

Nachweis der Proliferation von Spenderzellen nach Knochenmarkstransfusion durch Chromosomenanalysen

G. Schwantz, G. Hartwich, J. Becker

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| 1. Einleitung | 4. Chromosomen-Untersuchungen |
| 2. Kasuistik | 4.1. Material und Methoden |
| 2.1. Vorgeschichte | 4.2. Ergebnisse |
| 2.2. Befund | 5. Diskussion |
| 3. Therapie und Verlauf | Zusammenfassung |
| | Literatur |

1. Einleitung

In unserer transplantationsfreudigen Zeit werden bei irreversiblen Versagenszuständen der verschiedensten Organe Transplantationsversuche unternommen. Von der technischen Seite her ist das Problem in vielen Fällen gelöst, und es konnten spektakuläre Erfolge erzielt werden. Ungelöst ist aber nach wie vor das immunologische Problem trotz Antilymphocytenserum, Immunsuppressiva, Corticoiden etc.

Mit wechselndem Erfolg ist auch die Übertragung von Knochenmark versucht worden. In unserer Klinik konnten in über 90 Fällen Erfahrungen gesammelt werden (Witte, 1963-1968). Indikationen zu einer Knochenmarkstransfusion sind therapieresistente Knochenmarksaplasien, auch nach Überdosierung von Cytostatika, Agranulocytosen und Hämatoblastosen, bei denen das normale Knochenmark durch pathologische Elemente verdrängt ist. Hier kann der Versuch gemacht werden, durch eingreifende cytostatische Therapie das Mark von möglichst allen pathologischen Zellen frei zu bekommen, um dann durch die Knochenmarksübertragung die Regeneration einer normalen Hämatopoese herbeizuführen. Bei Übertragung homologen Knochenmarks konnten gute Ergebnisse nur dann erzielt werden, wenn genügend Zellen übertragen wurden ($6-10 \times 10^9$) und die Spender nahe Verwandte des Empfängers waren. Offenbar kommen in solchen Fällen die immunologischen Abwehrmechanismen weniger zum Tragen. Nicht sicher geklärt ist die Frage, auf welche Weise es nach einer Knochenmarksübertragung zu einer Besserung des Markbefundes beim Empfänger kommen kann. Zunächst wird natürlich durch die

Übertragung einer großen Zahl von Zellen (etwa 1% der Knochenmarkszellen) eine kurzzeitige Substitution erreicht.

Im Tierexperiment konnte eine Ansiedlung und Proliferation der übertragenen Knochenmarkszellen beobachtet werden und zwar bei Übertragung von Rattenknochenmark auf strahlenvorgeschädigte Mäuse. Hier kam es zu einem vollständigen Ersatz der Mäuseerythrocyten durch Rattenerythrocyten. Dieses tierexperimentelle Beispiel ist jedoch als experimenteller Sonderfall zu werten.

Bei Übertragungsversuchen beim Menschen konnte eine Ansiedlung und Proliferation der übertragenen Knochenmarkszellen bisher nicht beobachtet werden. Wohl ließen sich in Einzelfällen während einiger Wochen nach der Transplantation Spenderzellen im Blut des Empfängers nachweisen.

Bei den über 90 Übertragungen in unserer Klinik waren bisher Spenderzellen im Empfänger über wenige Tage hinaus nicht nachweisbar, so daß die Wirkung der Übertragung neben einer Substitution in einer Stimulierung der Empfänger-Markfunktion gesehen werden mußte.

Solange die immunologischen Abwehrmechanismen nicht sicher beherrscht werden können und eine Immuntoleranz nicht erreicht ist, ist eine Proliferation der übertragenen Zellen doppelt gefährlich. Einmal kommt es zu Abwehrvorgängen des Empfängers gegen die Spenderzellen, zum anderen würden die proliferierenden Spenderzellen gegen den Wirt immunologisch reagieren und ihn schädigen.

Wir möchten einen weiteren Fall mitteilen, bei dem wir über mehrere Monate nach einer Knochenmarksübertragung Spenderzellen im Blut des Empfängers nachweisen konnten, so daß tatsächlich eine Proliferation der Spenderzellen im Wirtsorganismus angenommen werden muß.

2. Kasuistik

Patient F. N., männlich, 32 Jahre alt.

2.1. VORGESCHICHTE

In seiner Familie keine besonderen Erkrankungen.

Übliche Kinderkrankheiten. Seit Jahren chronische Bronchitis. Im Oktober 1967 traten erstmals Lymphknotenvergrößerungen am Hals auf. Von November 67 bis März 68 wurde er mehrfach in auswärtigen Krankenhäusern behandelt. Es wurde dort zunächst eine akute Myelose vermutet und mit Prednison behandelt. Als sich die Lymphknoten aber nicht zurückbildeten, wurde er am 25.3.68 in unsere Klinik aufgenommen.

2.2. BEFUND

Bei der Aufnahme rel. guter Allgemein- und körperlicher Zustand. Der Patient klagte « über große Müdigkeit, Leistungsschwäche, die in der letzten Zeit deutlicher geworden seien ». Haut und sichtbare Schleimhäute waren minderdurchblutet. Im Halsbereich und supraclaviculär fanden sich mehrere bis kastaniengroße, verschiebliche, indolente Lymphknotenvergrößerungen. Leber und Milz nicht vergrößert.

Im Blutbild fand sich eine Anämie, eine Thrombopenie bei normalen Leukocytenzahlen (Abb. 1). Im Differentialblutbild allerdings 75% Lympho-Sarkomzellen. Cytologie und Histologie des Knochenmarks sowie die histologische Untersuchung eines exstirpierten Lymphknotens bestätigten die Diagnose Lymphosarkom. Das Knochenmark war fast vollständig mit Lymphosarkomzellen infiltriert.

