombozytenkonzentrat, EK: Erythrozytenkonzentrat, n.b.: nicht bekannt

### 3.4.2 Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin < 250 µg/l

Immunomagnetische separierte Proben von 9 Patienten (56 % weiblich/ 44 % männlich) mit Ferritinwerten < 250 µg/l wurden analysiert. Das Alter lag zwischen 40-68 Jahren, der Mittelwert/median war 59/64 Jahre.

#### 3.4.2.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose fand sich bei keinem Patienten der WHO-Subtyp 5q- Syndrom, bei 11 % RA/RARS, bei 44,5 % RCMD/RCMD-RS und bei 44,5 % RAEB I/II. Der IPSS-Risikoscore war für 22 % low, 22 % int I, 45 % int II und 11 % high. Der zytogenetische Risikoscore von 67 % der Patienten war low, von 11 % intermediate und von 22 % high.

#### 3.4.2.2 Blutparameter

Die Auswertung der Blutwerte ergab folgende Mittelwerte und Mediane:

Hb 10,8/10,8 g/dl (9 Patienten), Leukozytenzahl 3,1/2,6  $10^3$  /µl (9 Patienten), Thrombozytenzahl 104/114  $10^3$ /µl (9 Patienten) und ANC 57/55,5 Prozent (9 Patienten). Der Ferritinwert wurde zwischen 3 - 171 µg/l bestimmt, Mittelwerte und Median waren 99/75 µg/l.

#### 3.4.2.3 Transfusionsbedarf

Zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie waren von 7 der 9 Patienten mit Ferritin < 250 µg/l Daten bezüglich des Transfusionsbedarfes zu erheben. Von diesen 7 Patienten wurde keiner monatlich transfundiert.

Daten zum gesamten EK- bzw. TK-Verbrauch lagen von 7 (EK) bzw. 8 (TK) Patienten vor. Lediglich ein Patient wurde einmalig mit 2 EK transfundiert, keiner erhielt bis zum Messzeitpunkt TK. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 23.

**Tabelle 23: Angaben zur Datenerhebung und Auswertung der Transfusionen zur durchflusszytometrischen Auswertung bei Patienten mit Ferritin < 250 µg/l**

	Zahl der Patienten mit bekannten Daten			MW	Zahl der Patienten mit unbekanntem Daten
	transfundiert	range			
EK/Monat	7	0	-	0	2
EK total	7	1	0 - 2	2	1
TK total	8	0	-	0	1

#### **3.4.2.4 Apoptose/Nekrose**

Von 9 Patienten der prozentuale Anteil der CD34-positiven und Annexin/PI-positiven, also apoptotischen und/oder nekrotischen Zellen zwischen 6,2 bis 77,9 %, Mittelwert und Median lagen bei 29,8 und 20,8 %.

Der Anteil der CD34-negativen und Annexin/PI-negativen Zellen lag zwischen 79,1-97,8 %, Mittelwert und Median lagen bei 91,8 und 93,2 %.

#### **3.4.3 Deskriptive Angaben zum Patientenkollektiv Ferritin > 250 µg/l**

Von 16 Patienten mit erhöhten Ferritinwerten (37,5 % weiblich/62,5 % männlich) wurden immunomagnetisch separierte Proben durchflusszytometrisch analysiert. Das Alter lag zwischen 56-81 Jahren, der Altersmittelwert/median war 68/69,5 Jahre.

##### **3.4.3.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore**

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose fand sich bei 12,5 % der WHO-Subtyp 5q- Syndrom, bei 30,5 % RA/RARS, bei 19 % RCMD/RCMD-RS, und bei 19 % RAEB I/II. Bei 19 % (3 Patienten) konnte kein WHO-Subtyp bestimmt werden. Der IPSS-Risikoscore war für 25 % low, 56 % int I, 0 % int II, 6,5 % high. Bei 12,5 % (zwei Patienten) konnte kein IPSS bestimmt werden. Der zytogenetische Risikoscore von 81 % der Patienten war low, von 0 % intermediate und von 6,5 % high. Bei 6,5 % (ein Patient) lag kein Karyotyp vor.

##### **3.4.3.2 Blutparameter**

Die Auswertung der Blutwerte ergab folgende Mittelwerte und Mediane:

Hb 8,5/8,7 g/dl (16 Patienten), Leukozytenzahl 6,8/3,2  $10^3$  / $\mu$ l (16 Patienten), Thrombozytenzahl 206/187  $10^3$  / $\mu$ l (16 Patienten) und ANC 43,8/54,1 Prozent (11 Patienten). Der Ferritinwert wurde zwischen 285 - 4070 µg/l bestimmt, Mittelwerte und Median waren 1154/819 µg/l.

##### **3.4.3.3 Transfusionsbedarf**

Zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie waren von 10 der 16 Patienten mit Ferritin < 250 µg/l Daten bezüglich des Transfusionsbedarfes zu erheben. Von diesen 10 Patienten erhielten 6 monatlich unterschiedliche Mengen an EK, der mittlere EK-Bedarf lag bei 4 pro Monat.

Daten zum gesamten EK- bzw. TK-Verbrauch lagen von 7 (EK) bzw. 8 (TK) Patienten vor. Von 4 transfundierten Patienten lag der mittlere EK-Verbrauch bei 70

EK, der Median bei 10 EK. Von 3 mit TK transfundierten Patienten lag der mittlere TK-Verbrauch bei 4, der Median bei 5. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 24.

**Tabelle 24: Angaben zur Datenerhebung und Auswertung der Transfusionen zur durchflusszytometrischen Auswertung bei Patienten mit Ferritin > 250 µg/l**

	Zahl der Patienten mit bekannten Daten			Zahl der Patienten mit unbekannten Daten	
	transfundiert	range	MW		
EK/Monat	10	6	1 - 8	4	6
EK total	7	4	4 - 255	70	9
TK total	8	3	1 - 6	4	8

#### 3.4.3.4 Apoptose/Nekrose

Von 16 Patienten lag der prozentuale Anteil der CD34-positiven und Annexin/PI-positiven Zellen zwischen 0,1 bis 57,4 %, Mittelwert und Median lagen bei 18,9 und 16,6 %.

Der Anteil der CD34-negativen und Annexin/PI-negativen Zellen lag zwischen 74,4-96,6 %, Mittelwert und Median lagen bei 89,6 und 91,1 %.

#### 3.4.4 Vergleichende Darstellung der Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin

Die Ergebnisse durchflusszytometrischer Untersuchungen immunomagnetisch separierter und Annexin/PI-gefärbter Zellen von 25 MDS-Patienten wurden analysiert. 16 Patienten zeigten Ferritinwerte > 250 µg/l, das entsprach dem 1,8-fachen der Patientenzahl mit Ferritinwert < 250 µg/l (9 Patienten). Der Altersmedian lag bei 64 vs. 69,5 Jahre. Das Geschlechterverhältnis war 56 % weiblich / 44 % männlich bei normalen Ferritinwerten im Vergleich zu 37,5 % weiblich / 62,5 % männlich bei erhöhtem Ferritin. Eine graphische Anschauung bietet Abbildung 25. Die Geschlechterverteilung wurde mittels Chi-Quadrat-Vierfelder-Test verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden ( $p=0,38$ ). Beim Vergleich des Alters der beiden Gruppen mittels t-Test war ein Unterschied nachzuweisen ( $p=0,016$ ), die Gruppe der Patienten mit Ferritin > 250 µg/l war signifikant älter.

##### 3.4.4.1 WHO-Subtyp, IPSS-Score, zytogenetischer Risikoscore

Details zur prozentualen Verteilung der WHO-Subtypen, des zytogenetischen Risikoscores nach IPSS und des IPSS-Risikoscore sind in Tabelle 26 und den

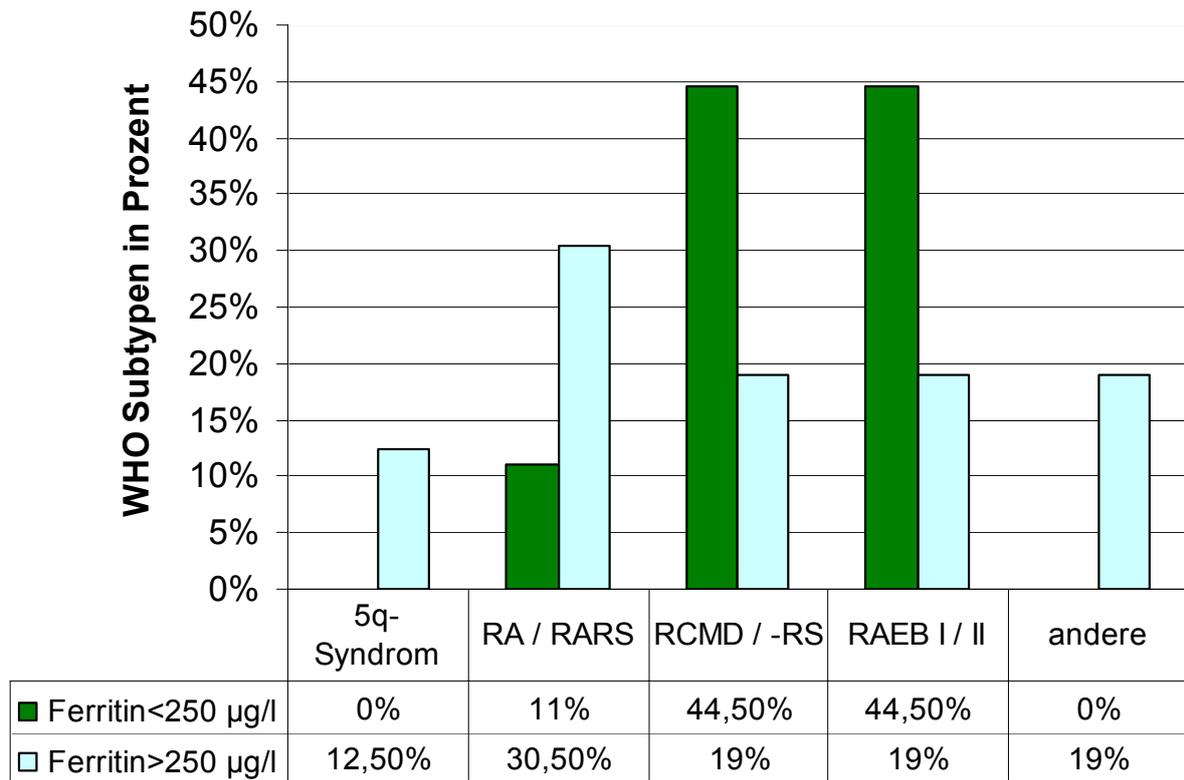
Abbildung 23 und 24 dargestellt. Die WHO-Stadien, der IPSS-Risikoscore und der zytogenetische Risikoscore nach IPSS wurden mit einem Chi-Quadrat-Mehrfeldertest verglichen. Signifikante Unterschiede wurden nicht nachgewiesen, siehe hierzu Tabelle 25.

