

Ein mathematisches Kompartimentmodell der murinen Erythro- und Granulopoese unter simultaner Gabe von Erythropoietin und G-CSF

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Corinna Mirjam Gebauer
geboren am 20. Februar 1974 in Hof / Saale

angefertigt an:

Universität Leipzig
Medizinische Fakultät
Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie

Betreuer:

Professor Dr. med. Markus Löffler
Dr. med. Christoph Engel

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.2.2011

für

meine Mutter und Karin

Inhaltsverzeichnis

1	Bibliografische Beschreibung.....	7
2	Abkürzungsverzeichnis.....	9
3	Einführung.....	11
4	Aufgabenstellung.....	15
5	Biologische Grundlagen der Hämatopoese.....	16
5.1	Die Hämatopoese der Maus	16
5.2	Zellstufen.....	17
5.3	Zytokine und Zytokinnetzwerk	20
5.3.1	Erythropoietin.....	20
5.3.2	G-CSF.....	22
5.3.3	Wirkung kombinierter Erythropoietin- und G-CSF-Gabe	25
5.4	Hämatopoese splenektomierter Mäuse.....	27
6	Stand der Forschung.....	30
7	Material und Methode	32
7.1	Experimentelle Daten.....	32
7.1.1	Simultane Gabe von EPO und G-CSF	32
7.1.2	G-CSF-Langzeitadministration	39
7.1.3	Re-Migration	43
7.2	Biostatistische Datenaufbereitung.....	45
7.3	Modell der Hämatopoese	46
7.3.1	Modellstruktur.....	46
7.3.2	Besonderheiten des Stammzellkompartimentes.....	50
7.3.3	Migration zwischen Knochenmark und Milz.....	51
7.4	Exogene Wachstumsfaktorgaben	53
7.5	Der Standardparametersatz	54
7.6	Technische Implementation	55
8	Ergebnisse	56
8.1	Regressionsmodelle für Dosis-Wirkungsbeziehungen.....	56
8.2	Pharmakodynamische Modelle	61
8.2.1	Simultane EPO- und G-CSF-Gabe bei normalen Mäusen.....	61
8.2.2	Simultane EPO- und G-CSF-Gabe bei splenektomierten Mäusen.....	66
8.3	Langzeitstimulation mit G-CSF	67
8.4	Rückmigration von Progenitoren von der Milz in das Knochenmark	74
9	Diskussion	80
9.1	Simultane EPO- und G-CSF-Gabe.....	81
9.2	Langzeitgabe von G-CSF	86
9.3	Rückmigration von der Milz in das Knochenmark	89
10	Zusammenfassung der Arbeit.....	91
11	Literaturverzeichnis.....	93

12	Ergänzendes Material	105
13	Anlagen	113
13.1	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	113
13.2	Lebenslauf	114
13.3	Publikationen.....	115
13.4	Danksagung.....	119

1 Bibliografische Beschreibung

Gebauer, Corinna Mirjam

Ein mathematisches Kompartimentmodell der murinen Erythro- und Granulopoese unter simultaner Gabe von Erythropoietin und G-CSF

Universität Leipzig, Dissertation

120 S., 130 Lit., 30 Abb., 16 Tab.

Referat:

In dieser Arbeit wird das in vivo-Verhalten der murinen Erythro- und Granulopoese, einschließlich der hämatopoetischer Stammzellen, unter dem Einfluß von exogen appliziertem G-CSF und Erythropoietin mit Hilfe eines mathematischen Kompartimentmodelles untersucht. Der Schwerpunkt liegt auf der Identifizierung von linienübergreifenden Wachstumsfaktoreffekten. Zu diesem Zweck werden experimentelle Daten mit den Modellsimulationen unter Berücksichtigung verschiedener Modellannahmen verglichen.

Die experimentellen Daten für die Modellentwicklung stammen zum einem kleinen Teil aus der Literatur, hauptsächlich betrachtet wurden jedoch Daten einer kooperierenden niederländischen Arbeitsgruppe. Die beiden Wachstumsfaktoren wurden kontinuierlich und simultan mittels osmotischer Minipumpen subkutan über einen längeren Zeitraum appliziert.

Die experimentellen Daten werden zunächst mit Hilfe eines nichtlinearen Regressionsmodelles analysiert und quantitativ beschrieben, wobei Interaktionseffekte zwischen den Wachstumsfaktoren besondere Berücksichtigung finden. Es wird dann ein umfassendes mathematisches Differentialgleichungsmodell der murinen Erythro- und Granulopoese unter Berücksichtigung der linienübergreifenden Wachstumsfaktoreffekte und Interaktionen aufgestellt.

Es wird zunächst überprüft, ob sich die beobachteten Daten unter Simultanstimulation durch die einfache Zusammenschaltung zweier bereits existierender Einzelmodelle der Erythro- und Granulopoese ohne weitere Modellannahmen erklären lassen. Dazu werden Daten von normalen als auch splenektomierten Tieren berücksichtigt. Es zeigt sich nach Prüfung verschiedener Hypothesen, dass erst unter Annahme einer durch Erythropoietin potenzierten Amplifikation der primär G-CSF-abhängigen Zellstufe der lienalen CFU-GM die experimentell beobachteten Effekte erklärt werden können. Es wird außerdem gezeigt, daß sich mit demselben Modell und denselben Modellparametern die bei splenektomierten Tieren zu beobachtende G-CSF-abhängige Entwicklung einer EPO-resistenten Anämie gut erklärt wird.

In einem zweiten Teil der Arbeit wird ein Modellkonzept erarbeitet, mit welchem sich die Effekte nach Langzeitgabe von G-CSF mittels rezeptorvermitteltem G-CSF-Abbau erklären lassen. In einem dritten Teil wird geprüft, ob sich die hämatopoetische Zellzahldynamik nach Absetzen der G-CSF-Gabe durch eine aktive Rückmigration von Progenitoren aus der Milz in das Knochenmark erklären läßt.

Das in dieser Arbeit entwickelte kombinierte Modell der Erythro- und Granulopoese impliziert eine Reihe von weiteren Fragen und bedarf der Überprüfung und Weiterentwicklung anhand weiterer experimenteller Daten. Dafür werden entsprechende Vorschläge erarbeitet, die weitere Einblicke in das komplexe Systemverhalten der Hämatopoese liefern könnten.

2 Abkürzungsverzeichnis

Modellkompartimente

Modellbezeichnung	biologische Bezeichnung
SC	CFU-S (colony-forming-units spleen)
BE	BFU-E (burst-forming units of erythroid)
CE	CFU-E (colony-forming units erythroid)
PEB	proliferierende Erythroblasten (proliferating erythroblasts)
MEB	reifende Erythroblasten (maturing erythroblasts)
RETR	residuale Retikulozyten in Knochenmark oder Milz
RETC	zirkulierende Retikulozyten
ERY	Erythrozyten im peripheren Blut
CG	CFU-GM (colony-forming units –macrophage granulocyte)
PGB	proliferierende Granuloblasten (proliferating granuloblasts)
MGB	reifende Granuloblasten (maturing granuloblasts)
GRA	Granulozyten
EP	Erythropoietin
GP	G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor)
EB	Erythroblasten (PEB + MEB)
GB	Granuloblasten (PGB + MGB)
E	erythropoetische Progenitoren und Präkursoren
G	granulopoetische Progenitoren und Präkursoren
BM	Knochenmark (bone marrow)
SP	Milz (spleen)

Modellparameter

Abkürzung	Modellparameter
a	proliferative Fraktion
p	Selbsterneuerungswahrscheinlichkeit
TT	Transitzeit
TC	Zellzykluszeit
A	Amplifikation ($=2^n$)
n	Anzahl der Mitosen ($=\log_2(A)$)
FoN	Fraction of Normal
k^{mig}	Migrationskoeffizient
k^{Seed}	Seeding efficiency

3 Einführung

Das periphere menschliche Blut besteht zu etwa 45% des Gesamtvolumens aus zellulären Bestandteilen, welche in Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten unterschieden werden können. Die Hauptaufgabe der Erythrozyten besteht im Transport von Sauerstoff von der Lunge in die einzelnen Gewebe, während die Thrombozyten wichtige Funktionen in der Blutstillung und Blutgerinnung wahrnehmen. Leukozyten lassen sich in Granulo- und Lymphozyten unterteilen. Die heterogene Population der Leukozyten ist von grundlegender Bedeutung für das Immunsystem. Granulozyten sind für die unspezifische Abwehr von bakteriellen Erregern verantwortlich. Sämtliche Blutzellen erfüllen somit lebenswichtige Aufgaben. Aufgrund ihrer begrenzten Lebens- bzw. Verweildauer im peripheren Blut müssen die Blutzellen zeitlebens in hoher Zahl produziert werden. Um z.B. den normalen Verlust auszugleichen produziert ein erwachsener Mensch täglich etwa 100 Milliarden Granulozyten, 200 Milliarden Erythrozyten und 40-100 Milliarden Thrombozyten. Diese Aufgabe erfüllt die Blutbildung (Hämatopoese), welche beim gesunden erwachsenen Menschen im Knochenmark lokalisiert ist. Alle Zelllinien differenzieren aus einem Pool von gemeinsamen Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen und deshalb als hämatopoetische Gewebstammzellen bezeichnet werden. Durch kontinuierliche Differenzierung und Proliferation entstehen aus diesen Stammzellen über verschiedene Zwischenstufen die reifen Zellen des peripheren Blutes. Im Normalfall muß die Produktionsrate der Verlustrate entsprechen, damit ein Fließgleichgewicht der Zellzahlen aufrecht erhalten werden kann. Die Hämatopoese muß aber auch auf veränderte Anforderungen sowie Störungen des Fließgleichgewichtes angemessen reagieren können. So muß im Falle eines verringerten Sauerstoffangebotes durch Höhengraufenthalt eine Steigerung der erythrozytären Produktionsrate ermöglicht werden, um durch eine höhere Erythrozytenkonzentration eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebe zu gewährleisten. Gleiches gilt für einen verstärkten Verlust von Erythrozyten z.B. im Rahmen einer Blutung. Die Möglichkeit der angemessenen Reaktion auf veränderte Bedingungen impliziert die Existenz von Regulations- und Steuerungsmechanismen für die Differenzierungs- und Proliferationsvorgänge auf dem Weg von der Stamm- bis zur reifen Blutzelle.

Die molekularen Grundlagen der Regulation und Steuerung der hämatopoetischen Zelldifferenzierung und -proliferation konnten in vielen Aspekten (Zytokine, intrazelluläre Signalverarbeitung, Genregulation) bereits weitreichend charakterisiert werden. Insbesondere den Zytokinen wird eine entscheidende Rolle beigemessen. Unter der großen heterogenen Gruppe der Zytokine sind viele Moleküle mit hämatopoetischer Wirkung bekannt. Sofern diese eine

stimulierende Wirkung besitzen (Steigerung der Proliferation, Beschleunigung der Differenzierung), werden sie auch als hämatopoetische Wachstumsfaktoren bezeichnet. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind das Erythropoietin (EPO) und G-CSF (engl.: Granulocyte Colony-Stimulating Factor).

Erythropoietin, ein Glykoprotein, stellt eines der am besten untersuchten Zytokine dar. Über die Höhe des Sauerstoffpartialdruckes im Blut wird in der Niere die Produktion von Erythropoietin und damit die Anzahl der Erythrozyten im peripheren Blut und damit wiederum der Sauerstoffpartialdruck geregelt. Im Falle einer Hypoxämie steigt der Erythropoietinspiegel an und stimuliert somit die Produktion von Erythrozyten. Die Klonierung des EPO-Gens im Jahre 1985, die Herstellung von rekombinantem Erythropoietin und die erfolgreiche klinische Etablierung zur Behandlung von Anämien stellte einen wesentlichen Fortschritt in der Biotechnologie dar.

G-CSF, ebenfalls ein Glykoprotein, wurde 1983 durch Metcalf und Nicola als Wachstumsfaktor für die Differenzierung myelomonozytärer Leukämiezellen charakterisiert, die erste Klonierung von humaner DNA des G-CSF-Gens erfolgte 1986. Rekombinant hergestelltes G-CSF findet als spezifischer Stimulator der neutrophilen Granulopoese Anwendung bei Krankheitsbildern und Zuständen, welche mit einer Verringerung der Neutrophilenkonzentration im peripheren Blut einhergehen.

Trotz des umfangreichen experimentellen Wissens über die Wirkungen von EPO und G-CSF kann das quantitative Zusammenwirken der beteiligten Steuerungs- und Regulationsmechanismen experimentell nur schwer erforscht werden. Viele wichtige Größen wie z.B. Zellproduktionsraten oder Differenzierungszeiten bestimmter Zellstufen sind nur in Ausnahmefällen in vivo direkt bestimmbar. Das regulatorische System der Hämatopoese zeigt sich dem Beobachter deshalb weitgehend als „Black Box“. Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen können jedoch durch Experimente mit exogenen Störungen wie Blutungsanämie, Bestrahlung, Hypertransfusionen oder durch Erzeugung von knock-out Mutanten gezogen werden, indem man die dynamischen Effekte dieser Manipulationen auf einfach bestimmbare Zielgrößen wie Zellzahlen oder Zytokinspiegel untersucht.

Für eine umfassende Beschreibung der Differenzierungs- und Proliferationsdynamik der Hämatopoese eignen sich in besonderer Weise mathematische Modelle. Mit ihrer Hilfe lassen sich Hypothesen über die zugrundeliegenden Steuerungs- und Regulationsmechanismen aufstellen und prüfen, indem man das Modellverhalten mit experimentell gewonnenen Daten vergleicht. Durch den Einsatz von Modellen, die bekannte Störungen suffizient erklären, kön-

nen dann Vorhersagen des Systemverhaltens unter bislang experimentell oder klinisch unerforschten Störungen gemacht werden. Im Bereich von iatrogenen Störungen der Hämatopoese, z.B. durch den therapeutischen Einsatz von Zytostatika bei Malignomerkrankungen, könnten solche Modelle dann z.B. als Therapieplanungswerkzeuge eingesetzt werden.

4 Aufgabenstellung

Aufgrund der hohen therapeutischen Relevanz der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren EPO und G-CSF ist ein qualitatives und quantitatives Verständnis ihrer Rolle in der Regulation von erythropoetischer und granulopoetischer Differenzierung und Proliferation außerordentlich wichtig. Eine Fülle von experimentellen Daten konnte hierzu in der Maus gewonnen werden. Diese Experimente beinhalten insbesondere Dauergaben dieser Wachstumsfaktoren, sowohl einzeln als auch in Kombination. In der eigenen Arbeitsgruppe sind bereits erfolgreich mathematische Modelle entwickelt worden, welche das linienspezifische Verhalten von Erythropoese (Dress, persönliche Kommunikation) und Granulopoese (Engel, 1999) unter Dauergaben von EPO und G-CSF in der Maus gut beschreiben. Zelllinienübergreifende Wirkungen, d.h. Wirkungen von EPO auf die Granulopoese und Wirkungen von G-CSF auf die Erythropoese, sowie das Verhalten bei gleichzeitiger Gabe dieser Substanzen, ist in diesen Modellen bislang nicht oder nur unzureichend untersucht. Des Weiteren besitzt das granulopoetische Modell keinen vollständig geschlossenen Kreis der G-CSF-vermittelten Regulation, das erythropoetische Modell berücksichtigt bislang nicht die Stammzellwirkungen von EPO.

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, mit Hilfe eines mathematischen Kompartimentmodelles der murinen Hämatopoese das dynamische Verhalten der Erythro- und Granulopoese unter kontinuierlicher und simultaner Stimulation mit G-CSF und Erythropoietin zu erklären. Es soll insbesondere ein Gesamtmodell der Granulo- und Erythropoese inklusive der vorgestellten Stammzellen mit vollständig geschlossenen Regelkreisen erarbeitet werden. Das Modell soll nicht nur die linienspezifischen Effekte der beiden Wachstumsfaktoren erklären, sondern auch die linienübergreifenden Effekte der Zytokine, die gegenseitigen Rückkopplungsmechanismen von Granulo- und Erythropoese und die auftretenden unterschiedlichen Verhaltensweisen in Knochenmark und Milz. Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist die Untersuchung einer kontinuierlichen Langzeitapplikation von G-CSF über eine Zeitspanne von acht Wochen bei normalen Mäusen. Hierzu ist die Implementierung pharmakokinetischer Aspekte der G-CSF-Eliminierung notwendig, die in den bisherigen Modellen keine Berücksichtigung fand. In einem dritten Teil der Arbeit wird die wachstumsfaktorabhängige Migration von Progenitorzellen zwischen den Kompartimenten Knochenmark und Milz qualitativ und quantitativ charakterisiert.

5 Biologische Grundlagen der Hämatopoese

In diesem Abschnitt werden die für das Verständnis der Arbeit notwendigen biologischen Grundlagen der Hämatopoese dargestellt.

5.1 Die Hämatopoese der Maus

Neben dem Knochenmark nimmt vor allem die Milz bei der Maus auch nach der Geburt einen wichtigen Platz in der Blutbildung ein. Während sich beim Menschen postnatal die Blutbildung auf das Knochenmark beschränkt, trägt in der Maus die Milz auch unter normalen Bedingungen einen Anteil von 2-15% zur Hämatopoese bei. Im Knochenmark beträgt das Verhältnis von Erythropoese zur Granulopoese beim Menschen 1:3, bei der Maus 1:1,6. In der Milz findet sich bei C57bl/6 Mäusen ein umgekehrtes Verhältnis von Erythropoese zu Granulopoese von 2:1.

Das Mikroumfeld des Knochenmarkes besteht neben hämatopoetischen Zellen auch aus einer Vielzahl nichthämatopoetischer Stromazellen wie Fibroblasten, Adipozyten und Endothelzellen. Diese Zellen sind essentiell für die Blutbildung und beeinflussen beispielsweise durch Zytokinproduktion die Proliferation und Reifung der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Kultivierung von hämatopoetischen Stammzellen im Gegensatz zu Progenitorzellen ohne Stromazellprodukte nicht gelingt. Die unterschiedliche Favorisierung von Erythro- und Granulopoese in Knochenmark und Milz resultiert möglicherweise aus der unterschiedlichen Zusammensetzung an Stromazellen und Stromazellprodukten.

Bei Mäusen wird für die experimentelle Untersuchung von Qualität und Quantität der hämatopoetischen Zellen das Knochenmark des Femurs herangezogen. Es wird postuliert, daß die hämatopoetische Zellmenge etwa 1/17 der gesamten hämatopoetischen Knochenmarkszellmenge ausmacht und in der Zusammensetzung repräsentativ für das gesamte Knochenmark ist (Wichmann und Loeffler, 1985). So läßt sich durch die relativ leichte Gewinnung des Femurknochenmarkes auf die totale hämatopoetische Knochenmarkszellmenge schließen. Durch Exstirpation und Untersuchung der Milz werden Qualität und Quantität der hämatopoetischen Zellen direkt bestimmt. Unter normalen Bedingungen werden weitere Lokalisationen der Hämatopoese der Maus wie z.B. die Leber vernachlässigt.

Im unstimulierten Normalzustand der murinen Hämatopoese befindet sich jeweils der größte Anteil der Progenitoren im Knochenmark.

5.2 Zellstufen

Der Aufbau des hämatopoetischen Systems läßt sich als Pyramidenstruktur mit Stammzellen an der Pyramidenspitze veranschaulichen. Die Zahl der Zellen steigt zur Basis kommend an, jedoch nehmen die Fähigkeiten zur Differenzierung und Proliferation ab.

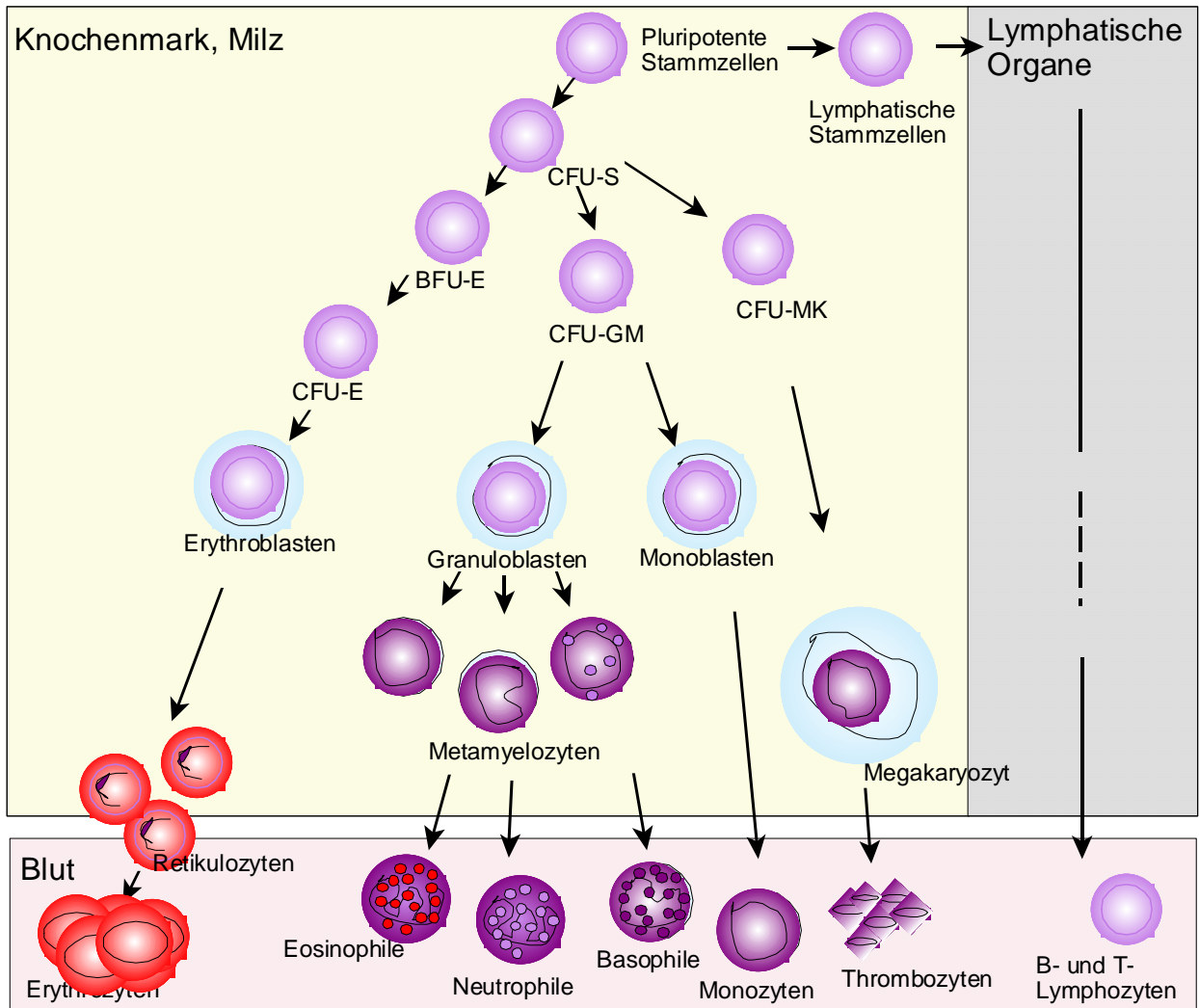


Abbildung 1: Schema der Blutzellendifferenzierung

Stammzellen

Stammzellen stehen am Anfang der hämatopoetischen Bahn. Aus einer geringen Anzahl dieser „pluripotenten“ Stammzellen, die bei der erwachsenen Maus nur 0,01% der Zellen des

Knochenmarkes ausmachen, entstehen durch Differenzierung und Zellteilung sämtliche hämatopoetische Zelllinien (McKinstry et al., 1997).

Klassischerweise werden adulte Gewebstammzellen über funktionelle Eigenschaften definiert. Es handelt sich um eine undifferenzierte Zelle, welche flexibel die Fähigkeit zur Differenzierung, Reifung, Proliferation und Selbsterhaltung (oder Expansion nach Störungen) besitzt. Es wurden eine Reihe von Modellen vorgeschlagen, darunter symmetrische und asymmetrische Teilungsmodelle, welche diese flexiblen Stammzeleigenschaften zu beschreiben versuchen (Potten und Loeffler, 1990). Neuere Einsichten in die Stammzellbiologie hinsichtlich Plastizität, Heterogenität und klonaler Fluktuation von Stammzellen zeigen jedoch, daß diese klassische zellbezogene Sichtweise zugunsten eines gewebebezogenen Konzeptes erweitert werden sollte, welche insbesondere die Interaktion zwischen der Stammzelle und ihrer Umgebung berücksichtigt. Entsprechende Konzepte und auch mathematische Modelle wurden vom Erstbetreuer dieser Arbeit und seinen Mitarbeitern entwickelt (Loeffler und Roeder, 2002; Loeffler und Roeder, 2004; Roeder, 2006; Roeder et al., 2006; Roeder und Loeffler, 2002; Roeder et al., 2003)

Ein direkter Nachweis der Stammzellen ist morphologisch - wie bei reifen Blutzellen - nicht möglich. Ein klassischer indirekter Nachweis beruht auf dem in-vivo Milz-Kolonieverfahren, welches 1961 von TILL und MCCULLOCH entwickelt wurde (Till und Mc, 1961). Die Bezeichnung CFU-S (Colony Forming Units Spleen) für die Stammzellen leitet sich hiervon ab. Ein später von PLOEMACHER und Mitarbeitern entwickeltes in-vitro Verfahren, der „cobblestone area forming cell“-Assay (CAFC), ermöglicht die quantitative Messung und die Differenzierung verschiedener Subtypen von Stammzellen (Ploemacher et al., 1991; Ploemacher et al., 1989). Die sogenannten CAFC-d14 korrelieren dabei mit den CFU-S.

Progenitoren

Aus den pluripotenten Stammzellen gehen durch Zellteilung und -differenzierung determinierte Progenitorzellen hervor. Sie lassen sich eindeutig einer Zelllinie zuordnen, haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren und besitzen nur ein beschränktes Reproduktionspotential.

Diese Progenitoren sind morphologisch ebenfalls nicht zu identifizieren. Durch in-vitro Zellkulturverfahren gelingt der Nachweis über Kolonien der reiferen spezifischen Zelllinien. Vertreter dieser Differenzierungsstufen sind die CFU-GM (colony forming units-granulocytes

macrophages) und BFU-E/CFU-E (burst/colony forming units-erythropoiesis). Die Anzahl der Progenitoren ist größer als die der pluripotenten Stammzellen, dennoch stellen sie weniger als 1% aller kernhaltigen Zellen des Knochenmarkes dar.

Die CFU-GM korrelieren gut mit den CAFC-d7. CFU-GM sind sensibel gegenüber G-CSF, GM-CSF, IL-11, IL-7 SCF (de Haan et al., 1995b; Varas et al., 1996; Wichmann und Loeffler, 1985).

Die BFU-E sind gegenüber Erythropoietin relativ unempfindlich (Erslev et al., 1980; Testa, 2004). Mit zunehmender Differenzierung steigt der Grad der Empfindlichkeit der erythropoetischen Zellen gegenüber Erythropoietin aufgrund zunehmender Ausbildung von Erythropoietin-Rezeptoren auf der Zellmembran an. Die Zellstufe der BFU-E differenziert sich in die Stufe der CFU-E, die sehr erythropoietinsensibel sind.

Morphologisch identifizierbare Präkursoren

Aus den CFU-GM gehen die morphologisch identifizierbaren Zellstufen der Granulopoese hervor. Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten besitzen noch die Fähigkeit zur Proliferation und gehören damit zum mitotischen Pool. Metamyelozyten, Stab- und Segmentkernige haben diese Fähigkeit verloren und gehören damit dem postmitotischen Pool (Reifungspool) an.

Als erythropoetische Präkursoren gehen aus den CFU-E die Erythroblasten hervor. Sie lassen sich morphologisch und funktionell unterscheiden. Pronormoblasten, basophile und polychromatische Normoblasten besitzen noch die Fähigkeit zur Proliferation und werden dem ersten mitotischen Subkompartiment zugeordnet. Es folgen die orthochromatischen Normoblasten, welche als ausreifende Zellstufen dem zweiten Subkompartiment angehören.

Neutrophile Granulozyten

Reife segmentkernige Neutrophile zirkulieren als neutrophile Granulozyten im peripheren Blut.

Retikulozyten

Mit dem Verlust des Zellkerns gehen die orthochromatischen Normoblasten in das Stadium der Retikulozyten über. Es werden organständige „residuale“ Retikulozyten des Knochenmarks und zirkulierende Retikulozyten des peripheren Blutes unterschieden. Letztere sind

bereits am Sauerstofftransport beteiligt. Der Pool der residualen Retikulozyten stellt eine schnell einsetzbare Reserve für den Sauerstofftransport dar.

Erythrozyten

Durch den Verlust von Mitochondrien und Ribosomen gehen Retikulozyten in Erythrozyten, über. Sie zeichnen sich durch eine relativ lange Halbwertszeit aus, bei der Maus 45 Tage, beim Menschen 120 Tage.

5.3 Zytokine und Zytokinnetzwerk

Es ist heute eine Vielzahl von Zytokinen bekannt, die auf die Produktion oder Funktion hämatopoetischer Zellen sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte haben. Einige entfalten ihre Wirkung nur auf eine bestimmte hämatopoetische Zellart, andere wiederum sind pleiotrop oder wirken sogar auf nichthämatopoetische Zellen. Einzelne hämatopoetische Zytokine wirken redundant, d.h. sie führen zum selben Effekt. Zytokine werden von vielen verschiedenen Zelltypen produziert, auch von hämatopoetischen Zellen (v.a. Lymphozyten und Monozyten), aber auch von Endothelzellen, Fibroblasten und Stromazellen. Zytokine werden nur in geringen Konzentrationen produziert und bilden ein kompliziertes Netzwerk und Kommunikationssystem. Nachfolgend werden kurz die wichtigsten biologischen Eigenschaften der Zytokine EPO und G-CSF beschrieben, welche Gegenstand der Modellierung sind.

5.3.1 Erythropoietin

Hauptregulator für die Erythropoese ist das Erythropoietin. Das 30 Kilodalton große Glykoprotein reguliert in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck die Produktion von roten Blutkörperchen.

Erythropoietin wird hauptsächlich in der Niere in den cortikalen peritubulären Zellen produziert (Fisher und Nakashima, 1992; Jacobson et al., 1957; Mirand und Prentice, 1957). Daneben bilden auch andere Zellen Erythropoietin wie Hepatozyten, Makrophagen und bestimmte Tumore (z.B. das zerebellare Hämangioblastom) (Bauer und Kurtz, 1989; Heit et al., 1981; Jeffreys et al., 1982; Koury et al., 1994). In der Fetal- und Neonatalperiode stellt die Leber die Hauptproduktionsstätte des Erythropoietins dar. Die Bildung findet dort in Kupfferzellen und Hepatozyten statt (Zanjani et al., 1977). Endothelzellen und interstitielle Zellen in

der Niere sind maßgeblich für die Bildung von Erythropoietin verantwortlich. Erythropoietin wird konstant in einer niedrigen Basalrate synthetisiert, bei Bedarf kann dieser Spiegel innerhalb weniger Stunden auf das 1000-fache ansteigen, ein Speichermechanismus besteht nicht. Das Hauptsignal für die Erythropoietinsynthese ist die Hypoxie. Die Hypoxie verursacht - vermittelt über eine komplexe Signalkaskade - u.a. über einen Sauerstoffhämrezeptor einen intrazellulären Anstieg des hypoxia-inducible transcription factor 1 (HIF-1). Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert weitere Gene und ihre Translationsprodukte und führt damit zu einem Anstieg von EPO in den Nierenzellen (Wang und Semenza, 1993). Weitere Zielgene von HIF-1 sind neben EPO auch Transferrin und VEGF (vascular endothelial growth factor).