3. Therapie und Verlauf

Wir behandelten zunächst mit verschiedenen Cytostatika (nach VM₂₆, einem Podophyllinderivat, mit Neo-Endoxan, schließlich mit Trenimon). Es kam jedoch zu einem starken Absinken sämtlicher Zellsysteme im Blut, so daß mehrere Blutkonserven gegeben werden mußten. Im Differentialblutbild fanden sich jetzt 100% Lymphosarkomzellen (Abb. 1). Es kam zu einer *Candida albicans* Infektion der Mundhöhle, die mit Nystatin (Moronal R) angegangen wurde. Beginnende Temperatursteigerungen konnten mit Antibiotica beherrscht werden. Im Knochenmark fand sich keine normale Hämatopoese mehr, nur noch Lymphosarkomzellen. Bei peripheren Leukocytenwerten von 700 pro cmm entschlossen wir uns zu einer Knochenmarkstransfusion. Als Spenderin wählten wir eine Schwester des Patienten, die die gleiche Blutgruppe wie unser Patient zeigte (A₁ cde).

Wir gewannen 450 ccm Knochenmark mit 23-30 000 Zellen pro cmm, also insgesamt etwa 12×10^9 Zellen. Die Übertragung erfolgte direkt ohne Konservierung am 26.4.1968. Vorher gaben wir noch einen sehr hohen Trenimon-Stoß (3mg, das entspricht der 15fachen üblichen Einzeldosis), um möglichst viele der das Knochenmark infiltrierenden Lymphosarkomzellen zu zerstören. Vor der Knochenmarkstransfusion führten wir bei dem Patienten und bei der Knochenmarksspenderin Chromosomenanalysen durch, die bei dem Patienten nach der Transfusion in regelmäßigen Abständen wiederholt wurden.

Die Knochenmarksübertragung wurde gut vertragen, und es kam unter Prednisonschutz auch in der Folgezeit zu keinen Unverträglichkeitserscheinungen.

Schon einen Tag nach der Knochenmarksübertragung kam es zu einer deutlichen Zunahme der reifen Granulocyten bis auf Werte über 50%, die über 14 Wochen konstant blieben. Die absolute Leukocytenzahl sank jedoch noch weiter ab und lag über viele Tage zwischen 150 und 200 pro cmm. Dabei verschlechterte sich das Allgemeinbefinden zusehends. Ende Mai kam es unter Temperaturerhöhung zu einem subileusartigen Krankheitsbild und über ein phlegmonöses Stadium zur Ausbildung eines Analabszesses. Es gelang mit konservativen Maßnahmen, den bedrohlichen Zustand zu überwinden.

Mitte Juni, etwa 7 Wochen nach der Knochenmarksübertragung, besserten sich die Erythrocyten- und Thrombocytenwerte im peripheren Blut deutlich, auch die Leukocytenwerte stiegen bis auf 1 000 pro cmm an. Gleichzeitig besserte sich auch das Allgemeinbefinden. Wir gaben erneut kleine Dosen eines Cytastotikums (wöchentlich 3mg Vincristin), ohne jedoch eine weitere Remission erreichen zu können.

Wir entließen den Patienten in ambulante Behandlung. Er kam jedoch schon

drei Tage später erneut in stationäre Behandlung, da sich zu Hause eine tiefe Armvenenthrombose mit einer erheblichen ödematösen Schwellung des linken Armes entwickelt hatte. Unter der Behandlung bildete sich diese Schwellung allmählich zurück. Die Leukocytenwerte stiegen zwischenzeitlich bis über 2 000 an, im Differentialblutbild waren aber jetzt wieder ca. 90% Lymphosarkomzellen nachweisbar. Weitere Gaben von Vincristin senkten zwar die absoluten Leukocytenzahlen, nicht dagegen den hohen Prozentsatz an Lymphosarkomzellen. Bei konstanten Blutwerten (Erythrocyten bei 2,5 Mill., Leukocyten bei 800 und Thrombocyten bei 40 000) entließen wir den Patienten in ambulante Behandlung.

Wöchentliche Kontrolluntersuchungen zeigten ein kontinuierliches Absinken der Erythrocyten- und Thrombocytenzahlen bei einem starken Anstieg der Leukocytenzahlen. Vier Wochen nach der Entlassung mußte der Patient bei Erythrocytenwerten von 1,9 Mill., Thrombocytenwerten von 22 000 und Leukocytenwerten von 18 000, dabei 100% Lymphosarkomzellen, erneut stationär aufgenommen werden.

Auch das Knochenmark zeigte jetzt wieder eine vollständige Infiltration mit Lymphosarkomzellen. Bei kaum erniedrigtem Gesamteiweiß fand sich in der Elektrophorese eine Verminderung der Globuline auf 6%. Unter der cytostatischen Behandlung mit Natulan (10.-24.11.68 tgl. 250mg) kam es zu einem raschen Absinken der Leukocytenzahlen. Gleichzeitig fielen aber auch die Thrombocytenwerte unter 10 000 ab. Lediglich die Erythrocytenwerte konnten mit Hilfe von Erythrocytentransfusionen in erträglichen Grenzen gehalten werden. Trotz massiver Therapie mit Prednison, Gammaglobulin und Antibiotica kam es unter Temperatursteigerung zur Ausbildung eines Ileus und zu massiven Blutungen in der Haut und inneren Organen. Am 26.11.68 kam es zum Exitus letalis, nachdem über 3 Wochen keine Granulocyten im peripheren Blut mehr nachweisbar gewesen waren. Der letzte gemessene Leukocytenwert betrug 50 pro cmm.

4. Chromosomen-Untersuchungen

4.1. MATERIAL UND METHODEN

Die ersten Chromosomenkulturen bei dem Patienten F. N. wurden bei diesem und bei seiner Schwester E. M. vor der Knochenmarksübertragung am 26.4.1968 angelegt.

Die nächsten Kulturen wurden 1, 3, 8 und 14 Tage nach der Transplantation durchgeführt. Danach wurden sie bis zum 25.11.68 einmal im Monat wiederholt.

Die zur Teilung stimulierbaren Zellen wurden aus dem peripheren Blut gewonnen und die Kulturen nach einer abgewandelten Methode von Moorhead und Mitarbeitern (1960) angesetzt.