**Tabelle 25: WHO-Subtypen, IPSS-Risikoscore und zytogenetischer Risikoscore wurden mittels Chi-Quadrat-Mehrfeldertest zwischen der Gruppe mit Ferritin < 250 µg/l und > 250 µg/l verglichen. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Der p-Wert von 0,04 beim Vergleich des IPSS-Scores wurde wegen multiplen Testens nicht als signifikant gewertet.**

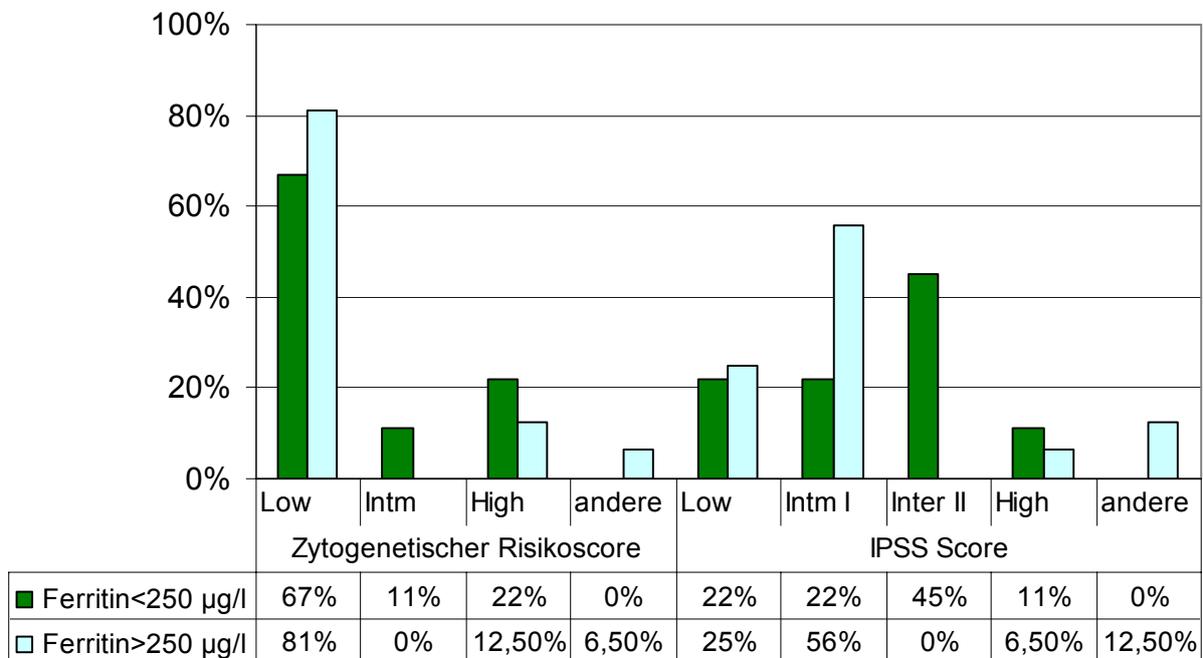
	WHO-Subtyp	IPSS-Score	Zytogenetischer Risikoscore nach IPSS
p-Wert	0,16	0,04	0,41

**Tabelle 26: Vergleich der prozentualen Anteile an WHO-Subtypen, IPSS-Risikoscore und zytogenetischer Risikogruppe der durchflusszytometrisch untersuchten Patienten mit normalem und erhöhtem Ferritin**

Ferritin < 250 µg/l n=9			Ferritin > 250 µg/l n=16		
<b>WHO-Subtyp</b>	<b>5q- Syndrom</b>	0 %	12,5 %	<b>5q- Syndrom</b>	<b>WHO-Subtyp</b>
	<b>RA/RARS</b>	11 %	30,5 %	<b>RA/RARS</b>	
	<b>RCMD/-RS</b>	44,5 %	19 %	<b>RCMD/-RS</b>	
	<b>RAEB I/II</b>	44,5 %	19 %	<b>RAEB I/II</b>	
	<b>andere</b>	0 %	19 %	<b>andere</b>	
<b>IPSS-Karyotyp</b>	<b>low</b>	67 %	81 %	<b>low</b>	<b>IPSS-Karyotyp</b>
	<b>intermediate</b>	11 %	0 %	<b>intermediate</b>	
	<b>high</b>	22 %	12,5 %	<b>high</b>	
	<b>andere</b>	0 %	6,5 %	<b>andere</b>	
<b>IPSS-Score</b>	<b>low</b>	22 %	25 %	<b>low</b>	<b>IPSS-Score</b>
	<b>intermediate I</b>	22 %	56 %	<b>intermediate I</b>	
	<b>intermediate II</b>	45 %	0 %	<b>intermediate II</b>	
	<b>high</b>	11 %	6,5 %	<b>high</b>	
	<b>andere</b>	0 %	12,5 %	<b>andere</b>	



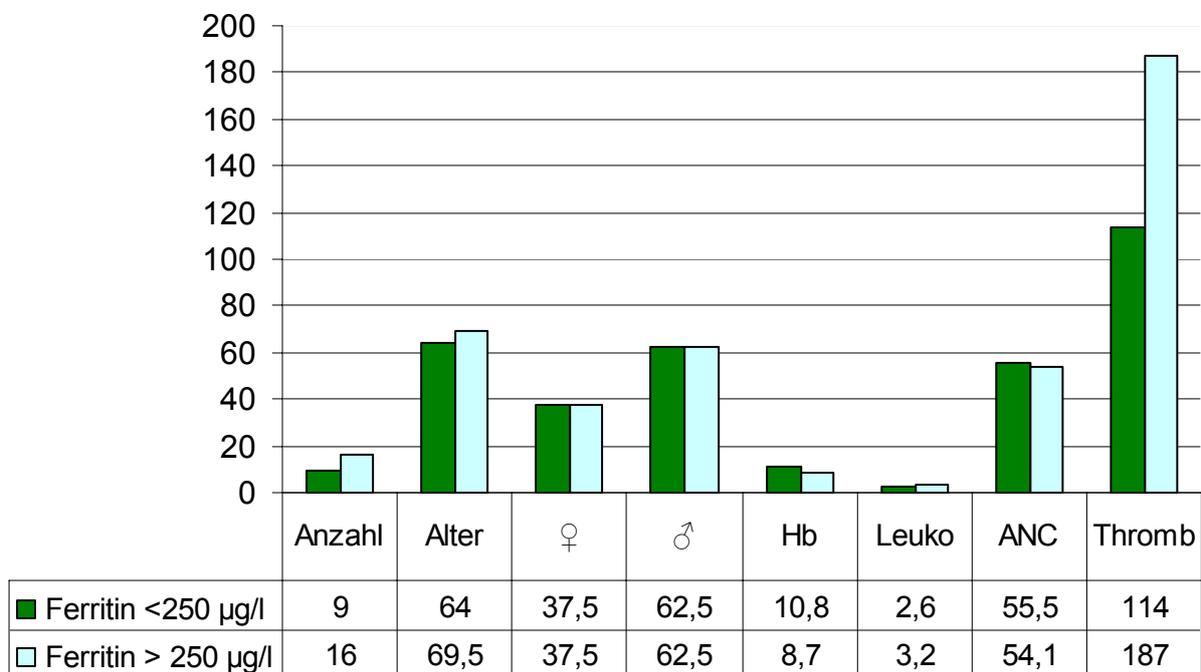
**Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der WHO-Subtypen des durchflusszytometrisch untersuchten Patientenkollektives mit normalem Ferritin vs. erhöhtes Ferritin**



**Abbildung 24: Vergleichende Darstellung der IPSS-Risikoscore und der zytogenetischen Risikogruppe des durchflusszytometrisch untersuchten Patientenkollektives mit normalem Ferritin vs. erhöhtes Ferritin**

### 3.4.4.2 Blutparameter

Beim Vergleich der Blutwerte fanden sich ein medianer Hb 10,8 vs. 8,7 g/dl, Leukozytenanzahl 2,6 vs. 3,2  $10^3/\mu\text{l}$ , ANC 55,5 vs. 54,1 % Thrombozytenanzahl 114 vs. 187  $10^3/\mu\text{l}$ . Der Vergleich des medianen Ferritinwertes ergab 75  $\mu\text{g/l}$  vs. 819  $\mu\text{g/l}$ . Abbildung 25 vergleicht Blutwerte, Anzahl, Alter und Geschlecht der untersuchten Gruppen. Mittels Wilcoxon-Test wurden Ferritin, Hb, Leukozytenanzahl, ANC und Thrombozytenanzahl zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei Ferritin und Hb und kein signifikanter Unterschied zwischen Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und ANC.



**Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin nach Anzahl, Median des Alters in Jahren, Geschlecht (♂, ♀) in Prozent, Median Hb g/dl, Leukozytenanzahl (Leuko.)  $10^3/\mu\text{l}$ , ANC und Thrombozytenanzahl (Thromb)  $10^3/\mu\text{l}$**

### 3.4.4.3 Transfusionsbedarf

Bei 17 von 25 Patienten (68 Prozent) konnten Daten zum Transfusionsbedarf erhoben werden. Von 32 Prozent (8 Patienten) lagen keine Daten vor, davon zeigten zwei normale und sechs erhöhte Ferritinwerte.

Von den 17 Patienten wurden 35 Prozent (6 Patienten) monatlich transfundiert. Der Vergleich der Daten zum Transfusionsbedarf von Patienten mit normalem Ferritin vs. Patienten mit erhöhtem Ferritin zeigte einen monatlichen Verbrauch von 0 vs. 4 EK.

Der totale EK-Verbrauch lag im Mittel bei 2 vs. 70 EK und der totale TK-Bedarf bei 0 vs. 4 TK.

### 3.4.5 Statistischer Vergleich des Anteils der Apoptose CD34-positiver Zellen bei normalem und erhöhtem Ferritin

#### 3.4.5.1 Deskriptive Angaben der statistischen Auswertung der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen und der Kontrolle

Der prozentuale Anteil der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen wurden zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin verglichen. Weiterhin wurden die Annexin/PI-negativen CD34-negativen Zellen als Kontrolle der Quadrantensetzung verglichen. Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde bei 25 Patienten ausgewertet, von denen 9 normale und 16 erhöhte Ferritinwerte hatten. Der mediane Anteil der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen bei normalem Ferritin vs. erhöhtes Ferritin war 20,8 % vs. 16,6 % bei einer Standard Abweichung von 22,9 vs. 15,2. Der Mittelwert der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen lag bei 29,7 % vs. 18,9 %. Der minimale Anteil der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen lag bei 6,2 vs. 0,1 %. Der maximale Anteil der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen war 77,9 vs. 57,4 %.