Erythropoietin bindet an einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche, den sogenannten Erythropoietinrezeptor. Erythropoietinrezeptoren finden sich auf folgenden erythroiden Vorstufen (murin): BFU-E, CFU-E Gesamtzahl pro Zelle: 360, Affinität 0,073 bei 40%, 0,813 bei 60%), Erythroblasten (Gesamtzahl pro Zelle: 43-62, Affinität: 0,09) (Landschulz et al., 1989). CFU-E besitzen die stärkste Empfindlichkeit gegenüber Erythropoietin. BFU-E im Knochenmark sind relativ unempfindlich gegenüber Erythropoietin (Emerson et al., 1989). Über den EPO-Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkette getriggert, welche die Aktivierung von rezeptor-assoziiierter Tyrosin-Kinase (JAK2) und die Phosphorylierung und nukleäre Translokation von STAT5 beinhaltet und so zu Proliferation und Differenzierung der Progenitorzellen führt. Kürzliche Studien zeigten, dass Erythropoietin und -rezeptoren auch eine wichtige Rolle im Rahmen der Angiogenese spielen (Kertesz et al., 2004).

Erythropoietin führt zu folgenden Effekten auf die murine Hämatopoese (de Haan et al., 1995a; Nijhof et al., 1995; Nijhof et al., 1993):

- Anstieg der CFU-E, Erythroblasten und Retikulozyten im Knochenmark, nicht jedoch der BFU-E
- Verminderung der Apoptoserate der CFU-E und Erythroblasten
- zeitdauer- und dosisabhängiger Anstieg der CFU-E und Erythroblasten in der Milz
- dosisabhängiger Anstieg der CFU-GM in der Milz
- zeitdauer- und dosisabhängiger Anstieg der zirkulierenden Retikulozyten, Erythrozyten und des Hämatokrits
- Erhöhung der Differenzierungsrate CFU-E/BFU-E in der Milz

- Migration von BFU-E vom Knochenmark in die Milz

Erythropoietin wird klinisch zur Behandlung von Anämien eingesetzt, insbesondere bei renalen Anämien, aplastischer Anämie und Anämien im Rahmen von Chemo- oder Radiotherapie bei Tumorerkrankungen.

Das erste rekombinante Erythropoietinpräparat (Epogen[®], Epoietin α) - hergestellt in Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters - wurde 1989 von der US-amerikanischen Firma Amgen auf den Markt gebracht. Ein gentechnisch verändertes Molekül mit längerer Halbwertszeit wurde 2001 ebenfalls von Amgen entwickelt: Darbepoietin α (Aranesp[®]). Bei Erythropoietin delta (DynEpo[®]) handelt es sich um ein in humanen Zelllinien hergestelltes Molekül, welches 2007 in Deutschland zur Anämie-Behandlung bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zugelassen wurde.

5.3.2 G-CSF

G-CSF wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Als stimulierende Agentien *in vitro* sind u.a. LPS, TNF, IL-1, TPA, GM-CSF, IL-3, IL-4 und INF-gamma bekannt (Lenhoff und Olofsson, 1996). G-CSF besteht aus vier Helices, die durch Aminosäurebrücken verbunden sind. Die molekulare Masse beträgt etwa 20 kD (Demetri und Griffin, 1991).

Pharmazeutische Formen zum Gebrauch am Menschen umfassen das rekombinante nichtglykosylierte G-CSF von *E. coli* (Filgrastim[®], Amgen, USA), das von den Ovarzellen des Chinesischen Hamsters exprimierte glykosylierte Protein (Lenograstim[®], Chugai Pharmaceuticals, Japan) und ein Polyethylenglykol-konjugiertes G-CSF-Molekül (Neulasta[®], Amgen, USA). Die Glykosylierung stabilisiert das Molekül gegenüber Proteasen im Serum. Die nicht PEG-konjugierten Formen haben ähnliche biologische Aktivitäten und Bioverfügbarkeiten und können subkutan oder intravenös appliziert werden. Die PEG-Konjugation vermindert die renale Clearance und beeinflusst damit entscheidend die pharmakokinetischen Eigenschaften des Moleküls. Die Hauptzielzellen des G-CSF sind neutrophile Präkursoren und reife Neutrophile.

Der bei gesunden Menschen vorhandene G-CSF-Spiegel befindet sich im allgemeinen unter der Nachweisgrenze von 30 pg/ml. Unter Streßbedingungen wie z.B. Infektionen oder Hochdosischemotherapie sind drastische Anstiege auf über 2000 pg/ml zu beobachten (Demetri

und Griffin, 1991). Anstiege werden ebenfalls während der neutropenischen Phase einer zyklischen Neutropenie gemessen.

Das G-CSF-Gen ist auf Chromosom 17 q21-22 lokalisiert, neben anderen Genen, die in die Entwicklung der neutrophilen Granulozyten involviert sind. Das Gen des G-CSF-Rezeptors (CD114) wird auf Chromosom 1 p35-p34.3 kodiert. Er wird auf myeloischen Progenitorzellen, myeloischen und Leukämiezelllinien, reifen Neutrophilen, Thrombozyten, Monozyten und einigen T- und B-Zelllinien exprimiert (Boneberg et al., 2000; Budel et al., 1989; Hanzono et al., 1990; Shimoda et al., 1993). Außerdem finden sich G-CSF-Rezeptoren auf nichthämatopoetischen Zellen wie z.B. Endothelzellen, Plazenta, Trophoblastzellen und einigen kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (Avalos, 1996). Die Zahl der G-CSF-Rezeptoren pro granulöider Zelle steigt mit deren Differenzierung, murine reife Neutrophile weisen durchschnittlich 260 Rezeptoren/Zelle auf, Progenitoren 30 Rezeptoren/Zelle, Granuloblasten 160 Rezeptoren/Zelle und Promyelozyten und Myelozyten 200 Rezeptoren/Zelle (Nicola und Metcalf, 1985). Verschiedene granulozytenaktivierende Faktoren führen zu einer Herabregulierung der G-CSF-Rezeptorzahl: GM-CSF, TNF, LPS, C5a, Phorbolster. Mäuse mit experimenteller Elimination des G-CSF- oder G-CSF-Rezeptors-Gens weisen etwa $\frac{1}{4}$ der Neutrophilenzahl von gesunden Mäusen auf (Lieschke et al., 1994).

G-CSF führt zu folgenden Effekten auf die murine Hämatopoese (Bungart et al., 1990; Chang et al., 1989; Cronkite et al., 1993; de Haan et al., 1992; Drize et al., 1996; Drize et al., 1995; Drize et al., 1993; Lee et al., 1991; Lord et al., 1991; Molineux et al., 1990a; Molineux et al., 1990b; Neben et al., 1993; Nijhof et al., 1994; Patchen et al., 1990; Pojda et al., 1990; Pojda et al., 1992; Roberts und Metcalf, 1994; Tamura et al., 1987; Uchida und Yamagiwa, 1992; Ulich et al., 1991; Varas et al., 1996; Yamagiwa, 1991):

- Verminderung der CFU-S, CFU-GM, BFU-E und CFU-E im Knochenmark
- Anstieg der CFU-S, CFU-GM, BFU-E und CFU-E in der Milz
- Anstieg der zirkulierenden Stammzellen und Progenitoren im peripheren Blut: CFU-S, BFU-E, CFU-E, CFU-GM
- dosis- und zeitdauerabhängige Erhöhung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut
- Auftreten einer Anämie bei splenektomierten Mäusen, jedoch nicht bei Normaltieren
- Verminderung der Transitzeit der postmitotischen Granuloblasten

- kein Effekt auf die Überlebenszeit der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten
- Inhibition der Erythropoese im Knochenmark
- Stimulation der Erythropoese in der Milz

Das klinische Einsatzgebiet von G-CSF besteht in der Behandlung von Neutropenien verschiedener Arten, so beispielsweise zur Therapie der schweren kongenitalen Neutropenie (Welte et al., 1990). Diese ist charakterisiert durch einen Reifungsstopp der myeloischen Zellen im Knochenmark mit folgender drastischer Reduktion der peripheren Neutrophilenzahl und dem Auftreten von schwerwiegenden bakteriellen Infektionen. Des Weiteren wird G-CSF zur Mobilisierung von Blutstammzellen (PBSC) zur Stammzelltransplantation eingesetzt (Begley et al., 1997; Molineux et al., 1990b; Varas et al., 1996). Der Mechanismus der Mobilisierung der PBSC durch G-CSF ist noch nicht vollständig geklärt. Es werden Mechanismen wie die Freisetzung von proteolytischen Enzymen, Aktivierung von Zytokinrezeptoren und Modulation von Adhäsionsmolekülen diskutiert (Lapidot und Petit, 2002; Thomas et al., 2002). G-CSF mobilisiert außerdem neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark (Semerad et al., 2002).

Tabelle 1: Übersicht über die Haupteffekte und klinische Einsatzgebiete von G-CSF

Effekt	Einsatz	Literatur
Mobilisierung von CD34+ periphere Blutstammzellen (PBSC) dosisabhängig abhängig von Ausgangswert CD34+-PBSC übliche Dosis 10-16 µg/kg/d	autologe und allogene Stammzellinfusion nach myeloablativer Chemotherapie	(Molineux et al., 1990b)
Erhöhung der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut	Neutropenie im Rahmen der Chemotherapie und Stammzelltransplantation Langzeittherapie bei chronischer Neutropenie (z.B. zyklische Neutropenie, Kostmann-Syndrom)	(Welte et al., 1990)
Aktivitätserhöhung der Funktion der Neutrophilen	Invasive Pilzinfektionen bei neutropenischen Patienten, Neutropenisches Fieber, Adjuvante Therapie bei Infektionen in nichtneutropenischen Patienten (Effekt umstritten)	(Kullberg et al., 2004)
Mobilisierung von Neutrophilen	Leukapherese bei gesunden Spendern zur Granulozytentransfusion (experimentelle Therapie)	(Semerad et al., 2002)

Unerwünschte Wirkungen des G-CSF beim Menschen umfassen vor allem Knochen- und Muskelschmerzen (bei 20-30% der Patienten), Anämie, Thrombozytopenie, Reaktionen am Injektionsort (bis zu 2%), Splenomegalie, respiratorische Störungen und selten allergische Reaktionen. Bisher sind auch nach Langzeitapplikation keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beschreiben. Es gibt keine ausreichenden Hinweise dafür, dass G-CSF selbst eine maligne Transformation hervorruft oder eine bestehende maligne Erkrankung verschlechtert.

5.3.3 Wirkung kombinierter Erythropoietin- und G-CSF-Gabe

Die kombinierte exogene Zufuhr von Erythropoietin und G-CSF führt gegenüber der alleinigen Gabe zu folgenden Effekten (Bessho et al., 1992; Pierelli et al., 1994; Pierelli et al., 1999):

- früherer und größerer Anstieg der zirkulierenden CFU-GM und BFU-E im peripheren Blut im Vergleich zu alleiniger G-CSF-Gabe (Mensch)
- Nadir der Leukozyten und des Hämatokrits höher im Vergleich zu alleiniger G-CSF-Gabe (Mensch, Chemotherapie)
- zirkulierende Progenitorzellen (PBPC) im peripheren Blut höher im Vergleich zu alleiniger G-CSF-Gabe
- Anstieg der Erythro-, Granulo- und Thrombozyten (Mensch, aplastische Anämie)

Die therapeutische simultane Applikation von G-CSF und Erythropoietin beim Menschen wird im allgemeinen gut toleriert (Negrin et al., 1996; Negrin et al., 1993; Olivieri et al., 1995; Pierelli et al., 1994; Pierelli et al., 1996). Als unerwünschte Wirkungen der Kombinationstherapie werden Milz- und Knochenschmerzen beschrieben. Pierelli zeigte, dass rh-EPO *in vitro* den Effekt von rh-G-CSF auf hämatopoetische Progenitoren bezüglich Proliferation und Differenzierung potenziert (Pierelli et al., 1994). Bei 5 Patientinnen mit Ovarialkarzinom und nach zytostatischer Therapie erbrachte der kombinierte Einsatz der beiden Zytokine keinen signifikanten Unterschied in der Erholung der Thrombo- und Granulozytenzahlen, der Nadir des Hämatokrits lag signifikant höher, die Anzahl der zirkulierenden CFU-GM und BFU-E höher als in der Kontrollgruppe, die rh-G-CSF alleine erhielt.

In einzelnen kleineren Studien gelang es nicht eine Überlegenheit der Kombinationstherapie von Erythropoietin und G-CSF bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom nachzuweisen. Hier werden zu hohe Erythropoietindosen und zu niedrige G-CSF-Dosen für das Versagen verantwortlich gemacht (Imamura et al., 1994; Musto et al., 1994).

Bei einer kombinierten Gabe von G-CSF und EPO im Vergleich zur alleinigen Gabe von G-CSF bei einer kleinen Anzahl (N=38) von Kindern, die aufgrund eines Neuroblastoms Chemotherapie erhielten, konnte kein Benefit der kombinierten Gabe gezeigt werden (Wagner et al., 2004). Die Kinder, die mit G-CSF und EPO behandelt wurden benötigten häufiger Bluttransfusionen. Als Ursache hierfür wird die durch Chemotherapie gestörte Erythropoese mit wenig verbleibenden erythroiden Progenitoren angenommen. Es traten jedoch keine unerwünschten Wirkungen auf, die ein Abbrechen der kombinierten Zytokingabe erforderlich machten. Es trat kein Unterschied bezüglich Neutro- und Thrombozytopenie auf, so dass nicht von einer Stammzellkompetition auszugehen ist.

Bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) liegen Berichte vor über den effektiven Einsatz von EPO und G-CSF und damit verbundenen höheren Responseraten (Kasper et al., 2002; Li, 2005).

Echte unerwünschte Wirkungen über den kombinierten Einsatz von EPO und G-CSF finden sich nicht. Es besteht jedoch eine höhere Kostenintensität und in einigen Untersuchungen ein fehlender Vorteil der Kombinationsgabe (Casadevall et al., 2004; Vannucchi et al., 1996).

Tabelle 2: Übersicht über die Haupteffekte und klinische Einsatzgebiete kombinierter Gaben von G-CSF und EPO

Effekt	Einsatz	Literatur
- Mobilisierung von CD34+ peripheren Blutstammzellen (PBSC) - Anstieg von immunkompetenten Zellen (CD14+ myeloische Zellen, CD20+ B-Zellen, CD56+ NK-Zellen)	- autologe und allogene Stammzellinfusion nach myeloablativer Chemotherapie	(Joshi et al., 2000; Olivieri et al., 1995; Pierelli et al., 1994; Pierelli et al., 1999; Pierelli et al., 1996)
- synergistischer in vivo Effekt auf Stimulation der Erythro-, Granulo- und Thrombopoese	- aplastische Anämie	(Bessho et al., 1992; Hellstrom-Lindberg et al., 1993; Imamura et al., 1995; Negrin et al., 1993)
- Anstieg von Hämatokrit, Retikulozyten, Leukozyten	- myelodysplastisches Syndrom	(Negrin et al., 1996; Negrin et al., 1993)

5.4 Hämatopoese splenektomierter Mäuse

Nach Splenektomie weisen Mäuse einen Anstieg der Retikulozyten, Leukozyten und Thrombozyten und eine erythrozytäre Makrozytose auf (Fiala und Viktora, 1976). Die Zahl der Stammzellen im Knochenmark ist am 8. postoperativen Tag leicht erhöht, gleicht sich im weiteren zeitlichen Verlauf jedoch der Kontrollgruppe an. Die absolute Zellzahl von CFU-E ist bei splenektomierten Mäusen gegenüber Normaltieren erhöht. Der Hämatokrit bleibt annähernd konstant (Weinberg und MacVittie, 1981). Die Erhöhung der Leukozyten beläuft sich auf den 2-4-fachen Wert von Normaltieren. Die Veränderungen resultieren nicht aus einem operativen Blutverlust, sondern sind auf die sogenannte "Asplenie" zurückzuführen, bei der die Milz als Zellfilter fehlt. Mäuse mit kongenitaler Asplenie weisen ebenfalls eine deutliche Leukozytose und Thrombozytose auf (Fiala und Viktora, 1976).

Literaturdaten zum Verhalten splenektomierter Mäuse unter Einzelgaben von G-CSF oder Erythropoietin

In einem Experiment von Cronkite zeigt sich, dass normale und splenektomierte Mäuse nach Stimulation mit 250 µg/kg/d G-CSF nach 20 Tagen signifikant anämisch sind (Cronkite et al., 1993). Die aufgetretene makrozytäre Anämie läßt sich unter 50 und 100 U/d EPO nicht beheben, erst unter 200 U/d EPO zeigt sich ein schwacher Wiederanstieg der Erythrozyten. Molineux fand ebenfalls eine supprimierte Erythropoese bei splenektomierten Mäusen unter G-CSF-Therapie (Molineux et al., 1990a). Daneben wiesen die Mäuse eine gesteigerte extramedulläre Blutbildung und erhöhte Stammzellen im peripheren Blut auf.

Experimentelle Daten von de Haan et al. bei splenektomierten Mäusen zeigen nach 7-tägiger Stimulation rh-G-CSF einen dosisabhängigen Abfall der CFU-E und BFU-E im Knochenmark gegenüber Normaltieren ohne Auftreten einer Anämie in beiden Gruppen. Die Neutrophilie ist bei splenektomierten Tieren ausgeprägter. Erythropoietin führt dosisabhängig zu einem Anstieg des Hämatokrits, der jedoch geringer ausgeprägt ist als bei Normaltieren. Auch Molineux beschreibt einen 2-fach größeren stimulatorischen Effekt durch G-CSF in Bezug auf die Neutrophilen bei splenektomierten Mäusen im Vergleich zu normalen Tieren (Molineux et al., 1990a). Daten von McDonald zeigen neben gesteigerter Erythropoese einen Abfall der Thrombozyten unter hohen Dosen EPO in normalen und splenektomierten Mäusen (McDonald et al., 1992).

Abbildung 3 vergleicht die Ausgangswerte von splenektomierten und normalen Mäusen im neuen Gleichgewichtszustand zwei Monate nach Splenektomie.

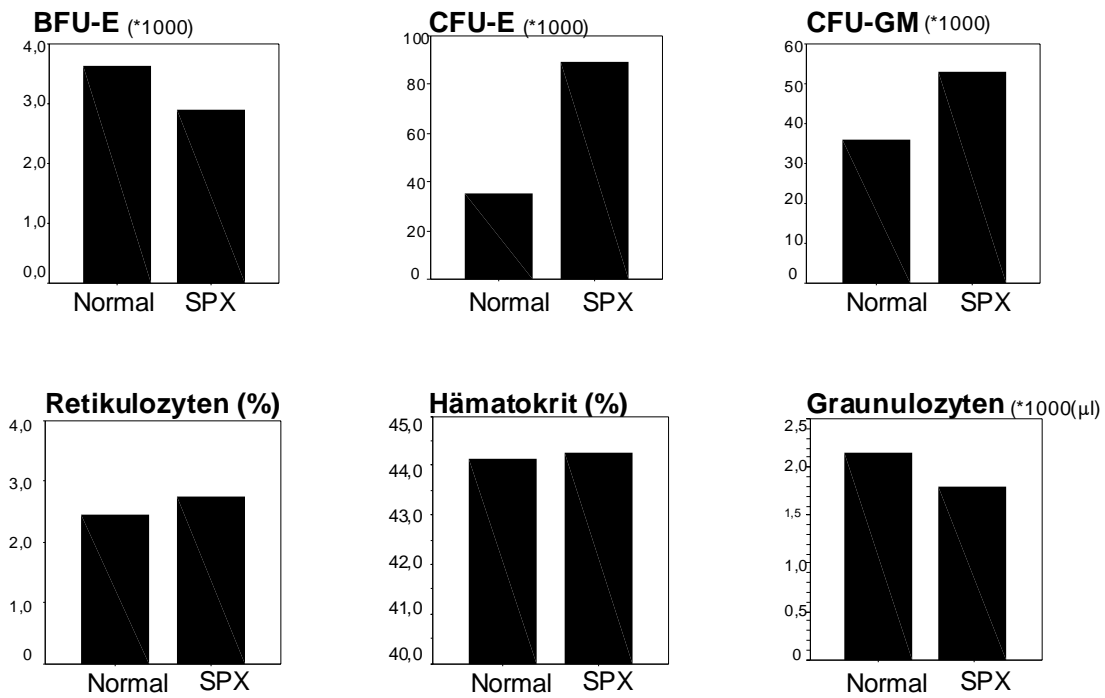


Abbildung 2: Vergleich des hämatopoetischen Ausgangszustandes normaler und splenektomierter Mäuse vor Beginn der Stimulation (2 Monate nach Splenektomie). Experimentelle Daten von de Haan (de Haan et al., 1994).

6 Stand der Forschung

Mathematische Modelle der murinen und menschlichen Hämatopoese wurden bereits in der eigenen Arbeitsgruppe erarbeitet. Hierbei erfolgte jedoch hauptsächlich eine separate Betrachtung der Erythropoese, Granulopoese und auch Thrombopoese (Engel, 1999; Kliem, 2001; Kribs, 1992; Loeffler et al., 1989; Pantel et al., 1990; Scheduling et al., 1992). Anhand von experimentellen Daten zu Einzelfaktorgaben wurden im Modell sowohl zeitliche Verläufe als auch Dosis-Wirkungskurven optimiert. Eine weitere Anpassung erfolgte durch Überprüfung verschiedener Szenarien wie z.B. Blutungsanämie, Hypertransfusion oder Splenektomie.

Die in der Arbeitsgruppe erstellten mathematischen Hämatopoese-Modelle gehen im wesentlichen auf die Entwicklungen von Wichmann und Wulff zurück (Wichmann und Loeffler, 1985; Wulff et al., 1989). Nachfolgend wurden sowohl das Erythropoese- als auch das Granulopoese-Modell anhand aktueller Daten überarbeitet. Die den Modellen zugrundeliegenden wesentlichen Regulationsmechanismen werden unter 7.3 beschrieben.

Ein von Engel optimiertes murines Granulopoese-Modell umfasst im wesentlichen folgende Regulationsmechanismen: von G-CSF dosisabhängige Verminderung der Apoptoserate reifer Neutrophiler im Knochenmark und Milz, Erklärung des komplementären Stammzell- und Progenitorzellverhaltens von Knochenmark und Milz einerseits durch Migration von Stamm- und Progenitorzellen vom Knochenmark in die Milz, andererseits durch lokal differente Proliferationseigenschaften und Auswirkungen der G-CSF-Applikation auf die erythropoetischen Progenitoren im Knochenmark. Anhand von experimentellen Daten zur kontinuierlichen 7-tägigen subkutanen Applikation von rekombinanten humanen G-CSF in 5 Dosisstufen (0 bis 2,5 µg/Maus/Tag) bei C57bl/6 Mäusen wurden die Annahmen mittels Dosis-Wirkungskurven für den hämatopoetischen Systemzustand an Tag 7 überprüft. Die experimentellen Arbeiten wurden durch eine kooperierende Arbeitsgruppe an der Universität Groningen, Niederlande, durchgeführt.

Das murine Erythropoese-Modell wurde von Dress um folgende regulatorische Schritte erweitert: erythropoietinabhängiger Anteil der lienalen Erythropoese, erythropoietinabhängige Verdopplungszeit der Zellen in proliferativen Kompartimenten, verminderte Amplifikation der lienalen proliferativen Erythroblasten unter Erythropoietingabe zugunsten einer Erhöhung der Amplifikation der lienalen CFU-E, Einführung der Apoptose. Im Modell von Dress ist die Regulation der Stammzellen nicht berücksichtigt. Die Entwicklung des Standardparametersatzes geht auf experimentelle Daten des oben genannten Kooperationspartners zurück, wobei C57bl/6 Mäusen kontinuierlich über 10 Tage subkutan 8 verschiedene Dosisstufen (0,5 bis

500 Units/Maus/Tag) von humanem rekombinantem Erythropoietin verabreicht wurde (Nijhof et al., 1993).

Diese beiden weitgehend getrennten Modelle für Erythropoese und Granulopoese beschreiben bisher die Effekte der Wachstumsfaktoren auf die komplementäre Zelllinie nur unzulänglich. Des weiteren wurden bisher lediglich Einzelfaktorgaben modelliert. Durch die nun vorhandenen Daten zur simultanen Stimulation durch G-CSF und Erythropoietin in verschiedenen Dosisstufen ist es möglich ein gemeinsames Erythro- und Granulopoesemodell mit Stammzellkompartiment und allen Rückkopplungsmechanismen zu implementieren.

7 Material und Methode

7.1 Experimentelle Daten

Die in dieser Arbeit betrachteten experimentellen Daten wurden durch eine kooperierende Arbeitsgruppe (Willem Nijhof und Gerald de Haan, Laboratory of Physiological Chemistry, University of Groningen, Groningen, Niederlande) im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projektes erhoben und zur Auswertung überlassen. Diese Daten beinhalten im Gegensatz zu den in der Literatur verfügbaren Daten die simultane Bestimmung aller wesentlichen Zellstufen sowohl im Knochenmark als auch in der Milz und eignen sich deshalb in besonderer Weise für die Modellanalyse.

7.1.1 Simultane Gabe von EPO und G-CSF

Nijhof und de Haan stimulierten Mäuse des Stammes C57Bl/6 simultan über 7 Tage mit rekombinantem humanen EPO (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) und rekombinantem humanen G-CSF (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) in verschiedenen Dosierungen in einem faktoriellen Design. Die Applikation erfolgte kontinuierlich über subkutan implantierte osmotische Minipumpen. Gemessen wurde der hämatopoetische Systemzustand am Tag 7. Bestimmt wurden alle im Modell betrachteten Zellstufen mit Ausnahme der Stammzellen. Die Meßdaten sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 vollständig dargestellt.

Tabelle 3: Einzelmausdaten zur 7-tägigen Stimulation mit Erythropoietin und G-CSF in verschiedenen Dosen:
Knochenmark

EPO [U]	G-CSF [µg]	Femur			
		BFU-E [10 ³]	CFU-E [10 ³]	CFU-GM [10 ³]	nukleäre Zellen [10 ⁶]
0	0	6,1	9,8	28,4	20,7
0	0	3,4	20,6	27,1	22,9
0	0	3,4	33,2	38,4	n.d.
0	0	1,5	56,1	38,3	n.d.
0	0	1,2	31,1	33,5	n.d.
0	0	2,5	42,2	23,1	22,0
0	0	4,8	18,9	43,3	24,1
0	0	3,1	27,7	33,8	27,1
0	0	5,4	13,3	48,0	25,3
0	0	3,1	75,2	33,8	27,1
0	0	5,4	60,0	48,0	25,3
2,50	0	6,2	20,0	41,0	29,3
2,50	0	4,8	n.d.	46,9	29,0
2,50	0,25	7,6	23,9	61,4	32,6
2,50	0,25	n.d.	n.d.	n.d.	24,6
2,50	2,50	0,6	0,3	21,0	25,9
2,50	2,50	2,2	0,3	29,5	24,9
25,00	0	3,7	60,0	30,7	27,9
25,00	0	3,8	n.d.	30,7	29,3
25,00	0,25	3,5	37,8	55,4	29,7
25,00	0,25	0,9	n.d.	34,4	26,8
25,00	2,50	1,5	0,8	24,6	24,6
25,00	2,50	0,6	0,5	20,9	23,9
0	0,05	0,9	77,8	27,3	27,3
0	0,05	4,6	78,5	22,6	25,2
0	0,05	4,8	85,0	31,8	29,3
0	0,25	6,5	9,5	48,9	30,6
0	0,25	4,1	7,1	42,9	29,9
0	0,25	1,1	62,6	41,1	33,3
0	0,25	0,8	32,7	18,3	24,9
0	0,25	3,8	18,9	26,9	25,3
0	0,625	1,2	18,5	25,6	32,0
0	0,625	0,4	7,9	13,7	23,6
0	0,625	1,0	6,1	17,8	30,5
0	2,50	1,2	0,2	28,6	24,9
0	2,50	0,8	0,4	19,3	18,1
0	2,50	0	1,0	13,5	19,8
0	5,00	0,3	0,2	13,2	22,0
0	5,00	0,3	0	17,4	21,4
0	5,00	0,3	0,2	18,7	21,7

Tabelle 4: Einzelmausdaten zur 7-tägigen Stimulation mit Erythropoietin und G-CSF in verschiedenen Dosen: Milz und peripheres Blut

EPO [U]	G-CSF [µg]	Milz				peripheres Blut			
		BFU-E [10 ³]	CFU-E [10 ³]	CFU-GM [10 ³]	nukleäre Zellen [10 ⁶]	RET [%]	HKT [%]	GRA [10 ⁶]	PLT [10 ⁶]
0	0	2,4	9,1	1,2	102,0	0,60	45,0	1,3	5,6
0	0	2,2	2,7	1,1	91,0	1,00	46,0	1,4	5,1
0	0	7,3	18,5	2,6	n.d.	n.d.	44,0	n.d.	n.d.
0	0	3,6	40,9	0,9	n.d.	n.d.	44,0	n.d.	n.d.
0	0	4,9	6,6	1,5	n.d.	n.d.	44,5	n.d.	n.d.
0	0	1,0	3,9	2,1	157,8	2,50	43,6	2,0	10,0
0	0	4,9	109,1	11,4	185,7	4,00	44,4	1,8	8,8
0	0	1,6	40,0	4,4	160,0	2,00	44,6	1,7	8,3
0	0	7,3	97,7	26,3	195,4	4,30	42,5	3,7	9,6
0	0	1,6	40,0	4,4	160,0	1,00	44,6	1,6	8,3
0	0	7,3	97,7	26,3	195,4	4,30	42,5	3,7	9,6
2,50	0	8,7	46,4	7,4	161,4	7,50	46,0	2,0	6,6
2,50	0	9,7	n.d.	11,7	162,3	3,20	44,5	2,2	9,0
2,50	0,250	14,7	239,0	25,4	173,2	4,50	46,0	3,6	11,3
2,50	0,250	n.d.	n.d.	n.d.	200,1	3,70	46,3	3,8	11,8
2,50	2,500	2,2	637,7	100,8	263,1	6,20	40,0	10,7	23,2
2,50	2,500	18,2	220,8	264,3	182,3	3,00	47,1	1,3	6,1
25,00	0	21,2	1382,4	34,7	289,0	17,50	50,0	2,6	10,1
25,00	0	23,9	n.d.	71,8	398,9	20,70	58,2	7,2	18,2
25,00	0,250	16,1	2185,0	105,6	358,2	3,20	57,0	2,9	14,5
25,00	0,250	97,1	n.d.	468,5	571,3	9,00	52,2	6,2	22,1
25,00	2,500	29,3	1151,1	485,5	418,5	10,20	51,0	28,9	48,2
25,00	2,500	57,1	628,5	502,8	571,4	8,00	55,2	29,4	37,7
0	0,050	1,5	11,5	0,8	82,8	1,30	43,9	0,4	2,9
0	0,050	1,2	17,6	1,6	117,7	3,00	46,0	0,4	4,9
0	0,050	0,9	46,1	2,3	142,0	2,60	42,7	1,0	6,3
0	0,250	20,1	164,7	53,0	219,0	2,20	44,0	3,5	12,7
0	0,250	24,4	n.d.	44,7	203,2	3,20	42,0	4,8	14,0
0	0,250	0,9	114,4	10,5	176,1	3,00	45,3	1,4	7,1
0	0,250	10,0	131,5	29,3	202,3	3,60	41,5	1,3	3,5
0	0,250	4,3	314,6	13,3	190,7	1,80	42,1	0,9	6,9
0	0,625	9,9	905,1	118,5	329,1	3,00	43,8	8,7	17,1
0	0,625	22,9	718,3	120,7	287,3	3,00	45,6	6,3	14,1
0	0,625	39,6	825,6	208,0	330,2	3,00	41,7	11,1	24,7
0	2,500	10,2	579,7	192,6	341,0	4,70	33,0	28,9	37,0
0	2,500	12,8	448,7	219,7	366,2	3,00	45,7	25,5	33,5
0	2,500	n.d.	364,0	155,4	280,0	,60	46,9	16,2	25,8
0	5,000	11,2	939,1	375,6	375,4	4,30	41,5	17,0	29,9
0	5,000	45,2	835,0	375,7	347,8	2,10	38,0	12,2	20,0
0	5,000	20,0	367,4	344,0	334,0	4,00	40,6	15,4	22,3

In einem anderen Experiment wurden splenektomierte Mäuse mit EPO und G-CSF via subkutan implantierter osmotischer Minipumpen stimuliert. Das Experiment ist als 4 x 4 faktorielles

Design konzipiert, d.h. 4 Dosisstufen von Erythropoietin und 4 Dosisstufen von G-CSF wurden untersucht (Tabelle 5).