Die Kulturflüssigkeit bestand aus 6ml Medium TC 199 und 2ml autologem Plasma. Bei einigen Kulturen wurde statt des Plasmas des Patienten auch foetales Kälberserum verwendet. Zwischen beiden Kulturmethoden ließ sich kein Unterschied nachweisen. Die Lymphocyten wurden durch Phytohämagglutinin (4 Tr. auf 8ml Kulturflüssigkeit) zur Teilung stimuliert. Es wurden mindestens 2 Parallelkulturen angesetzt. Die Kulturdauer betrug 3 und 3½ Tage. Bei allen Chromosomenkulturen wurden ca. 8ml Blut entnom-

men. Nach dem Absetzen des Leukocytenaumes wurde dieser vollständig abgesaugt und auf die Kulturgefäße verteilt. Es wurden bei dem Patienten F. N. jeweils 100 gut ausgebreitete Metaphasen ausgewertet. Eine Ausnahme bildeten die Kulturen 438 und 452 (cf Tab. I), die nur eine geringere Anzahl von Mitosen enthielten.

Bei der Knochenmarkspenderin Frau E. M. betrug die Zahl der analysierten Mitosen $n = 50$.

Durch die laufenden cytologischen Untersuchungen sollte einmal festgestellt werden, ob sich nach der Knochenmarksübertragung von der Schwester auf den Bruder im Blut des Patienten Zellen mit weiblichem Karyotyp nachweisen ließen und ob deren Anzahl sich im Laufe der Zeit veränderte.

Zum anderen wurde geprüft, welche Chromosomenaberrationen durch den einmaligen Trenimon-Stoß (3mg) unmittelbar vor der Knochenmarkstransfusion entstanden waren und wie sich der Typ der Aberration mit zunehmendem Abstand von der Behandlung veränderte.

In den Mitosen des Patienten F. N. war das Y-Chromosom deutlich von den Chromosomen der Gruppe G unterscheidbar (Abb. 3). Es ließen sich daher mit großer Sicherheit schon im mikroskopischen Bild männlicher und weiblicher Karyotyp unterscheiden. Von allen Platten mit weiblichem Karyotyp ($2n = 46/XX$) wurde zusätzlich ein Karyogramm angefertigt (Abb. 4).

Der Patient F. N. wurde in der Zeit vor und nach der Knochenmarkstransfusion mit Cytostatika behandelt. Vor der Transfusion erhielt er insgesamt 5g Neo-Endoxan, 720 mg VM₂₆ und 3.2mg Trenimon, nach der Transfusion 0.6mg Trenimon und im Laufe von etwa 5 Monaten 27mg Vincristin (Abb. 1).

4.2. ERGEBNISSE

Der Karyotyp der Knochenmarkspenderin Frau E. M. (N. 437) war normal weiblich ($2n = 46/XX$). Die Aneuploidierate betrug 2%, der Anteil sekundärer Chromosomenaberrationen 10%. Beide Werte liegen nach Untersuchungen bei der Durchschnittsbevölkerung im Bereich der Norm (Hampel, 1968).

Die erste Chromosomenanalyse bei dem Patienten F. N. wurde vor der Knochenmarksübertragung durchgeführt (N. 436). Der Karyotyp war männlich ($2n = 46/XY$). Allgemein waren die Chromosomen sehr schlecht spiralisiert und teilweise wurden degenerierte Mitosen beobachtet. Der Anteil sekundärer Chromosomenaberrationen betrug 14%. Es handelte sich dabei fast ausschließlich um « gaps », sowie um Chromatid- und Isochromatidbrüche. In einer Zelle wurden 3 Aberrationen beobachtet, 5 Zellen zeigten 2 Aberrationen, die übrigen nur eine. Der Patient war bis zu diesem Zeitpunkt mit insgesamt 5g Neo-Endoxan, 720 mg VM₂₆ und 0.2mg Trenimon behandelt worden.

Die nächste Chromosomenkultur wurde 1 Tag nach der Transfusion angesetzt (N. 438).

Wahrscheinlich als Folge der Trenimon-Behandlung (3mg-Stoß direkt vor der Knochenmarksübertragung) fanden sich zu diesem Zeitpunkt in den Kulturen nur insgesamt 37 Mitosen, von denen nur 14 auswertbar waren. Auch hier waren die Chromosomen schlecht spiralisiert und häufig verklumpt. Über die Anzahl sekun-

Tab. I. Chromosomenuntersuchungen nach Knochenmarkstransfusion

N.	Karyotyp		Mitosen mit Aberrationen (Angabe in %)	Zeit nach der Transplan- tation	Bemerkungen
	♂	♀			
437		n = 50 n = 100%	10	26.4.68 Transpl.	Knochenmarks- spenderin
436	n = 100	n = 100 ./.	14	26.4.68 Transpl.	degenerierende Mitosen Knochenmarks- empfänger
438	n = 13	n = 14 n = 1	(64)	27.4.68 = 24h n. Transpl.	Chr. schlecht spi- ralisiert u. neigen zum Verkleben
439	n = 98	n = 100 n = 2	25	29.4.68 3 Tg. n. Transpl.	
441	n = 99	n = 100 n = 1	34	3.5.68 = 8 Tg. n. Transpl.	
452	n = 91	n = 92 n = 1	39	10.5.68 = 14 Tg. n. Transpl.	Chrom. schlecht spiralisiert u. neigen zum Verkleben
472				29.5.68 = 4. Wo. n.T.	Kulturen nicht ge- wachsen
492	n = 98	n = 100 n = 2	26	27.6.68 = ca. 8 Wo. n. Transpl.	
513	n = 98	n = 100 n = 2	16	1.8.68 = ca. 14 Wo. n. Transpl.	4% Spiralisierungs- defekte, 1% klump- pige Metaphasen
558	n = 100	n = 100 ./.	24	20.9.68 = ca. 21 Wo. n. Transpl.	Chr. teilw. schlecht spir. und klumpig
607				1.11.68 = ca. 27 Wo. n. Transpl.	Kulturen nicht ge- wachsen
615	n = 99	n = 100 n = 1	19	7.11.68 = ca. 28 Wo. n. Transpl.	nur einzelne Mito- sen schlecht spi- ralisiert (20%)
640	n = 100	n = 100 ./.	41	18.11.68 = ca. 29 Wo. n. Transpl.	35% schlecht spi- ralisiert
650				25.11.68 = ca. 30 Wo. n. Transpl.	Kulturen nicht ge- wachsen