Der mediane Anteil der Annexin/PI-negativen CD34-negativen Zellen bei normalem Ferritin vs. erhöhtes Ferritin war 93,2 vs. 91,1 bei einer Standard Abweichung von 5,8 vs. 6,2. Der minimale Anteil lag bei 79,1 vs. 74,4 %, der maximale Anteil bei 97,8 vs. 96,5 %. Zu diesen Angaben vergleiche Tabelle 27.

**Tabelle 27: Deskriptive Angaben zum Vergleich des Anteils Annexin/PI-positiver CD34-positiver Zellen (A) und Annexin/PI-negativer CD34-negativer Zellen (B) bei Patienten mit normalem vs. erhöhtes Ferritin**

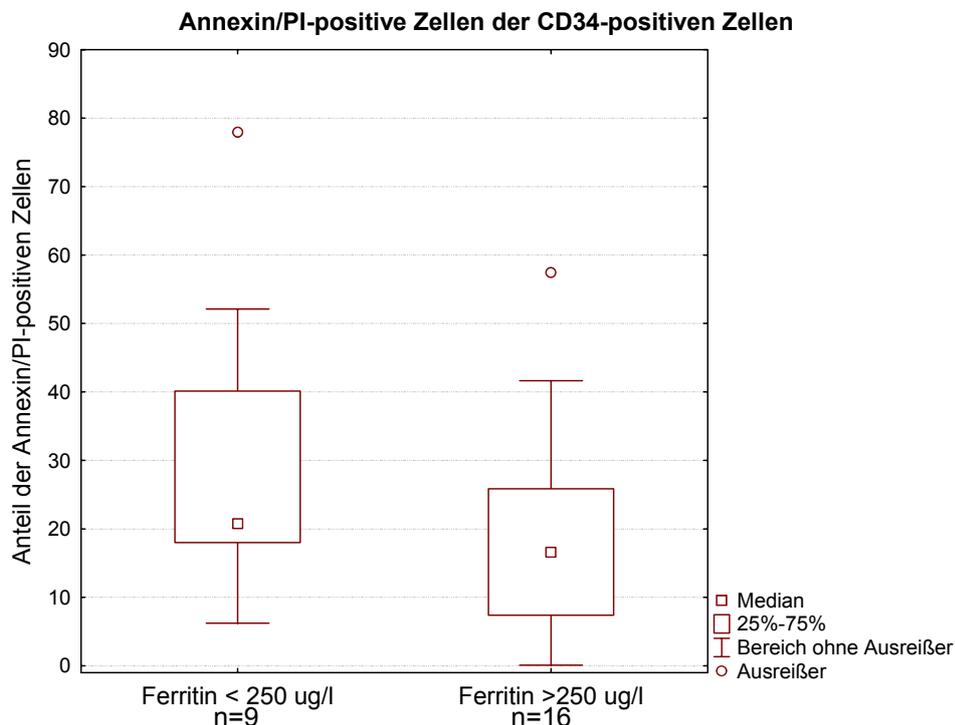
Ferritin < 250 µg/l						
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
<b>A</b>	9	29,7	20,8	6,2	77,9	22,9
<b>B</b>	9	91,8	93,2	79,1	97,8	5,8
Ferritin > 250 µg/l						
	Valid N	Mean	Median	Minimum	Maximum	Std.Dev.
<b>A</b>	16	18,9	16,6	0,1	57,4	15,2
<b>B</b>	16	89,6	91,1	74,4	96,5	6,2

### 3.4.5.2 Wilcoxon-Test

Der statistische Vergleich des Anteils Annexin/PI-positiver CD34-positiver Zellen zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin erfolgte mittels Wilcoxon-Test. Dieser Test wurde gewählt da bei den Daten nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann und es sich bei dem Wilcoxon-Test um einen verteilungsfreien Test handelt. Er zeigte bei einem p-Wert  $p=0,22$  keinen signifikanten Unterschied für den Anteil der Annexin- und PI-Anfärbung zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin. Die Auswertungen sind in Tabelle 28 und Abbildung 26 dargestellt.

**Tabelle 28: Statistischer Vergleich des Anteils der Annexin/PI-positiven CD34-positiven Zellen mit Mann-Whitney-U-Test. Werte sind signifikant ab einem  $p < 0,05$**

	Valid N - Ferritin < 250 µg/l	Valid N – Ferritin > 250 µg/l	p-level
<b>Anteil der Annexin/PI-positiven Zellen CD34-positiv</b>	9	16	<b>0,223</b>

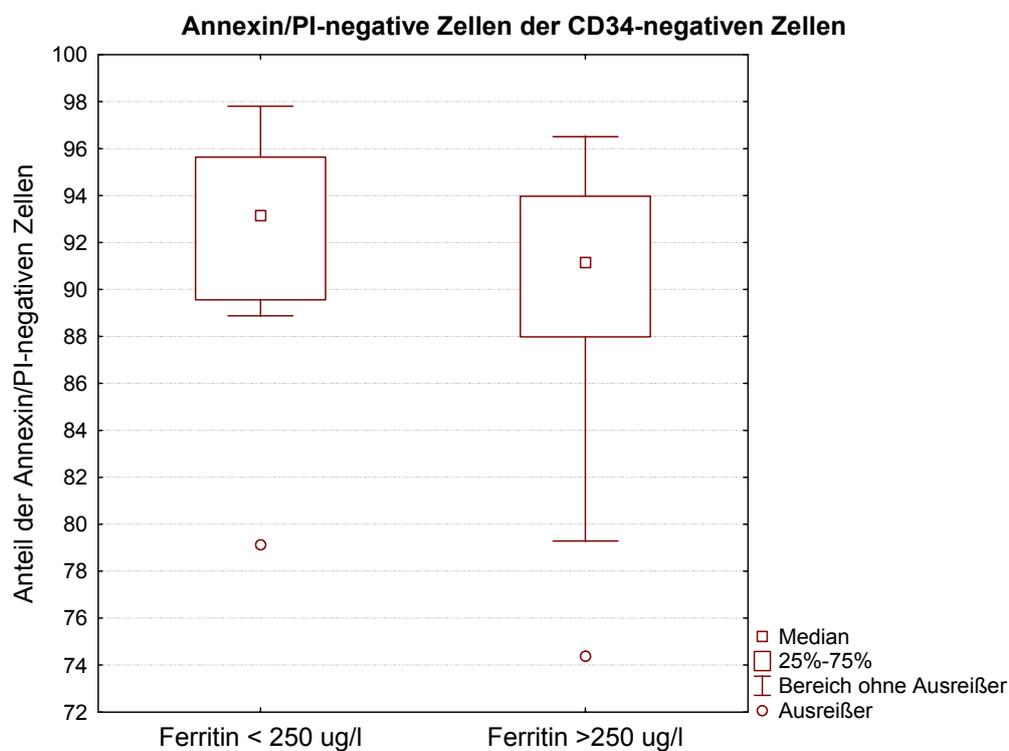


**Abbildung 26: Box Plot Darstellung des statistischen Vergleichs des Anteils der Annexin/PI-angefärbten CD34-positiven Zellen bei Patienten mit normalen (n=9) und erhöhten Ferritinwerten (n=16). Dies zeigt bei einem  $p=0,22$  keinen signifikanten Unterschied**

Der Vergleich des Anteils Annexin/PI-negativer CD34-negativer Zellen zwischen den Gruppen mit normalem und erhöhtem Ferritin zeigte bei einem p-Wert  $p=0,25$  keinen signifikanten Unterschied. Die Auswertungen sind in Tabelle 29 und Abbildung 27 dargestellt.

**Tabelle 29: Statistischer Vergleich des Anteils der Annexin/PI-negativen CD34-negativen Zellen mit Mann-Whitney-U-Test. Werte sind signifikant ab einem  $p < 0,05$**

	Valid N - Ferritin < 250 µg/l	Valid N – Ferritin > 250 µg/l	p-level
<b>Anteil der Annexin/PI-positiven Zellen CD34-positiv</b>	9	16	<b>0,41</b>



**Abbildung 27: Box Plot Darstellung des statistischen Vergleichs des Anteils der Annexin/PI-negativen CD34-negativen Zellen bei Patienten mit normalen (n=9) und erhöhten (n=16) Ferritinwerten. Dies zeigt bei einem  $p=0,41$  keinen signifikanten Unterschied**

## **4 Diskussion**

### **4.1 Signifikante Unterschiede des BFU-E-Wachstums bei Patienten mit und ohne Eisenüberladung**

In dieser experimentellen Studie wurde die Hypothese untersucht, ob Eisenüberladung bei MDS-Patienten die Funktion hämatopoetischer Stammzellen negativ beeinflusst. Hierzu wurde mittels Colony Assay die koloniebildende Aktivität der hämatopoetischen Progenitoren (BFU-E: erythrozytären Vorläuferzellen und CFU-GM: bipotente Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen) von 52 MDS-Patienten analysiert. Die Kolonienanzahl von Patienten mit normalen Eisen ( $n=14$ ) wurde mit der Kolonienanzahl von Patienten mit erhöhtem Körpereisen ( $n=38$ ) statistisch verglichen. Als Bezugsparameter für den Eisengehalt des Körpers diente das Serum-Ferritin. Dies stellt eine adäquate Referenz-Methode im klinischen Monitoring des Eisenhaushaltes dar (Porter 2001).

In der Studie wurden ausschließlich Patienten untersucht, die keine oder einen definierten Zeitabstand zu bestimmten Therapiemaßnahmen hatten. Dadurch wurde die Beeinflussung des Kolonienwachstums durch z.B. Zytostatika oder Erythropoetin ausgeschlossen.

Die Anzahl der im Colony Assay kultivierten BFU-E von MDS-Patienten mit normalem Ferritin ( $< 250 \mu\text{g/l}$ ) wurde verglichen mit der Kolonienanzahl von Patienten mit erhöhten Ferritinwerten ( $> 250 \mu\text{g/l}$ ). Der Unterschied war bei einem Wert von  $p=0,0013$  hoch signifikant. Damit ergeben sich deutliche Hinweise darauf, dass bei MDS-Patienten mit Eisenüberladung die Knochenmarksfunktion durch Verminderung der koloniebildenden Aktivität der erythrozytären Vorläuferzellen signifikant unterdrückt ist.

#### **4.1.1 Rahmenbedingungen und Validität der Methodik des Colony Assay**

Colony Assays sind eine etablierte und lang bekannte Methode, durch die myeloische und erythrozytäre Vorläuferzellen qualitativ und quantitativ erfasst werden.