Tabelle 5: Einzelmausdaten zum SPX-Experiment: experimentelle Daten des Systemzustandes an Tag 7 nach 7-tägiger simultaner Stimulation mit G-CSF und EPO via subkutan osmotischer Minipumpen.

EPO [U]	G-CSF [µg/kg]	Femur				peripheres Blut		
		BFU-E [10 ³]	CFU-E [10 ³]	CFU-GM [10 ³]	nukleäre Zellen [10 ⁶]	RET [%]	HKT [%]	GRA [10 ⁶]
0	0	2,4	75,6	64,9	21,2	2,00	47,0	1,9
0	0	3,4	103,6	41,0	18,4	3,50	41,5	1,7
0	10,0	3,9	27,4	47,1	27,9	1,50	45,0	6,6
0	10,0	5,2	51,0	53,4	31,4	3,70	n.d.	3,6
0	25,0	2,9	18,5	40,2	33,1	0,200	45,0	15,3
0	25,0	1,6	16,6	24,6	24,8	1,00	43,0	27,3
0	100,0	1,0	3,3	21,0	24,5	0,200	41,0	37,8
0	100,0	0,5	3,0	16,7	23,1	0,700	41,5	36,6
0,50	0	4,4	62,2	51,0	18,7	1,20	45,2	1,0
0,50	0	4,7	126,8	47,0	19,9	2,20	41,1	2,6
0,50	10,00	2,1	56,6	46,0	23,5	2,00	44,1	4,3
0,50	10,00	5,2	46,5	44,4	26,8	1,70	45,0	5,2
0,50	25,00	2,4	21,1	37,5	26,1	0,200	41,5	26,6
0,50	25,00	1,6	16,0	25,4	22,3	0,500	41,5	24,6
0,50	100,0	0,2	0,4	14,8	19,3	0,200	42,5	36,1
0,50	100,0	0,5	1,5	11,5	24,7	0,700	39,4	21,5
5,00	10,00	5,7	84,5	45,0	23,8	3,00	47,0	2,9
5,00	10,00	4,1	100,3	36,0	25,7	2,50	47,4	6,3
5,00	25,00	7,1	30,7	36,0	30,6	2,50	44,6	13,4
5,00	25,00	2,5	15,4	29,0	24,4	2,70	44,1	29,4
5,00	100,0	0,1	2,4	21,4	29,1	1,20	43,1	44,1
5,00	100,0	0,2	2,7	14,8	20,0	1,00	40,9	31,4
50,0	0	n.d.	320,1	26,1	12,5	7,70	55,9	2,1
50,0	0	2,2	327,0	27,3	12,9	9,70	51,3	4,5
50,0	10,00	1,4	230,0	31,1	14,9	17,7	50,4	5,6
50,0	10,00	4,8	108,3	28,2	17,9	9,70	44,9	2,9
50,0	25,00	1,6	73,4	37,0	19,3	4,20	48,5	3,9
50,0	25,00	5,0	86,0	35,5	18,2	6,00	50,7	9,9
50,0	100,0	0,6	10,1	23,1	20,3	1,70	48,1	12,1
50,0	100,0	0,7	6,7	22,1	22,3	2,00	44,4	11,7

Die Mittelwerte der einzelnen Zellstufen an Tag 7 der Stimulation für die jeweilige Dosiskombination sind in Abbildung 3 bis Abbildung 6 grafisch dargestellt.

Normale Maus:

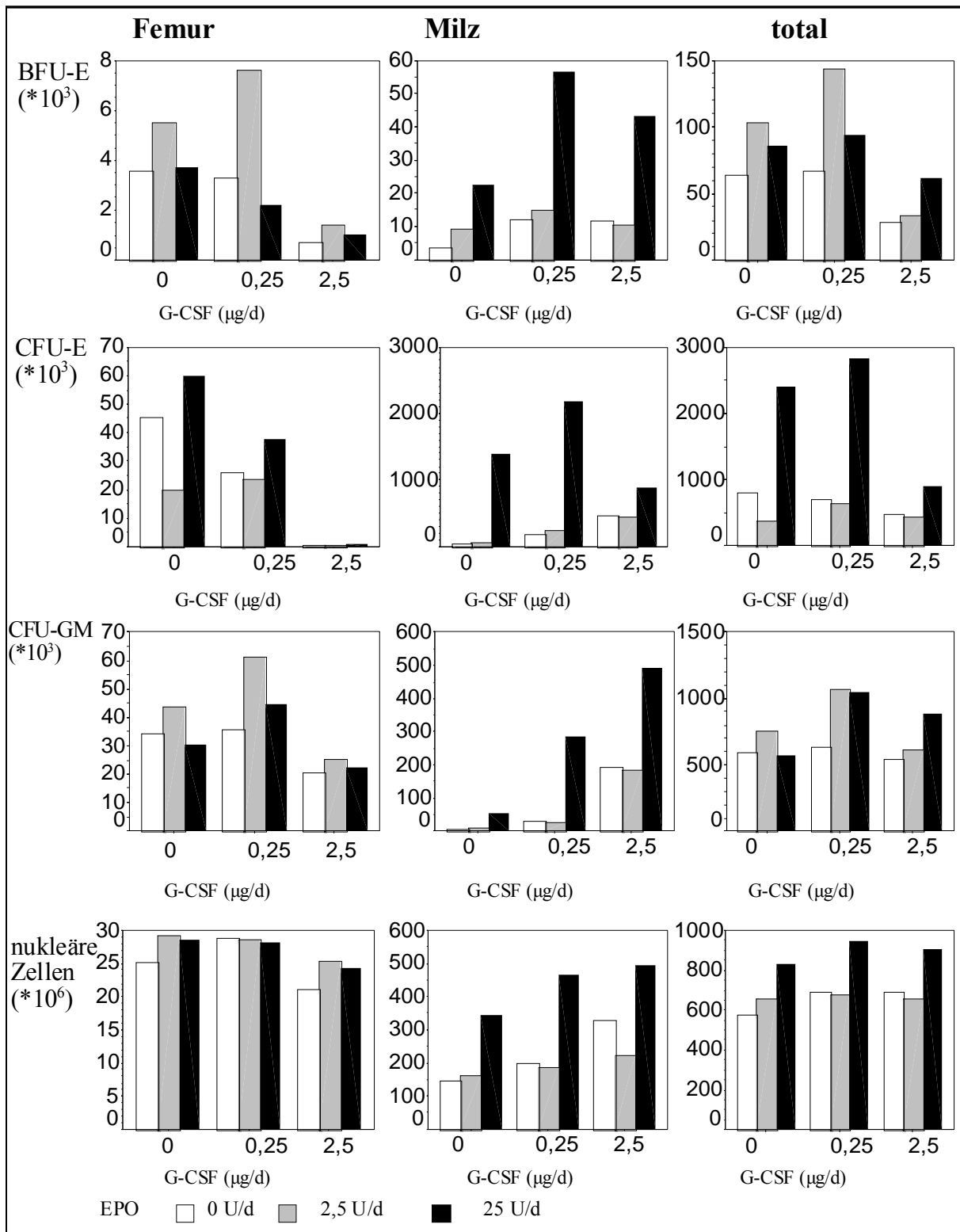


Abbildung 3: Knochenmark/Milz: Experimentelle Daten zur simultanen kontinuierlichen Gabe von unterschiedlichen Dosierungen von G-CSF und Erythropoietin bei normalen Mäusen, Mittelwerte der Zellstufen am 7. Tag der Stimulation. Dosisstufen: G-CSF: 0, 0,25 und 2,5 µg/d, EPO: 0, 2,5 und 25 U/d (Roeder et al., 1998).

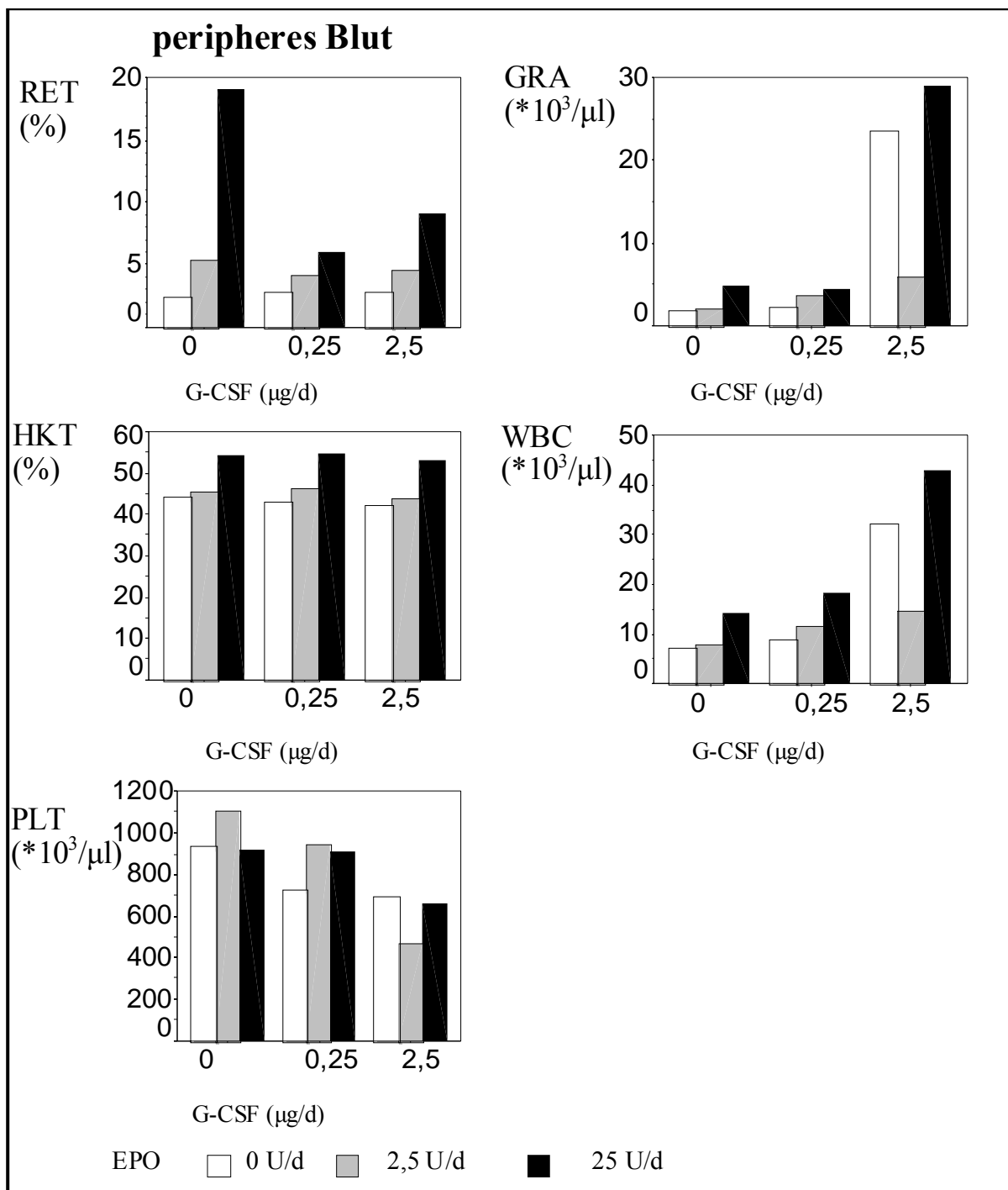


Abbildung 4: Peripheres Blut: Experimentelle Daten zur simultanen kontinuierlichen Gabe von unterschiedlichen Dosierungen von G-CSF und Erythropoietin bei normalen Mäusen, Mittelwerte der Zellstufen am 7. Tag der Stimulation. Dosisstufen: G-CSF: 0, 0,25 und 2,5 µg/d, EPO: 0, 2,5 und 25 U/d (Roeder et al., 1998).

Splenektomierte Maus:

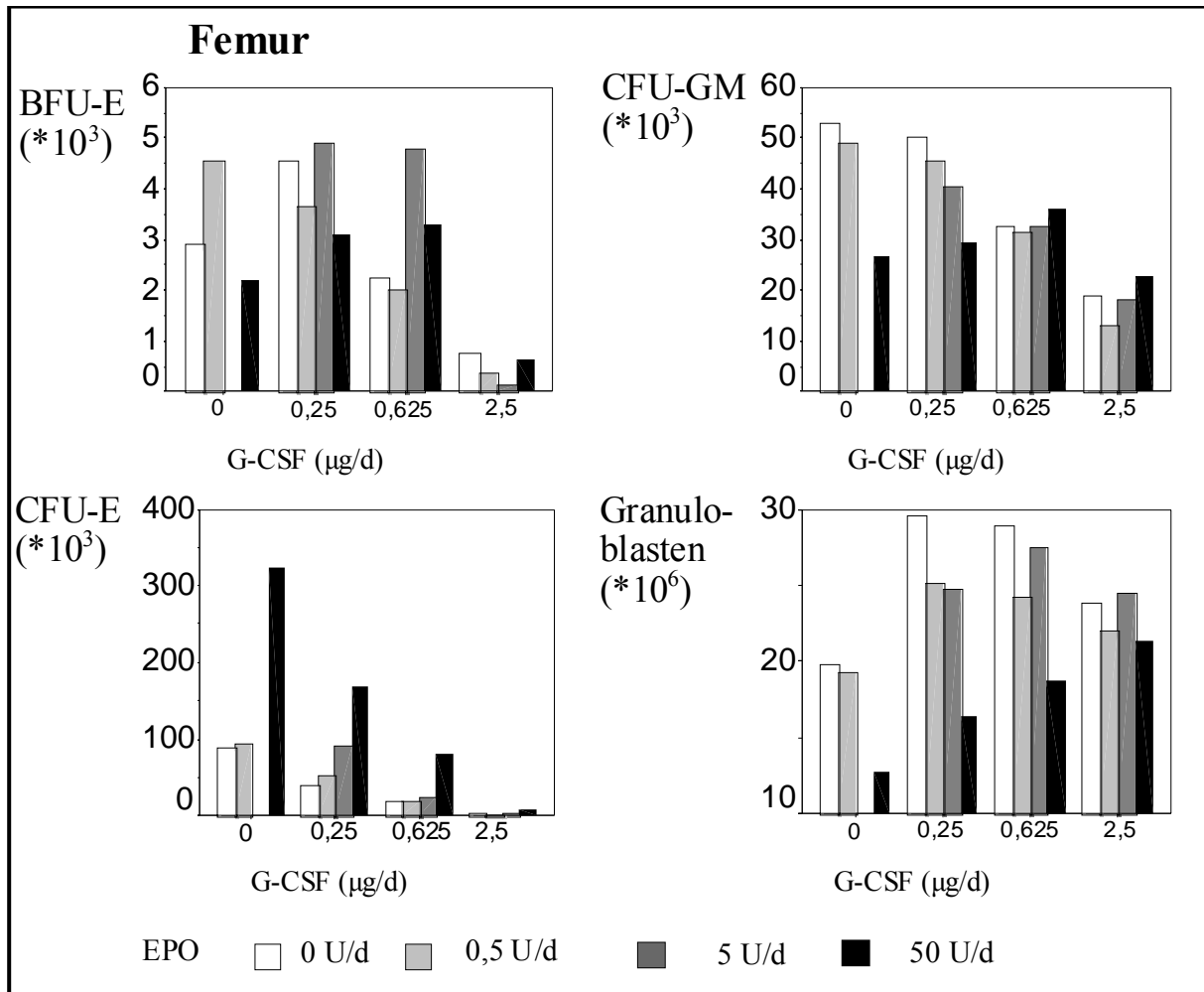


Abbildung 5: Knochenmark: Experimentelle Daten zur simultanen kontinuierlichen Gabe von unterschiedlichen Dosierungen von G-CSF und Erythropoietin bei splenektomierten Mäusen, Mittelwerte der Zellstufen am 7. Tag der Stimulation. Dosisstufen: G-CSF: 0, 0,25, 0,625 und 2,5 µg/d, EPO: 0, 0,5, 5 und 50 U/d (de Haan et al., 1994).

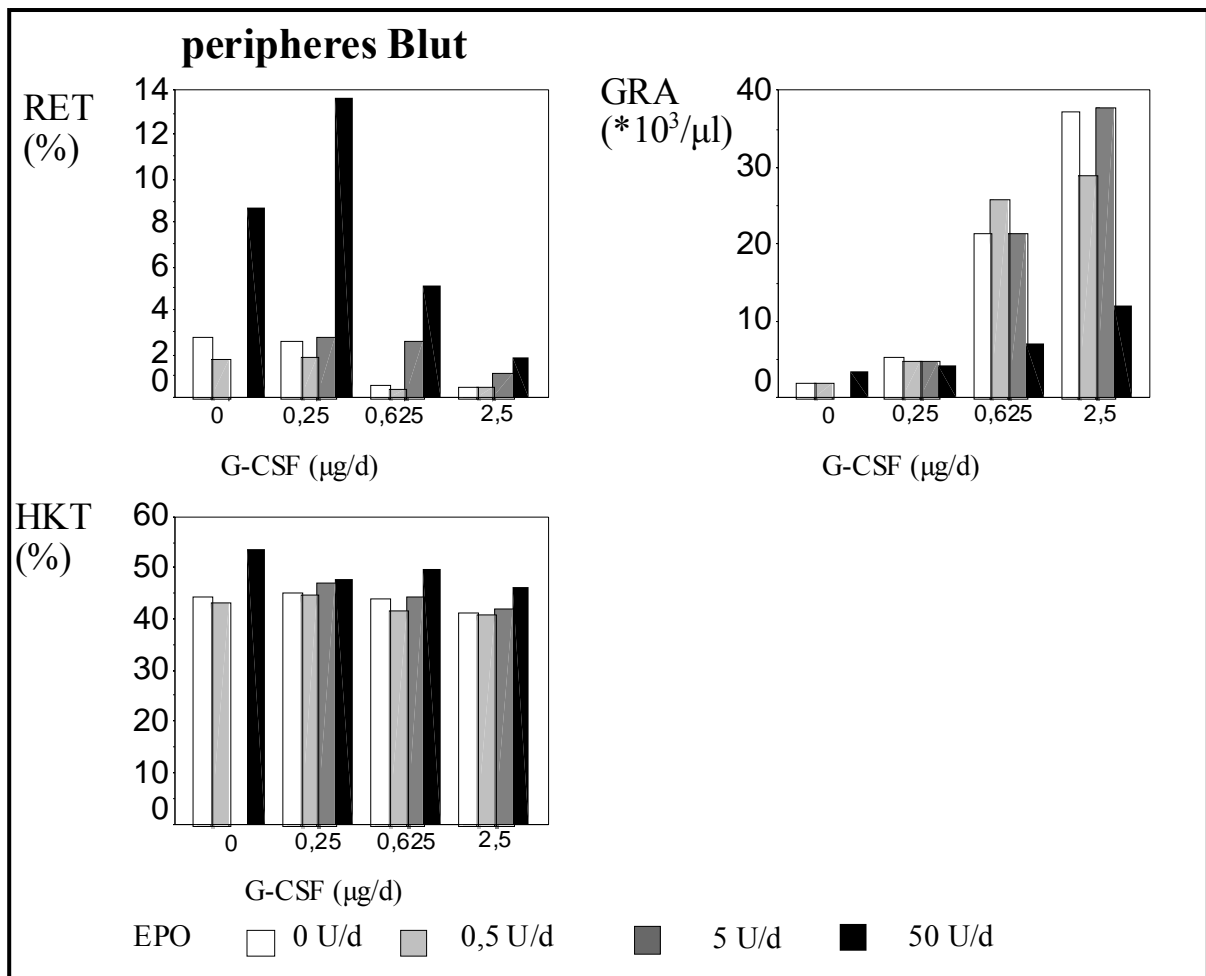


Abbildung 6: Peripheres Blut: Experimentelle Daten zur simultanen kontinuierlichen Gabe von unterschiedlichen Dosierungen von G-CSF und Erythropoietin bei splenektomierten Mäusen, Mittelwerte der Zellstufen am 7. Tag der Stimulation. Dosisstufen: G-CSF: 0, 0,25, 0,625 und 2,5 µg/d, EPO: 0, 0,5, 5 und 50 U/d (de Haan et al., 1994).

7.1.2 G-CSF-Langzeitadministration

C57Bl/6 Mäuse erhielten über subkutan implantierte osmotische Minipumpen eine G-CSF-Dosis von 2,5 µg/Maus/d über eine Dauer von 8 Wochen. In wöchentlichen Abständen wurde der hämatopoetische Systemzustand für folgende Parameter bestimmt: CAFC-7, CAFC-14, CAFC-21, CAFC-28, BFU-E, CFU-E, CFU-GM, erythroide und granuloide Präkursoren, Hämatokrit, Retikulozyten, Leukozyten und Spiegel des G-CSF. Der Meßplan für dieses Langzeitexperiment ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Meßplan für Langzeitstimulationsexperiment mit G-CSF. Untersuchte Zellstufen und Fallzahlen.

Zellstufe	Woche								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
CAFC-7 (KM, SP)		1			1	3			
CAFC-14 (KM, SP)		1			1	3			
CAFC-21 (KM, SP)		1			1	3			
CAFC-28 (KM, SP)		1			1	3			
BFU-E (KM, SP)	3	1	1		3	3	1	1	1
CFU-E (KM, SP)	3	1	1		3	3	1	1	1
CFU-GM (KM, SP)	3	1	1		3	3	1	1	1
erythroide Präkursoren	3	1	1		3	3	1	1	1
granuloide Präkursoren	3	1	1		3	3	1	1	1
Hämatokrit	3	1	1		3	3	1	1	1
Retikulozyten	3	1	1		3	3	1	1	1
Leukozyten	7	7	7	7	4	3	3	1	1
G-CSF-Spiegel	6	6	6	7	3	2	2		

Die experimentellen Ergebnisse (Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9) zeigen, daß sich selbst nach 8-wöchiger kontinuierlicher Stimulation kein hämatopoetischer Gleichgewichtszustand eingestellt hat. In einigen Kompartimenten treten deutliche Fluktuationen mit oszillierendem Charakter auf. Die Zellstufe CFU-GM zeigt eine anfängliche Verminderung im Knochenmark in Woche 1 und 2, dann einen leichten Wiederanstieg. In der Milz findet sich ein deutlicher Anstieg auf das 140-fache des Ausgangswertes in der 8. Woche. Im BFU-E-Kompartiment kommt es im Knochenmark in Woche 1 und 2 zu einer anfänglichen Verminderung, dann zu einem Anstieg bis Woche 6, gefolgt von einer erneuten Verminderung. In der Milz findet sich ein starker Zuwachs in der Milz bis Woche 6, dann erneut bei Woche 8. Die CFU-E zeigen anfänglich eine fast komplette Depletion im Knochenmark, gefolgt von einem Anstieg auf etwa 50% des Ausgangswertes in Woche 4. Es zeigt sich ein fluktuierendes Verhalten in der Milz mit einem Anstieg bis auf den ca. 100-fachen Normalwert in Woche 5 und 8. Die Granuloblasten zeigen einen Anstieg im Knochenmark auf den 3-fachen Ausgangswert, in der Milz ist ein drastischer Anstieg auf das 260-fache in Woche 8 festzustellen. Die Erythroblasten zeigen eine starke Reduktion im Knochenmark bis auf ca. 10% des Ausgangswertes, dazwischen oszillatorische Erholung in Woche 4 und 6. Es findet sich eine deutliche Stimulation in der Milz mit Anstieg auf das ca. 50-fache in Woche 5 und 8. Der Hämatokrit ist ab Woche 1 um etwa 10% reduziert, es erfolgt kein nennenswerter Abfall im weiteren Verlauf. Die Granulozyten zeigen einen deutlich oszillierenden Verlauf mit wesentlichem Gipfeln zwischen Tag 10 und 20. Bei einigen Mäusen zeigt sich ein zweiter Peak um Tag 35.

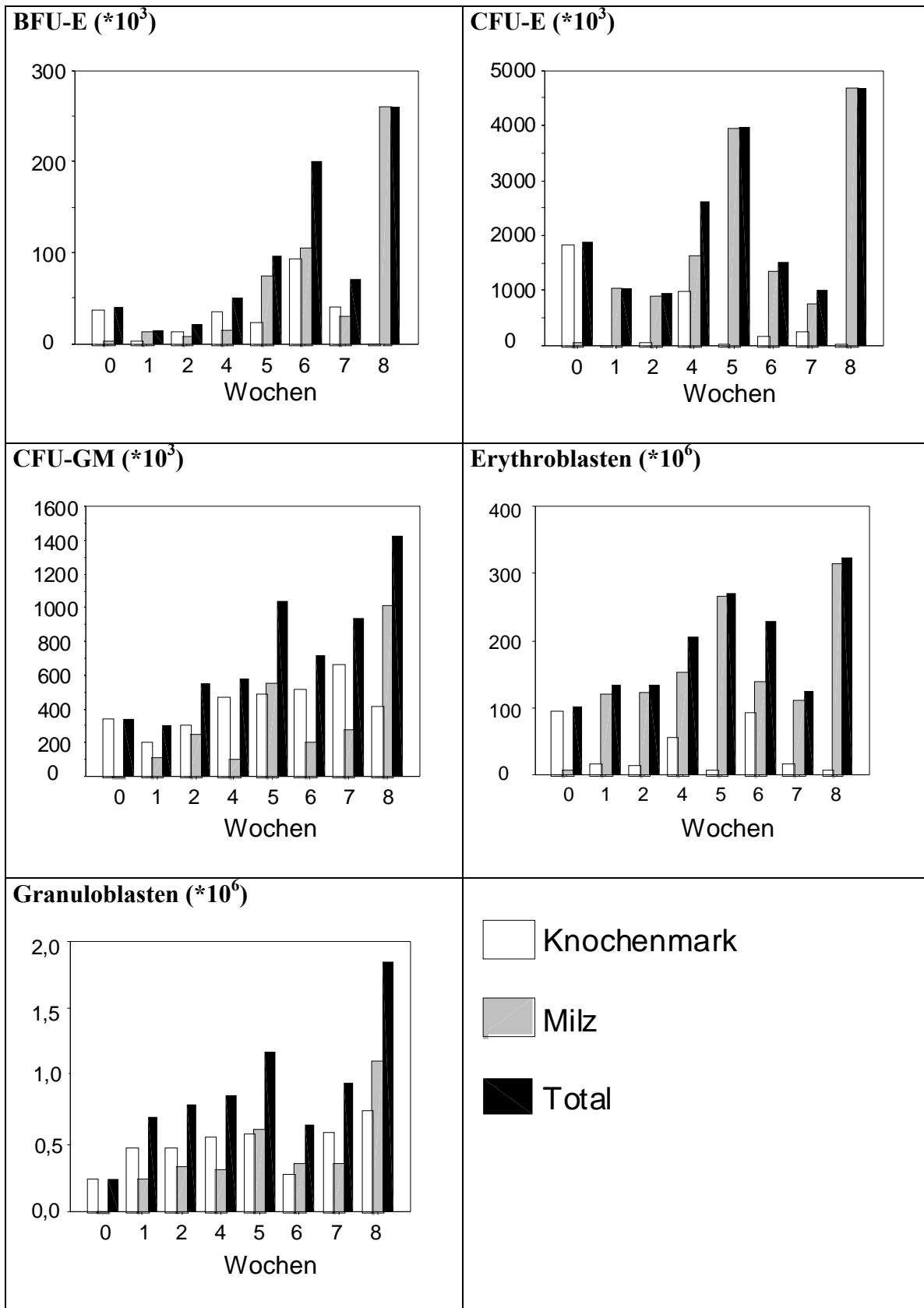


Abbildung 7: Verlauf der Hämatopoese über 8 Wochen unter kontinuierlicher G-CSF-Langzeitstimulation. Experimentelle Daten (erhoben in Kooperation mit NIJHOF und DE HAAN). Zellen in Knochenmark und Milz.

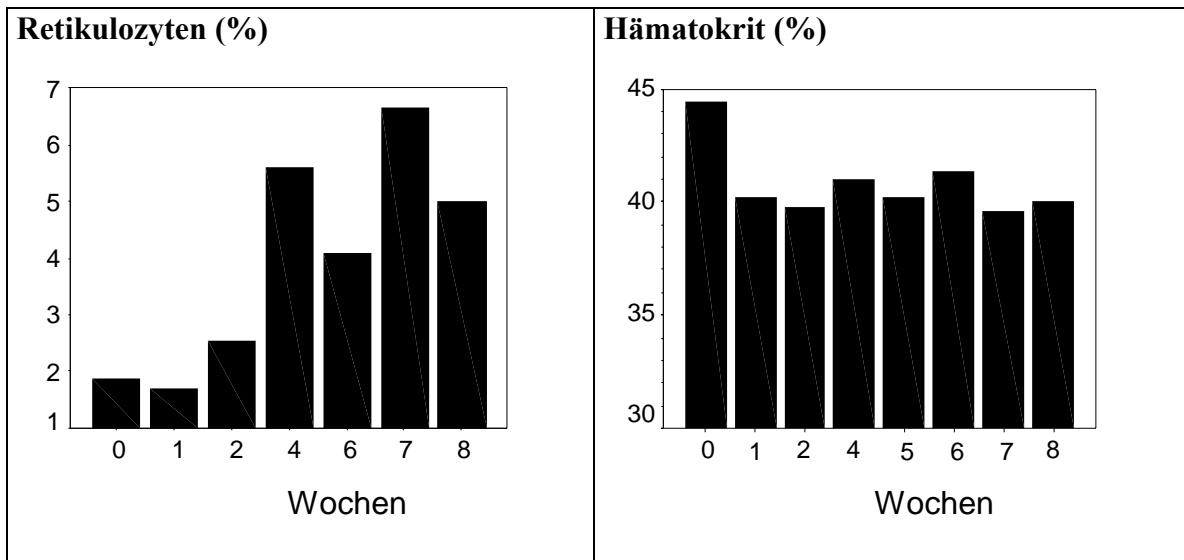


Abbildung 8: Verlauf der Hämatopoese über 8 Wochen unter kontinuierlicher G-CSF-Langzeitstimulation. Experimentelle Daten (erhoben in Kooperation mit NIJHOF und DE HAAN). Retikulozyten und Hämatokrit.