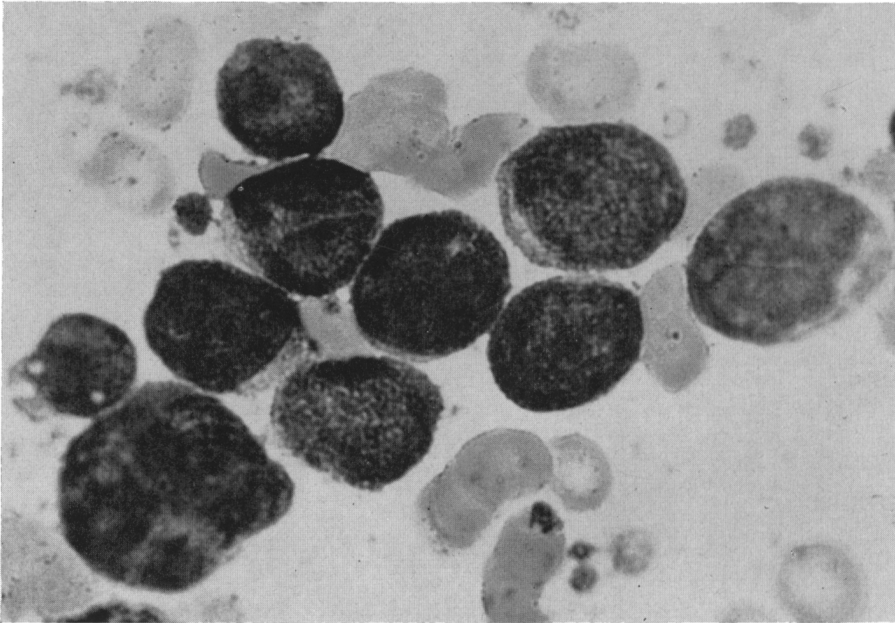


Abb. 2. Lympho-Sarkomzellen im peripheren Blut des Pat. F.N.

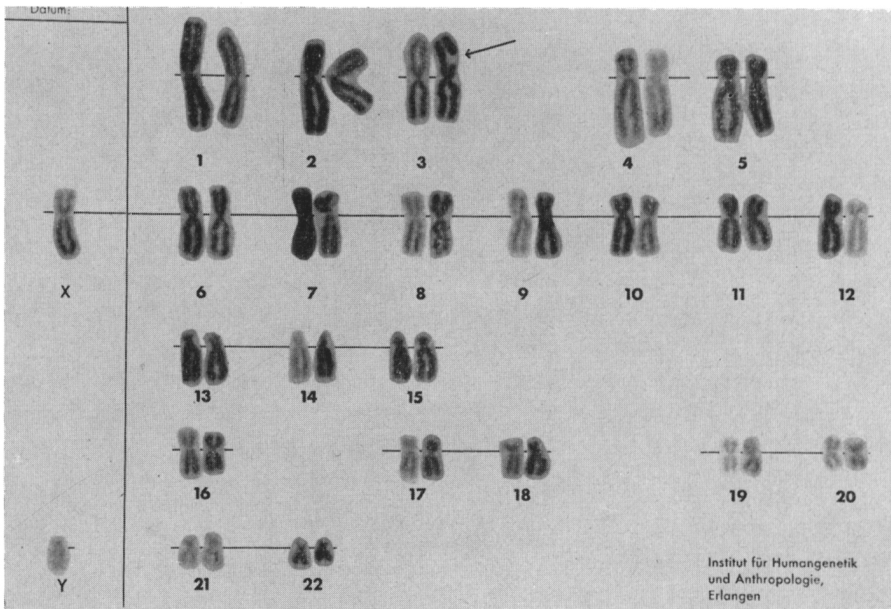


Abb. 3. Karyogramm des Patienten F.N. $2n = 46/XY$ Ein A_3 -Chromosom zeigt einen Chromatidbruch.

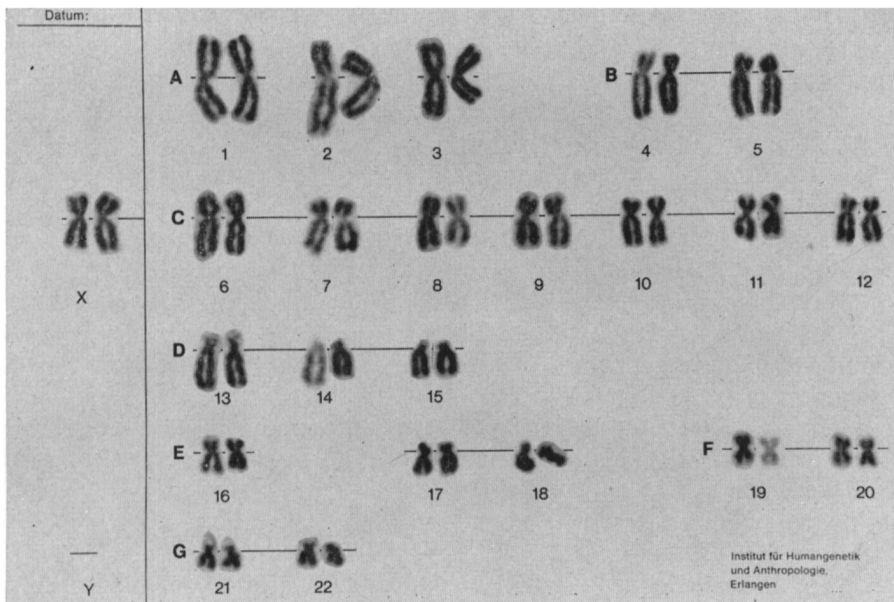


Abb. 4. Karyogramm der Knochenmarksspenderin E.M. $2n = 46/XX$. Diese Mitose wurde 8 Wochen nach der Transfusion in Chromosomenpräparaten des Patienten F.N. beobachtet.

därer Chromosomenaberrationen lassen sich bei so geringer Mitosezahl keine befriedigenden Aussagen machen. Sie würde zwar, berechnet auf 100 Mitosen, 64% betragen, doch ist dieser Wert nicht exakt.