Die in dieser Studie angewendete Technik entspricht den allgemein anerkannten Vorstellungen und Protokollen zur Stimulierbarkeit verschiedener Zelllinien in vitro (Nissen-Druey et al. 2005). Auszählung und Beurteilung der Kolonien und Cluster erfolgte am Mikroskop. Dies lässt sich bis zu einem gewissen Grad standardisieren,

individuelle Unterschiede können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden (Nissen-Druey et al. 2005). In dieser Studie wurden alle mikroskopischen Auswertungen von derselben, erfahrenen Person durchgeführt, um so eine mögliche Fehlerquelle gering zu halten. In die Auswertung ging dabei die quantitative, nicht aber die qualitative Beurteilung der Zellen ein.

Die verminderte Anzahl der BFU-E ist ein charakteristischer Befund bei MDS (Nissen-Druey et al. 2005, Öhler et al. 2003, San Miguel 1996), der sich auch in diesen Untersuchungen widerspiegelt. Nach im Median 14 Tagen Kultivierung lag die mediane Anzahl der BFU-E aus 52 Untersuchungen bei 1,5 Kolonien pro  $10^5$  Zellen. Im Vergleich hierzu liegt der Referenzwert der Kontrollassays aus Leukozytenapheresepreparaten bei nicht an MDS-erkrankten-Patienten bei 374 +/- 198 BFU-E pro  $10^5$  Zellen.

#### **4.1.2 Homogene Verteilung der Krankheitscharakteristika innerhalb des Patientenkollektivs**

Da unter anderem die Anzahl der BFU-E bei Patienten im FAB-Stadium RA signifikant höher liegt als bei anderen Stadien (Oscier et al. 1989) wurden die Kollektive nach Alter, Geschlecht, WHO-Stadium, IPSS-Score und zytogenetischem Risikoscore verglichen, um eine Beeinflussung des Kolonienwachstums durch andere Faktoren auszuschließen. Diesbezüglich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kollektiven mit Ferritin < 250 µg/l und > 250 µg/l, siehe hierzu Tabelle 30.

**Tabelle 30: WHO-Subtypen, IPSS-Risikoscore und zytogenetischer Risikoscore wurden mittels Chi-Quadrat-Mehrfeldertest zwischen der Gruppe mit Ferritin < 250 µg/l und > 250 µg/l verglichen. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.**

	Alter	Geschlecht	WHO-Stadium	IPSS-Score	Zytogenetischer Risikoscore nach IPSS
p-Wert	0,19	0,1	0,71	0,8	0,61

Ebenso wurden die Blutwerte mittels Wilcoxon-Test verglichen, Patienten mit erhöhten Ferritinwerten zeigten signifikant niedrigere Hb-Werte. Mögliche Erklärungen sind sowohl ein erhöhter therapeutischer Transfusionsbedarf mit konsekutiver Eisenüberladung bei Patienten mit erniedrigten Hb-Werten, als auch der supprimierende Effekt eben dieser Eisenüberladung auf die Hämatopoese.

In wenigen Einzelfällen waren Verlaufsbeobachtungen und Re-Evaluationen von Diagnose und Ferritinwerten nicht vollständig möglich. Dadurch konnte sowohl verändertes Kolonienwachstum durch Fortschreiten oder Veränderung der Grunderkrankung als auch erhöhte Ferritinwerte z.B. durch Entzündungen bei diesen Patienten nicht ausgeschlossen werden.

Brechignac et al. bezifferten den Anteil transfusionsabhängiger Patienten je nach IPSS auf 40 bis 80 Prozent (Brechignac et al. 2004). In unserem Kollektiv wurden 18 von 44 Patienten (40 Prozent) monatlich transfundiert. Dieser Prozentsatz entspricht ungefähr dem von Brechignac et al. (2004) beschriebenen Anteil transfusionsabhängiger Patienten mit dem IPSS-Score low. Dieser Wert ist jedoch nur eingeschränkt verwendbar, da von 16 Prozent der Patienten, die anamnestisch Transfusionen erhalten hatten, keine Daten zum Transfusionsverlauf vorlagen. Bezieht man diese 16 Prozent in die Auswertung ein, ergibt das einen Anteil transfundierter Patienten von insgesamt 50 Prozent.

#### **4.1.3 Genotoxizität und „oxyradical overload disease“ als Ursache des reduzierten Kolonienwachstums bei Eisenüberladung?**

In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Untersuchungen oder Angaben, die das Ergebnis dieser Studie widerlegen oder bestärken könnten. Doch zeigen verschiedenen Untersuchungen die toxischen Einflüsse von Eisen auf hämatopoetische Zellen. Park et al. (2008) beschrieben die Genotoxizität von Eisen an Leukozyten von Menschen und Ratten in vivo und in vitro sowohl generell, als auch spezifisch durch Zunahme von DNA-Schäden im Bereich des Tumorsupressorgenes P-53. Dieses Ergebnis stützt die These, dass zumindest Leukozyten als hämatopoetische Zellen mit DNA-Veränderungen auf Eisenbelastung reagieren. Dieser Sachverhalt ist ebenso bei Hepatozyten (Hussain et al. 2000) und humanen Kolonzellen (Knöbel et al. 2006) beschrieben worden.

Jagetia et al. (2004) setzten Zellen einer humanen Leberzellkarzinom-Zelllinie verschiedenen Konzentrationen von Eisenionen aus. Zusätzlich zu einer zeitabhängigen Zunahme von DNA-Strangbrüchen fanden sie eine dosisabhängige Abnahme des klonogenen Potenzials der Zellen in vitro. Das Überleben der Zellen ließ sich durch Antioxidantien verlängern. Dies spricht für die Theorie, dass die intrazelluläre Anreicherung von freiem, ungebundenem Eisen bei Eisenüberladung zu oxidativen Stress führt, als dessen Folge DNA-Strang-Brüche und Proteinfragmentation bekannt sind (Ramm und Ruddell 2005). Dadurch wäre eine

Einschränkung der Proliferationsfähigkeit von hämatopoetischen Zellen bei Eisenüberlastung zu erklären.

1970 postulierten Robbins und Pederson die bedeutsame Rolle von Eisen bei der DNA-Synthese. Der exakte molekulare Mechanismus ist jedoch bis heute nur oberflächlich verstanden. Verschiedene Studien in vitro haben gezeigt, dass Eisenlimitation zum Arrest der Zellen in der G-1-Phase des Zellzyklus führt, weiterhin berichtet Ponka (2004), dass auch das Durchlaufen der S-Phase der Zellteilung eisenabhängig zu sein scheint.

Es gibt viele Hinweise durch voneinander unabhängige Untersuchungen, dass Eisenüberladung DNA und Proteinstrukturen in Zellen verändert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit von Progenitorzellen bei Eisenüberladung sein.

#### **4.1.4 Signifikante Beeinflussung des Kolonienwachstums schon unterhalb des Serum-Ferritin-Schwellenwertes**

Die Indikation zur Chelattherapie besteht laut internationalem Konsens bei Ferritinwerten über 1000 µg/l bzw. Transfusion von zwei oder mehr Ek/Monat seit mindestens einem Jahr (Bennett 2008). Von 38 Patienten mit Ferritinwerten über 250 µg/l, lag bei 45 % (n=17) der Patienten ein Ferritinwert über 1000 µg/l vor. 55 Prozent (n=21) zeigten Ferritinwerte zwischen 250 µg/l und 1000 µg/l, ein Bereich der über der Normgrenze liegt, in dem jedoch noch keine Therapieindikation besteht. Der Vergleich der BFU-E Auswertungen von Patienten mit verschiedenen Stufen der Eisenüberladung und Patienten mit normalen Ferritinwerten ergab bei allen Gruppenvergleichen signifikante Unterschiede:

1. Ferritin < 250 µg/l (n=14) vs. Ferritin > 250 µg/l (n=38)  $p= 0,0013$
2. Ferritin < 250 µg/l (n=14) vs. Ferritin 250 - 1000 µg/l (n=21)  $p= 0,0008$
3. Ferritin < 250 µg/l (n=14) vs. Ferritin > 1000 µg/l (n=17)  $p= 0,0354$

Da sich die Proliferation der erythrozytären Progenitoren auch bei Patienten mit Ferritinwerten zwischen 250 µg/l und 1000 µg/l signifikant von Patienten mit normwertigem Ferritin unterscheidet, liegt die Vermutung nahe, dass eine Eisenüberladung bereits deutlich vor Erreichen des Ferritinwertes von 1000 µg/l biologisch relevant wird.

#### 4.1.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend scheint die Funktion der koloniebildenden erythrozytären Vorläuferzellen bei Eisenüberladung durch oxidativen Stress und/oder Vorgänge im Zellstoffwechsel/-zyklus gegenüber einem normalem Eisenhaushalt bei MDS signifikant herabgesetzt zu sein. Dies zeigt sich auch bei Patienten, die unterhalb des gemäß internationalem Konsens definierten therapeutischen Schwellenwertes von 1000 µg/l Serum-Ferritin liegen.

Um die Frage zu klären, ob die erniedrigten Kolonienanzahlen bei Eisenüberladung Folge der Eisenüberladung durch Transfusionen oder Ursache der niedrigen Hb-Werte und damit Ursache des Transfusionsbedarfes sind, müssen die Ergebnisse dieser Dissertation im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Jensen et al. (1996), Messa et al. (2008) und den Verlaufsuntersuchungen dieser Studie betrachtet werden. Wäre die erniedrigte Kolonienanzahl und der daraus resultierende Transfusionsbedarf Ursache der Eisenüberladung durch Transfusionen und nicht ihre Folge, würde sich die Kolonienanzahl und der Transfusionsbedarf unter Chelattherapie nicht verbessern. Dies ist aber in allen drei zitierten Untersuchungen der Fall. Weiterhin verglichen Oscier et al. (1989) die BFU-E-Anzahl von Patienten mit Hb-Werten über und unter 10 g/dl, dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Dies unterstützt die Annahme, dass die eingeschränkte Proliferation der BFU-E von Patienten mit Eisenüberladung nicht durch die niedrigen Hb-Werte allein begründet ist. Allerdings wurden in der Untersuchung von Oscier et al. (1989) lediglich Knochenmarksproben von Patienten des FAB-Stadium RA in die Auswertung einbezogen.

Fall sich eine verminderte BFU-E-Anzahl bei Eisenüberladung auch bei anderen chronischen Anämien wie z.B. der Sichelzellanämie fände, würde dies interessante Hinweise darauf geben, ob generell ein Zusammenhang zwischen der Proliferationsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen und Eisenüberladung existiert, oder ob es sich hierbei um ein singuläres Phänomen der Erkrankung MDS handelt.