Granulozyten (*10⁹/ml)

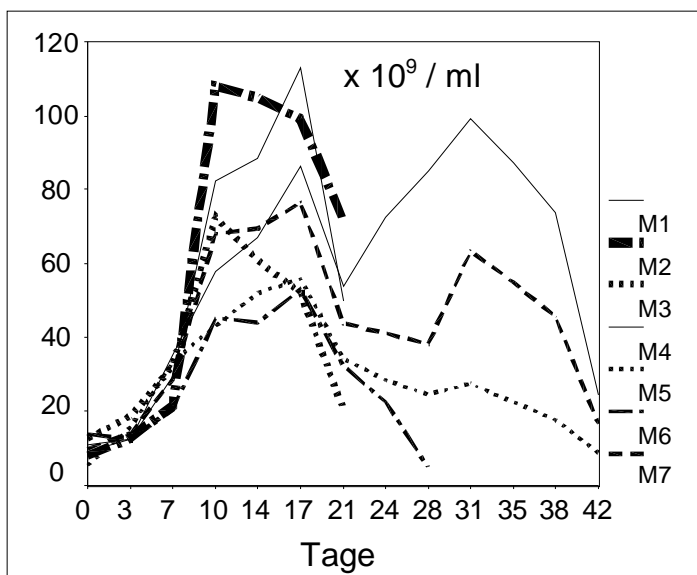


Abbildung 9: Verlauf der Hämatopoese über 8 Wochen unter kontinuierlicher G-CSF-Langzeitstimulation. Experimentelle Daten (erhoben in Kooperation mit NIJHOF und DE HAAN). Granulozyten im peripheren Blut (Einzelmausdaten).

Zusätzlich zu den hier gezeigten Zellzahlen wurde auch der Spiegel des im Serum zirkulierenden G-CSF bestimmt. Es findet sich nach 3 Tagen Stimulation ein maximaler Spiegel bei 5300 pg/ml, bis etwa Tag 20 ein Absinken auf Werte unter 5 pg/ml, angedeuteter oszillatorischer Verlauf mit zweitem und dritten Gipfel bei Tag 17 bzw. Tag 28.

7.1.3 Re-Migration

Eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen weist darauf hin, daß unter exogener Zytokinapplikation Stamm- und früher Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut ausgeschwemmt werden und sich möglicherweise in der Milz ansiedeln. Es ist jedoch bislang unklar, wie sich das Migrationsverhalten dieser Zellstufen unmittelbar nach Sistieren der Zytokinapplikation darstellt und welche Auswirkungen dies auf die Dynamik der hämatopoetischen Zellkompartimente in Milz und Knochenmark hat. Um dieser Frage nachzugehen, wurde von NIJHOF und Mitarbeitern folgendes Experiment durchgeführt:

Nach 7-tägiger Stimulation mit 2,5 µg/d rhG-CSF werden C57/Bl-Mäuse splenektomiert oder erhalten eine Scheinoperation. An Tag 0, 1, 2, 3, 4 und 5 nach dem Eingriff werden BFU-E, CFU-GM, CFU-E und kernhaltige Zellen in Knochenmark, Milz (nur scheinoperierte Tiere) und peripherem Blut gemessen. Des weiteren werden Leukozyten, Retikulozyten und der Hämatokrit bestimmt. Die Meßergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 7: Einzelmausdaten zum Erholungsverhalten der Hämatopoese nach 7-tägiger G-CSF-Stimulation und Scheinoperation. Knochenmark und Milz.

Tag	Knochenmark				Milz			
	nukleäre Zellen [$\cdot 10^6$]	CFU-E [$\cdot 10^3$]	BFU-E [$\cdot 10^3$]	CFU-GM [$\cdot 10^3$]	nukleäre Zellen [$\cdot 10^6$]	CFU-E [$\cdot 10^3$]	BFU-E [$\cdot 10^3$]	CFU-GM [$\cdot 10^3$]
0	348,5	0	0	361,6	356	730	44,6	215,5
0	350,2	0	8,8	240,8	303,6	409,4	41	151,9
0	334,9	0	12,56	243,1	405,6	811,4	54,8	217,1
1	377,4	0	6,3	561	208,1	166,5	16,7	123,8
1	425	0	42,5	580,9	286,9	200,8	27,3	132
1	391	0	0	391	292,3	467,7	20,5	134,5
2	460,7	0	23,8	753,1	225	371,2	19,1	130,5
2	421,6	960,5	32,3	527	358,6	2645	21,5	96
2	465,8	35,7	18,7	501,5	329,3	1284	5	72,4
2	502,9	0	44,03	622,3	280,2	1261	23,82	187,7
2	343,9	8,598	30,1	528,7	324,2	761,9	38,9	269,1
3	469,2	258,1	46,94	938,4	274,2	383,9	17,14	61,7
3	465,8	81,52	9,316	400,6	262,7	354,7	22,33	75,53
3	399,5	419,2	23,97	399,5	237,8	279,4	8,32	43,4

4	431,8	1253	74,8	918	241	506,1	21,7	54,6
4	433,5	680	43,4	686,8	201,4	120,8	2	17,5
4	387,6	633,3	38,8	459	212,8	234,1	5,7	23,4
5	467,5	1964	31,2	521,9	197,7	118,7	3	20
5	363,8	1843	48,5	545,7	196,9	152,6	4,5	13,3
5	453,9	2361	68	770,9	178,1	115,8	3,6	8

Tabelle 8: Einzelmausdaten zum Erholungsverhalten der Hämatopoese nach 7-tägiger G-CSF-Stimulation und Scheinoperation. Peripheres Blut.

Tag	peripheres Blut				
	WBC [*10 ⁶]	HKT [%]	RET [%]	BFU-E [*10 ³ /ml]	CFU-GM [*10 ³ /ml]
0	17,7	46	7	0,171	2,95
0	29,4	47,8	4	1,1	8,3
0	16,1	46,3	5,2	0,644	5,313
1	10,8	47,1	4	0,054	0,648
1	9,8	42	6,5	0,123	2,132
1	14,6	42,1	1,2	0,219	5,658
2	15,2	42	2,2	0,05	2,4
2	31,7	32	14,7	0	3,8
2	19,4	41	2,7	1,2	1,2
2	9,71	41,4	3	0,146	0,85
2	13,09	41	4,7	0,229	2,684
3	9,11	40	13	0,068	0,797
3	15,6	39,7	11	0,195	4,095
3	14,9	42,4	8	0,157	3,539
4	27,9	38	9	0	2,5
4	28,4	41,4	5	0,178	1,781
4	10,1	46,5	5,4	0,051	0,291
5	11,3	40,9	11	0,198	0,649
5	9,9	41,8	9,2	0,148	0,716
5	7,6	42,3	9,5	0,076	0,303

Tabelle 9: Einzelmausdaten zum Erholungsverhalten der Hämatopoese nach 7-tägiger G-CSF-Stimulation und Splenektomie. Knochenmark und peripheres Blut.

Tag	Knochenmark				Peripheres Blut				
	nukleäre Zellen [*10 ⁶]	CFU-E [*10 ³]	BFU-E [*10 ³]	CFU-GM [*10 ³]	WBC [*10 ⁶]	HKT [%]	RET [%]	BFU-E [*10 ³ /ml]	CFU-GM [*10 ³ /ml]
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	312,8	0	0	558,6	4,4	43,8	0	0	0,1
1	334,9	0,871	0	273,7	4,1	45,7	0,7	0	0,144
1	348,5	0	5,1	540,6	7,8	46,4	0,5	0	0,3
2	379,1	18,7	30,6	630,7	2,9	35	0	0	0
2	387,6	52,7	15,3	557,6	3,9	43	0	0	0,08
2	355,3	18,7	39,1	341,7	4,2	35	0	0,04	0,2
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	409,7	102,3	16,93	753,8	8,06	38,8	0	0,101	0,846
3	397,1	436	22,7	712,7	5,73	35,8	0	0	0,172

3	418,2	167,3	25,1	467,7	4,92	20	0	0,012	0,394
4	399,5	343,4	45,9	654,5	7,3	34	0	0	0
4	423,3	1074,4	52,7	685,1	7,4	35	0	0	0
4	404,6	1295,4	66,3	481,1	4,5	23	0,5	0	0,8
5	442	2520	58,9	728,9	5,5	38	0,5	0,178	0,307
5	391	2659	104,3	540,9	8,71	35,4	6	0,283	0,305
5	443,7	2595	44,37	769,1	6,47	34,4	1,5	0,34	0,615

7.2 Biostatistische Datenaufbereitung

Die vorliegenden experimentellen Daten zu den kombinierten Gaben von EPO und G-CSF wurden mit Hilfe einer Regressionsanalyse aufbereitet. Damit können quantitative Aussagen über die Beziehung zwischen Dosis der Zytokine (unabhängige Variablen) im untersuchten Dosisbereich und deren Wirkung auf die Zellzahl in einem bestimmten Kompartiment (abhängige Variable) gemacht werden.

Aufgrund früherer Experimente ist bekannt, daß eine nichtlineare Dosis-Wirkungsbeziehung vorliegt (Nijhof et al., 1994; Nijhof et al., 1995). Des weiteren liegen für EPO und G-CSF Daten vor, die eine Sättigungscharakteristik der Dosis-Wirkungskurve auf einer logarithmischen Skala zeigen. 50 U EPO und 2,5 µg G-CSF haben nahezu maximalen Effekt. Es wird deshalb eine monotone, nicht-lineare Dosis-Wirkungsbeziehung mit Sättigungscharakteristik angenommen. Die gegebenen pharmakologischen Dosen wurden für die Regressionsanalyse logarithmisch transformiert. Die Dosen von EPO wurden wie folgt kodiert: 0 und 0,5 U/Maus = 0 (kein Effekt), 5 U/Maus = 1 (halbmaximaler Effekt) und 50 U/Maus = 2 (maximaler Effekt). Zwischen der Applikation von 0 und 0,5 U/Maus wurde biologisch kein Unterschied festgestellt. Die Dosen von G-CSF wurden in ähnlicher Weise kodiert: 0 µg/Maus = 0, 0,25 µg/Maus = 1, 0,625 µg/Maus = 1,4 µg und 2,5 µg/Maus = 2.

Für jede Zellstufe wurde ein quadratisches Regressionsmodell der Form

$$Z = a + bx + cx^2 + dy + ey^2 + fxy$$

gewählt. Z beschreibt die zu modellierende Zahl der Zellen in einem bestimmten Kompartiment (z.B. CFU-GM_{KM}), x stellt die transformierte Dosis von EPO, y die transformierte Dosis von G-CSF dar und a,b,c,d,e,f sind die zu schätzenden Regressionskoeffizienten.

Mit Hilfe des Regressionsmodells können auch Aussagen zur Signifikanz des linearen (Koeffizienten b und d) und nicht-linearen (Koeffizienten c und e) Einflusses der Dosen von EPO-

und G-CSF sowie einer möglichen Interaktionen zwischen beiden Zytokinen (Koeffizient f) getroffen werden. Positive Werte für die Koeffizienten beschreiben stimulatorische Effekte, negative Werte weisen auf inhibitorische Effekte hin.

Die Regressionsanalyse erfolgte mit der Statistiksoftware SAS 6.0.3 für PC. Graphisch wurden die Dosis-Wirkungsbeziehungen in Form von Konturdiagrammen dargestellt.

7.3 Modell der Hämatopoese

Für die Modellentwicklung in dieser Arbeit wurden bestehende Modelle der Erythropoese (Dress, persönliche Mitteilung) und Granulopoese (Engel, 1999) zugrundegelegt.

7.3.1 Modellstruktur

An dieser Stelle wird die Struktur des Modells erläutert, soweit dies für das Verständnis und die Ergebnisse dieser Arbeit relevant ist. Für Details, welche nicht von spezieller Bedeutung für die jetzige Arbeit sind, wird auf die Vorarbeiten anderer Autoren verwiesen. Eine Übersicht über die Modellstruktur geben Abbildung 10 (Grobübersicht und Regulationsstruktur) und Abbildung 11 (Detailübersicht und Einzeleffekte der Zytokine). Die Hämatopoese wird als System miteinander verbundener Kompartimente dargestellt. Jedes Kompartiment beschreibt die Populationsgröße (d.h. Zellzahl) in einer bestimmten biologisch identifizierbaren Zellstufe, abhängig von der Zeit und bestimmten zellkinetischen Parametern (Transitzeit, Proliferationsrate). Die Kompartimente sind entsprechend der Differenzierungsfolge aneinandergereiht. Granulopoese und Erythropoese entspringen einem gemeinsamen Stammzellkompartiment, welches die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzt. Unter den Bedingungen des normalen Fließgleichgewichts treten 50% der aus dem Stammzellkompartiment ausströmenden Zellen wieder in dieses ein, während 50% in die Erythro- und Granulopoese fließen. Die CFU-GM stellen die erste determinierte Zellstufe der Granulopoese dar. Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten bilden den Pool der morphologisch identifizierbaren proliferativen Präkursoren. Metamyelozyten, Stabkernige und Segmentkernige bilden das postmitotische Reifungskompartiment. Im peripheren Blut wird das Kompartiment der zirkulierenden Granulozyten berücksichtigt. Die BFU-E stellen die frühen, nicht erythropoietinsensitiven Vorläuferzellen der Erythropoese dar, die CFU-E die differenziertere erythropoietinsensitive Stufe. Es schließt sich das Kompartiment der proliferativen Pronormoblasten und Normoblasten an, gefolgt vom Kompartiment der nicht mehr teilungsfähigen Normoblasten. Diese ge-

hen über in die knochenmark- bzw. milzansässigen Retikulozyten. Im peripheren Blut wird ein zirkulatorisches Retikulozytenkompartiment berücksichtigt, gefolgt vom Kompartiment der reifen Erythrozyten.

Der Übergang von Zellen zwischen Kompartimenten wird als Rate dargestellt (Anzahl von pro Zeiteinheit übergehenden Zellen). Diese Raten hängen von den bereits genannten zellkinetischen Parametern ab. Die Transitzeit ist als mittlere Aufenthaltsdauer einer Zelle interpretierbar, während die Amplifikation den Zellgewinn durch mitotische Zellteilung beschreibt. Mathematisch wird ein Kompartiment durch eine gewöhnliche Differentialgleichung der folgenden Form beschrieben (Kompartiment ohne mitotische Zellteilung):

$$\frac{dC_i(t)}{dt} = C_i^{ein}(t) - C_i^{aus}(t)$$

Die Gleichung beschreibt die Änderung der Größe des Kompartimentes zu jedem Zeitpunkt als Bilanz zwischen Ein- und Ausstromrate. Die Einstromrate ergibt sich aus der Ausstromrate des jeweils vorgeschalteten Kompartimentes. Die Ausstromrate ist in folgender Weise abhängig von der Anzahl der Zellen im Kompartiment und der Transitzeit.

$$C_i^{aus}(t) = \frac{C_i(t)}{T_i}$$

Je größer die Transitzeit wird, desto kleiner wird der Ausstrom und umgekehrt. Die vollständige Differentialgleichung für ein nichtproliferierendes Kompartiment i zu einem bestimmten Zeitpunkt t lautet deshalb:

$$\frac{dC_i(t)}{dt} = C_i^{ein}(t) - \frac{C_i(t)}{T_i}$$

Die hier gezeigte Übergangskinetik 1. Ordnung (auch altersunabhängiger Übergang genannt) stellt eine Vereinfachung dar, die für das postmitotische Kompartiment der Granulopoese aufgrund experimenteller Hinweise nicht zulässig erscheint. In diesem Kompartiment wird deshalb ein annähernd altersabhängiger Übergang angenommen, der mathematisch durch ver-

kettung mehrerer Differentialgleichungen mit jeweils altersunabhängigem Übergang dargestellt wird.

Wird ein proliferatives Kompartiment betrachtet, wird die Gleichung um einen Amplifikationsterm (A) sowie den Anteil der Zellen, die an der Zellteilung teilnehmen (proliferative Fraktion, a) in folgender vereinfachter Form erweitert.

$$\frac{dC_i(t)}{dt} = C_i^{ein}(t) \cdot A(t) - \frac{C_i(t) \cdot a_i}{T_i}$$

Die Amplifikation A_i eines Kompartimentes i kann als das Verhältnis von Ausstromrate zu Einstromrate definiert werden:

$$A_i = \text{Ausstrom}_i / \text{Einstrom}_i$$

Die Anzahl der **Zellverdopplungen (m)**, die eine Zelle durchschnittlich in einem Kompartiment erfährt, steht mit der Amplifikation in folgender Beziehung:

$$m = \log_2 A$$

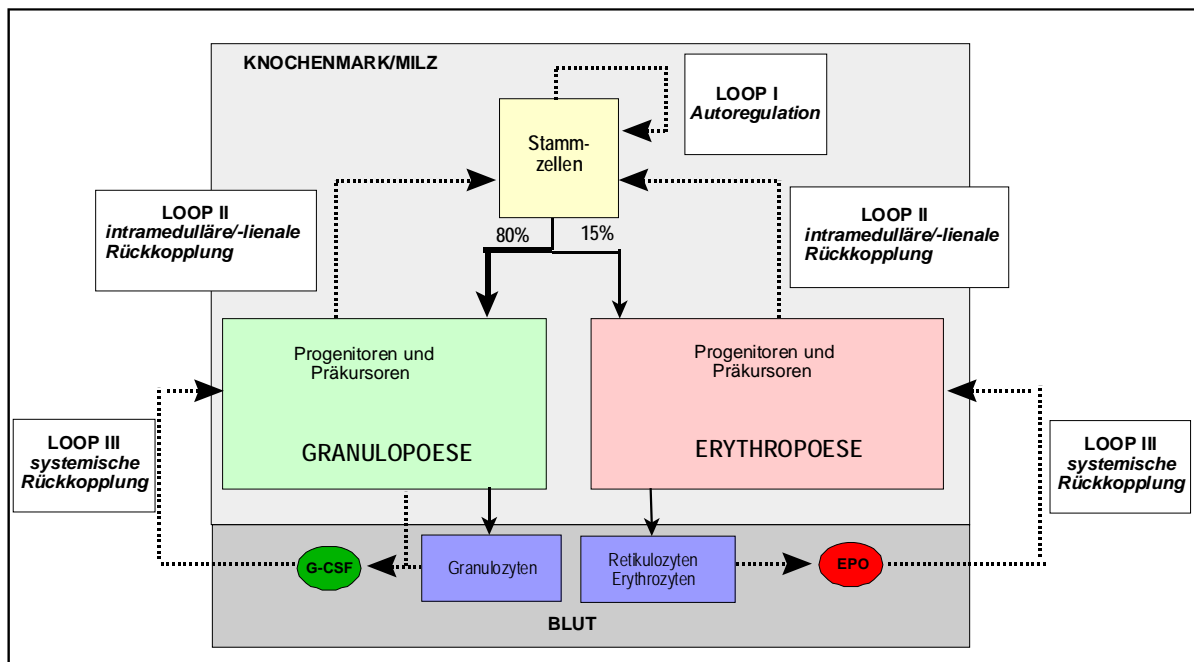


Abbildung 10: Darstellung des Modells aus den Kompartimenten der Stammzellen, Progenitoren und Präkursoren und peripheren Zellen mit Rückkopplungsschleifen: Loop I: Autoregulation der Stammzellen, Loop II: intramedulläre/intralienale Rückkopplung und Loop III: systemische Rückkopplung.

Die beiden Hauptblutbildungsstätten der Maus Knochenmark und Milz werden im Modell durch zwei parallel und gleich aufgebaute Kompartimentsysteme dargestellt.

Im Modell wird angenommen, daß Amplifikation, Transitzeit, Apoptose und proliferative Fraktion Funktionen des momentanen Systemzustandes (d.h. der Kompartimentgrößen) im Sinne negativer Rückkopplungsschleifen sind. Diese Rückkopplungsschleifen vermitteln eine bedarfsabhängige Regulation der zellkinetischen Parameter im Knochenmark und damit der Produktion reifer Zellen. Die Beziehung zwischen Systemzustand und regulatorischer Zielgröße wird durch charakteristische gesättigte (sigmoidale) Dosis-Wirkungskurven vermittelt. Die Regulation des Systems wird durch drei wesentliche Rückkopplungsschleifen (Loops) erzielt:

- Loop I: Autoregulation der Stammzellen
- Loop II: intramedulläre Regulation
- Loop III: Peripherie-Knochenmark/Milz-Regulation

Loop I reguliert die Größe des Stammzellkompartimentes in Abhängigkeit seiner eigenen Größe. Unterschreitet die Stammzellzahl eine kritische Schranke, so erfolgt eine autonome Stammzellproliferation unabhängig vom Bedarf an differenzierteren Zellen. Damit wird ein Aussterben des Systems unter extremen Bedingungen verhindert. Loop II reguliert den Bedarf an Stammzellen zur Differenzierung zu Progenitoren. Dazu wird von den Kompartimenten der Progenitoren und Präkursoren die Information über Zellzahl an den Stammzellpool weitergegeben. Die Informationsweitergabe von Knochenmark und Milz erfolgt getrennt an die jeweiligen Stammzellkompartimente in Knochenmark und Milz.

Über Loop III, auch „systemische Rückkopplung“ genannt, erfolgt eine Rückmeldung der Anzahl der Funktionszellen im peripheren Blut über die jeweiligen Zytokinspiegel G-CSF und EPO an die Progenitoren und Präkursoren im Knochenmark.

Mit Einbezug dieser Regulationsmechanismen ergibt sich ein komplexes nichtlineares Differentialgleichungssystem, welches mit Computerhilfe durch numerische Integrationsverfahren gelöst wird.

7.3.2 Besonderheiten des Stammzellkompartimentes

Das Kompartiment der Stammzellen stellt im Modell die Zellstufe der CFU-S oder CAFC-d14 dar. Als einziges Modellkompartiment besitzt es keinen Einstrom, sondern nur einen Ausstrom. Der Ausstrom erfolgt sowohl in das Kompartiment der granulo- als auch in das der erythropoetischen Progenitoren aus ein und dem selben Stammzellkompartiment, jedoch getrennt für Knochenmark und Milz.

G-CSF-abhängig ist eine Migration von CFU-S vom Knochenmark in die Milz möglich. Die Migration wird quantitativ durch die Migrationsrate k_{mig} und die seeding efficacy k_{Seed} beschrieben. Im unstimulierten Zustand findet keine Migration statt.

Die Größe des Stammzellkompartimentes wird durch zwei weitere Parameter bestimmt: die proliferative Fraktion a und die Selbsterneuerungswahrscheinlichkeit p . Im Normalzustand proliferiert nur ein bestimmter Anteil der Gesamtzahl der Stammzellen. Im unstimulierten Zustand ist $a=0,15$. Steigt a an, steigt die Anzahl der Stammzellen, die sich selbsterneuern oder differenzieren. Die Wahrscheinlichkeit der Selbsterneuerung p , beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine sich teilende Stammzelle wieder eine Stammzelle wird. Mit der Wahrscheinlichkeit $1-p$ verliert die Stammzelle die stammzellspezifischen Eigenschaften. Normalerweise beträgt $p=0,5$. Ein Anwachsen des Stammzellkompartimentes bedeutet, dass

Selbsterneuerung wahrscheinlicher ist als Differenzierung, d.h. $p < 0,5$. Die Parameter a und p sind abhängig von der Größe des Stammzellkompartimentes (Autoregulation, Loop I) und von der Größe der Progenitoren (intramedulläre bzw. intralienale Rückkopplung, Loop II).

7.3.3 Migration zwischen Knochenmark und Milz

Der Hauptanteil der hämatopoetischen Zellproduktion findet sich unter normalen Bedingungen im Knochenmark, der kleinere Anteil in der Milz. Sowohl unter Normalbedingungen als auch nach Störungen (Chemotherapie, Blutung, Stimulation mit G-CSF) finden sich im peripheren Blut Stamm- und Progenitorzellen. Diese mobilisierten Zellen können migrieren und sich im Stroma der Milz oder Leber ansiedeln, um dort zu proliferieren und zu reifen. Bei der Maus wurde dies in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen (Hara und Ogawa, 1976; Hara und Ogawa, 1977). Nach einer induzierten Anämie kann der Anteil der Erythropoese in der Maus in wenigen Tagen von ca. 10% bis auf ca. 40% ansteigen. Diese Verlagerung beruht vermutlich auf einer Migration von CFU-S und BFU-E aus dem Knochenmark in die Milz. Es läßt sich in dieser Phase auch ein erhöhter Anteil von Stammzellen und Progenitoren im Blut nachweisen (de Haan et al., 1994).

Im Modell sind folgende Kompartimente zur Migration fähig: Stammzellen, BFU-E und CFU-GM. Dabei ist im bisherigen Modell nur der Migrationsfluss vom Knochenmark in die Milz vorgesehen. In der Milz beschreibt ein Parameter $k_{Seed}(C)$ den Anteil der migrierten Zellen, die dort anwachsen können (sog "Seeding Efficiency"). Die Migrationsrate $k_{Mig}(C)$ ist wachstumsfaktorabhängig und hat im normalen Fließgleichgewicht den Wert 0, während die Seeding Efficiency als konstant angenommen wird. Eine Erweiterung des Modells um die Annahme einer Rückmigration von Stammzellen, BFU-E und CFU-GM aus der Milz ins Knochenmark ist im Abschnitt 8.4 beschrieben. Auch hier gilt eine wachstumsfaktorabhängige Migrationsrate und eine konstante Seeding Efficiency.

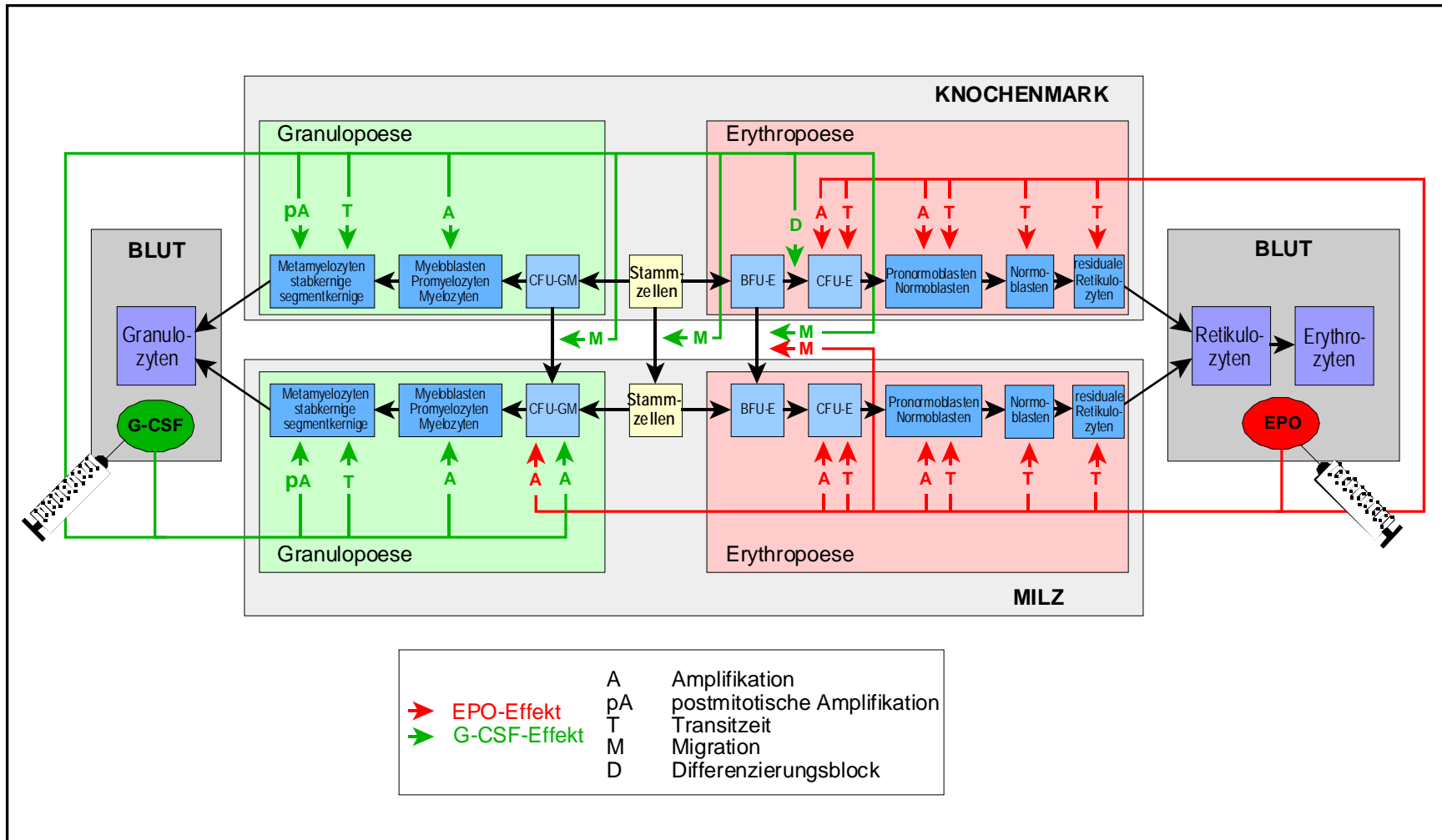


Abbildung 11: Schema der Modellstruktur mit gleichartig strukturierten Kompartimenten in Knochenmark und Milz, Verdeutlichung der unterschiedlichen Zytokineffekte mittels farbigen Pfeilen: grün = G-CSF-Effekt, rot = EPO-Effekt.