Eine der untersuchten Mitosen zeigte in dieser Kultur einen weiblichen Karyotyp.

Drei Tage nach der Transfusion waren die Chromosomenkulturen ausreichend gewachsen (N. 439).

Die Chromosomen wiesen schwächere Spiralisierungsdefekte auf, degenerierte Mitosen wurden nicht beobachtet.

Der Anteil sekundärer Chromosomenaberrationen betrug 25%. Die gestörten Metaphaseplatten zeigten bis zu 4 verschiedene Aberrationstypen. Neben « gaps », Chromatid- und Isochromatidbrüchen, traten dizentrische und atypische Chromosomen, sowie eine Reunionsfigur auf. Zwei Mitosen besaßen einen tetraploiden Chromosomensatz (Tab. II).

In 2 von 100 Mitosen war der Karyotyp weiblich.

Eine Woche nach der Knochenmarksübertragung waren die Chromosomenkulturen gut gewachsen (N. 441).

Es wurden nur Spiralisierungsdefekte geringeren Ausmaßes beobachtet. Klumpige oder degenerierte Mitosen fehlten.

Vierunddreissig Prozent der untersuchten Metaphaseplatten zeigten sekundäre

Veränderungen der Chromosomen. Der Anteil der Aberrationen hatte demnach weiter zugenommen (Tab. I). Es wurden wiederum bis zu 4 Aberrationen pro Mitose nachgewiesen. Die Zahl der Chromosomen-Umbaufiguren war größer geworden. Neben atypischen und dizentrischen Chromosomen waren 1 Translokationskreuz und 1 Triradial vorhanden.

Eine der 100 analysierten Mitosen zeigte einen weiblichen Karyotyp. Polyploide Mitosen fehlten.

Vierzehn Tage nach der Transfusion waren die Chromosomenkulturen schlecht gewachsen (N. 452). Es konnten insgesamt nur 92 Mitosen ausgewertet werden.

Die Chromosomen waren klumpig und häufig schlecht spiralisiert, bedingt möglicherweise durch die erneuten Trenimongaben (Abb. 1). Der Anteil sekundärer Chromosomenveränderungen betrug zu diesem Zeitpunkt 39%. Maximal zeigte eine Metaphaseplatte 4 verschiedene Aberrationen.

Die Verteilung der verschiedenen Defekttypen entsprach in etwa den Verhältnissen bei der vorhergehenden Untersuchung (Tab. II). Eine der untersuchten Mitosen wies einen weiblichen Karyotyp auf.

Die Chromosomenkulturen 4 Wochen nach der Transfusion ließen sich nicht zur Zellteilung anregen (N. 472).

Acht Wochen nach der Transfusion waren die Chromosomenkulturen wieder ausreichend gewachsen (N. 492).

Etwa 15% der Mitosen zeigten Spiralisierungsdefekte der Chromosomen, 26% sekundäre Aberrationen.

Pro Mitose waren nicht mehr als 2 Chromosomenveränderungen gleichzeitig vorhanden.

Der Anteil der Chromosomen- und Chromatidbrüche war in dieser Kultur stark zurückgegangen, während die Zahl der Umbaufiguren etwa konstant geblieben war (Tab. II).

Zwei der 100 untersuchten Mitosen besaßen einen weiblichen Karyotyp.

Vierzehn Wochen nach der Transfusion waren die Kulturen gut gewachsen (N. 513). Nur einzelne Mitosen wiesen Spiralisierungsdefekte geringeren Ausmaßes auf.

Der Anteil sekundärer Chromosomenaberrationen betrug nur noch 16%. Nur in einer Mitose wurden 6 verschiedene Anomalien beobachtet, in allen übrigen nur eine oder zwei.

Der Anteil der Chromosomen- und Chromatidbrüche war weiter zurückgegangen, während die Chromosomenumbaufiguren im Verhältnis vermehrt zu sein schienen (Tab. II). Zwei Mitosen zeigten einen tetraploiden Chromosomensatz, 2 weitere einen weiblichen Karyotyp.

Einundzwanzig Wochen nach der Transfusion waren die Chromosomenkulturen mäßig gewachsen (N. 558). Die Chromosomen waren häufig klumpig und schlecht spiralisiert. Der Anteil der Chromosomenaberrationen war wieder auf 24% angestiegen. In einer Zelle waren maximal 4 verschiedene Chromosomenveränderungen nachweisbar. Der Anteil der Chromosomen- und Chromatidbrüche hatte wieder

Tab. II. Chromosomenaberrationen bei dem Patienten F.N. in Kulturen, die in zunehmendem Abstand zu einem hochdosierten Trenimon-Stoß angesetzt wurden

N.	G'	G''	B'	B'' und azentrische Fragmente	Minutes	Delet.	Transl.	Trirad.	Reunion	Ringchr.	dis. Chr.	atyp. Chr.	tetraploide Mitosen
436	2	7	1	6	3	/.	/.	/.	/.	1	/.	/.	/.
(438)	2	1	/.	10	/.	/.	/.	/.	/.	/.	/.	/.	/.
439	3	8	2	21	1	/.	/.	/.	1	/.	5	1	2
441	6	2	2	29	2	1	1	1	/.	/.	6	2	/.
452	8	12	2	21	2	/.	1	/.	/.	/.	3	3	/.
472													
492	11	5	2	7	/.	/.	/.	/.	/.	/.	2	2	/.
513	5	3	/.	4	3	/.	/.	1	/.	/.	6	3	2
558	7	4	2	12	2	/.	/.	/.	/.	/.	2	7	/.
607													
615	7	6	3	4	3	3	/.	/.	/.	/.	/.	7	2
640	11	6	15	17	4	/.	/.	/.	/.	/.	/.	5	2
650													

G', G'' = Chromatid- und Isochromatidachromasien;
B', B'' = Chromatid- und Isochromatidbrüche.

zugenommen, während die Zahl der Umbaufiguren etwa konstant geblieben war. Die Zahl der atypischen Chromosomen war gestiegen, die der dizentrischen hatte abgenommen, Translokationskreuze und Triradiale fehlten. Alle 100 Mitosen wiesen einen männlichen Karyotyp auf.