Viele Studien zum Thema Eisenüberladung beschäftigen sich mit Patienten, deren Serum-Ferritin-Werte über 1000 µg/l liegen. Legt man die Annahme zu Grunde, dass die signifikante Verschlechterung des Kolonienwachstums bereits bei Ferritinwerten unter 1000 µg/l eine Manifestation der Eisenüberladung ist, wäre zu untersuchen, ob Patienten von einer Chelattherapie schon vor Erreichen der Grenze von 1000 µg/l Ferritin profitieren würden.

## **4.2 Keine Unterschiede im Wachstum der CFU- GM bei Patienten mit und ohne Eisenüberladung – notwendige Änderung der Auswahlkriterien und Zukunftsperspektiven**

CFU-GM sind Progenitorzellen von Granulozyten und Makrophagen. Das Wachstum dieser Zellen wurde im Colony Assay zwischen Patienten mit normalem und solchen mit erhöhtem Ferritin verglichen. Die Eisenüberladung wirkte sich nicht auf das Wachstum der CFU-GM aus ( $p=0,57$ ). Dies unterstreicht, dass eine Eisenüberladung spezifisch die Erythropoese zu hemmen scheint, in welcher Eisen eine wesentlich essenziellere Rolle übernimmt als in der Granulopoese.

Viele Autoren wie Öhler et al. (2003) hatten beobachtet, dass die Zunahme von myeloiden Clustern und CFU-GM-Kolonienanzahl mit dem Risiko einer AML-Entstehung korreliert. Klinische Beobachtungen zeigen, dass die Entwicklung einer Eisenüberladung ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und die Progression in eine AML ist (Sanz et al. 2008). Die Kombination dieser beiden Sachverhalte könnte eine erhöhte CFU-GM-Kolonien- und Clusteranzahl bei Patienten mit Eisenüberladung ergeben. Dies zeigte sich nicht in unserer Auswertung, da die Kriterien dieser Studie gerade solche Patienten ausschließen, die im Colony Assay diffuses Wachstum oder Cluster in der erythrozytären Reihe zeigten. Für die Fragestellung, ob sich eine Eisenüberladung auf die Anzahl von Kolonien und Cluster hinsichtlich einer AML-Entstehung auswirkt, ist folglich nicht das gesamte Patientenkollektiv erfasst worden. Hier müsste eine Auswertung nach anderen Gesichtspunkten und ohne Ausschluss von Patienten mit Clustern und diffusem Wachstum erfolgen.

## **4.3 Stammzellfunktion als Korrelat der abnehmenden Ferritinwerte bei Chelattherapie - Interpretation der sequenziellen BFU-E-Untersuchungen**

Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine Untersuchung von Jensen et al. aus dem Jahr 1996 die zeigte, dass eine adäquate und ausreichend lange durchgeführte Eisenentzugstherapie bei elf MDS-Patienten mit Eisenüberladung den Transfusionsbedarf signifikant senken und den Hämoglobinwert anheben konnte. Eine Gruppe um Messa bestätigte 2008 die Abnahme des Transfusionsbedarfes bei steigenden Hämoglobinwerten unter der Therapie mit dem oralen Eisenchelator

Deferasirox bei drei MDS-Patienten und einem Patienten mit primärer Myelofibrose. Aus dieser Erkenntnis leitete sich die Hypothese dieser Studie ab, dass ein hoher Eisengehalt die Proliferationsfähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen beeinträchtigt und sich diese Fähigkeit durch Eisenentzug wieder verbessert.

Um zu überprüfen ob die Anzahl der BFU-E, als Ausdruck der Funktion der hämatopoetischen Progenitoren, mit wechselnden Eisenwerten korreliert und die klinisch zu evaluierenden Auswirkungen (sinkender Transfusionsbedarf, steigende Hb-Werte) widerspiegelt, wurden sequenzielle BFU-E Untersuchungen (mehr als zwei Messungen) von zehn Patienten ausgewertet.

Vier dieser untersuchten Patienten zeigten am ersten Messzeitpunkt normale und sechs erhöhte Ferritinwerte. Fünf Patienten mit erhöhten Ferritinwerten erhielten länger als drei Monate eine Eisenentzugstherapie. Darunter zeigten alle initial fallende Ferritinwerte. Während der Eisenentzugstherapie fand sich bei zwei Patienten keine Veränderung der BFU-E-Anzahl (ID 34, 45). Bei zwei Patienten stieg die Kolonienanzahl (ID 17, 75), ein Patient mit wechselnd hohen Ferritinwerten zeigte einen intermittierenden BFU-E-Verlauf (ID 42). Insgesamt stieg die BFU-E-Anzahl in unterschiedlichen Zeitabständen zu den Ferritinabfällen, der Zeitraum lag zwischen 6 Monaten und mehreren Jahren.

Zwei Patienten zeigten im Jahresdurchschnitt ein Jahr nach Beginn der Chelattherapie einen abnehmenden EK-Bedarf (ID 34, 42), ein Patient abnehmenden Transfusionsbedarf 2-3 Jahre nach Beginn der Deferasiroxtherapie (ID 17), eine Patientin zeigte ein Jahr nach Beginn der Chelattherapie keine Veränderungen des EK-Bedarfes (ID 75).

Im Beobachtungszeitraum sank der Transfusionsbedarf bei drei von vier Patienten mit Chelattherapie. Einer dieser Patienten, der nur einen relativ kurzen Zeitraum bis zum Beginn der Chelattherapie (10 Monate) EK-pflichtig war, wurde unter der Therapie transfusionsfrei.

Beim Vergleich der Verläufe scheint eine Verbesserung hinsichtlich des EK-Bedarfes durch Eisenentzugstherapie mehr vom Grad der Eisenüberladung (initiales Ferritin) als von der Dauer der Eisenüberladung abhängig zu sein. Bedeutsam scheint weiterhin die Aufrechterhaltung eines niedrigen Ferritinwertes und damit die Vermeidung der erneuten Eisenüberladung nach Beendigung der Chelattherapie zu sein. Zur Verdeutlichung siehe Tabelle 31.

**Tabelle 31: Angaben zu den Verlaufsbeobachtungen mit Chelattherapie, Ferritinwerten und Transfusionsverlauf. Gewertet wird der Zeitraum der Chelattherapie mit Deferasirox (20 - 25 mg/kg KG)**

ID	Ferritinwert µg/l bei Start Deferasirox	EK-pflichtig seit x Monaten bei Start Deferasirox	Dauer der initialen Chelattherapie	Zeit bis Verbesserung des EK-Bedarfs	Erhaltungstherapie mit Deferasirox nach Erreichen Ziel Ferritin
17	4832 (09/2006)	55 Monate (102 EK)	mind. 46 Monate	2-3 Jahre	ja
34	1955 (08/2008)	10 Monate (14 EK)	10 Monate	1 Jahr	nein (transfusionsfrei)
42	1135-1961 (03/2006)	46 Monate (130 EK)	11 Monate	1 Jahr	nein
75	2938 (01/2008)	19 Monate (26 EK)	12 Monate	bis Ende 2009 keine Verbesserung	nein

In der Literatur ist keine vergleichbare Arbeit zu finden, die anhand von Colony Assays sequenziell die Proliferationsfähigkeit der hämatopoetischen Progenitorzellen bezogen auf Eisenwerte und eine Eisenentzugstherapie untersucht hat. Deshalb kann hier nur mit Ergebnissen verglichen werden, die sich an Transfusionsbedarf, Blutwerten und anderen klinischen Gesichtspunkten orientieren. Zwei Studien zeigten den Benefit einer Chelattherapie bei low-risk-MDS-Patienten mit Eisenüberladung (Rose et al. 2007, Leitch 2007), eine andere hingegen sah die sekundäre Hämosiderose und den Transfusionsbedarf nicht als prognostischen Faktoren an (Chee et al. 2008).

Es gibt einige klinische Beispiele, die die Auswirkung sinkender Eisenwerte auf die Hämatopoese beschreiben (Jensen et al. 1996, Messa et al. 2008). Ende 2009 veröffentlichte eine japanische Arbeitsgruppe den case report einer 75-jährigen MDS-Patientin im Stadium RCMD, die nach 17 Monaten täglicher Deferasiroxeinnahme (als alleinige Therapiemaßnahme) bei ansteigenden Hb- und Thrombozytenwerten transfusionsfrei wurde (Okabe et al. 2009). Auch innerhalb des für diese Studie untersuchten Patientenkollektives wurde ein Patient (ID 34) nach elf Monaten Chelattherapie transfusionsfrei.

Der dauerhafte oder intermittierende Anstieg der Kolonienzahlen unter Chelattherapie bei drei Patienten dieser Studien erfolgte nach mindestens 12 Monaten Therapie. Dies ergänzt die Beobachtungen von Jensen, der die maximale Verbesserung der Erythropoese nach mindestens 1,5 Jahren Chelattherapie

beschreibt. Bedeutsam scheint also zu sein, dass die Chelattherapie konsequent, effektiv und über einen langen Zeitraum durchgeführt wird (Jensen et al. 1996, Messa et al. 2008). Der Patient (ID 42), der intermittierende Anstiege der BFU-E Zahl zeigte, konnte auf Grund von Unverträglichkeiten nicht durchgehend mit einem Chelatbildner therapiert werden, so dass es immer wieder zum Anstieg des Ferritins und zeitlich versetzt teilweise zum Abfall der BFU-E kam. Hieraus ergeben sich Hinweise, dass Schwankungen im Eisenhaushalt, wie z.B. durch erneut ansteigende Ferritinwerte nach Beenden einer Chelattherapie bei weiterhin bestehendem EK-Bedarf, vermieden werden sollten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass bei einem Teil der Patienten der abnehmende Eisenbestand mit steigenden BFU-E-Werten korreliert und als Verbesserung der Progenitorzellfunktion gewertet werden kann. Des Weiteren konnten die Beobachtungen des abnehmenden Transfusionsbedarfes unter Chelattherapie von Jensen et al. (1996) und Messa et al. (2008) bestätigt werden. Ein mögliches methodisches Problem könnte darin bestanden haben, dass die Untersuchungen nicht bei allen Patienten in gleichen Zeitabständen erfolgten und somit die Vergleichbarkeit eingeschränkt sein könnte.

#### **4.3.1 Fazit**

Aus den sequenziellen Colony-Assay-Untersuchungen kann keine allgemein gültige Aussage über die Auswirkungen von Eisenentzugstherapien in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit der Progenitorzellen getroffen werden. In Einzelfällen zeigt sich aber eine deutliche Korrelation des abnehmenden Eisenbestandes mit Zunahme der BFU-E und Abnahme des Transfusionsbedarfes.