7.4 Exogene Wachstumsfaktorgaben

Erythropoietin

Erythropoietin wirkt im Modell hauptsächlich auf die Erythropoese. Es werden folgende dosisabhängigen Wirkmechanismen von EPO im Modell angenommen:

- Erhöhung der Amplifikation der CFU-E, Pronormoblasten / Normoblasten
- Verkürzung der Transitzeit der CFU-E, Pronormoblasten, Normoblasten und residuellen Retikulozyten
- Erhöhung in Amplifikation der CFU-GM
- Erhöhung der Migrationsrate von BFU-E vom Knochenmark und die Milz

Da die exogen verabreichten Dosen den endogenen Spiegel um Größenordnungen erhöhen, wird der durch endogene Produktion verursachte Beitrag zum Gesamtspiegel im Modell vernachlässigt. Es wird aufgrund der kontinuierlichen exogenen Infusion durch osmotische Minipumpen eine konstante Erhöhung des zirkulierenden EPO-Spiegels angenommen. Um den exogen applizierten Dosen von EPO einen entsprechenden Erythropoietinspiegel zuzuordnen, wurde folgende Transformation der applizierten Dosis in den resultierenden Wirkspiegel vorgenommen:

Tabelle 10: Transformation der exogen applizierten EPO-Dosis im Modell

rhEPO-Dosis [U/Maus/d]	EPO-Spiegel im Modell
0	1
0,5	1,27
1	1,66
2	2,58
5	5,73
10	11,16
50	55,48
200	221,93
500	554,82

G-CSF

G-CSF wirkt im Modell hauptsächlich auf die Granulopoese. Es werden folgende dosisabhängigen Wirkmechanismen von G-CSF im Modell angenommen:

- Erhöhung der Amplifikation der CFU-GM, Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten
- Verkürzung der Transitzeit der Metamyelozyten, Stabkernigen und Segmentkernigen
- Verminderung der Apoptoserate der Segmentkernigen (sog. "postmitotische Amplifikation")
- Verminderung der Differenzierung von BFU-E zu CFU-E im Knochenmark
- Erhöhung der Migrationsrate von Stammzellen, CFU-GM und BFU-E vom Knochenmark in die Milz

Da auch bei der exogenen Verabreichung von G-CSF der endogene Spiegel um Größenordnungen erhöht wird, wird der durch endogene Produktion verursachte Beitrag zum Gesamtspiegel im Modell vernachlässigt. Es wird aufgrund der kontinuierlichen exogenen Infusion durch osmotische Minipumpen eine konstante Erhöhung des zirkulierenden G-CSF-Spiegels angenommen. Um den exogen applizierten Dosen von G-CSF einen entsprechenden G-CSF-Spiegel zuzuordnen, wurde folgende Transformation der applizierten Dosis in den resultierenden Wirkspiegel vorgenommen:

Tabelle 11: Transformation der exogen applizierten G-CSF-Dosis im Modell

rhG-CSF-Dosis [µg/Maus/d]	GCSF-Spiegel im Modell
0	1
0,5	10
1	20
2,5	50
5	100

7.5 Der Standardparametersatz

Im Normalzustand befindet sich das Modell im Fließgleichgewicht. Das System beschreibt dann den Zustand normaler, gesunder, unstimulierter Mäuse. In diesem Gleichgewichtszustand sind sowohl die Kompartimentgrößen als auch die zellkinetischen Parameter (Transitzeit, Amplifikation) keiner zeitlichen Änderung unterworfen. Ein großer Teil der in diesem Modell verwendeten Parameter wurde aus früheren Modellen zur Erythro- und Granulopoese übernommen (Standardparameter). Andere Parameter wurden nach Zusammenführung der getrennten Modelle für Erythro- und Granulopoese angepaßt. Für die Modellanalyse der Hä-

matopoese von splenektomieren Mäusen bleiben die Parameter für die Knochenmarkhämato-
poese unverändert. Die verwendeten Parameter sind im Anhang dargestellt.

7.6 Technische Implementation

Das Modell wurde mit Hilfe des mathematischen Softwarepaketes MATLAB und der grafi-
schen Benutzerschnittstelle SIMULINK implementiert. Die Modellrechnungen wurden auf
Workstations und PCs des Institutes für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie
der Universität Leipzig durchgeführt.

8 Ergebnisse

8.1 Regressionsmodelle für Dosis-Wirkungsbeziehungen

Aus den von NIJHOF und DE HAAN erhobenen Daten zum hämatopoetischen Systemzustand am Tag 7 nach simultaner kontinuierlicher Gabe von EPO und G-CSF wurden mit Hilfe von Regressionsmodellen für jede Zellstufe entsprechende Dosis-Wirkungsbeziehungen für den untersuchten Dosisbereich geschätzt. Die ermittelten Regressionskoeffizienten, deren Signifikanz und die Güte der Modellanpassung sind in Tabelle 12 (normale Mäuse) und Tabelle 13 (splenektomierte Mäuse) dargestellt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Regressionsanalyse für normale Mäuse.

Zellstufe	a	b	c	d	e	f	R ²
	const	EPO	EPO ²	G-CSF	G-CSF ²	EPO* G-CSF	
BFU-E (KM)	1,15 ***	1,59 n.s.	-0,91 n.s.	-0,23 n.s.	-0,26 n.s.	0,02 n.s.	0,4364
BFU-E (Milz)	1,01 ***	0,58 n.s.	0,45 n.s.	1,75 *	-0,53 n.s.	-0,38 n.s.	0,5619
BFU-E (total)	4,06 ***	0,84 n.s.	-0,33 n.s.	0,31 n.s.	-0,40 n.s.	0,12 n.s.	0,3110
CFU-E (KM)	3,58 ***	-0,96 n.s.	0,73 n.s.	1,36 *	-1,78 ***	-0,03 n.s.	0,8905
CFU-E (Milz)	3,08 ***	0,51 n.s.	1,10 n.s.	3,17 ***	-0,76 n.s.	-1,07 **	0,7810
CFU-E (total)	6,48 ***	-0,95 n.s.	1,01 *	0,60 n.s.	-0,36 n.s.	-0,19 n.s.	0,3700
CFU-GM (KM)	3,49 ***	0,83 *	-0,48 *	0,25 n.s.	-0,30 *	0,12 n.s.	0,4431
CFU-GM (Milz)	1,11 ***	0,57 n.s.	0,68 n.s.	2,61 ***	-0,23 n.s.	-0,64 *	0,8298
CFU-GM (total)	6,34 ***	0,50 n.s.	-0,25 n.s.	0,25 n.s.	-0,19 n.s.	0,17 n.s.	0,3622
Retikulozyten	2,61 ***	4,03 n.s.	2,49 n.s.	-0,75 n.s.	1,84 *	-3,26 ***	0,7741
Hämatokrit	44,08 ***	-0,41 n.s.	3,74 *	0,29 n.s.	-0,72 n.s.	0,40 n.s.	0,6935
Granulozyten	0,37 n.s.	-0,67 n.s.	0,83 n.s.	0,09 n.s.	0,58 n.s.	-0,35 n.s.	0,6375
Leukozyten	1,92 ***	-0,54 n.s.	0,60 n.s.	0,12 n.s.	0,28 n.s.	-0,15 n.s.	0,6396
Thrombozyten	6,48 ***	0,58 n.s.	-0,21 n.s.	0,09 n.s.	-0,10 n.s.	-0,07 n.s.	0,0649

* = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, n.s. = nicht signifikant

Tabelle 13: Ergebnisse der Regressionsanalyse für splenektomierte Mäuse.

Zellstufe	a	b	c	d	e	f	R ²
	const	EPO	EPO ²	G-CSF	G-CSF ²	EPO* G-CSF	
BFU-E (KM)	1,30 ***	-0,53 n.s.	0,15 n.s.	1,65 **	-1,38 ***	0,13 n.s.	0,7528
CFU-E (KM)	4,51 ***	-0,29 n.s.	0,37 *	0,73 n.s.	-1,36 ***	0,05 n.s.	0,9447
CFU-GM (KM)	4,01 ***	-0,44 *	0,05 n.s.	0,26 n.s.	-0,44 ***	0,24 ***	0,3110
Granuloblasten	3,01 ***	-0,04 n.s.	-0,09 n.s.	0,44 ***	-0,18 **	0,08 *	0,7559
Retikulozyten	0,69 *	0,36 n.s.	0,14 n.s.	0,03 n.s.	-0,51 n.s.	0,13 n.s.	0,7584
Hämatokrit	43,96 ***	0,80 n.s.	1,13 n.s.	0,96 n.s.	-1,11 n.s.	-0,99 n.s.	0,7441
Granulozyten	0,40 n.s.	0,84 n.s.	-0,26 n.s.	1,20 *	0,24 n.s.	-0,39 **	0,8313

* = p< 0,05, ** = p< 0,01, *** = p< 0,001, n.s. = nicht signifikant

Die so geschätzten quantitativen Beziehungen zwischen der Dosis von EPO bzw. G-CSF und dem entsprechenden hämatopoetischen Systemzustand am Tag 7 unter Stimulation sind nachfolgend grafisch in Form von Konturdiagrammen dargestellt (Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14). Diese Art der Darstellung erlaubt es, den Effekt jeder Dosis-Kombination innerhalb des untersuchten Dosisbereiches abzulesen. Die dargestellten Linien markieren dabei Dosis-Kombinationen, die zu einem identischen Systemzustand führen (Iso-Response-Linien).

Die Bestimmtheitsmaße (R²) der Regressionen zeigen, daß mittels dieser einfachen Modelle die in den Daten beobachtete Varianz für viele Zellstufen gut erklärt werden kann (R² > 0,7).

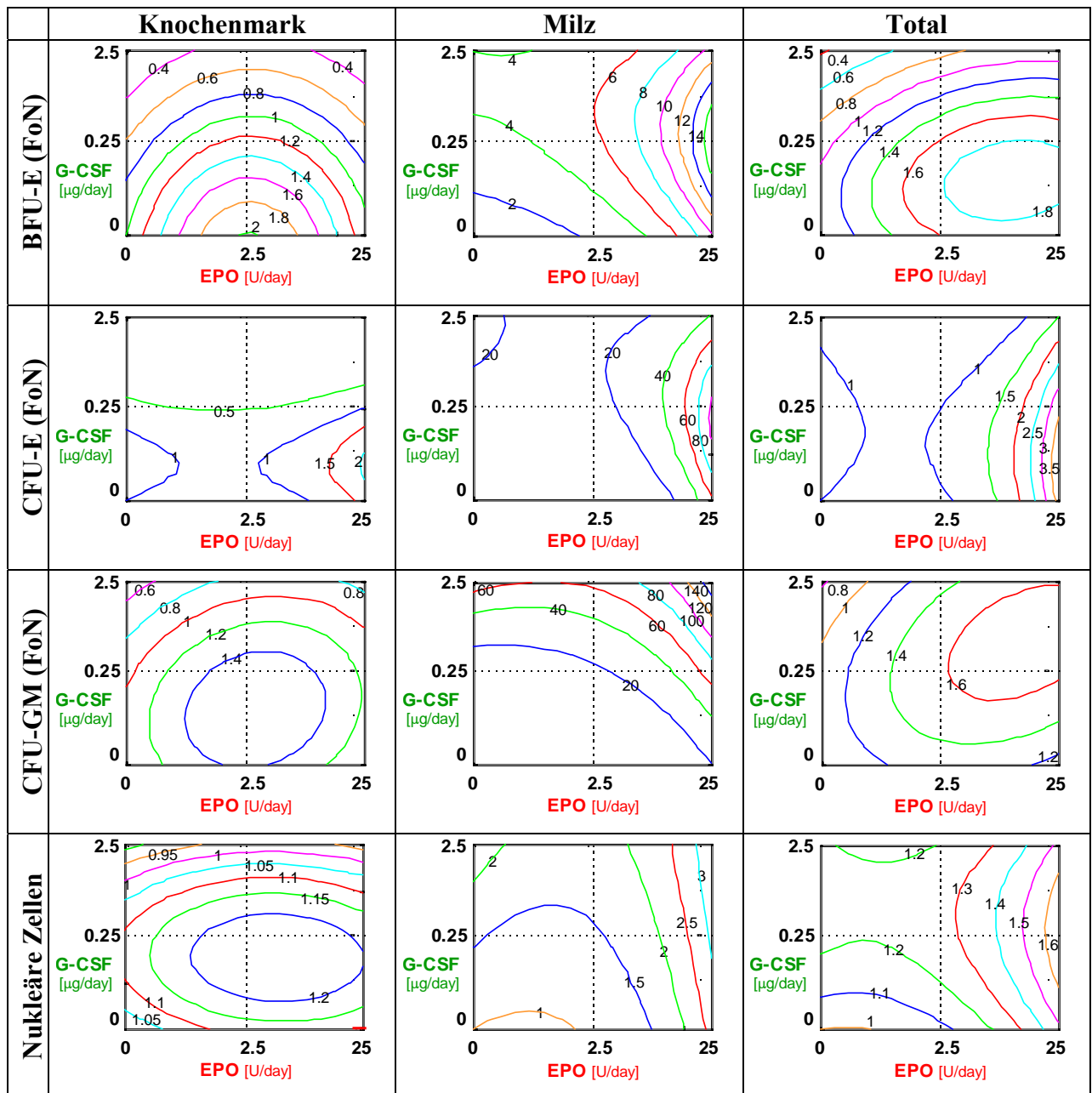


Abbildung 12: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in normalen Mäusen (Regressionsmodell). Zellen in Knochenmark und Milz. FoN = Fraction of Normal, relativer Anteil im Vergleich zur normalen Gleichgewichtssituation.

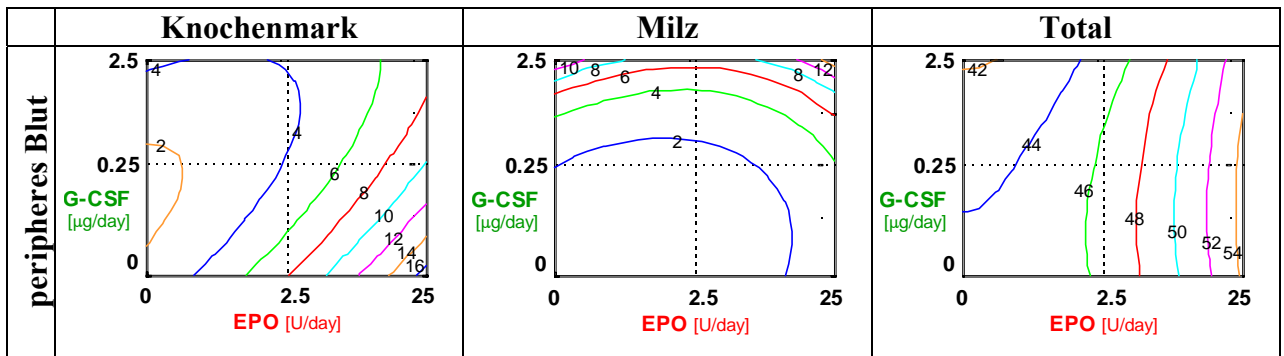


Abbildung 13: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in normalen Mäusen (Regressionsmodell). Peripheres Blut.

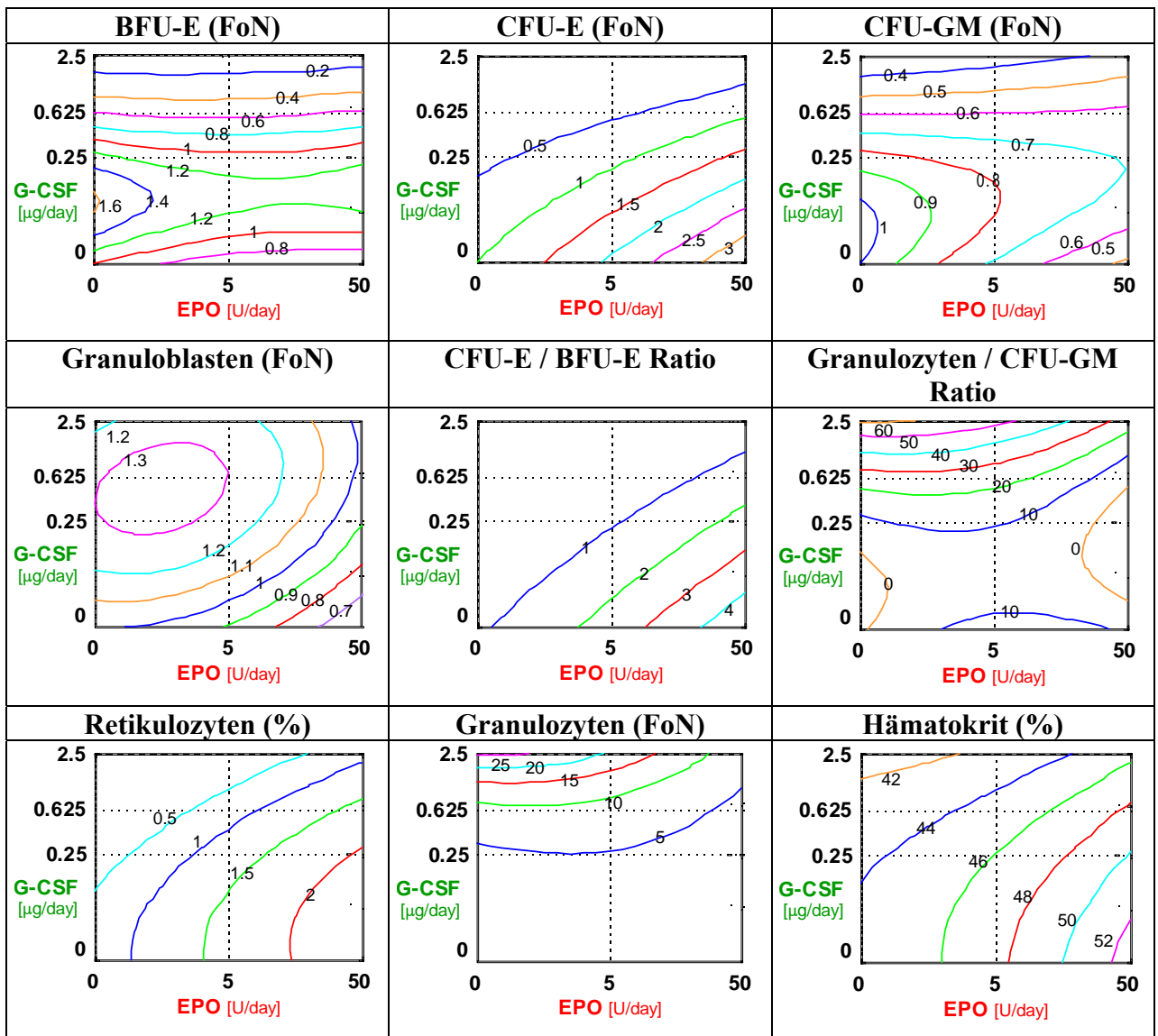


Abbildung 14: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in splenektomierten Mäusen (Regressionsmodell).

Die wesentlichen Effekte der kombinierten Zytokingabe in den gezeigten Experimenten faßt Tabelle 14 zusammen:

Tabelle 14: Zusammenfassung der wesentlichen Effekte und Interaktionen der simultanen Applikation von EPO und G-CSF auf den hämatopoetischen Systemzustand an Tag 7.

	EPO	G-CSF	EPO x G-CSF
Erythropoese	<ul style="list-style-type: none"> • Anstieg aller erythroiden Zellstufen außer der BFU-E im Knochenmark 	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion der Retikulozyten • Reduktion der Progenitoren im Knochenmark (BFU-E, CFU-E) • kein Effekt auf Hämatokrit (nach 7 Tagen Stimulation) • geringe Stimulation der BFU-E und CFU-E in der Milz 	<ul style="list-style-type: none"> • EPO-induzierter Anstieg der Retikulozyten durch G-CSF vermindert • EPO-induzierter Anstieg der CFU-E in der Milz durch G-CSF verstärkt mit Sättigungseffekt bei hohen Zytokinspiegeln
Granulopoese	<ul style="list-style-type: none"> • geringe Stimulation der Granulozyten • Stimulation der CFU-GM in der Milz 	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhung der Granulozyten im peripheren Blut • Erhöhung der CFU-GM in der Milz • Verminderung der CFU-GM im Knochenmark 	<ul style="list-style-type: none"> • additiver stimulatorischer Effekt auf CFU-GM in der Milz
Thrombopoese	<ul style="list-style-type: none"> • kein Effekt 	<ul style="list-style-type: none"> • Verminderung der Thrombozyten im peripheren Blut 	<ul style="list-style-type: none"> • Modulation der G-CSF induzierten Inhibition bei hohen Dosen EPO

8.2 Pharmakodynamische Modelle

8.2.1 Simultane EPO- und G-CSF-Gabe bei normalen Mäusen

Tabelle 15 zeigt die Annahmen, die im Kompartimentmodell über die linienspezifischen und linienübergreifenden pharmakodynamischen Effekte von EPO und G-CSF gemacht werden.

Tabelle 15: Annahmen über die linienspezifischen und linienübergreifenden pharmakodynamischen Effekte von EPO und G-CSF

	EPO	G-CSF
Erythropoese	<ul style="list-style-type: none"> • Dosisabhängige Erhöhung der Knochenmark-Milz-Migrationsrate von BFU-E • Dosisabhängige Erhöhung der Amplifikation und Verkürzung der Transitzeit in Knochenmark und Milz für CFU-E und PEB • Dosisabhängige Verkürzung der Transitzeit in Knochenmark und Milz für CFU-E und PEB • Dosisabhängige Verkürzung der Transitzeit der residualen Retikulozyten in Knochenmark und Milz 	<ul style="list-style-type: none"> • Dosisabhängige Erhöhung der Knochenmark-Milz-Migrationsrate von BFU-E • Dosisabhängiger Differenzierungsstopp zwischen BFU-E und CFU-E im Knochenmark
Granulopoese	<ul style="list-style-type: none"> • Dosisabhängige Erhöhung der Amplifikation von CFU-GM in der Milz 	<ul style="list-style-type: none"> • Dosisabhängige Erhöhung der Knochenmark-Milz-Migrationsrate von S und CFU-GM • Dosisabhängige Erhöhung der Amplifikation und Verkürzung der Transitzeit in Knochenmark und Milz für PGB • Dosisabhängige Verkürzung der Transitzeit in Knochenmark und Milz für MGB

Die unter diesen Annahmen sich ergebenden Modellresultate für die verschiedenen Zellstufen sind in Abbildung 15 und Abbildung 16 gezeigt. Diese Ergebnisse können direkt mit den weiter oben dargestellten Resultaten der Regressionsanalyse verglichen werden.

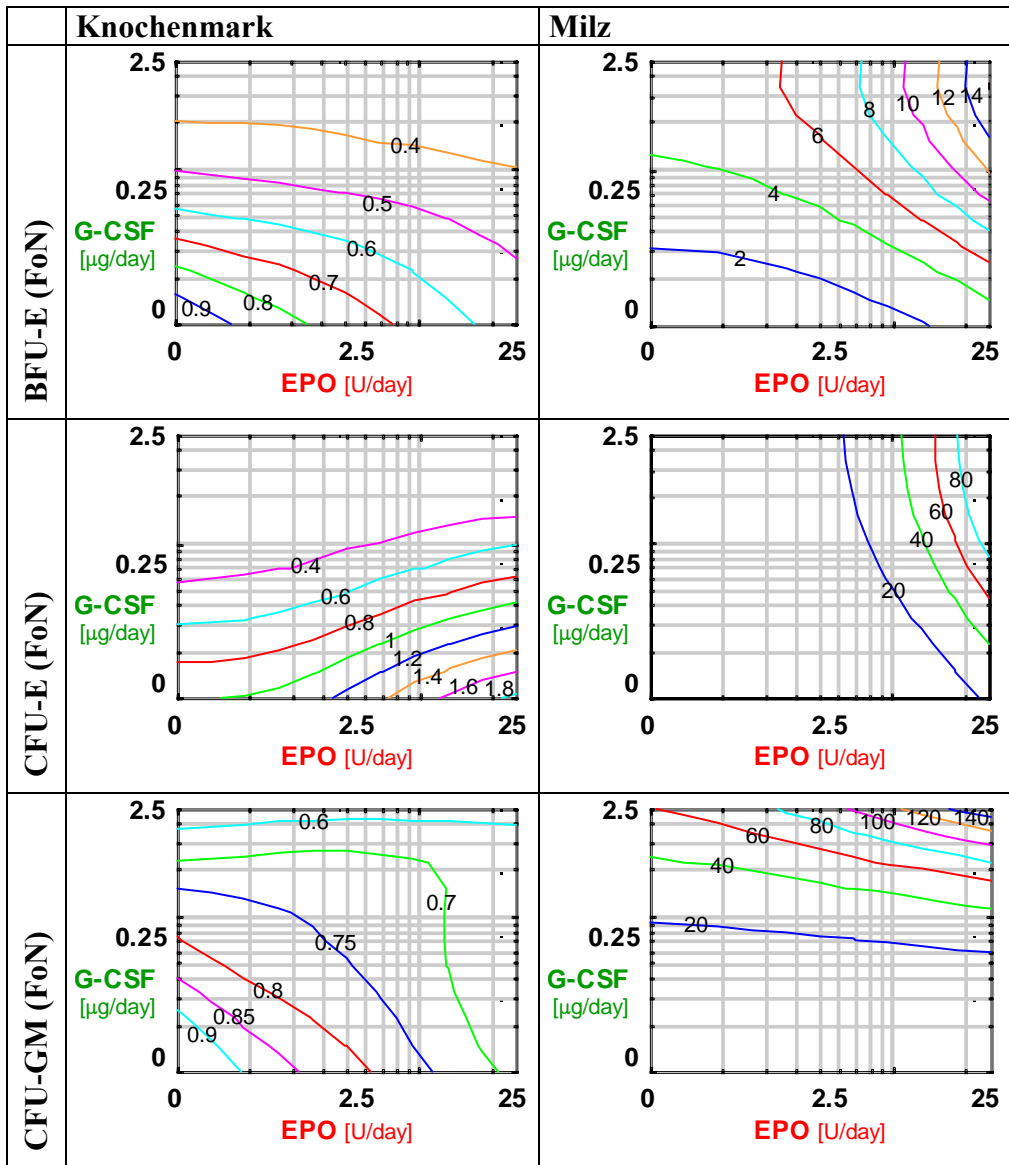


Abbildung 15: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in normalen Mäusen (pharmakodynamisches Modell). Zellen in Knochenmark und Milz.

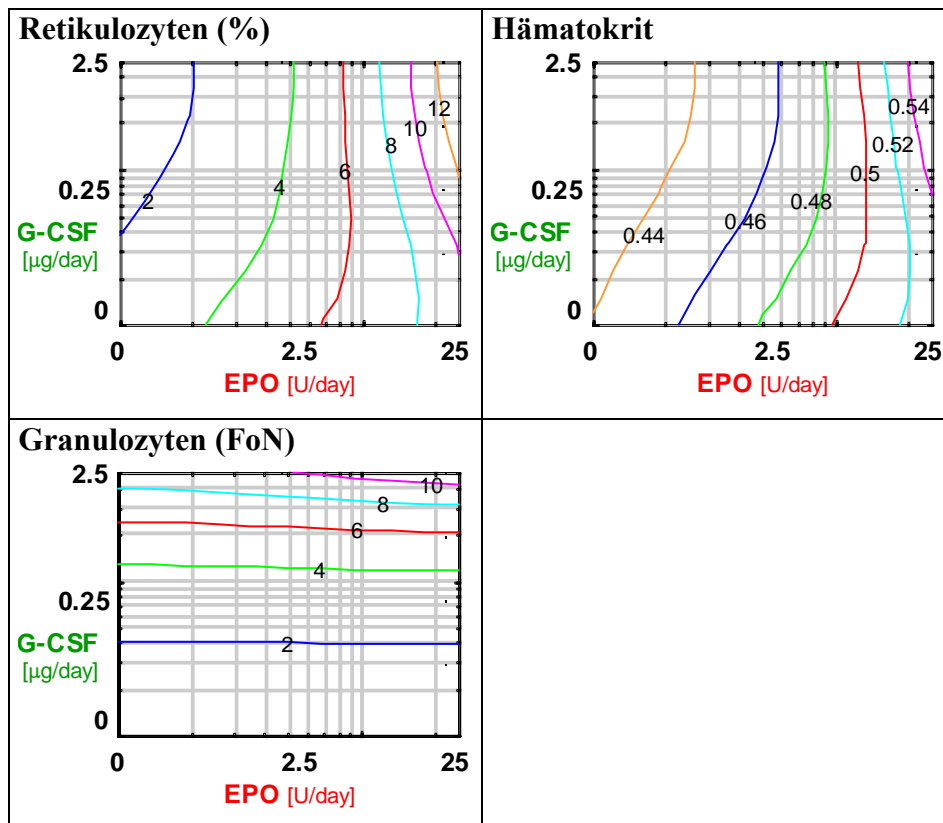


Abbildung 16: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in normalen Mäusen (pharmakodynamisches Modell). Peripheres Blut.

Abbildung 17 zeigt den relativen Beitrag der Milz an der Bildung peripherer Blutzellen unter der Stimulation. Der lienale Anteil an der Erythrozytenproduktion nimmt sowohl unter EPO- als auch G-CSF-Stimulation zu und erreicht unter maximaler Dosierung beider Zytokine über 90%. Im Gegensatz dazu wird der lienale Produktionsanteil in der Granulopoese hauptsächlich durch G-CSF gesteigert (maximaler Anteil 35%).

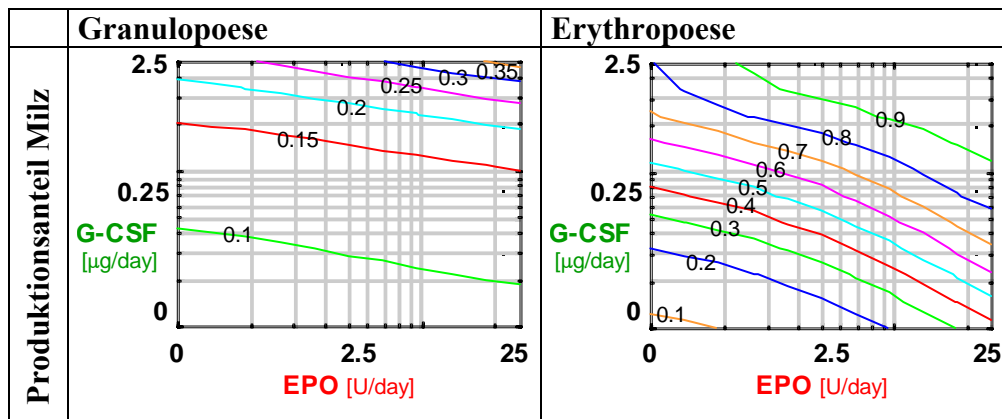


Abbildung 17: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in normalen Mäusen (pharmakodynamisches Modell). Anteil der Milz an der Granulo- und Erythropoese.

Modellanalyse des Effekts von EPO auf die lienalen CFU-GM

Gegenüber den bislang entwickelten Einzelmodellen wird im jetzigen kombinierten Modell die zusätzliche Annahme einer EPO-abhängigen Erhöhung der Amplifikation von CFU-GM in der Milz gemacht. Nachfolgend wird eine modellbasierte Überlegung beschrieben, die zur Annahme dieses Wirkmechanismus führte.

Die experimentellen Daten zeigen, daß das lienale Kompartiment der CFU-GM eine dosisabhängige Zunahme sowohl durch G-CSF als auch durch EPO zeigt. Der Effekt durch G-CSF ist mit einer Zunahme auf das 80-fache des normalen Ausgangswert stärker als der Anstieg auf das 20-fache durch EPO. Beide Faktoren in simultaner Applikation führen zu einem starken Anstieg auf das 140-fache des Ausgangswertes.