Siebenundzwanzig Wochen nach der Transfusion gelang es nicht, die Lymphocyten zur Teilung anzuregen (N. 607). Nur einzelne Zellkerne waren transformiert, Mitosen waren nicht vorhanden.

Eine Woche später (28 Wochen nach der Transfusion) wurden erneut Kulturen angesetzt, die dieses Mal eine ausreichende Zellteilungsrate ergaben (N. 615).

Bei etwa 20% der Mitosen waren die Chromosomen ungleich spiralisiert. Die Aberrationsrate betrug 19%.

Maximal enthielt eine Mitose 3 verschiedene Chromosomenveränderungen. Bei dieser Kultur ließen sich bei den Chromosomenumbaufiguren nur noch atypische Chromosomen nachweisen, während dizentrische Chromosomen fehlten. Der Anteil der «gaps», der Chromosomen- und Chromatidbrüche war konstant geblieben.

Zwei Mitosen wiesen einen tetraploiden Chromosomensatz auf. Eine Metaphaseplatte besaß einen weiblichen Karyotyp.

Neunundzwanzig Wochen nach der Transfusion wurde erneut eine Chromosomenanalyse durchgeführt (N. 640), da sich der Zustand des Patienten plötzlich rapide verschlechtert hatte.

Einundvierzig Prozent der Mitosen wiesen sekundäre Strukturveränderungen der Chromosomen auf. Dabei war der Anteil der «gaps» und Brüche stark angestiegen, während die Zahl der Umbaufiguren etwa gleich geblieben war (Tab. II). Etwa 35% der Chromosomen zeigten zum Teil starke Spiralisierungsdefekte.

Zwei Mitosen besaßen einen tetraploiden Chromosomensatz. Der Karyotyp der untersuchten Zellen war in allen 100 Mitosen männlich.

Eine Woche später (30 Wochen nach der Transfusion) wurden nochmals Kulturen angesetzt (N. 650). Alle Kulturen enthielten Bakterien, Zellteilungen fehlten.

5. Diskussion

Bei unserem Patienten F.N. fanden wir zu Beginn der Behandlung die normalen Knochenmarkszellen durch Lympho-Sarkomzellen fast vollständig verdrängt. Durch eine cytostatische Behandlung ließ sich eine Besserung nicht erzielen. Wir entschlossen uns daher zu einer Knochenmarkstransfusion. Vorher versuchten wir durch einen sehr hohen Trenimon-Stoß (3mg i. v.) möglichst viele der pathologischen Zellen zu zerstören. Als Spenderin stand uns eine nahe Verwandte des Patienten (Schwester) zur Verfügung, so daß keine erheblichen immunologischen Abwehrmechanismen zu erwarten waren. Wir übertrugen insgesamt 12×10^9 Knochenmarkszellen. Die Übertragung wurde gut vertragen. Auch in größerem Abstand von der Transfusion traten keine Unverträglichkeitssymptome in Erscheinung.

Obwohl die Gesamtleukocytenzahlen über lange Zeit sehr niedrig lagen (Abb. 1), war im Differentialblutbild über Wochen doch eine deutliche Besserung zu verzeich-

nen. Nach der Knochenmarksübertragung lebte der Patient noch 7 Monate. Drei Wochen ante finem waren im peripheren Blut keine normalen Leukocyten mehr zu finden, nur noch Lympho-Sarkomzellen. Unter septischen Erscheinungen kam es zum Exitus letalis. Immerhin hatte die durchgeführte Knochenmarkstransfusion einen deutlich lebensverlängernden Effekt.

Wir prüften die Frage, ob durch die Knochenmarkstransfusion ein unspezifischer Reiz auf das Empfängerknorpelmark ausgeübt wurde, so daß es zu einer Regeneration gesunder eigener Zellen kam, oder ob die Spenderzellen im Wirtsorganismus überlebten und sich weiterteilten. Da wir als Spenderin die Schwester des Patienten, also eine Frau, gewählt hatten, die sich in ihrem Chromosomensatz durch die Geschlechtschromosomen XX vom Mann (XY) unterscheidet, war es uns mit Hilfe von mehrfach durchgeführten Chromosomenanalysen möglich, zu prüfen, ob sich und wie lange nach der Knochenmarksübertragung weibliche Zellen bei unserem Patienten nachweisen ließen.

Nach der Knochenmarkstransplantation wurden in 7 von 9 Lymphocytenkulturen auch Zellen mit einem weiblichen Karyotyp im peripheren Blut des Patienten gefunden. Da in allen diesen Zellen das sehr charakteristische Y-Chromosom des Patienten fehlte, während in der Reihe der C- + X-Chromosomen 14 Chromosomen vorhanden waren, erscheint es unwahrscheinlich, daß hier durch sekundäre Chromosomenumbauten ein weiblicher Karyotyp vorgetäuscht wurde. Nur einmal wurde in einer dieser Zellen eine sekundäre Chromosomenaberration, ein Isolocusbruch, nachgewiesen.

Der Anteil dieser weiblichen Zellen stieg im Verlaufe der Untersuchungen während eines halben Jahres nicht über 2% an. (Tab. I). Erstaunlicherweise verschwanden diese Zellen aber auch nicht wieder: noch 6½ Monate nach der Transplantation hatte eine von 100 untersuchten Zellen einen weiblichen Karyotyp.