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, warum nicht alle behandelten Patienten auf die Chelattherapie mit einer Verbesserung der BFU-E ansprachen bzw. ob Kriterien existieren, die ein gutes Ansprechen wahrscheinlich machen.

In der Literatur wird bis dato lediglich von Einzelfällen berichtet, bei denen sich der abnehmende Eisenbestand positiv auf die hämatopoetische Funktion auswirkt. Nur standardisierte Beobachtungen einer konsequent durchgeführten Langzeittherapie mit Eisenchelatoren bei transfusionsbedingter Eisenüberladung können verbindlich zur Klärung der Frage nach den Auswirkungen eines Eisenentzugs auf die Funktion hämatopoetischer Progenitoren beitragen

#### **4.4 Kein signifikanter Unterschied bezüglich der Apoptose/Nekrose CD34-positiver Zellen bei Patienten mit und ohne Eisenüberladung**

Der dritte Versuchsteil dieser Studie untersuchte, ob sich eine Eisenüberladung auf den Anteil apoptotischer und nekrotischer CD34-positiver Zellen auswirkt. Das CD34-Epitop befindet sich auf ein bis vier Prozent der Zellen im Knochenmark, einschließlich der pluripotenten Stammzellen und festgelegten Progenitorzellen einer jeden hämatopoetischen Zelllinie (Burn et al. 1992). Es verliert sich im Laufe der Differenzierung der Zellen.

Von neun Patienten mit normalen Ferritinwerten und 16 Patienten mit erhöhten Ferritinwerten wurde an immunomagnetisch angereicherten CD34-positiven Zellen durchflusszytometrisch der Anteil von Apoptose und Nekrose mittels Annexin- und Propidiumiodid-Färbung bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf das Serum-Ferritin bezogen und verglichen zwischen Patienten mit Werten  $< 250 \mu\text{g/l}$  und  $> 250 \mu\text{g/l}$ . Um Messfehler zu vermeiden, wurden ausschließlich Patienten untersucht, die keine oder genügend Zeitabstand zu anderen Therapiemaßnahmen hatten. Der Vergleich des Anteils CD34-positiver Zellen in Apoptose und Nekrose zwischen Patienten mit normalem und erhöhtem Ferritin ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,22353$ ). Hieraus ergeben sich keine Hinweise, dass Eisenüberladung zu einer Induktion von Apoptose oder Nekrose an CD34-positiven Zellen führt.

Bei der methodischen Beurteilung der Studie müssen folgende Punkte beachtet werden: CD34-positive Zellen werden bei der sogenannten *Magnetic cell separation* (MACS) durch Bindung von eisenhaltigen Microbeads und Fluss durch eine Magnetsäule gewonnen. Dafür müssen in der zu untersuchenden Patientenprobe mindestens 0,05-0,2 Prozent aller Zellen CD34-positiv sein (Miltenyi Biotec 2008). Bräulke et al. (2010) fanden, dass bei MDS-Patienten 0,2-1,5 % der peripheren mononuklären Zellen CD34-positiv waren. Eine unveröffentlichte Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte aus 26 Proben von MDS-Patienten bezogen auf alle MNZ immunomagnetisch 0,02-4,3 % CD34-positive Zellen (Median 1,1 %) anreichern. Die Wahrscheinlichkeit, dass für die korrekte Anreicherung die Zellenanzahl zu klein war, ist nach diesen Untersuchungen somit existent, aber gering.

Der Hersteller empfiehlt je nach Zellzahl unterschiedliche Säulentypen für die Anreicherung CD34-positiver Zellen (Miltenyi Biotec 2008). In den durchgeführten Untersuchungen wurde jedoch ausschließlich eine mittlere Säulengröße verwendet. Lichtmikroskopisch zeigte sich, dass die angereicherten Populationen homogen und unreif waren. Ein verbindlicher durchflusszytometrischer Nachweis der Anreicherung CD34- positiver Zellen wurde nicht durchgeführt.

#### **4.4.1 Verteilung von Krankheitscharakteristika und Apoptose- Nekroseanteil innerhalb des Patientenkollektivs**

Die Kollektive wurden nach Alter, Geschlecht, WHO-Stadium, IPSS-Score zytogenetischem Risikoscore und Blutwerten verglichen, um die Beeinflussung der Ergebnisse durch andere Faktoren auszuschließen. In unserem Kollektiv lag eine homogene Verteilung der WHO-Stadien und des IPSS-Risikoscores vor. Die Patienten mit erhöhtem Ferritin waren signifikant älter als die Patienten mit normalem Ferritin.

Aus allen Proben lag der mediane Apoptose-/Nekroseanteil CD34-positiver Zellen bei 18,5 Prozent, der mediane Apoptose-/Nekroseanteil CD34-negativer Zellen bei 8 Prozent. Dieses Ergebnis kann nicht mit Angaben in der Literatur verglichen werden, da in früheren Untersuchungen die Apoptoserate CD34-positiver und negativer Zellen stadienspezifisch (WHO bzw. FAB) bestimmt wurde, wofür das Patientenkollektiv dieser Studie jedoch zu klein war. Eine Messung von Apoptose/Nekrose vor Trennung der Zellen in CD34-positive und negative Zellen erfolgte nicht.

#### **4.4.2 Krankheitsspezifische Eigenschaften CD34-positiver Zellen bei MDS**

Um unser Ergebnis einordnen zu können, werden im Folgenden verschiedene Veröffentlichungen herangezogen, die sich mit den Besonderheiten der Anzahl zirkulierender CD34-positiver Zellen und deren Apoptoseverhalten bei MDS-Patienten auseinandersetzen.

##### **4.4.2.1 Anzahl CD34-positiver Zellen**

Eine Gruppe um Fuchigami verglich die Anzahl der zirkulierenden CD34-positiven Zellen von 41 MDS-Patienten mit einem gesunden Kollektiv (n=36). Die Varianz bei an MDS Erkrankten war sehr hoch und lag zwischen  $0-188 \times 10^6 /l$  (Kontrolle:  $0.81 \pm 0.35 \times 10^6 /l$ ). Im Vergleich zwischen Kontrolle und Fällen aus verschiedenen FAB-

Stadien hatten Patienten des Stadiums RA signifikant weniger zirkulierende CD34-positive Zellen, Patienten der Stadien RAEB und RAEB-t wiesen eine extrem hohe Anzahl zirkulierender CD34-positiver Zellen ( $p < 0,001$ ) auf (Fuchigami et al. 1999).

Ebenso variiert der Anteil CD34-positiver Blasten im Knochenmark zwischen den verschiedenen MDS-Stadien (Oertel et al. 1994, Pecci et al. 2003). Pecci et al. (2003) fanden ähnliche Veränderungen der Anzahl CD34-positiver Blasten im Knochenmark im Bezug auf das Krankheitsstadium wie Fuchigami et al. (1999) es bei peripher zirkulierenden Zellen beschrieben hatten, wobei die Gruppen unterschiedliche Nachweismethoden verwendeten.

Aus diesen Informationen ergibt sich, dass die Zahl der zirkulierenden und damit anzureichernden CD34-positiven Zellen sehr stark zwischen den einzelnen MDS-Stadien variieren und auch gegen null gehen kann (Fuchigami et al. 1999).

#### **4.4.2.2 Apoptose CD34-positiver Zellen**

Patienten mit MDS haben im Vergleich zu gesunden Kontrollen einen erhöhten Apoptoseanteil im Knochenmark (Pecci et al. 2003). Eine deutlich gesteigerte Apoptose wurde bei CD34-positiven Zellen aus KM in den Stadien RA/RARS und RAEB (<10 % Blasten) im Vergleich zu Kontrolle, fortgeschrittenem MDS und de-novo-AML beobachtet (Pecci et al. 2003, Parker et al. 1998). CD34-positive Zellen bei high-risk-MDS und AML besitzen eine erhöhte Apoptoseresistenz, diese findet sich nicht bei low-risk-MDS (Suárez et al. 2004).

Aus den beschriebenen Untersuchungen ergibt sich, dass die Apoptoserate der CD34-positiven Zellen stark zwischen den einzelnen MDS-Stadien variiert und die Apoptoseresistenz bei fortgeschrittener Erkrankung zunimmt, was auch als ein möglicher Grund der Krankheitsprogression angenommen wird. Die zitierten Untersuchungen wurden an Knochenmarkproben durchgeführt, so dass die Übertragbarkeit auf Messungen an peripheren CD34-positiven Zellen nicht klar ist.

#### **4.4.3 Fazit**

Es wird deutlich, dass sowohl die Anzahl und Art der anzureichernden CD34-positiven Zellen als auch die Apoptoserate vom Krankheitsstadium abhängen. Weiterreichende Erkenntnisse über eventuelle Zusammenhänge zwischen Eisenüberladung und Apoptose könnten Vergleichsuntersuchungen von Patienten mit und ohne Eisenüberladung derselben Krankheitsstadien ergeben. Für diesen Vergleich ist das Patientenkollektiv dieser Studie zu klein.

Wenn man die Apoptose CD34-positiver Zellen zwischen Patienten aller Stadien mit und ohne Eisenüberladung vergleicht, ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Folglich sprechen unsere Daten dagegen, dass sich eine Eisenüberladung auf die Apoptoserate CD34-positiver Zellen auswirkt und somit dafür, dass die verminderte BFU-E-Anzahl bei Eisenüberladung nicht durch gesteigerte Apoptose, sondern durch eine qualitative Beeinträchtigung der Erythropoese durch die toxische Wirkung von Eisen erklärt werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome sind eine der häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen älterer Menschen (Goldberg et al. 2010). Patienten mit MDS entwickeln je nach Stadium in 40-80 Prozent chronischen Transfusionsbedarf mit konsekutiver Eisenüberladung (Brechignac et al. 2004). Im Vergleich zu nicht transfundierten MDS-Patienten gleicher Stadien erhöhen sich Morbidität und Mortalität, vor allem durch Anreicherung des Eisens in Herz und Leber mit folgender Organdysfunktion (Cazzola und Malcovati 2005, Delea et al. 2009).

Vorausgegangene Arbeiten geben Hinweise darauf, dass Eisenentzug durch Chelattherapie bei einigen MDS-Patienten mit Eisenüberladung zu einer Verbesserung der Hämatopoese, speziell der Erythropoese, führt (Jensen et al. 1996, Messa et al. 2008). Daraus wurde die Hypothese einer negativen Beeinflussung der hämatopoetischen Progenitorzellfunktion durch intrazelluläre Akkumulation von Eisen abgeleitet. Zur Differenzierung der Art der Schädigung wurden in dieser Promotionsarbeit Proliferation und Zelltod der Progenitorzellen untersucht. Des Weiteren wurde der Hypothese nachgegangen, ob eine Chelattherapie positive Auswirkungen auf die Progenitorzellproliferation zeigt.