Die Kinetik der lienalen CFU-GM ist im Modell von folgenden 5 Parametern abhängig:

- Amplifikationsrate
- Transitzeit
- Einstromrate der aus dem Knochenmark emigrierten CFU-GM
- Seeding efficiency der aus dem Knochenmark in die Milz migrierenden CFU-GM
- Einstromrate der aus dem lienalen Stammzellkompartiment stammenden Zellen

Die G-CSF-dosisabhängige Stimulation der CFU-GM erfolgt durch eine Steigerung der Amplifikationsrate, durch eine Steigerung der Migrationsrate von CFU-GM aus dem Knochenmark in die Milz (mit einer konstanten Seeding efficiency von 0,4 in der Milz), sowie indirekt

durch eine Steigerung der Migration von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Milz (ebenfalls mit einer konstanten seeding efficiency von 0,4). Damit wird bei Dosisstufe 0,25 µg/d ein ca. 20-facher Anstieg, bei Dosisstufe 2,5 µg/d ein ca. 60-facher Anstieg der lienalen CFU-GM erreicht. Ein dosisabhängiger EPO-Effekt wird durch diese Annahmen allein jedoch nicht erreicht, die Äquipesekurven verlaufen unter diesen Annahmen parallel zur EPO-Achse. Zur Erklärung dieses Effektes im Modell bedarf es demnach einer zusätzlichen Annahme. Es wurden folgende alternative Annahmen im Modell geprüft

A) EPO-abhängige Migration von CFU-GM aus dem Knochenmark in die Milz

Im Knochenmark ist unter alleiniger EPO-Applikation kein nennenswerter Effekt auf die CFU-GM zu verzeichnen. Bei mittlerer EPO-Dosis ist ein ca. 1,4-facher Anstieg zu finden, die Kompartimentgröße fällt jedoch bei höheren Dosen auf den Ausgangswert zurück. Wird im Modell nun eine EPO-abhängige Emigration von CFU-GM aus dem Knochenmark angenommen, ergibt sich eine deutliche dosisabhängige Verminderung der CFU-GM im Knochenmark mit jedoch nur unzureichendem Anstieg der CFU-GM in der Milz. Auch unter Annahme einer Seeding efficiency von 1,0 kann im Modell keine den Daten entsprechende Zunahme der Kompartimentgröße auf den 140-fachen Ausgangswert erreicht werden.

B) EPO-abhängige Migration von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Milz

Die Simulationsergebnisse unter Annahme einer zusätzlich durch EPO stimulierten Stammzellmigration vom Knochenmark in die Milz erklären den starken Anstieg der lienalen CFU-GM ebenfalls nicht.

C) EPO-abhängige Stimulation der Amplifikation der CFU-GM in der Milz

Es wird eine dosisabhängigen Steigerung der Amplifikation der lienalen CFU-GM durch EPO angenommen, wobei die G-CSF-dosisabhängige Steigerung der Amplifikation multiplikativ verstärkt wird. Unter dieser Annahme kann die Kompartimentgröße den beobachteten 140-fachen Anstieg bei simultaner Wachstumsfaktorgabe in hohen Dosen erreichen, ohne daß die Kompartimentgröße der CFU-GM im Knochenmark beeinträchtigt wird. Insbesondere wird die überproportionale Zunahme im höheren Dosisbereich gut reproduziert.

8.2.2 Simultane EPO- und G-CSF-Gabe bei splenektomierten Mäusen

Für die Modellierung des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 nach kontinuierlicher simultaner Gabe von EPO und G-CSF bei splenektomierten Mäusen gelten die in Tabelle 15 definierten Modellannahmen in unveränderter Weise. Die Modellierung erfolgt durch vollständige Abtrennung der Milzkompartimente für Stammzellen, Erythro- und Granulopoese. Es wird angenommen, daß weiterhin eine Emigration von Zellen aus dem Knochenmark stattfindet, diese jedoch verloren gehen. Eine Rückmigration der ausgeschwemmten Zellen vom peripheren Blut zurück ins Knochenmark wird also nicht angenommen. Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die Ergebnisse der Modellrechnungen. Es findet sich ohne zusätzliche Annahmen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten (vgl. Konturdiagramme der Ergebnisse der Regressionsanalyse).

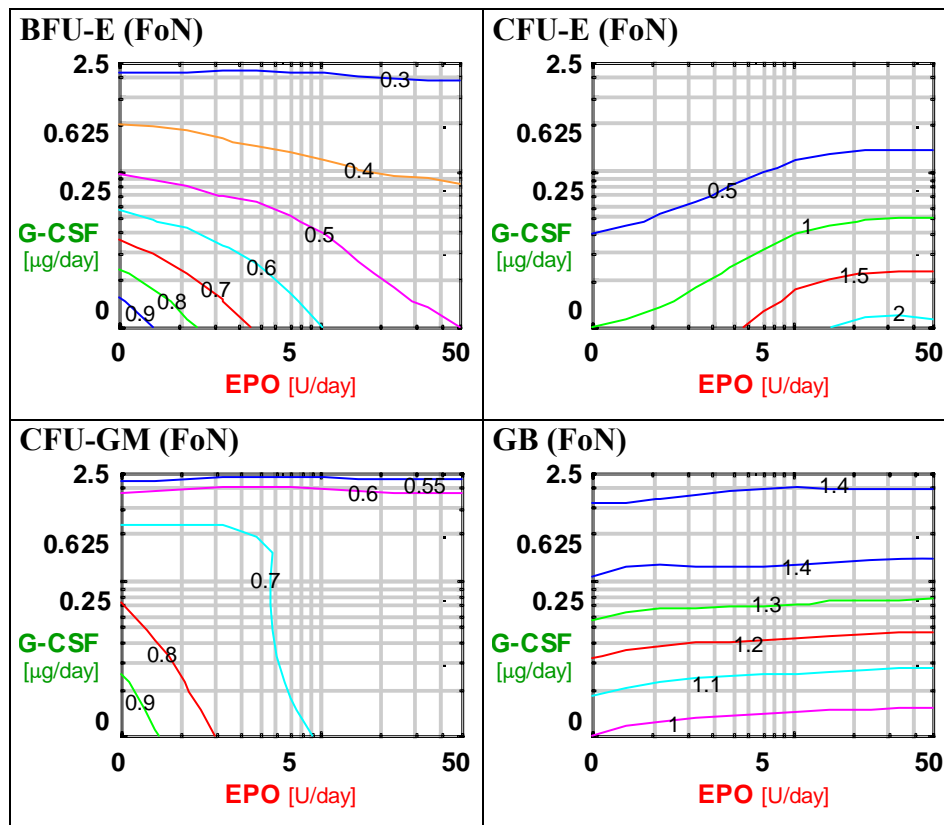


Abbildung 18: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in splenektomierten Mäusen (pharmakodynamisches Modell). Zellen in Knochenmark und Milz.

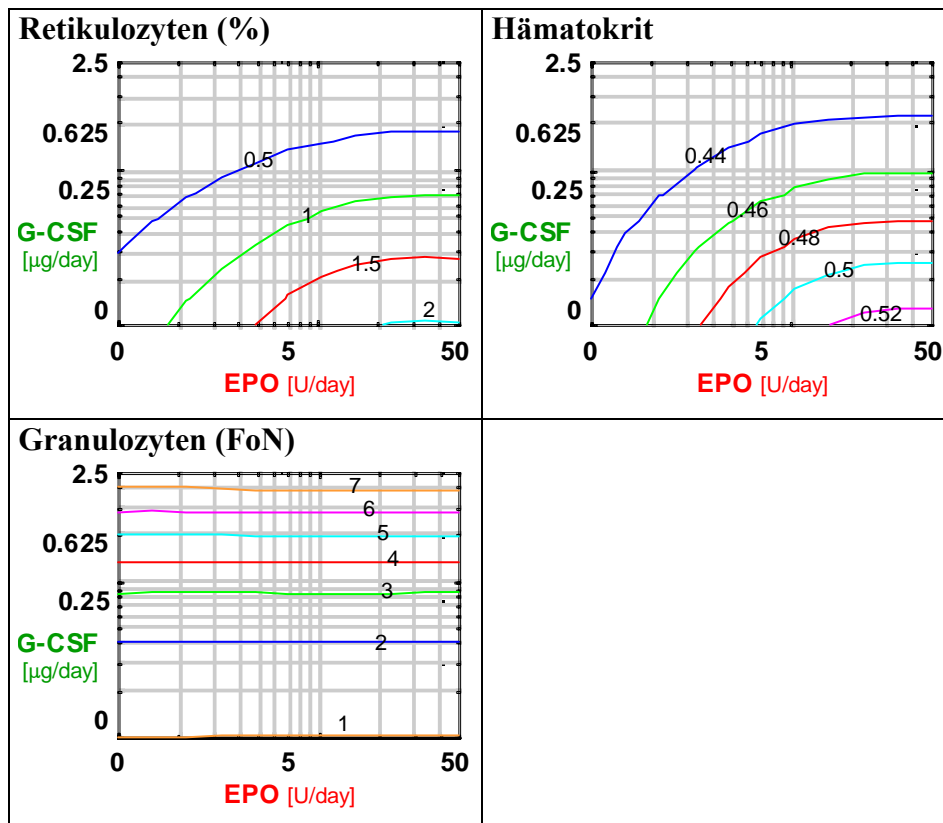


Abbildung 19: Konturdiagramme des hämatopoetischen Systemzustandes am Tag 7 unter simultaner EPO- und G-CSF-Stimulation in splenektomierten Mäusen (pharmakodynamisches Modell). Peripheres Blut.

8.3 Langzeitstimulation mit G-CSF

Es liegen in der Literatur bislang kaum experimentelle Daten über Langzeitstimulationen der murinen Hämatopoese mit G-CSF vor. Aus diesem Grunde wurde durch NIJHOF und DE HAAN im Rahmen einer Kooperation ein entsprechendes Langzeitexperiment durchgeführt und die Daten zur Modellanalyse überlassen. Wie in Abschnitt 7.1.2 bereits gezeigt, findet sich selbst nach 8-wöchiger Dauerstimulation keine Einstellung eines neuen Gleichgewichts der Zellzahlen auf einem höheren Niveau. Es finden sich vielmehr Fluktuationen der Zellzahlen, welche durch das bisherige Modell nicht zu erklären sind. Dieser Abschnitt befaßt sich deshalb mit der Frage, welche zusätzlichen Modellannahmen erforderlich sind, um die beobachteten Phänomene unter Langzeitstimulation zu erklären.

Verschiedene experimentelle Untersuchungen anderer Autoren haben gezeigt, daß die Elimination von G-CSF durch zwei wesentliche Prozesse bestimmt wird. Zum einen wird G-CSF unspezifisch über die Niere ausgeschieden. Zum anderen gibt es Hinweise auf einen quantitativ bedeutsamen Abbau über eine Interaktion des G-CSF-Liganden mit seinem zellständigen Rezeptor (der hauptsächlich auf neutrophilen Granulozyten zu finden ist) und nachfolgender

Endozytose. Dieser biologische Prozeß wird im Modell bislang nicht als Regulationsmechanismus berücksichtigt. Der Abbau von G-CSF folgt im Modell einer Kinetik erster Ordnung mit konstanter Halbwertszeit von 3,3 h. Biologisch entspricht dies einer (unspezifischen) Elimination durch glomeruläre Filtration.

Es soll daher im Folgenden die Frage untersucht werden, ob durch Annahme eines zusätzlichen spezifischen Abbaus die Daten adäquat zu erklären sind. Es werden dazu schrittweise drei Modellvarianten untersucht.

Variante 1: Alleinige unspezifische G-CSF-Elimination

Diese Variante entspricht dem bisherigen Modell mit konstanter G-CSF-Eliminationshalbwertszeit von 3,3 Stunden. Unter dieser Annahme entspricht der G-CSF-Spiegel im Modell während der gesamten Simulationszeit von 56 Tagen dem 50-fachen des Normalwertes (entspricht exogener rh-G-CSF-Dosis von 2,5 µg/Maus/d). Als Resultat zeigen die peripheren Neutrophilen eine unaufhörliche Expansion ihrer Zahl. Eine entsprechende Expansion findet sich auch in den granulozytären Progenitor- und Präkursorkompartimenten der Milz und der Gesamtzahl der CFU-GM und Granuloblasten. Durch den G-CSF-vermittelten Differenzierungsstop kommt es im CFU-E-Kompartiment im Knochenmark zu einer fast vollständigen Depletion ab Tag 7 sowie einer Verminderung der nachfolgenden Erythroblasten im Knochenmark. Die anhaltende Migration von BFU-E aus dem Knochenmark in die Milz führt zu einer Reduktion des BFU-E-Kompartimentes im Knochenmark auf 25% des Normalwertes. Die hiermit im Knochenmark supprimierte Erythropoese kann mittels stimulierter lienaler Erythropoese in der 3. Woche ausgeglichen werden und resultiert in einem erneuten Hämatokritanstieg auf etwa den Ausgangswert am Ende der Simulation.

Variante 2: Vorgabe des gemessenen G-CSF-Spiegels

In dieser Modellvariante wird die bisherige Regulation des G-CSF-Kompartimentes durch unpezifische Elimination ausgeschaltet. Um das grundsätzliche Modellverhalten unter dem tatsächlich beobachteten G-CSF-Spiegelverlauf zu betrachten, wird der Verlauf des G-CSF-Spiegels im Modell durch den experimentell beobachteten Verlauf vorgegeben. Diese Modellvariante beinhaltet deshalb zunächst keine explizite Annahme über einen Regulationsmechanismus, der zu dem beobachteten Spiegelverlauf führt.

Unter dieser Annahme findet der in Variante 1 beobachtete stete Anstieg der Milzkompartimente nicht mehr statt. Die Gesamtzahlen der Progenitoren stimmen recht gut mit den experimentellen Beobachtungen überein, ebenso das Verhalten der Progenitoren und Präkursoren

im Knochenmark. Die Neutrophilen zeigen nach einem raschen Anstieg auf etwa das 15-fache des Normwertes einen steten Abfall entsprechend dem absinkenden G-CSF-Spiegel. Der Hämatokrit fällt etwas zu stark ab und hat am Ende der Simulation den Ausgangswert nicht wieder erreicht in Übereinstimmung zum experimentell gemessenen Wert.

Variante 3: Zusätzliche spezifische G-CSF-Elimination

Es wird gegenüber dem bisherigen Modell ein zusätzlicher spezifischer G-CSF-Abbau angenommen (entsprechend einem rezeptorvermittelten G-CSF-Abbau) sowie eine zusätzliche Elimination ab Tag 20 (entsprechend der Beobachtung von IgG-Antikörpern gegen exogenes G-CSF ab diesem Zeitpunkt).

Die Bilanzgleichung für das G-CSF-Kompartiment wird für diese Modellvariante deshalb wie folgt formuliert:

$$\frac{dC_{GP}}{dt} = GCSF_{endo} + GCSF_{exo} - \frac{C_{GP}}{T_{GP}} - C_{GP} (k_1 C_{MGB_S_rel} + k_2 C_{GRA_rel}) - C_{GP} f_{IgG}$$

Die einzelnen Größen in dieser Gleichung sind wie folgt charakterisiert:

$GCSF_{endo}$	Einstrom durch endogene Produktion
$GCSF_{exo}$	Einstrom durch exogene Applikation
C_{GP}	Absolute Größe des G-CSF-Kompartimentes
T_{GP}	Transitzeit (Eliminationskonstante für unspezifischen Abbau)
k_1	Wichtungsfaktor für Rezeptordichte auf lienalen postmitotischen Präkursoren
k_2	Wichtungsfaktor für Rezeptordichte auf peripheren Granulozyten
$C_{MGB_S_rel}$	Relative Größe des Kompartimentes der lienalen postmitotischen Präkursoren
$C_{MGB_S_rel}$	Relative Größe des Kompartimentes der peripheren Granulozyten
f_{IgG}	Eliminationskonstante für antikörpervermittelten Verlust

Nach MATSUZAKI exprimieren vor allem die lienalen Zellstufen unter G-CSF-Einfluss vermehrt membranständige G-CSF-Rezeptoren (Matsuzaki et al., 1996). Zur Abschätzung der Wichtung der zellspezifischen Konsumption wurde die Verteilung der G-CSF-Rezeptoren bei

C57bl/6-Mäusen aus Untersuchungen von MCKINSTRY herangezogen. Demnach beträgt die Gesamtzahl an Rezeptoren pro Zellen auf polymorphen Neutrophilen 260, bei Promyelozyten und Myelozyten 200, bei Blasten 160, bei Progenitoren 30 und auf Stammzellen 60-80 (McKinstry et al., 1997). Im Modell wurde daher ein Verhältnis der Konsumption zwischen Granulozyten und lienalen reifenden Präkursoren von 1 : 0,475 angenommen. Um die im Experiment gemessenen IgG-Antikörper gegen rh-G-CSF im Modell zu implementieren wurde ein zusätzlicher Ausstrom ab Tag 21 mit einer Eliminationskonstante f_{IgG} angenommen.

Durch den nun explizit berücksichtigten Konsumptionsmechanismus kommt die charakteristisch verlaufende G-CSF-Serumspiegel-Kurve auch in der Modellsimulation zustande. Durch den etwa ab Tag 10 wieder deutlich erniedrigten G-CSF-Spiegel wird die Expansion der lienalen granulozytären Kompartimente und die Suppression der erythropoetischen Progenitoren im Knochenmark verhindert. Im peripheren Blut spiegelt sich dies in einem zunächst plateau-förmigen Verlauf der Granulozyten wieder. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Absinken durch die antikörpervermittelte weitere Abnahme des G-CSF-Spiegels. Die Größe der lienalen Kompartimente liegen in der Simulation verglichen mit den experimentellen Daten allerdings zu niedrig.

Die Abbildungen 20 bis 23 zeigen den Vergleich der Modellergebnisse unter diesen drei erläuterten Varianten mit den Mittelwerten der experimentellen Daten aus dem G-CSF-Langzeitexperiment. Die Modellvariante 2 ist als Zwischenschritt in der Modellbildung aufzufassen. Es werden deshalb nur die wesentlichen Unterschiede zwischen der Modellvariante 1 (bisheriges Modell) und Modellvariante 3 (neu vorgeschlagenes Modell) nachfolgend erläutert. Modellvariante 3 reproduziert gegenüber Modellvariante 1 den Verlauf der peripheren Granulozyten als auch den Verlauf den G-CSF-Spiegels deutlich besser. Durch den Anstieg der Granulozytenanzahl kommt es durch die angenommene spezifische (granulozytenvermittelte) Elimination zu einer Absenkung des G-CSF-Spiegels trotz weiter stattfindender exogener Applikation, welche wiederum eine Begrenzung des Wachstums der peripheren Granulozytenzahl bewirkt. Die zusätzlich angenommene antikörpervermittelte Elimination ab Tag 20 bewirkt eine Absinken der Granulozytenzahl ab diesem Tag. Im wesentlichen wird die Wachstumsbegrenzung durch eine Bremsung der Expansion von CFU-GM und Granuloblasten in der Milz verursacht. Für die Erythropoese ergeben sich ebenfalls Unterschiede im Verlauf von CFU-E und Erythroblasten zwischen Knochenmark und Milz im Vergleich der zwei Modellvarianten, die jedoch auf die Gesamtdynamik der Erythropoese (gemessen an Gesamt BFU-E, Gesamt CFU-E, Retikulozyten und Hämatokrit) keine Auswirkung zeigen.

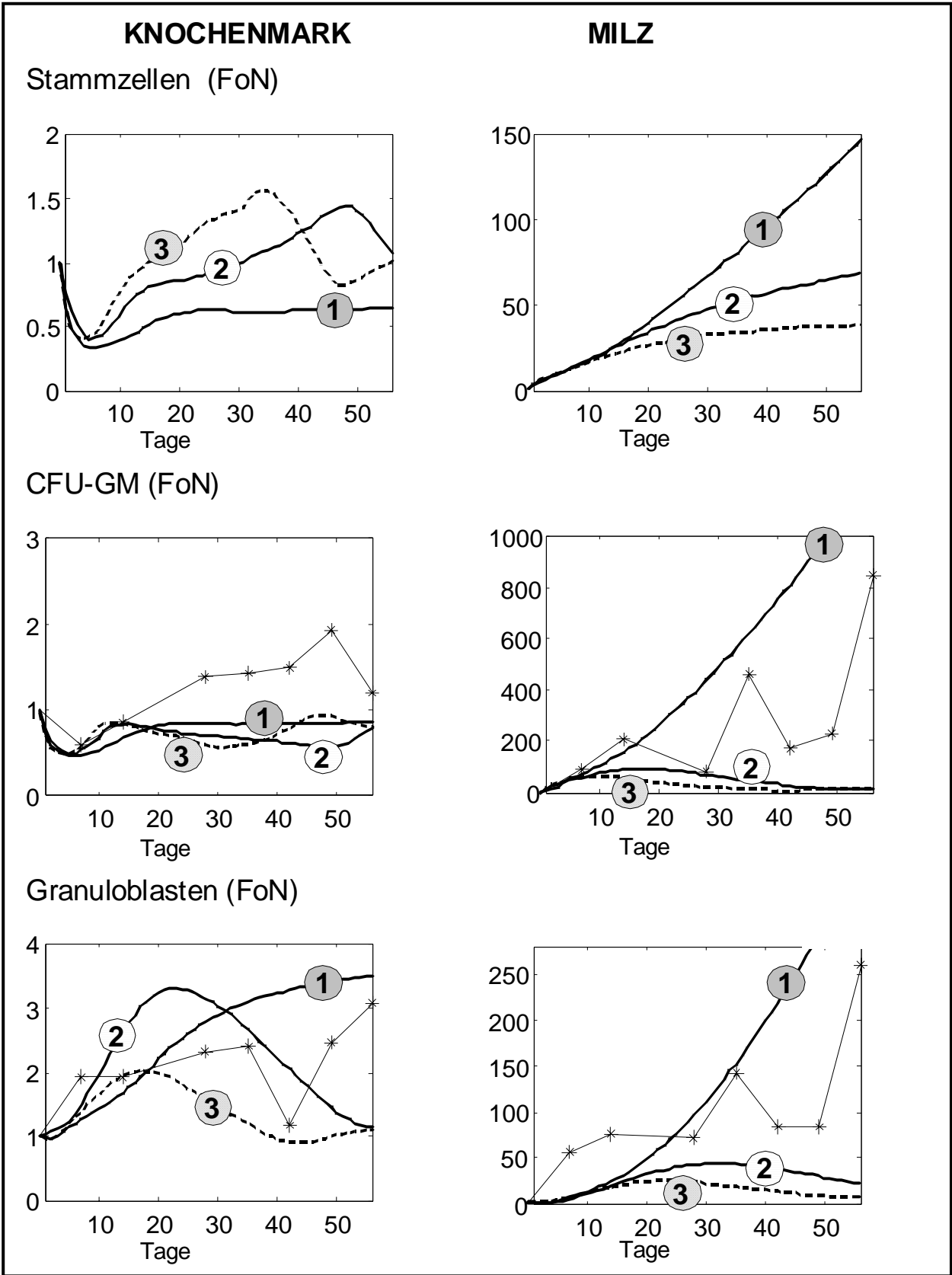


Abbildung 20: Experimentelle Daten (*—) und Simulationsergebnisse der Modellvarianten 1, 2 und 3. Granulopoese.

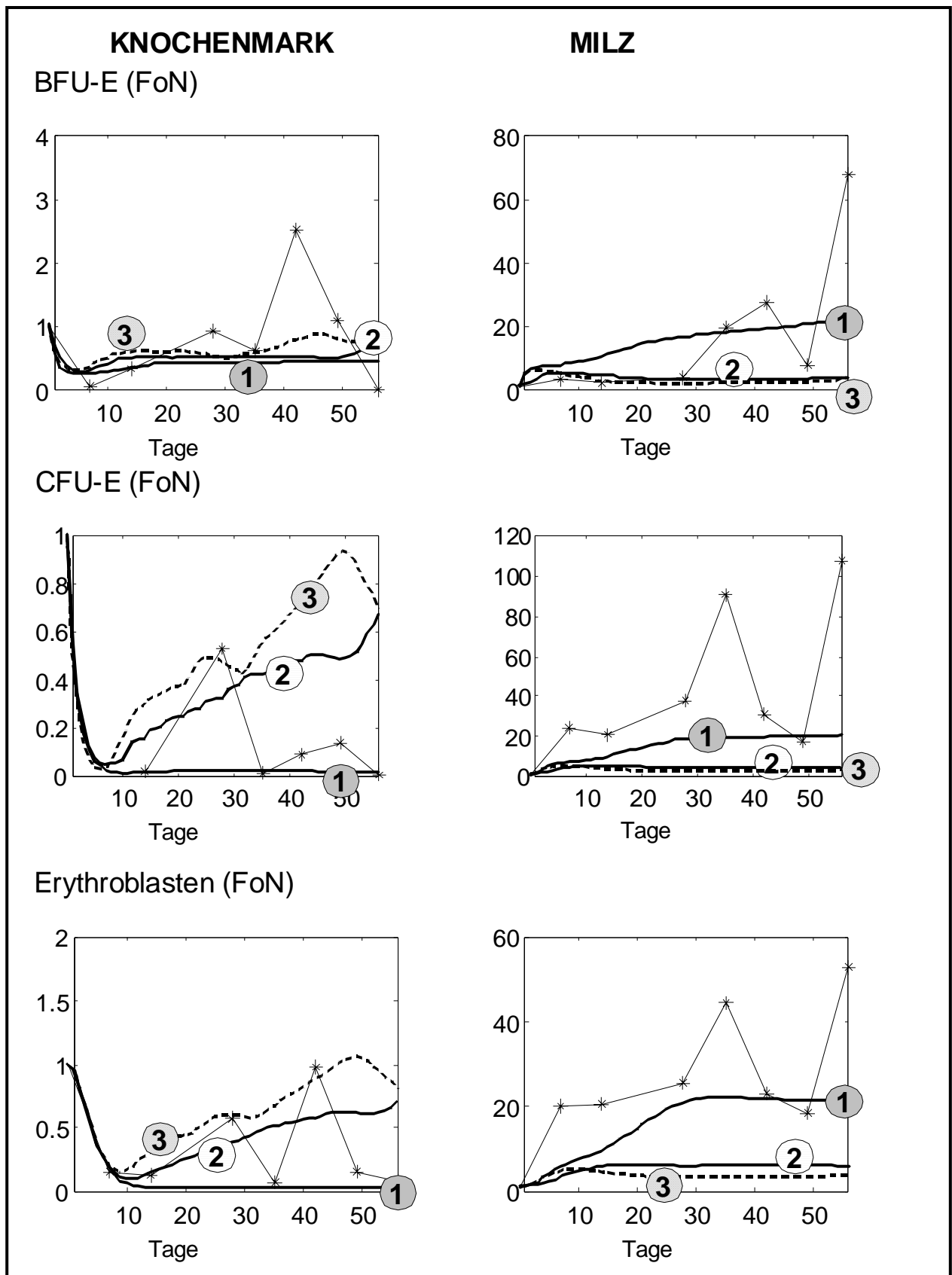
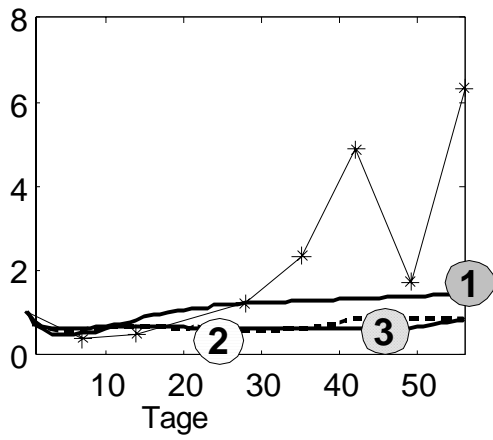


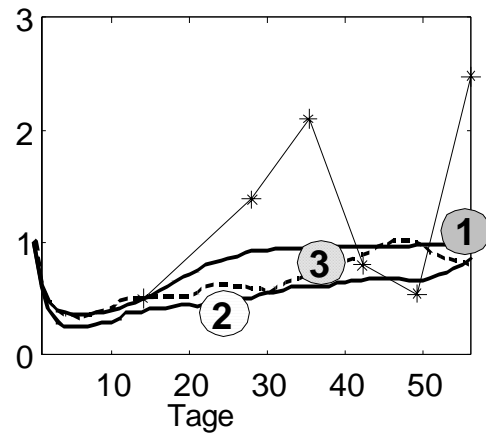
Abbildung 21: Experimentelle Daten (*—) und Simulationsergebnisse der Modellvarianten 1, 2 und 3. Erythropoese.

PROGENITOREN

Gesamt-BFU-E (FoN)



Gesamt-CFU-E (FoN)



Gesamt-CFU-GM (FoN)

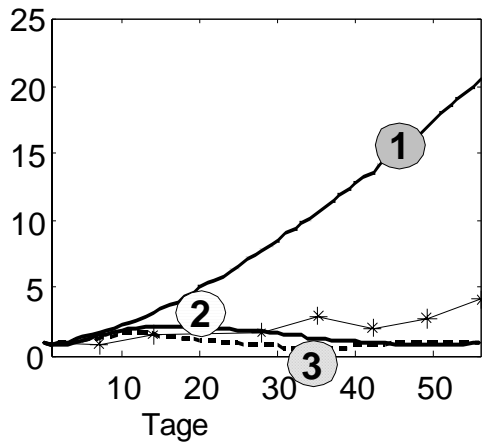


Abbildung 22: Experimentelle Daten (*—) und Simulationsergebnisse der Modellvarianten 1, 2 und 3. Progenitoren gesamt.

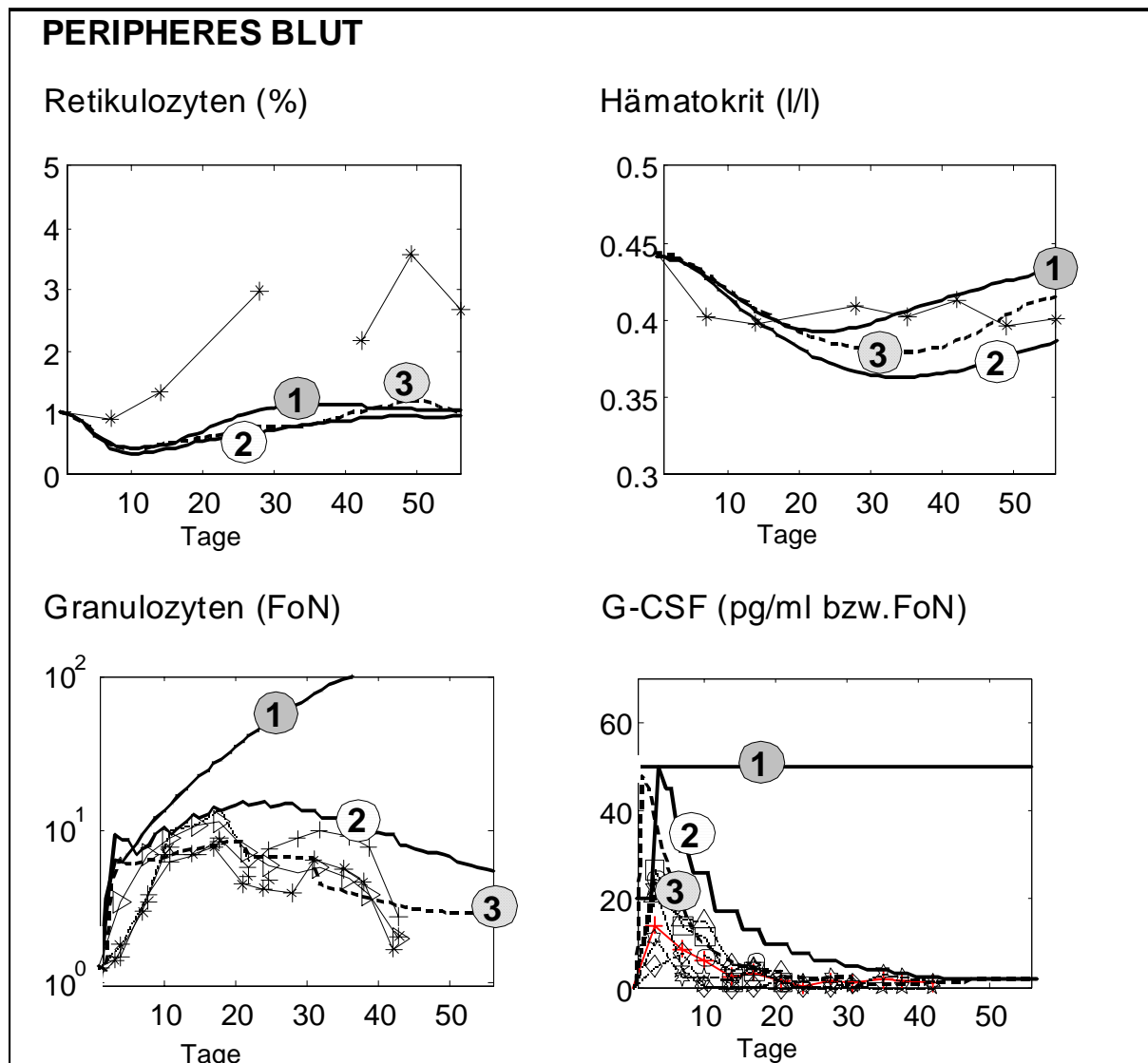


Abbildung 23: Experimentelle Daten (*—) und Simulationsergebnisse der Modellvarianten 1, 2 und 3. Peripheres Blut.