Daraus ist zu schließen, daß es tatsächlich zu einer Proliferation von Spenderzellen im Wirtsorganismus gekommen sein muß, auch wenn die Häufigkeit der nachweisbaren weiblichen Zellen nie über 2% lag.

Die Verteilung im Knochenmark wurde nicht untersucht.

Durch eine Proliferation auch immunologisch potenter Zellen im Wirtsorganismus hätte wohl mit Antikörperbildung gegen die Empfängerzellen gerechnet werden müssen. Wir konnten jedoch eine immunologische Reaktion von Spenderzellen gegen den Wirt nicht nachweisen.

Weitere Chromosomenveränderungen, die wir beobachteten, waren Folge der cytostatischen Behandlung (Abb. 5).

Die Anzahl der Chromosomenaberrationen vor der Knochenmarkstransfusion war mit 14% relativ niedrig, wenn man berücksichtigt, daß der Patient in dieser Zeit mit 5g Neo-Endoxan, 720 mg VM₂₆ und 0.2mg Trenimon behandelt worden war. Umbaufiguren wurden hier keine nachgewiesen. Demnach dürften die nach der Transfusion beobachteten Chromosomenanomalien vorwiegend auf die hochdosierte Trenimon-Behandlung vor der Transfusion zurückzuführen sein.

Der Anteil der Chromosomenaberrationen in den Zellen des Patienten schwankte

während der Zeit nach der Transfusion stark. Typisch für die hochdosierte Behandlung mit Trenimon ist der hohe Anteil an Chromosomenumbaufiguren (Tab. II), im Gegensatz etwa zu den Befunden nach der Einwirkung von Myleran (Gebhart, 1969), wo diese ausgesprochen selten sind.

Erwartungsgemäß nahm im Verlauf der Untersuchungen der Anteil der atypi-

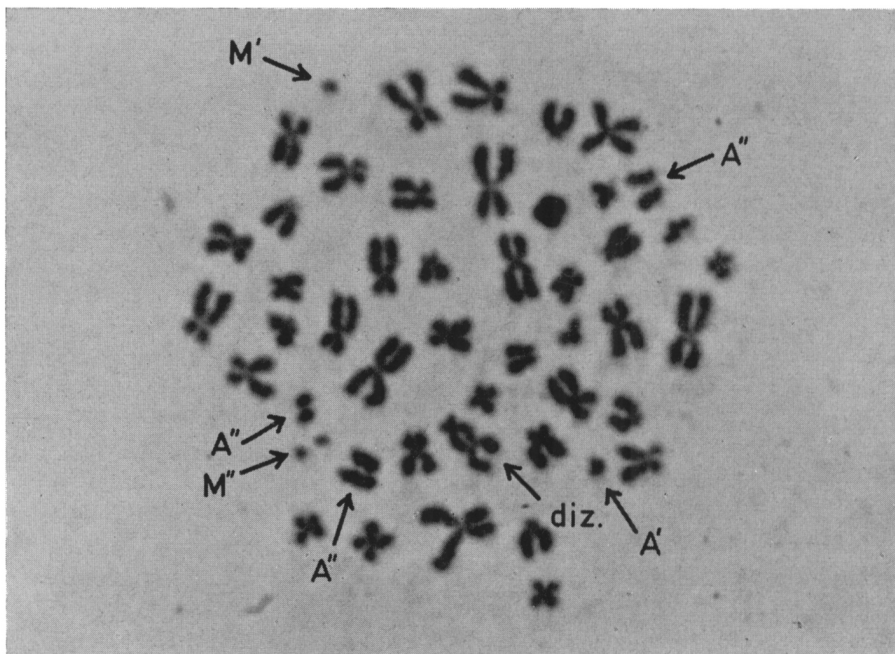


Abb. 5. Karyotyp des Patienten F. N. mit zahlreichen Chromosomenaberrationen.

M', M'': Minutes;
A', A'': azentrische Fragmente;
diz: dizentrisches Chromosom.

schen Chromosomen zu, während dizentrische Chromosomen, Translokationskreuze und Triradiale verschwanden.

Während atypische Chromosomen bei der Anaphase der Mitose durch den Spindelapparat normal verteilt werden, kommt es bei den übrigen Umbaufiguren zur Brückenbildungen sowie zur Entstehung von Mikronuklei (Gebhart, 1967; Schwannitz et al, 1968). Bei den Chromosomenbrüchen lag die Zahl der Isocusbrüche im Vergleich zu den Chromatidbrüchen wesentlich höher (Tab. II).

Dieser Befund ist für Untersuchungen *in vivo* charakteristisch. Selbst wenn das Medikament bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme einwirkte, so schlossen sich daran immer die Zellteilungen während der Kultur an, und in diesem Zeitraum fand dann

Tab. III. Häufigkeit und Verteilung aneuploider Chromosomenzahlen in den ausgewerteten Mitosen des Patienten F. N. und seiner Schwester E. M. (Knochenmarkspenderin)

N.	Chromosomenzahl : on --											
	37	3 ⁸	4 ¹	4 ²	4 ³	4 ⁴	4 ⁵	4 ⁶	4 ⁷	4 ⁸	5 ⁵	9 ²
437								49	1			
436							2	97	1			
(438)	1					1		12				
439			3	2	3	4	11	74	3			2
441			1		1	4	12	81	1			
452					3	3	14	72				
492					2	3	7	87				
513						3	2	91	3		1	2
558		2			2	3	11	80	1	1		
615				2	1	2	8	86	1			2
640						1	13	84	2			2
Σ 436-640	1	2	4	4	12	24	80	764	12	1	1	8

eine Verdoppelung der meisten chromatidalen Defekte statt, so daß sie dann bei der mikroskopischen Auswertung als Isolocusbrüche erscheinen.