Die Proliferationsfähigkeit hämatopoetischer Progenitorzellen wurde durch Kultivierung mittels Colony Assay an Hand der Kolonienanzahl erythrozytärer Progenitorzellen (BFU-E) und Progenitoren von Granulozyten und Makrophagen (CFU-GM) zwischen Patienten mit normalem und erhöhtem Eisen verglichen. Referenzwert war das Serum-Ferritin. Weiterhin wurde bei fünf Patienten die BFU-E Anzahl und bei vier Patienten der Transfusionsbedarf im Verlauf einer Chelattherapie beobachtet. Als möglicher Ausdruck der Zellschädigung durch Eisen wurde durchflusszytometrisch Apoptose- und Nekroserate von immunomagnetisch angereicherten hämatopoetischen Stammzellen (CD34-positive Zellen) zwischen Patienten mit normalem und erhöhtem Ferritin verglichen.

In den Untersuchungen zeigten Patienten mit Eisenüberladung ein signifikant niedrigeres Wachstum erythrozytärer Progenitoren als Patienten mit normalen Ferritinwerten ( $p=0,0013$ ). Ebenfalls signifikant vermindertes BFU-E-Wachstum zeigten Patienten mit Ferritinwerten zwischen 250 und 1000  $\mu\text{g/l}$  im Vergleich zu Patienten mit normalem Ferritin ( $p=0,0008$ ). Ab 1000  $\mu\text{g/l}$  ist gemäß internationalem

Konsens die Indikation zur Chelattherapie gegeben. Keine Unterschiede fanden sich in der Kolonienanzahl der Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen zwischen Patienten mit normalem und erhöhtem Ferritin.

Bei Verlaufsbeobachtungen zeigte sich der Effekt einer Chelattherapie in drei von fünf Fällen durch eine zumindest temporäre Zunahme der Kolonienanzahl erythrozytärer Progenitoren, in drei von vier Fällen verringerte sich der Transfusionsbedarf.

Es war kein Unterschied in der Apoptoserate CD34-positiver Zellen bei Patienten mit und ohne Eisenüberladung festzustellen.

Die verringerte BFU-E-Kolonienanzahl von Patienten mit erhöhtem Ferritin im Vergleich zu Patienten mit normalem Ferritin weist darauf hin, dass bei MDS durch Eisenüberladung eine Suppression der Proliferationsfähigkeit erythrozytärer Progenitorzellen vorliegt. Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Beginn der Proliferationssuppression bei Werten unterhalb der empfohlenen Grenze zur Chelattherapie (Ferritin 1000 µg/l). Ob die verminderte Proliferationsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen bei Eisenüberladung ein Phänomen der Erkrankung MDS ist oder generelle Zusammenhänge existieren, sollte weiter untersucht werden.

Durch mehrere Verlaufbeobachtungen ergaben sich Hinweise auf die Verbesserung der hämatopoetischen Funktion durch eine Chelattherapie sowohl durch steigende Kolonienzahlen (BFU-E) in drei von fünf Fällen als auch durch sinkenden Transfusionsbedarf in drei von vier Fällen. Ein Patient wurde unter Deferasirox nach 10 Monaten Therapie vollständig transfusionsfrei. Diese Ergebnisse bestärken die auch von anderen Autoren postulierte These der sich regenerierenden Hämatopoese durch Eisenentzug. Warum die positive BFU-E Entwicklung nur bei einigen der untersuchten Patienten zu zeigen war bzw. ob bestimmte Faktoren sowohl bezüglich der Erkrankung MDS als auch der Chelattherapie die Regeneration der Erythropoese beeinflussen, bleibt an Verlaufsbeobachtungen mit höherer Patientenzahl und standardisiertem Ablauf weiter zu untersuchen.

Die Untersuchung des Zelltodes CD34-positiver Zellen ergab keinen Unterschied zwischen Patienten mit normalem und erhöhtem Ferritin. Ein möglicher apoptoseinduzierender Effekt durch Eisen ist folglich in diesem Zusammenhang nicht nachgewiesen worden. Damit ist das verminderte BFU-E-Wachstum bei

---

Eisenüberladung nicht durch gesteigerte Apoptose, sondern durch Zellschädigung und Proliferationsstörung zu erklären.

Um zu vertiefen, auf welche Weise Progenitorzellen in ihrer Proliferation durch Eisen gehemmt werden, könnten Analysen spezifischer wachstumsregulierender Gene im Bezug auf Eisenüberladung hilfreiche Informationen liefern. Hier zeigten sich in anderen Studien z.B. Veränderungen im Bereich des Tumorsuppressorgens P 53 durch erhöhte Eisenkonzentrationen (Hussain et al. 2000, Park et al. 2008).

Hinweise auf die supprimierende Auswirkung von Eisenüberladung auf die Hämatopoese und die Verbesserung dieser durch Eisenentzug bei MDS-Patienten häufen sich (Jensen et al. 1996, Hartmann et al. 2009, Messa et al. 2008, Okabe et al. 2009). Diese Erkenntnis sollte auf Grund der zunehmenden Lebenserwartung und der damit steigenden Inzidenz von MDS und hinsichtlich der großen Anzahl von chronischen Anämien mit Transfusionsbedarf zu einer intensiveren Erforschung der zu Grunde liegenden Mechanismen führen.

## 6 Literaturverzeichnis

ANDREWS NC (1999): Disorders of Iron Metabolism. N Engl J Med 341: 1986-1995

BD BIOSCIENCES: Customer Education-Einführung in die Durchflusszytometrie.

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland 2000

genome.tugraz.at/GrundlBiomTechnik/FACS.pdf

BENNETT JM (2008): Consensus statement on iron overload in myelodysplastic syndromes. Am J Hematol. 83: 858-861.

BRAULKE F, Schanz J, Jung K, Shirneshan K, Schulte K, Schuetze C, Steffens R, Trümper L, Haase D (2010): FISH analysis of circulating CD34+ cells as a new tool for genetic monitoring in MDS: Verification of the method and application to 27 MDS patients. Leuk Res 2010 (im Druck)

BRECHIGNAC S, Hellstrom-Lindberg E, Bowen DT, DeWitte TM, Cazzola M and Fenaux P (2004): Quality of Life and Economic Impact of Red Blood Cell (RBC) Transfusions on Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS). Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 104: Abstract 4716

BRUNNING R, Orazi A, Germing U: Myelodysplastic syndromes/neoplasms. In: WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues, Swerdlow S et al. 4. Auflage, IARC press, Lyon 2008, S.88-107

BURN TC, Satterthwaite AB, Tenen DG (1992): The human CD34 hematopoietic stem cell antigen promoter and a 3' enhancer direct hematopoietic expression in tissue culture. Blood 80: 3051-3059.

CAZZOLA M, Malcovati L (2005). Myelodysplastic syndromes—coping with ineffective hematopoiesis. N Engl J Med 352:536–538.

- CAZZOLA M, Della Porta MG, Malcovati L (2008): Clinical Relevance of Anemia and Transfusion Iron Overload in Myelodysplastic Syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 166-175
- CHEE CE, Steensma DP, Wu W, Hanson CA, Tefferi A (2008): Neither serum ferritin nor the number of red blood cell transfusions affect overall survival in refractory anemia with ringed sideroblasts. *Am J Hematol* 83: 611-613
- DELEA TE, Hagiwara M, Phatak PD (2009): Retrospective study of the association between transfusion frequency and potential complications of iron overload in patients with myelodysplastic syndrome and other acquired hematopoietic disorders. *Curr Med Res Opin* 25:139-147
- DIETRICH V: Notfall und Massivtransfusionen. In: *Transfusionspraxis-Perioperatives Management* Singbartl G, Walter Wenke G. 1. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2003, S. 136
- FUCHIGAMI K, Mori H, Matsuo T, Iwanaga M, Nagai K, Kuriyama K, Tomonaga M (1999): Absolute number of circulating CD34+ cells is abnormally low in refractory anemias and extremely high in RAEB and RAEB-t; novel pathologic features of myelodysplastic syndromes identified by highly sensitive flow cytometry. *Leuk Res* 24: 163-174.
- GANZ T (2006): Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Haematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 29-35
- GATTERMANN N (2009): Therapie mit Eisenchelatoren bei chronischen Anämien. *Hämotherapie* 12: 4-21
- GOLDBERG SL, Mody-Patel N, Chen ER (2008): Clinical and Economic Consequences of Myelodysplastic Syndromes in the United States: An Analysis of the Medicare Database. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 112: 636

- GOLDBERG SL, Chen E, Corral M, Guo A, Mody-Patel N, Pecora AL, Laouri M (2010): Incidence and Clinical Complications of Myelodysplastic Syndromes Among United States Medicare Beneficiaries. *J Clin Oncol* 28: 2847-2852
- GREENBERG P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D (1997): International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89: 2079–2088
- GUPTA P, LeRoy SC, Luikart SD, Bateman A, Morrison VA (1999): Long-term blood product transfusion support for patients with myelodysplastic syndromes (MDS): cost analysis and complications. *Leuk Res* 23: 953-959
- HAASE D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AA (2007): New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110: 4385-4395
- HARTMANN J, Sinzig U, Wulf G, Truemper LH, Konietzschke F, Fischer S and Haase D (2009): Significant Suppression of the Colony Forming Capacity of Erythroid Progenitors by Iron Overload in Patients with MDS and Sequential Analyses of BFU-E Under Chelation Therapy. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 114: 3826
- HASLE H, Kerndrup G, Jacobsen BB (1995): Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions. *Leukemia* 9: 1569-1572
- HELLSTROM-LINDBERG E (2005): Management of anemia associated with myelodysplastic syndrome. *Semin Hematol* 42: 10-13
- HEROLD G: Innere Medizin. Hrsg Herold. Köln 2009, 18-132