8.4 Rückmigration von Progenitoren von der Milz in das Knochenmark

In den bisherigen Modellen wird eine Migration von Stammzellen, BFU-E und CFU-GM aus dem Knochenmark in die Milz angenommen. Die migrierten Zellen siedeln sich zu einem konstanten Anteil in der Milz an und beteiligen sich an der dort stattfindenden lienalen Hämatopoese. Diese Migration wird durch G-CSF und EPO dosisabhängig gesteigert. Ein derartiges Modell ist mit beobachteten Daten zum dynamischen Verlauf unter Stimulation gut verträglich. Es ist bislang unklar, ob unmittelbar nach Aufhören der Zytokinstimulation eine Rückmigration von Zellen aus der Milz in der Knochenmark stattfindet und ob eine solche Rückmigration für die Erholungsdynamik von quantitativer Bedeutung ist.

Um diese Frage zunächst experimentell zu untersuchen, wurde von NIJHOF und Mitarbeitern folgendes Experiment durchgeführt: Nach 7-tägiger Stimulation mit 2,5 µg/d rhG-CSF wurden C57/Bl-Mäuse splenektomiert oder erhielten eine Scheinoperation. An den Tagen 0 bis 5 nach dem Eingriff wurden BFU-E, CFU-GM, CFU-E und kernhaltige Zellen in Knochenmark, Milz (nur scheinoperierte Tiere) und peripherem Blut gemessen. Des weiteren wurden Leukozyten, Retikulozyten und der Hämatokrit bestimmt.

Abbildung 24 zeigt, daß sich das Verhalten der Progenitoren CFU-GM und BFU-E im peripheren Blut zwischen den beiden Gruppen deutlich unterscheidet. Während in der splenektomierten Gruppe kaum Veränderungen zu beobachten sind, fällt die Konzentration in der scheinoperierten Gruppe von hohem Niveau bis zum Tag 5 deutlich ab.

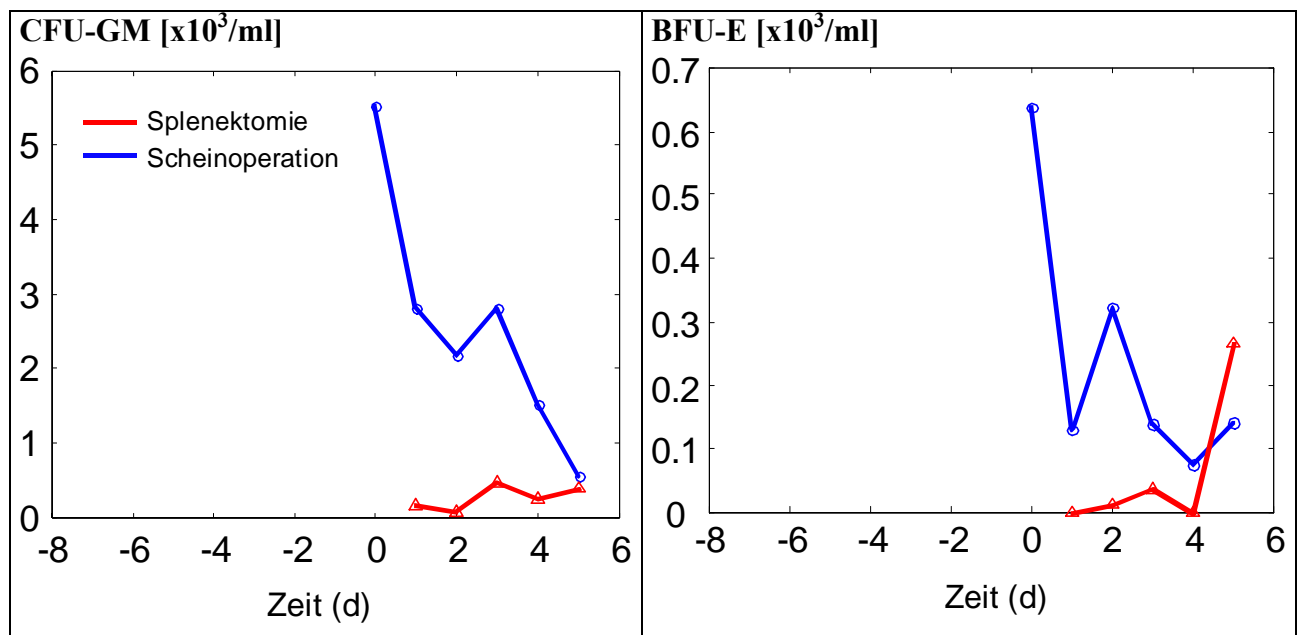


Abbildung 24: Konzentration von Progenitorzellen im peripheren Blut splenektomierter (rot) und scheinoperierter (blau) Mäuse nach Ende der 7-tägigen Stimulation mit 2,5 µg/d G-CSF.

In den Progenitor-kompartimenten des Knochenmarkes tritt bei den scheinoperierten Mäusen ein früherer Wiederanstieg der unter G-CSF-Stimulation verringerten Zellzahlen in den Zellstufen BFU-E, CFU-E und CFU-GM ein. In der Milz hingegen kommt es bis an Tag 5 der Erholungsphase zu einem Absinken der stimulierten Kompartimente BFU-E, CFU-E und CFU-GM auf nahezu Normalwert.

Die beobachteten Unterschiede könnten durch eine Rückmigration von Zellen aus der Milz verursacht werden. Im Modell wurde deshalb die Annahme einer Rückmigration von Zellen aus der Milz in das Knochenmark auf Verträglichkeit mit den experimentellen Beobachtun-

gen geprüft. Dazu wird in den Differentialgleichungen für die linealen Kompartimente BFU-E und CFU-GM ein zusätzlicher Term definiert, der einen Abstrom von Zellen mit einer Kinetik erster Ordnung (d.h. proportional zur Zellzahl im Kompartiment) beschreibt. Gleichzeitig wird ein Einstrom dieser Zellen in die entsprechenden Knochenmark-Kompartimente angenommen.

Im Modell wird zunächst dem Experiment entsprechend eine 7-tägige Behandlung mit 2,5 µg/d G-CSF simuliert (Tag -7 bis 0). Ab Tag 0 erfolgt keine G-CSF-Stimulation mehr, so daß die weitere Dynamik des Systems durch das Erholungsverhalten bestimmt wird. Verglichen wird das bisherige Modell ohne Annahme einer Rückmigration mit einem neuen Modell, welches eine Rückmigration berücksichtigt. Abbildung 25 bis Abbildung 27 zeigen die entsprechenden Ergebnisse. Für die erythro- und granulopoetischen Progenitoren in der Milz führt die Annahme eines Ausstroms dieser Zellen zu einer deutlich besseren Anpassung des Modells an die Daten als ohne diese Annahme. Im Knochenmark führt der angenommene Einstrom dieser Zellen jedoch kaum zu Änderungen im Erholungsverhalten der Progenitoren. Dies gilt auch für den Vergleich der Zellstufen im peripheren Blut. Im Knochenmark wird eine Anwachsrate für BFU-E und CFU-GM von je 5% der einströmenden Zellen angenommen. Die Remigrationsrate aus der Milz beträgt für CFU-GM 60%, für BFU-E 40%. Im Erholungsverhalten der CFU-E im Knochenmark fällt auf, daß diese Zellstufe erst nach Tag 1 wieder zu steigen beginnt. Dieses Verhalten kann im Modell nur reproduziert werden, wenn eine um 24 Stunden verzögerte Aufhebung des durch G-CSF verursachten Differenzierungsstopps angenommen wird.

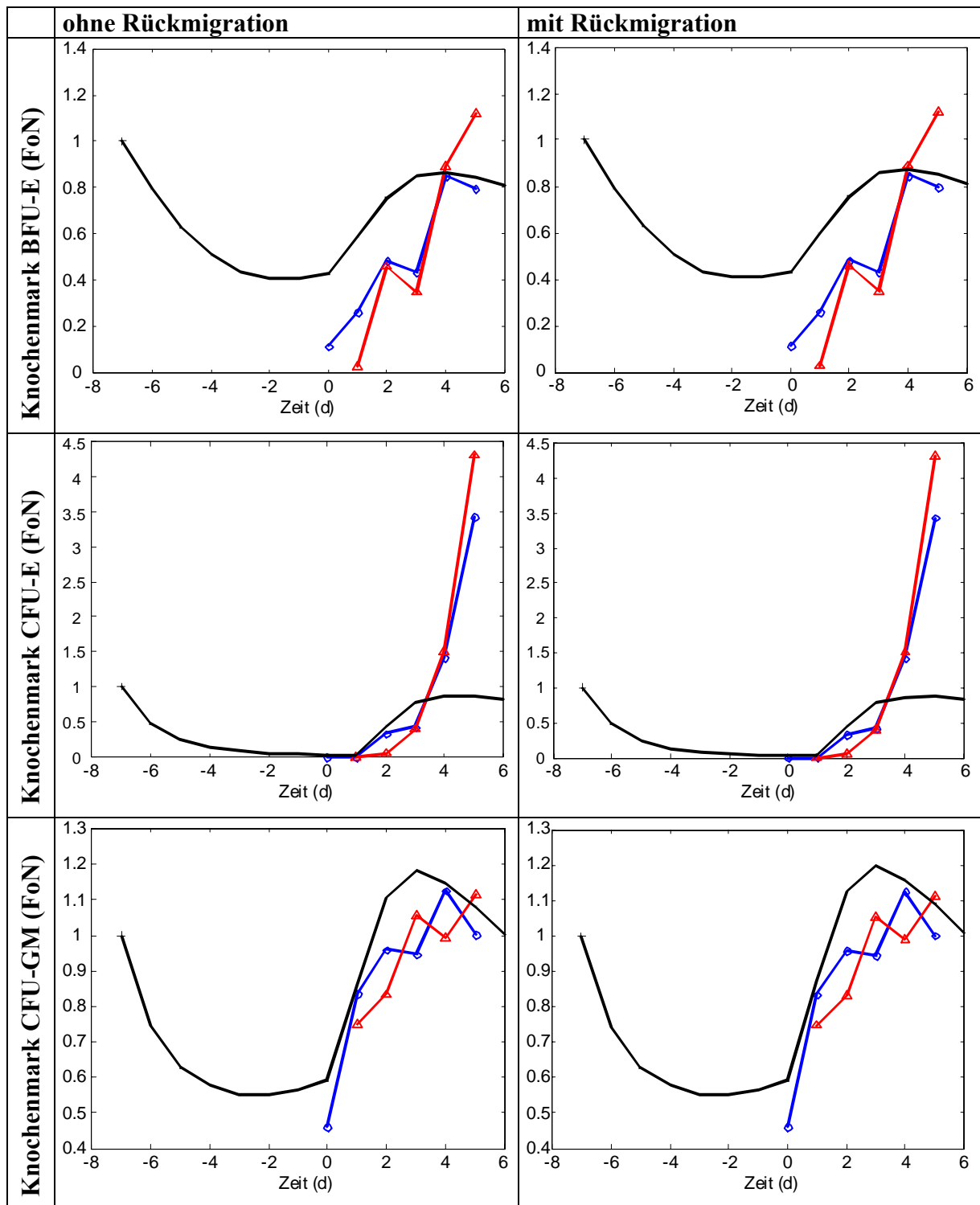


Abbildung 25: Vergleich des Verhaltens der Progenitoren in der Erholungsphase im Knochenmark nach 7-tägiger Stimulation mit $2,5 \mu\text{g/d}$ G-CSF im Modell ohne und mit Annahme einer Rückmigration. Schwarz: Simulation, blaue: scheinoperierte Tiere, rot: splenektomierte Tiere.

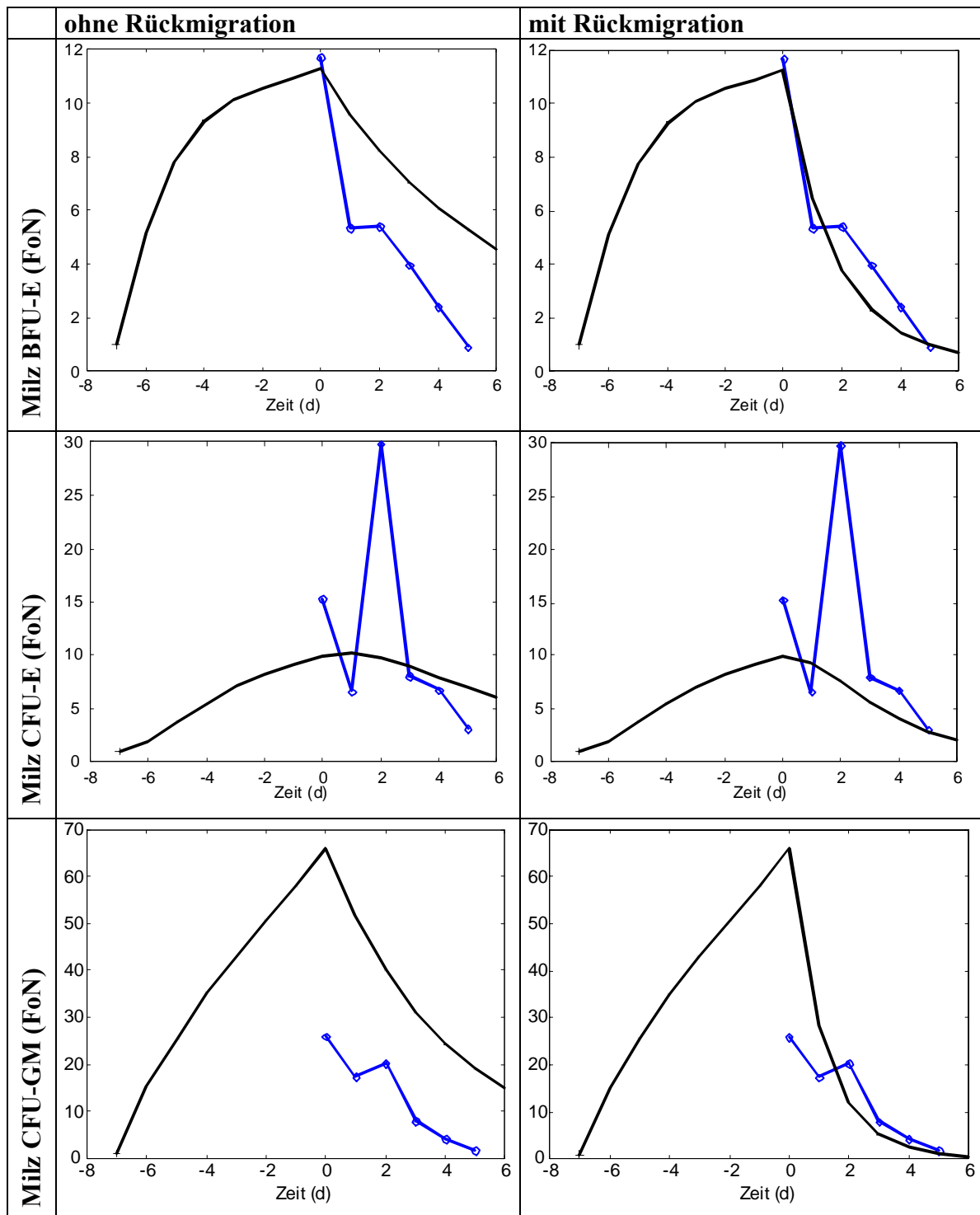


Abbildung 26: Vergleich des Verhaltens der Progenitoren in der Erholungsphase in der Milz nach 7-tägiger Stimulation mit $2,5 \mu\text{g/d}$ G-CSF im Modell ohne und mit Annahme einer Rückmigration. Schwarz: Simulation, blaue: scheinoperierte Tiere.

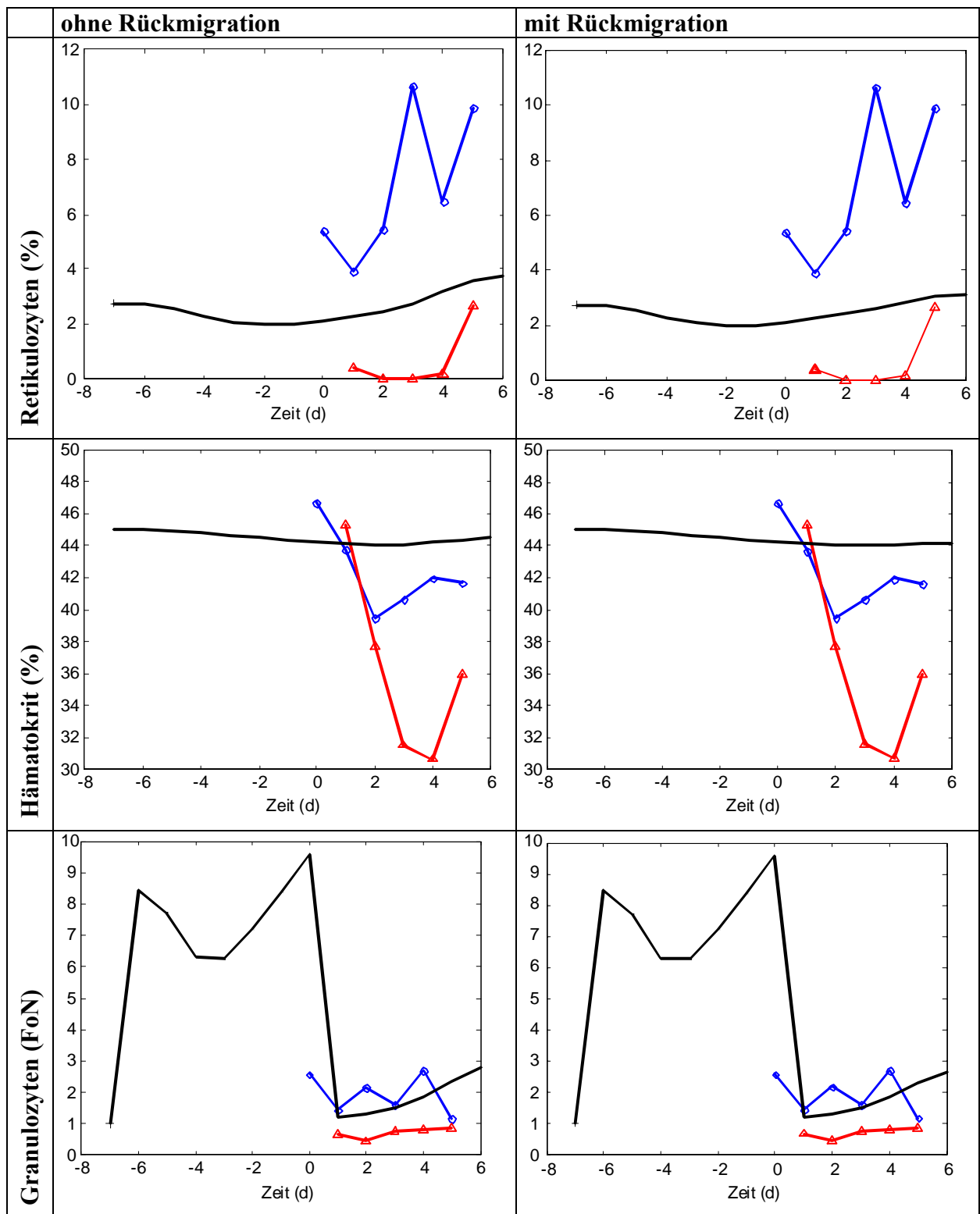


Abbildung 27: Vergleich des Verhaltens der peripheren Blutzellen in der Erholungsphase nach 7-tägiger Stimulation mit 2,5 µg/d G-CSF im Modell ohne und mit Annahme einer Rückmigration. Schwarz: Simulation, blaue: scheinoperierte Tiere, rot: splenektomierte Tiere.

9 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird ein umfassendes mathematisches Kompartimentmodell der murinen Granulo- und Erythropoese erarbeitet. Das Modell wird mit umfangreichen experimentellen Daten für eine Reihe verschiedenartiger experimentell herbeigeführter Störungen des stationären Zellproduktionsgleichgewichts verglichen. Es werden folgende experimentelle Szenarien untersucht:

- 7-tägige simultane Dauergabe von G-CSF und EPO in verschiedenen Dosen (faktorielles Design) in der normalen und splenektomierten Maus
- 8-wöchige Dauerstimulation mit G-CSF
- Messung der Erholungsdynamik nach 7-tägiger G-CSF-Stimulation in der normalen und splenektomierten Maus

Es wird angenommen, daß das Wachstum und die Differenzierung hämatopoetischer Zellen durch ein komplexes Netzwerk hämatopoetischer Wachstumsfaktoren gesteuert und geregelt wird. Obwohl EPO und G-CSF weitgehend linienspezifisch wirken, sind bei gleichzeitiger Gabe unerwünschte Effekte und Interaktionen zwischen diesen beiden Wachstumsfaktoren nicht auszuschließen. Da sowohl EPO und G-CSF von hohem klinischen Interesse sind (Anwendungsgebiete: Niereinsuffizienz, hämatologische Erkrankungen, Support bei myelosuppressiven Therapien), ist ein grundlegendes Verständnis für deren Wirkung unerlässlich. Das hier vorgestellte mathematische Modell soll insbesondere dabei helfen, eine Vorstellung darüber entwickeln, in welcher Weise die Zytokine EPO und G-CSF qualitativ und quantitativ auf Proliferation und Differenzierung wirken und welche Proliferationsdynamik daraus *in vivo* resultiert. In diesem Sinne stellt es weniger ein Werkzeug zur Vorhersage als vielmehr ein Werkzeug zur Unterstützung der Interpretation experimenteller Befunde dar.

Nachfolgend sollen nun die im Ergebnisteil dargestellten Modellresultate für die drei genannten experimentellen Grundlagen einer kritischen Diskussion unterzogen werden.

9.1 Simultane EPO- und G-CSF-Gabe

Ausgangspunkt der Modellentwicklung war ein Modell der murinen Erythropoese, mit welchem die Effekte von alleinigen EPO-Gaben gut erklärt werden können (Dress, persönliche Kommunikation), sowie ein Modell der murinen Erythro- und Granulopoese, mit welchem die Effekte von alleinigen G-CSF-Gaben gut erklärt werden können (Engel, 1999). Es war zunächst das Ziel zu prüfen, ob durch die Vereinigung beider Teil-Modelle ohne zusätzliche Annahmen die Effekte von kombinierten Gaben von EPO und G-CSF auf die murine Erythro- und Granulopoese ausreichend gut erklärt werden können. Die Modellrechnungen zeigen, daß eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Daten nur erzielt werden kann, wenn gegenüber den bislang entwickelten Einzelmodellen im jetzigen kombinierten Modell die zusätzliche Annahme einer EPO-abhängigen Erhöhung der Amplifikationsrate von CFU-GM in der Milz gemacht wird. Diese zusätzliche Annahme ist nötig, um den unter EPO-Gabe beobachteten starken Anstieg der lienalen CFU-GM zu erklären. Die Ergebnisse zeigen auch, daß zwei alternative Mechanismen, nämlich die Annahme einer EPO-abhängigen Migration von CFU-GM aus dem Knochenmark in die Milz oder EPO-abhängige Migration von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Milz das beobachtete Phänomen im Modell nicht hinreichend erklären.

Das erythro-granulopoetische Kombinationsmodell macht also einerseits Annahmen über die linienspezifischen Wirkungen von EPO und G-CSF, andererseits müssen aber auch vereinzelte Annahmen über linienübergreifende Effekte gemacht werden. Dies sind (1) ein G-CSF-abhängiger Differenzierungsstopp der CFU-E im Knochenmark, (2) eine G-CSF-abhängige Migration von BFU-E vom Knochenmark in die Milz, und (3) eine EPO-abhängige Steigerung der Amplifikation der auch G-CSF-vermittelten Amplifikation der lienalen CFU-GM.

Unter G-CSF-Stimulation kommt es sowohl bei normalen als auch bei splenektomierten Mäusen zu einer Suppression der Erythropoese im Knochenmark. Granulopoetische Zellen nehmen hierunter den Hauptteil des Knochenmarkes im Femur ein (Cohen et al., 1987; Molineux et al., 1990a). Bei intakten Mäusen kann dies durch eine vermehrte lienale Erythropoese kompensiert werden, bei splenektomierten Mäusen wird eine kompensatorische Erythropoese zum Teil in der Leber gefunden (Molineux et al., 1990a).

Das Verhältnis CFU-E/BFU-E nimmt im Knochenmark unter alleiniger G-CSF-Stimulation bei annähernd gleichbleibender Anzahl der BFU-E ab, d.h. es findet offenbar ein Differenzierungsstopp auf der Stufe der CFU-E im Knochenmark statt. Dieser Differenzierungsstopp

kann selbst unter hohen Dosen Erythropoietin nicht aufgehoben werden. Möglicherweise findet eine Veränderung der EPO-Rezeptorsensitivität oder -anzahl der CFU-E im Knochenmark durch die G-CSF-Stimulation statt. Dafür spricht die Beobachtung, daß G-CSF-stimulierte CFU-E aus dem Knochenmark gegenüber unstimulierten CFU-E eine deutlich erniedrigte EPO-Sensitivität und eine erniedrigte CFU-E/BFU-E-Ratio aufweisen (Nijhof et al., 1994).

Unter simultaner Stimulation mit hohen Dosen beider Zytokine ist ein starker Anstieg der CFU-GM in der Milz auf das ca. 140-fache des Normalwertes zu beobachten, ohne daß eine Sättigungskinetik erkennbar ist. Durch Migrationsvorgänge vom Knochenmark in die Milz auf der Ebene der CFU-GM oder auf Ebene der Stammzellen läßt sich das Phänomen quantitativ nicht ausreichend erklären. Erst eine der Amplifikation durch G-CSF aufgepropfte zusätzliche Amplifikation durch Erythropoietin führt zum beobachteten Zellzuwachs. Als wichtigster zusätzlicher Mechanismus wurde eine dosisabhängige Amplifikation der lienalen CFU-GM durch Erythropoietin im Modell implementiert.

In weiteren Experimenten von NIJHOF und DE HAAN war ebenfalls ein stimulierender Effekt von EPO auf lienale CFU-GM zu beobachten: dosisabhängiger Anstieg der CFU-GM in der Milz nach 6 Tagen mit subkutan implantierten osmotischen Minipumpen unter 5 U/d auf das 1,3-fache des Ausgangswertes, unter 50 U/d auf das 1,6-fache des Ausgangswertes. Dieser Effekt erwies sich auch in der Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehungen mit Hilfe der nicht-linearen Regressionsanalyse als signifikant.

Es gibt Hinweise, daß auch beim Menschen unter rh-EPO-Administration ein Anstieg der CFU-GM erfolgt. DESSYPRIS und Mitarbeiter beschreiben einen 1,86-fachen Anstieg der CFU-GM im Knochenmark nach 2-wöchiger Gabe von rhEPO bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und renaler Anämie (Dessypris et al., 1988). Bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) wurde die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren Erythropoietin und G-CSF in verschiedenen Studien überprüft. Die myelodysplastischen Syndrome (MDS) sind eine Gruppe von Stammzellerkrankungen, denen eine gestörte Proliferation und Reifung hämatopoetischer Zellen im Knochenmark gemeinsam ist. Man beobachtet eine Tendenz zum Übergang in prognostisch ungünstigere Formen und schließlich in eine AML (akute myeloische Leukämie). Bei 85% der Patienten bestehen erhöhte Serum-Erythropoietin-Spiegel. Durch zusätzliche exogene Gabe von rhEPO soll die unzureichende Proliferation und Differenzierung erythroider Progenitoren unterstützt werden. Bei 25% der low-risk MDS-Patienten kann so die Transfusionsmenge und -häufigkeit von Erythrozytenkonzentraten reduziert werden. Patienten mit Serum-Erythropoietin-Spiegeln unter 200 U/l zählen zu den guten Respondern. Die kombinierte Gabe von Erythropoietin mit G-CSF oder

GM-CSF bewirkt einen synergistischen Effekt (Hofmann und Koeffler, 2005). Dem gegenüber stehen die erhöhten Kosten einer kombinierten Wachstumsfaktorgabe und der fehlende Vorteil bezüglich Langzeitverlauf und Lebensqualität.

Über die genauen biologischen Mechanismen der Expansion des lienalen CFU-GM-Kompartimentes unter EPO-Stimulation und der weitaus größeren Expansion unter simultaner Stimulation mit EPO und G-CSF können hier nur Vermutungen angestellt werden. Aufgrund der vorliegenden Literatur sollen nachfolgend drei mögliche Mechanismen diskutiert werden.

1. Beeinflussung der Apoptose

Als relevanter Mechanismus könnte eine verminderte Apoptoserate der CFU-GM unter EPO-Stimulation existieren. EPO gilt als Wachstumsfaktor mit reduzierender Wirkung auf die Apoptoserate erythropoetischer Zellen. Der anti-apoptotische Effekt ist jedoch nicht nur auf das hämatopoetische System begrenzt. So wurde dieser Effekt auch im neuronalen und vaskulären System nachgewiesen (Maiese et al., 2005). Zugabe von rhEPO zu ECFC-Zellen (vergleichbar mit CFU-E) führt zu einer merklichen Verminderung des Anteils der apoptotischen DNA in vitro (Koury et al., 1994; Muta und Krantz, 1993). Auch G-CSF nimmt Einfluß auf den Apoptose-Prozeß. So weisen z.B. die Neutrophilen G-CSF-rezeptordefizienter Mäuse eine erhöhte Apoptoserate auf mit erniedrigten Neutrophilenzahlen (Basu et al., 2002; Liu et al., 1996). HELLSTROM-LINDBERG und Mitarbeiter wiesen unter simultaner Gabe von rhEPO und rhG-CSF einen anti-apoptotischen Effekt von G-CSF auf die Erythropoese bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom nach (Hellstrom-Lindberg et al., 1997). TEHRANCHI zeigte, dass G-CSF die Fas-induzierte Caspaseaktivierung bei Patienten mit sideroblastischer Anämia (RARS) unterdrückt (Tehranchi et al., 2003).