Der Anteil der aneuploiden Zellen in den Kulturen war relativ hoch. Es wurden hier nur hyperploide Zellen (insgesamt etwa 3%) in Betracht gezogen, da für sie eine durch die Präparation bedingte Entstehungsweise mit größerer Sicherheit auszuschließen ist (Tab. III).

Die Aneuploidie in den Kulturen kann eine Folge von non-disjunction bei der Mitose von Zellen mit Chromosomenaberrationen sein. Der hohe Prozentsatz von tetraploiden Mitosen (ca. 1%) kann durch die Behandlung des Patienten mit Vincristin, einem Spindelgift, begründet sein.

Überblickt man den gesamten Zeitraum der cytologischen Untersuchungen bei dem Patienten F.N., so fällt auf, daß die Teilungsrate der Lymphocyten sehr stark schwankte. Sie veränderte sich auch nicht konstant in einer Richtung.

Die Kulturen 452, 558 und 640 waren nur mäßig gewachsen. Gegenüber den vorhergehenden Untersuchungen war der Anteil der Chromosomenaberrationen wieder gestiegen, die Mitosen zeigten gleichzeitig größere Spiralisierungsdefekte der Chromosomen (Tab. I). Die Lymphocyten in den Kulturen, die sich an diese Nummern angeschlossen haben (N. 472, 607, 650), ließen sich nicht zur Zellteilung stimulieren.

Zusammenfassung

Bei unserem Pat. F.N., dessen Knochenmark vollständig mit Lympho-Sarkomzellen infiltriert war, führten wir nach hochdosierter cytostatischer Behandlung eine Knochenmarkstransfusion durch. Als Spenderin stand eine Schwester des Pat. zur Verfügung. Wegen der Unterschiedlichkeit der Geschlechtschromosomen war eine weitere Verfolgung des Transplantationserfolges möglich. Direkt nach der Transfusion und bis zu 6½ Mon. nachher ließen sich im peripheren Blut des Patienten Zellen mit weiblichem Karyotyp (bis 2%) nachweisen.

Damit ließ sich eine Proliferation von Spenderzellen im Empfänger belegen.

Literatur

- BEILBY J. O. W., CADE I. S., JELLIFFE A. M., PARKIN D. M., STEWART J. W. (1960). Prolonged survival of a bone-marrow graft resulting in a blood-group chimera. *Brit. Med. J.*, 1: 96.
- DUNNIGAN M. G., BROWN A. (1963). Autologous bone marrow and large doses of malignant disease. Report of a controlled trial. *Lancet*, 2: 477.
- GEBHART E. (1967). Untersuchungen über die cytogenetische Wirkung einiger Vaginalantikonzipienten und ihrer Hauptwirkstoffe. Diss. München.
- (1969). Chromosomenaberrationen durch Myleran in menschlichen Leukocyten in vitro. *Humangenetik*, 7: 126.
- HAMPEL K. E. (1968). Über die Wirkung von Zytostatica auf die Chromosomen des Menschen. *Int. J. Clin. Pharmacol.*, 14: 322.
- HELLER P., YAKULIS V. (1958). Bone marrow transplants. *Lancet*, 1: 1131.
- KURNICK N. B. (1962). Autologous and isologous bone marrow therapy in man. Bone marrow therapy and protection in irradiated primates. Rijswijk, 289.

- MOORHEAD P. S., NOWELL P. C., MELLMAN W. J., BATTIPS D. M., HUNGERFORD D. A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, **20**: 613.
- SCHWANITZ G., WOLF F., KOCH G. (1968). Aberraciones cromosómicas y alteraciones mitóticas después de tratamiento combinado con radioyodo y radiaciones Röntgen. *Folia Clin. Int. (Barc.)*, **18**: 3.
- WITTE S. (1963). Die Knochenmarkstransfusion. Lehmanns Verlag, München.
- (1968). Knochenmarkstransplantation. In K. Betke und P. Tosberg: *Das Knochenmark*. Lehmanns Verlag, München.

RIASSUNTO

Il paziente, F.N., il cui midollo osseo era completamente infiltrato di linfosarcociti, è stato sottoposto ad un trapianto di midollo osseo, dopo trattamento con sostanze citostatiche a forti dosi. Una sorella del paziente si è prestata come donatrice. La differenza gonosomica tra donatrice e ricevente ha reso possibile la verifica del successo del trapianto. Subito dopo il trattamento, e fino a sei mesi e mezzo dopo, si potevano osservare nel sangue periferico del paziente cellule con cariotipo femminile (fino al 2%). Questo dimostra la proliferazione delle cellule della donatrice nel ricevente.

SUMMARY

After an intense cytostatic treatment of the patient F.N., whose bone marrow was completely infiltrated with lympho-sarcocytes, a bone marrow transplantation was made. The donor was the patient's sister. The difference in sex chromosomes made it possible to observe the fate of the transferred cells. Immediately after the treatment, till 6½ months later, cells with feminine caryotype were traceable in the patient's peripheral blood (up to 2%). This proves the proliferation of donor cells in the acceptor.

RÉSUMÉ

Le patient F.N., dont la moelle osseuse était complètement infiltrée avec des cellules de lymphosarcome, a été soumis à transplantation de moelle osseuse après traitement avec des substances cytostatiques en dose massive.

La donatrice était une sœur du patient. La différence des gonosomes chez la donatrice et le receveur rendait possible l'observation du succès de la transplantation.

Immédiatement après la transplantation et jusqu'à six mois et demi plus tard, des cellules avec un caryotype féminin ont été observées dans le sang périphérique du patient (jusqu'à 2%). Ainsi, il a été possible de démontrer une prolifération des cellules de la donatrice dans le receveur.

Herrn Dr. rer. nat. E. Gebhart danken wir für zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Dr. Gesa Schwanitz, Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Erlangen-Nürnberg, Bismarckstrasse 26/11, 8520 Erlangen, Deutschland.

Dr. G. Hartwich und Dr. J. Becker, Medizinische Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg, Krankenhausstrasse 12, 8520 Erlangen, Deutschland.