- HSING AW, McLaughlin JK, Olsen JH, Mellekjær L, Wacholder S, Fraumeni JF Jr (1995): Cancer risk following primary hemochromatosis: A population-based cohort study in Denmark. *Int J Cancer* 60: 160-162
- HUSSAIN SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, Hofseth LJ, Shields PG, Billiar TR, Trautwein C (2000): Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: Oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12770-12775
- JAGETIA GC, Reddy TK, Venkatesha VA, Kedlaya R (2004): Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin Chim Acta* 347: 189-19
- JANSEN AJ, Essink-Bot ML, Beckers EA, Hop WC, Schipperus MR, Van Rhenen DJ (2003): Quality of life measurement in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 121: 270-274
- JANSSEN JW, Buschle M, Layton M, Drexler HG, Lyons J, van den Berghe H, Heimpel H, Kubanek B, Kleihauer E, Mufti GJ (1989): Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood* 73: 248-254
- JENSEN PD, Heickendorff L, Pedersen B, Bendix-Hansen K, Jensen FT, Christensen T, Boesen AM, Ellegaard J (1996): The effect of iron chelation on haemopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload. *Br J Haematol* 94: 288-299
- JUVONEN E, Aimolahti A, Volin L, Ruutu T (1999): The prognostic value of in vitro cultures of erythroid and megakaryocyte progenitors in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 23: 889-894
- KNÖBEL Y, Gleis M, Osswald K, Pool-Zobel BL (2006): Ferric iron increases ROS formation, modulates cell growth and enhances genotoxic damage by 4-hydroxynonenal in human colon tumor cells. *Toxicol In Vitro* 20: 793-800

- KOLNAGOU A, Michaelides Y, Kontos C, Kyriacou K, Kontoghiorghes GJ (2008): Myocyte damage and loss of myofibers is the potential mechanism of iron overload toxicity in congestive cardiac failure in thalassemia. Complete reversal of the cardiomyopathy and normalization of iron load by deferiprone. *Hemoglobin* 32:17-28
- KRAUSE DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1-13
- LEITCH HA (2007): Improving clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome and iron overload using iron chelation therapy. *Leuk Res* 3: 7-9
- MALCOVATI L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travaglino E, Passamonti F, Arcaini L, Maffioli M, Cazzola M (2005): Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 23: 7594–603
- MALCOVATI L, Della Porta MG, Cazzola M (2006). Predicting survival and leukemia evolution in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 91:1588–1590
- MALCOVATI L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S (2007): Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 25: 3503–3510
- MESSA E, Cilloni D, Messa F, Arruga F, Roetto A, Saglio G (2008): Deferasirox Treatment Improved the Hemoglobin Level and Decreased Transfusion Requirements in Four Patients with the Myelodysplastic Syndrome and Primary Myelofibrosis. *Acta Haematol* 120: 70-74
- MILTENYI BIOTEC: CD34 MicroBead Kit human. Bergisch Gladbach, Deutschland 2008

MILTENYI BIOTEC: Clinical product catalog. Bergisch Gladbach,  
Deutschland 2009 / 2010, S. 1.08

MÜLLER MJ, BOSY-WESTPHAL A: Energiehaushalt und Ernährung. In: Physiologie.  
Speckmann EJ, Hescheler R, Köhling R. 5. Auflage; Urban & Fischer,  
München 2008: 583-614

NISSEN-DRUEY C, Tichelli A, Meyer-Monard S (2005): Human hematopoietic colonies  
in health and disease. *Acta Haematol* 113: 5-96

OERTEL J, Oertel B, Beyer J, Huhn D (1994): CD34 immunotyping of blasts in  
myelodysplasia. *Ann Hematol* 68: 77-80

ÖHLER L, Kollars M, Bohle B, Berer A, Reiter E, Lechner K, Geissler K (1999):  
Interleukin-10 inhibits burst-forming unit-erythroid growth by suppression of  
endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production  
from T cells. *Exp Hematol* 27: 217-232

ÖHLER L, Geissler K, Hinterberger W (2003): Diagnostic and prognostic value of  
colony formation of hematopoietic progenitor cells in myeloid malignancies.  
*Wien Klin Wochenschr* 115:537-46

OKABE H, Suzuki T, Omori T, Mori M, Uehara E, Hatano K, Ueda M, Matsuyama T,  
Toshima M, Qzaki K (2009): Hematopoietic recovery after administration of  
deferasirox for transfusional iron overload in a case of myelodysplastic  
syndrome. *Rinsho Ketsueki* 50: 1626-1629

OSCIER DG, Worsley A, Darlow S, Figes A, Williams JD, Hamblin TJ (1989):  
Correlation of bone marrow colony growth in the myelodysplastic syndromes  
with the FAB classification and the Bournemouth score. *Leuk Res* 13: 833-839

- PARK MJ, Kim HJ, Kim SH, Kim DH, Kim SJ, Jang JH, Kim K, Kim WS, Jung CW (2008): Is International Prognostic Scoring System (IPSS) still standard in predicting prognosis in patients with myelodysplastic syndrome? External validation of the WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) and comparison with IPSS. *Eur J Haematol* 81: 364-373
- PARKER JE, Fishlock KL, Mijovic A, Czepulkowski B, Pagliuca A, Mufti GJ (1998): 'Low-risk' myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro- versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br J Haematol* 103: 1075-1082.
- PECCI A, Travaglino E, Klersy C, Invernizzi R (2003): Apoptosis in relation to CD34 antigen expression in normal and myelodysplastic bone marrow. *Acta Haematol* 109: 29-34
- PIETRANGELO A (2004): Hereditary Hemochromatosis – A New Look At An Old Disease. *N Engl J Med* 350: 2383-2397
- PONKA P (2004): Iron and cell proliferation: another piece of the puzzle. *Blood* 104: 2620-2621
- PORTER JB (2001): Practical management of iron overload. *Br J Haematol* 115: 239-252
- PURICH DL: Enzyme Kinetics and Mechanism, Part F: Detection and Characterization of Enzyme Reaction Intermediates: Methods in Enzymology. Ausgabe 354, Academic Press, San Diego 2002: 436
- RAMM GA, Ruddell RG (2005): Hepatotoxicity of Iron Overload: Mechanisms of Iron Induced Hepatic Fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 25: 433 – 449
- ROBBINS E, Pederson T (1970): Iron: its intracellular localization and possible role in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66: 1244-1251

ROCHE : Annexin – V- Fluos Produktinformation. Mannheim, Deutschland 1999

ROSE C, Brechignac S, Vassilief D, Beyne-Rauzy O, Stamatoullas A, Larbaa D, Guerci A, Roy L, Dumazert L, Mahe B (2007): Positive Impact of Iron Chelation Therapy (CT) on Survival in Regularly Transfused MDS Patients. A Prospective Analysis by the GFM. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 110: Abstract 249

RUUTU T, Partanen S, Lintula R, Teerenhovi L, Knuutila S (1984): Erythroid and granulocyte-macrophage colony formation in myelodysplastic syndromes. Scand J Haematol 32: 395-402

SAN MIGUEL JF, Sanz GF, Vallespí T, del Cañizo MC, Sanz MA (1996): Myelodysplastic syndromes. Crit Rev Oncol Hematol 23: 57-93

SANZ G, Nomdedeu B, Such E, Bernal T, Belkaid M, Ardanaz MT, Marco V, Pedro C, Ramos F, Consuelo del Cañizo M (2008): Independent Impact of Iron Overload and Transfusion Dependency on Survival and Leukemic Evolution in Patients with Myelodysplastic Syndrome. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 112: 640

SEKERES MA (2010): The epidemiology of myelodysplastic syndromes. Hematol Oncol Clin North Am 24:287-294

SIGMA-ALDRICH: Propidium Iodid Produktinformation P 4170. St. Louis, USA 1997

SUÁREZ L, Vidriales MB, García-Laraña J, Sanz G, Moreno MJ, López A, Barrena S, Martínez R, Tormo M, Palomera L (2004): CD34+ cells from acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and normal bone marrow display different apoptosis and drug resistance-associated phenotypes. Clin Cancer Res 10: 7599-7606

- 
- STEWART NT, Byrne KM, Hosick HL, Vierck JL and Michael V. Dodson (2000):  
Traditional and emerging methods for analyzing cell activity in cell culture.  
Methods Cell Sci 22: 67-78
- WEI J, Zhou X-F, Zhou JF, Chen Y Jia Wei, Xiao-fen Zhou (2009): Analysis of WHO-  
based Prognostic Scoring System (WPSS) of myelodysplastic syndrome and  
its comparison with international prognostic scoring system (IPSS) in 100  
Chinese patients. Chin J Cancer Res 21: 50-55
- WEIß C: Basiswissen medizinische Statistik, 4. Auflage; Springer Medizin Verlag,  
Heidelberg 2008

## Danksagung

Mein Dank gilt besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. D. Haase, der mein Interesse für wissenschaftliches Arbeiten geweckt hat und mir durch gute Betreuung, lehrreiche Ratschläge und die richtigen Fragen diese Promotion ermöglicht hat.

Besonders möchte ich mich bei Frau Ursula Sinzig bedanken, sie hat über lange Zeit engagiert und effektiv im Projekt der Colony Assays gearbeitet und mir sowohl durch ihre fachliche als auch durch ihre persönliche Unterstützung sehr geholfen.

Den Mitarbeitern der hämatologisch/onkologischen Labore im Universitätsklinikum Göttingen danke ich für die gute Zusammenarbeit und umfangreiche Hilfe bei den Laborarbeiten.

Des Weiteren möchte ich Dr. F. Braulke und Alexandra Preuß aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie sowie den Mitarbeitern der Transfusionsmedizin der Universität Göttingen für die gute Zusammenarbeit an vielen wichtigen Stellen dieser Promotion danken.

Bei den Mitarbeitern der hämatologischen Ambulanz und der Kurzzeitonkologie des Klinikums Göttingen möchte ich mich für die Hilfe bei der Zusammenstellung der klinischen Daten der Patienten und die stets freundliche Atmosphäre bedanken.

Für die kollegiale und freundliche Hilfe bei der Analyse und Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen möchte ich Prof. Dr. G. Wulf und Dr. B. Chapuy und ihren Mitarbeitern herzlich danken.

Prof. Dr. Brunner und seinen Mitarbeitern aus der Abteilung Medizinische Informatik, und hierbei insbesondere Dr. Frank Konietschke danke ich für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung.

## **Curriculum Vitae**

Mein Name ist Julia Hartmann, ich wurde am 10.08.1982 in Quakenbrück geboren. Meine Eltern sind Dr. Karsten Hartmann, geboren am 08.02.1944, von Beruf Tierarzt, und Charlotte Hartmann geb. Flerlage, geboren am 16.09.1950, von Beruf Lehrerin. Von 1989 bis 1993 habe ich die Grundschule in Essen/Oldenburg besucht und wechselte 1993 an die Liebfrauenschule Cloppenburg, die ich bis 2002 besuchte und wo ich im Frühjahr 2002 erfolgreich an der Abiturprüfung teilgenommen habe. Anschließend begann ich im April 2003 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, wo ich am 02.03.2005 die ärztliche Vorprüfung (Physikum) bestand. Am 16. November 2009 beendete ich erfolgreich das Studium der Humanmedizin mit dem Staatsexamen (Note 2.0). Seit September 2010 bin ich als Assistenzärztin im Sana Klinikum Lichtenberg, Berlin angestellt.