2. Modulation von Rezeptoren

Ein anderer Mechanismus der synergistischen Wirkung von Erythropoietin und G-CSF in hohen Dosen auf die CFU-GM-Produktion in der Milz könnte auf Ebene der Wachstumsfaktorrezeptoren zu finden sein. Dies kann auf verschiedene Weise stattfinden: Konkurrenz um die selbe Rezeptoreinheit aufgrund von ähnlichen Rezeptoruntereinheiten, Up- oder Down-Regulation von nicht-wachstumsfaktor-gleichen Rezeptoren auf gleicher Zellebene oder auf höherer oder niedrigerer Zellebene, Regulation der Rezeptoranzahl oder -affinität über Beeinflussung des Spiegels von "dritten" Wachstumsfaktoren oder Interaktion auf der molekularen Ebene der Signaltransduktion.

Der G-CSF-Rezeptor wie auch der Erythropoietinrezeptor gehört zur Familie der Zytokin-Rezeptor-Familie, denen Tyrosinkinase-Aktivität fehlt (Testa et al., 1996). Die Bindung an den Rezeptor induziert die Tyrosinphosphorylierung einer Anzahl von zellulären Proteinen und aktiviert Signalkaskaden wie u.a. die Pfade STAT (signal transducer and activator of transcription)- und MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase). SCF gehört zur Rezeptorgruppe der Tyrosinkinase-Familie, kodiert durch *c-kit*, einem Protoonkogen. Die Bindung von SCF an *c-kit* aktiviert die Kinase und führt zu einer Transphosphorylierung der Rezeptorketten. Phosphotyrosinresiduen fungieren dann als Andockstellen für Proteine, die die Vernetzung zu verschiedenen Signalwegen darstellen. Eine Interaktion auf Ebene der Signalwege ist durchaus vorstellbar und wurde in Zellmodellen überprüft (Case et al., 2001; Duarte und Frank, 2000; Panzenbock et al., 1998). WU postuliert, dass *c-kit* durch Tyrosinphosphorylierung eine Aktivierung des Erythropoietinrezeptors bewirkt, welche die weitere Proliferation und Reifung von erythropoetischen Progenitorzellen induziert (Wu et al., 1995).

Die Bindung von GM-CSF und IL-3 an den jeweils eigenen Rezeptor führt zu einer Abnahme der Rezeptoranzahl für andere Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder M-CSF auf murinen hämatopoetischen Progenitorzellen des Knochenmarks (Walker et al., 1985). Andererseits wird die Relevanz dieser *in vitro* beobachteten Phänomene unter physiologischen Bedingungen in Frage gestellt (Scott et al., 2000).

In vitro Experimente zeigen bei 37°C eine rasche Internalisierung des Oberflächen-G-CSF-Rezeptor-Liganden-Komplexes auf unreifen und differenzierten myeloischen Zellen innerhalb von 5 min (Neutrophile: 2883 +/- 672 R/Zelle, > 70% internalisiert), eine Reexpression von G-CSF-Rezeptoren wurde nicht beobachtet. Eine Abnahme der G-CSF-Oberflächenrezeptoren bei 37°C wurde ebenfalls für folgende Substanzen entdeckt: GM-CSF, TNF, Lipopolysaccharide, f-met-leu-phe, C5a und chemische Substanzen wie Phorbolster (Khawaja et al., 1993). Gilma konnte dieses Phänomen auch *in vivo* nachweisen: G-CSF-Rezeptor-Abnahme innerhalb 1,5 Stunden nach Bolulinfusion von G-CSF, der Ausgangswert ist nach ca. 24 Stunden wieder erreicht (Gilma et al., 2000). Dies führt zu einer transitorischen Neutropenie von ca. 60 min. Die Granula von Neutrophilen enthalten u.a. Gelatinase B, welche in der Lage ist extrazelluläre Matrix abzubauen wodurch möglicherweise die Mobilisierung von hämatopoetischen Progenitoren unterstützt wird. Außerdem induziert es nach Injektion von Gelatinase B in Kaninchen nach transitorischer Neutropenie eine Neutrophilie innerhalb von 1 Stunde nach Injektion. Daneben ist Gelatinase B in der Lage die TNF-Vorstufe in biologisch aktiven TNF zu spalten. Allein diese Beobachtungen lassen vermuten, dass in der Regulation der hämatopoetischen Homöostase und vielmehr vermutlich noch unter Störungen

wie Wachstumsfaktorgaben ein extrem komplexes und vielschichtiges Regulationssystem vorhanden ist.

3. Änderungen der Bedingungen des Mikroenvironmentes

In vitro Kulturtechniken in serumfreiem semisolidem Medium ermöglichten die Erforschung spezifischer hämatopoetischer Wachstumsfaktoren. Neben den Faktoren, die für das Überleben, Proliferation und Differenzierung von Progenitorzellen und die funktionellen Eigenschaften von reifen Zellen essentiell sind, benötigt die Hämpoese ein angemessenes sogenanntes Mikroenvironment, welches aus verschiedenen Stromazelltypen und aus extrazellulärer Matrix besteht. Interzelluläre Kontakte, Adhäsion von Zellen und Wachstumsfaktoren zu Matrixmolekülen scheinen für die Regulation des hämatopoetischen Mikroenvironmentes essentiell zu sein. In long-term bone marrow-Kulturen kann die Entwicklung eines Stroma-Mikroenvironmentes das Langzeitüberleben von Stammzellen und eine hämatopoetische Differenzierung ermöglichen.

Die experimentellen Daten beschreiben den hämatopoetischen Systemzustand der Tiere nach siebentägiger Stimulation. Dies läßt den Blick auf das hämatopoetische Systemverhalten der Maus nur durch ein sehr kleines Fenster zu. Es bleiben Aspekte der Sättigungskinetiken, wie z.B. G-CSF- und EPO-vermittelte Stimulation der CFU-GM in der Milz, G-CSF-stimulierte Granulopoese oder die lienale EPO-abhängige Stimulation der CFU-E und BFU-E offen. Der zeitliche Verlauf einer simultanen Stimulation kann nur anhand vorheriger Experimente unter Stimulation mit Einzelfaktoren überprüft werden. Simultane Applikation von G-CSF und EPO sind anhand vereinzelter Daten aus der Literatur überprüfbar (Cronkite et al., 1993; Drize et al., 1993). Unter täglicher Gabe von 125 µg/kg/d rhG-CSF entwickelten splenektomierte Mäuse eine makrozytäre anhaltende Anämie, die selbst unter hohen Dosen von 200 U/d Erythropoietins nicht aufgehoben wird.

In den Experimenten, die den Modellrechnungen zugrunde liegen, wurde rekombinantes humanes G-CSF verwendet. Es ist bekannt, dass unter kontinuierlicher Stimulation mit murinem G-CSF gegenüber rhG-CSF bei C57BL/6-Mäusen nach 21 Tagen eine dreifach höhere Neutrophilenzahl im peripheren Blut vorhanden ist, an Tag 7 eine fast 4-fach erhöhte Zahl (Lee et al., 1991). Im Modell werden sowohl endogene Spiegel des murinen G-CSFs als auch regulatorisch veränderte Spiegel des endogenen G-CSFs vernachlässigt. Unter murinem G-CSF gelten möglicherweise qualitativ und vor allem quantitativ andere charakteristische Dosis-Wirkungsbeziehungen.

Außerdem bestehen Unterschiede in der biologischen Wirkung im Hinblick auf verschiedene Applikationsarten. Werden Langzeitstimulationen untersucht, so scheint die Applikation mittels subkutan implantierten osmotischen Minipumpen durch Aufrechterhaltung eines konstanten Zytokinspiegels eine geeignete Form darzustellen. Weitere Experimente neben denen von NIJHOF und Mitarbeitern zur simultanen Gabe von Zytokinen bei Mäusen mittels dieser Applikationsform stehen in der Literatur nicht zur Verfügung.

Um das Modell für die (simultane) Gabe weiterer Wachstumsfaktorgaben (z.B. Stammzellfaktor) weiterzuentwickeln, wären zusätzliche Daten zu endogenen und exogenen Wachstumsfaktorspiegeln und zu exprimierten Oberflächenrezeptoren der Wachstumsfaktoren auf bestimmten hämatopoetischen Zellen hilfreich. Auch liegt keine Überprüfung des Modells für den zeitlichen Verlauf der Kompartimentgrößen oder die versetzte oder dosiseskalierende Gabe von Erythropoietin und G-CSF vor, wie dies teilweise in der klinischen Anwendung bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom durchgeführt wird (Hellstrom-Lindberg et al., 1998; Mantovani et al., 2000; Negrin et al., 1993).

9.2 Langzeitgabe von G-CSF

In den bisherigen Granulopoese-Modellen wurde bei exogener Applikation von G-CSF der endogen produzierte Anteil vernachlässigt. Außerdem wurde für den Abbau von G-CSF bisher ein rein unspezifisch wirkender Mechanismus angenommen. Für Betrachtungen des Systemzustandes am Tag 7 oder von zeitlichen Verlaufsdaten bis maximal 20 Tage ist diese Vereinfachung ausreichend. Mit den experimentellen Daten zur 8-wöchigen kontinuierlichen Langzeitstimulation durch G-CSF von VOSSelman und Mitarbeitern [persönliche Mitteilung] ergibt sich die Möglichkeit das Modell im Hinblick auf diese Annahmen zu überprüfen. Unter den bisherigen Annahmen kumuliert der G-CSF-Spiegel und resultiert in einer steten Stimulation und Überproduktion der granulozytären Zellen, insbesondere der Neutrophilen. In der Modellsimulation zeigt sich, dass der oszillierende Charakter einzelner Kompartimente, vor allem der Leukozyten, eng an den Verlauf des Serum-G-CSF-Spiegels gekoppelt ist. In dem beschriebenen Langzeitexperiment wurde über die gesamte Zeitdauer der Spiegel an rhG-CSF gemessen. Bei Vorgabe des Verlaufs des gemessenen G-CSF-Spiegels im Modell ergibt sich eine gute qualitative und quantitative Übereinstimmung der einzelnen Kompartimente. Als Mechanismus für den Abfall des G-CSF-Spiegels zwischen Tag 3 und Tag 7 der

G-CSF-Stimulation und ein im Verlauf fehlender Wiederstieg über 8 pg/ml wurde im Modell eine zusätzlich zur unspezifischen Elimination eine spezifische Elimination von G-CSF durch rezeptor-vermittelte Konsumption (Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes) angenommen. Für die Existenz eines solchen Mechanismus gibt es zahlreiche Hinweise in der Literatur (Ikeda et al., 1994; Jilka et al., 2000; Khwaja et al., 1993).

Beim gesunden Menschen liegt der endogene G-CSF-Spiegel normalerweise unterhalb des mittels EIA messbaren Bereichs von 30 pg/ml, falls messbar meist unter 100 pg/ml (Demetri und Griffin, 1991). Unter Stressbedingungen wie z.B. Infektionen oder nach Hochdosischemotherapie und Knochenmarktransplantation sind Spiegel über 2000 pg/ml messbar.

Bei Hunden stellt sich unter kontinuierlicher rh-G-CSF- oder caniner G-CSF-Applikation innerhalb der ersten 18-21 Tage eine stabile Neutrophilie ein. Unter weiterer Gabe ist ein Abfall der Neutrophilen auf den Ausgangswert und darunter zu verzeichnen, welche auch nach Beendigung der G-CSF-Injektionen am Tag 30 anhält (Hammond et al., 1991). Ursächlich dafür ist in diesem Experiment eine Antikörperbildung gegen humanes G-CSF, welche zwischen Tag 14 und 21 einen starken Anstieg aufweist. Diese Antikörper richten sich auch gegen canines G-CSF. Die Neutropenie hält bis 4 Monate nach Beendigung der rh-G-CSF-Gabe an. Die Antikörperbildung ist sowohl gegen rhG-CSF als auch gegen endogen produziertes G-CSF gerichtet. Es wird ausschließlich eine Verminderung der Neutrophilen und nicht deren Vorstufen beobachtet. Wird den Hunden rekombinantes canines G-CSF appliziert, resultiert eine Neutrophilie über die gesamte Beobachtungsdauer von 3 Monaten (Hammond et al., 1991). Die Annahme einer Antikörperbildung der Mäuse gegen rekombinantes humanes G-CSF wurde im Experiment von VOSSSELMAN überprüft und es wurden ebenfalls IgG-Antikörper gefunden (persönliche Mitteilung). Um Tag 35 ist ein zweiter sehr kleiner Gipfel des gemessenen G-CSF zu beobachten. Das Auswechseln der osmotischen Minipumpen an den Tagen 14, 28 und 42 kann allerdings in keinen direkten Zusammenhang zu beobachteten Schwankungen gebracht werden.

Bei Patienten mit aplastischer Anämie nach Chemotherapie ist eine inverse Korrelation des endogenen G-CSF-Spiegels und der Blutneutrophilen zu beobachten (Watari et al., 1997). Dieser Effekt tritt auch nach Knochenmarktransplantation ein (Cairo et al., 1992). Es wird berichtet, dass unter kontinuierlicher subkutaner rh-G-CSF-Applikation beim Menschen eine Abnahme des Serum-G-CSF-Spiegels ab Tag 4 der Stimulation eintritt (Ikeda et al., 1994; Layton et al., 1989). Die Induktion eines zusätzlichen Clearance-Mechanismus wird angenommen. Eine Antikörperbildung scheint hierfür nicht verantwortlich zu sein, da es sich um humanes G-CSF handelte, wogegen eine körpereigene Antikörperbildung unwahrscheinlich

erscheint. Des Weiteren ist das Zeitintervall von 4 Tagen für eine körpereigene Antikörperproduktion zu kurz, rh-G-CSF-Antikörper konnten außerdem bei diesen Patienten nicht gefunden werden (Layton et al., 1989). MATSUZAKI (Matsuzaki et al., 1996) zeigte bei Mäusen, die entweder niedrigdosiert (1 µg/kg/d) oder hochdosiert (100 µg/kg/d) rh-G-CSF täglich intraperitoneal für 8 Tage erhielten, daß ein Abfall des zunächst erhöhten rh-G-CSF-Spiegels im Blut eintritt. Der Abfall erfolgt dabei in der Hochdosis-Gruppe ab Tag 3, in der Niedrigdosis-Gruppe erst an Tag 6. Die Wirkung auf die Leukozyten (hauptsächlich Neutrophile und lienale nukleäre Zellen) lag im Hochdosisbereich erwartungsgemäß höher. Eine gleichzeitige Messung der membranständiger G-CSF-Rezeptor-Gene korrelierte invers mit dem rh-G-CSF-Spiegel im Serum. mRNA von löslichen G-CSF-Rezeptoren konnte weder in Milz noch im peripheren Blut gefunden werden. Mit zunehmender Differenzierung steigt die Expression an G-CSF-Rezeptoren auf den granulozytären Zellstufen an (McKinstry et al., 1997). Im Modell wird dies durch unterschiedliche Gewichtung der Anteile der an der Konsumption beteiligten Zellstufen realisiert. Reife periphere Granulozyten sind hauptsächlich beteiligt, als zweitwichtigste Zellstufe wurden die letzten Kompartimente der reifenden Granuloblasten in der Milz als konsumierende Zellen ausgewählt. Unter dieser Annahme ist zunächst ein steter Anstieg des G-CSF-Spiegels und damit eine ungesättigte Expansion des Granulozytenkompartimentes zu verhindern. Die oszillatorischen Verhaltensmuster auch der Progenitoren werden lediglich in einer ersten Fluktuation im Bereich bis Tag 20 in den Simulationen erreicht. Hier besteht eine gute quantitative Übereinstimmung des G-CSF-Spiegels im Modell mit den im Experiment ermittelten Serumwerten. Unter einem ab Tag 20 unter 10 pg/ml liegendem G-CSF-Spiegel stellt sich im Modell wie auch in den experimentellen Daten kein neuer stabiler Systemzustand ein. Neben den experimentellen Daten von Vosselman zur G-CSF-Langzeitgabe bei Mäusen liegen keine weiteren vergleichbaren Daten in der Literatur vor.

Kürzlich wurde die Theorie der Konsumption in einem humanen Granulopoesemodell der eigenen Arbeitsgruppe überprüft (Engel, persönl. Mitteilung). Hier wird ebenfalls eine zellstufenspezifische Konsumption der granulozytären Zelllinien angenommen. Pharmakokinetische Aspekte im Rahmen von systembiologischen Hämatopoesemodellen gewinnen zunehmend an Bedeutung. Um eine effektivere Behandlung zu erzielen wurden verschiedene Formulierungen des rh-G-CSFs mit unterschiedlicher Eliminationskinetik auf den Markt gebracht, zuletzt ein langwirksames polyethylenglykol-konjugiertes G-CSF-Molekül (PEG-G-CSF, Pegfilgrastim). Für zukünftige humane Hämatopoesemodelle zur Simulation von Zytokinapplikationen sollte das entsprechende pharmakokinetische Verhalten des jeweiligen Wachstumsfaktors berücksichtigt werden, vor allem bei der Betrachtung von Langzeitgaben.

9.3 Rückmigration von der Milz in das Knochenmark

Im normalen Fließgleichgewicht zirkuliert ein geringer Anteil hämatopoetischer Progenitoren im peripheren Blut (Barnes und Loutit, 1967; Fliedner und Steinbach, 1988; Goodman und Hodgson, 1962). Es ist bekannt, dass es unter G-CSF-Administration zu einem Anstieg der hämatopoetischen Progenitorzellen im peripheren Blut kommt (Drize et al., 1993; Duhrsen et al., 1988; Goodnough et al., 1993; McNiece et al., 1993). Es wird angenommen, dass der zytokinvermittelte Anstieg der Progenitoren im peripheren Blut hauptsächlich durch Freisetzung aus dem Knochenmark resultiert und weniger durch Freisetzung aus der Milz oder Produktion im peripheren Blut selbst (Drize et al., 1996; Drize et al., 1995; Drize et al., 1993). ROBERTS hingegen fand bei Mäusen in Knochenmark und peripherem Blut eine unterschiedliche Zusammensetzung verschiedener Progenitoren unter G-CSF-Stimulation. Er formulierte die Hypothese einer selektiven Freisetzung spezifischer Progenitoren aus dem Knochenmark unter G-CSF-Stimulation (Roberts und Metcalf, 1994). VARAS (Varas et al., 1996) zeigte mittels klonaler Analyse allerdings, daß nach Mobilisierung mit G-CSF im peripheren Blut ein im Vergleich zum Knochenmark nahezu identisches Repertoire an CFU-S-Populationen zu finden ist.

MOLINEUX (Molineux et al., 1990a) fand unter 4-tägiger Stimulation mit 250 µg/kg/d rhG-CSF im peripheren Blut splenektomierter Mäuse nach 96-stündiger Stimulation einen ca. 5-fach erhöhten Anstieg von CFU-S im Vergleich zu stimulierten normalen Tieren. 24 Stunden nach letzter Gabe ist ein Abfall der CFU-S im peripheren Blut bis auf minimal erhöhte Werte gegenüber dem unstimulierten Zustand eingetreten. Die absolute Anzahl von CFU-S im peripheren Blut der splenektomierten Mäuse liegt weiterhin über der der normalen Mäuse. Nach weiteren 12 Stunden kommt es jedoch zu einem Überkreuzen der beiden Kurven, im Blut der splenektomierten Tiere sind jetzt im Vergleich zu Normaltieren weniger CFU-S zu finden. Zwei Tage nach Ende der G-CSF-Stimulation ist eine Reduktion der lienalen CFU-S auf die Hälfte des Maximalwertes an Tag 4 der Stimulation eingetreten.

Im Experiment von NIJHOF sind in der Erholungsphase nach 7-tägiger Stimulation mit 2,5 µg/d rhG-CSF bei scheinoperierten Mäusen eine größere Zahl von BFU-E und CFU-GM im peripheren Blut zu finden als bei splenektomierten Tieren. Dieser Effekt ist über 4 Tage zu beobachten, wobei im Blut der Normaltiere eine Verminderung der absoluten Zahl BFU-E und CFU-E eintritt. Bezüglich der BFU-E kommt es an Tag 5 zu einem Überkreuzen der bei-

den Kurven, d.h. die Zahl der BFU-E ist jetzt bei den splenektomierten Tieren größer als bei den scheinoperierten Tieren. Unter der Annahme einer passiven Abnahme der Stammzellen, BFU-E und CFU-GM in der Milz nach Ende der Stimulation tritt im Modell ein zu langsamer Abfall der BFU-E und CFU-GM ein. Das Stammzellkompartiment bleibt im beobachteten Zeitraum mit 15-fach erhöhtem Normalwert auf stimuliertem Niveau. Im Gegensatz zum Verhalten der lienalen CFU-GM in den Daten von Molineux (Molineux et al., 1990a) kehren im Experiment von Nijhof die lienalen Progenitoren (BFU-E, CFU-E und CFU-GM) innerhalb der 5-tägigen Erholungsphase auf nahezu Ausgangsniveau zurück. Der Mechanismus dieser diskrepanten Beobachtung bleibt unklar. Im Modell kann unter Annahme einer nicht wachstumsfaktorabhängigen Rückmigration von Stammzellen, BFU-E und CFU-GM aus der Milz ins Knochenmark nach Beendigung der G-CSF-induzierten Stimulation eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten erzielt werden. Das Verhalten der lienalen Stammzellen, die im Experiment von NIJHOF nicht bestimmt wurden, zeigt ein den Daten von Molineux ähnliches Verhalten .

10 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel

Ein mathematisches Kompartimentmodell der murinen Erythro- und Granulopoese unter simultaner Gabe von Erythropoietin und G-CSF

eingereicht von

Corinna Mirjam Gebauer

angefertigt an

Universität Leipzig

Medizinische Fakultät

Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie

betreut von

Professor Dr. med. Markus Löffler

Dr. med. Christoph Engel

August 2010

In dieser Arbeit wird das *in vivo*-Verhalten der murinen Erythro- und Granulopoese, einschließlich der hämatopoetischer Stammzellen, unter dem Einfluß von exogen appliziertem G-CSF und Erythropoietin mit Hilfe eines mathematischen Kompartimentmodelles untersucht. Der Schwerpunkt liegt auf der Identifizierung von linienübergreifenden Wachstumseffekten. Zu diesem Zweck werden experimentelle Daten mit den Modellsimulationen unter Berücksichtigung verschiedener Modellannahmen verglichen.

Die experimentellen Daten für die Modellentwicklung stammen zum einen kleinen Teil aus der Literatur, hauptsächlich betrachtet wurden jedoch Daten einer kooperierenden niederländischen Arbeitsgruppe. Die beiden Wachstumsfaktoren wurden kontinuierlich und simultan mittels osmotischer Minipumpen subkutan über einen längeren Zeitraum appliziert.

Die experimentellen Daten werden zunächst mit Hilfe eines nichtlinearen Regressionsmodells analysiert und quantitativ beschrieben, wobei Interaktionseffekte zwischen den Wachstumsfaktoren besondere Berücksichtigung finden. Es wird dann ein umfassendes mathematisches Differentialgleichungsmodell der murinen Erythro- und Granulopoese unter Berücksichtigung der linienübergreifenden Wachstumsfaktoreffekte und Interaktionen aufgestellt.

Es wird zunächst überprüft, ob sich die beobachteten Daten unter Simultanstimulation durch die einfache Zusammenschaltung zweier bereits existierender Einzelmodelle der Erythro- und Granulopoese ohne weitere Modellannahmen erklären lassen. Dazu werden Daten von normalen als auch splenektomierten Tieren berücksichtigt. Es zeigt sich nach Prüfung verschiedener Hypothesen, dass erst unter Annahme einer durch Erythropoietin potenzierten Amplifikation der primär G-CSF-abhängigen Zellstufe der lienalen CFU-GM die experimentell beobachteten Effekte erklärt werden können. Es wird außerdem gezeigt, daß sich mit demselben Modell und denselben Modellparametern die bei splenektomierten Tieren zu beobachtende G-CSF-abhängige Entwicklung einer EPO-resistenten Anämie gut erklärt wird.

In einem zweiten Teil der Arbeit wird ein Modellkonzept erarbeitet, mit welchem sich die Effekte nach Langzeitgabe von G-CSF mittels rezeptorvermitteltem G-CSF-Abbau erklären lassen. In einem dritten Teil wird geprüft, ob sich die hämatopoetische Zellzahldynamik nach Absetzen der G-CSF-Gabe durch eine aktive Rückmigration von Progenitoren aus der Milz in das Knochenmark erklären läßt.

Das in dieser Arbeit entwickelte kombinierte Modell der Erythro- und Granulopoese impliziert eine Reihe von weiteren Fragen und bedarf der Überprüfung und Weiterentwicklung anhand weiterer experimenteller Daten. Dafür werden entsprechende Vorschläge erarbeitet, die weitere Einblicke in das komplexe Systemverhalten der Hämatopoese liefern könnten.

11 Literaturverzeichnis

1. Avalos, B.R. (1996): Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 88(3), 761-777.
2. Barnes, D.W., Loutit, J.F. (1967): Haemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet*. 2(7526), 1138-1141.
3. Basu, S., Hodgson, G., Katz, M., Dunn, A.R. (2002): Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*. 100(3), 854-861.
4. Bauer, C., Kurtz, A. (1989): Oxygen sensing in the kidney and its relation to erythropoietin production. *Annu Rev Physiol*. 51(845-856).
5. Begley, C.G., Basser, R., Mansfield, R., Thomson, B., Parker, W.R., Layton, J., To, B., Cebon, J., Sheridan, W.P., Fox, R.M., Green, M.D. (1997): Enhanced levels and enhanced clonogenic capacity of blood progenitor cells following administration of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor to humans. *Blood*. 90(9), 3378-3389.
6. Bessho, M., Toyoda, A., Itoh, Y., Sakata, T., Kawai, N., Jinnai, I., Saito, M., Hirashima, K. (1992): Trilineage recovery by combination therapy with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) and erythropoietin (rhEpo) in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 80(3), 409-411.
7. Boneberg, E.M., Hareng, L., Gantner, F., Wendel, A., Hartung, T. (2000): Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood*. 95(1), 270-276.
8. Budel, L.M., Touw, I.P., Delwel, R., Lowenberg, B. (1989): Granulocyte colony-stimulating factor receptors in human acute myelocytic leukemia. *Blood*. 74(8), 2668-2673.
9. Bungart, B., Loeffler, M., Goris, H., Dontje, B., Diehl, V., Nijhof, W. (1990): Differential effects of recombinant human colony stimulating factor (rh G-CSF) on stem cells in marrow, spleen and peripheral blood in mice. *Br J Haematol*. 76(2), 174-179.
10. Cairo, M.S., Suen, Y., Sender, L., Gillan, E.R., Ho, W., Plunkett, J.M., van de Ven, C. (1992): Circulating granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) levels after allogeneic and autologous bone marrow transplantation: endogenous G-CSF production correlates with myeloid engraftment. *Blood*. 79(7), 1869-1873.
11. Casadevall, N., Durieux, P., Dubois, S., Hemery, F., Lepage, E., Quarre, M.C., Damaj, G., Giraudier, S., Guerci, A., Laurent, G., Dombret, H., Chomienne, C., Ribrag, V., Stamatoullas, A., Marie, J.P., Vekhoff, A., Maloisel, F., Navarro, R., Dreyfus, F., Fenaux, P. (2004): Health, economic, and quality-of-life effects of erythropoietin and

- granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of myelodysplastic syndromes: a randomized, controlled trial. *Blood*. 104(2), 321-327.
12. Case, J., Rice, A., Wood, J., Gaudry, L., Vowels, M., Nordon, R.E. (2001): Characterization of cytokine interactions by flow cytometry and factorial analysis. *Cytometry*. 43(1), 69-81.
 13. Chang, J.M., Metcalf, D., Gonda, T.J., Johnson, G.R. (1989): Long-term exposure to retrovirally expressed granulocyte-colony-stimulating factor induces a nonneoplastic granulocytic and progenitor cell hyperplasia without tissue damage in mice. *J Clin Invest*. 84(5), 1488-1496.
 14. Cohen, A.M., Zsebo, K.M., Inoue, H., Hines, D., Boone, T.C., Chazin, V.R., Tsai, L., Ritch, T., Souza, L.M. (1987): In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(8), 2484-2488.
 15. Cronkite, E.P., Burlington, H., Shimosaka, A., Bullis, J.E., Pappas, N. (1993): Anemia induced in splenectomized mice by administration of rhG-CSF. *Exp Hematol*. 21(2), 319-325.
 16. de Haan, G., Dontje, B., Engel, C., Loeffler, M., Nijhof, W. (1995a): In vivo effects of interleukin-11 and stem cell factor in combination with erythropoietin in the regulation of erythropoiesis. *Br J Haematol*. 90(4), 783-790.
 17. de Haan, G., Dontje, B., Nijhof, W., Loeffler, M. (1995b): Effects of continuous stem cell factor administration on normal and erythropoietin-stimulated murine hemopoiesis: experimental results and model analysis. *Stem Cells*. 13(1), 65-76.
 18. de Haan, G., Engel, C., Dontje, B., Nijhof, W., Loeffler, M. (1994): Mutual inhibition of murine erythropoiesis and granulopoiesis during combined erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, and stem cell factor administration: in vivo interactions and dose-response surfaces. *Blood*. 84(12), 4157-4163.
 19. de Haan, G., Loeffler, M., Nijhof, W. (1992): Long-term recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) treatment severely depresses murine marrow erythropoiesis without causing an anemia. *Exp Hematol*. 20(5), 600-604.
 20. Demetri, G.D., Griffin, J.D. (1991): Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 78(11), 2791-2808.
 21. Dessypris, E., Graber, S.E., Krantz, S.B., Stone, W.J. (1988): Effects of recombinant erythropoietin on the concentration and cycling status of human marrow hematopoietic progenitor cells in vivo. *Blood*. 72(6), 2060-2062.
 22. Drize, N., Chertkov, J., Samoilina, N., Zander, A. (1996): Effect of cytokine treatment (granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor) on hematopoiesis and the circulating pool of hematopoietic stem cells in mice. *Exp Hematol*. 24(7), 816-822.

23. Drize, N., Chertkov, J., Zander, A. (1995): Hematopoietic progenitor cell mobilization into the peripheral blood of mice using a combination of recombinant rat stem cell factor (rrSCF) and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF). *Exp Hematol.* 23(11), 1180-1186.
24. Drize, N., Gan, O., Zander, A. (1993): Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor treatment of mice on spleen colony-forming unit number and self-renewal capacity. *Exp Hematol.* 21(9), 1289-1293.
25. Duarte, R.F., Frank, D.A. (2000): SCF and G-CSF lead to the synergistic induction of proliferation and gene expression through complementary signaling pathways. *Blood.* 96(10), 3422-3430.
26. Duhresen, U., Villeval, J.L., Boyd, J., Kannourakis, G., Morstyn, G., Metcalf, D. (1988): Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood.* 72(6), 2074-2081.
27. Emerson, S.G., Thomas, S., Ferrara, J.L., Greenstein, J.L. (1989): Developmental regulation of erythropoiesis by hematopoietic growth factors: analysis on populations of BFU-E from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver. *Blood.* 74(1), 49-55.
28. Engel, C. (1999): Charakterisierung der zellkinetischen Wirkungen von G-CSF auf die Granulopoese, Erythropoese und Stammzellen in der Maus mit Hilfe eines mathematischen Kompartimentmodells. Medizinische Dissertation. Köln.
29. Erslev, A.J., Caro, J., Birgegard, G., Silver, R., Miller, O. (1980): The biogenesis of erythropoietin. *Exp Hematol.* 8 Suppl 8(1-13).
30. Fiala, J., Viktora, L. (1976): The effect of splenectomy on bone marrow haematopoiesis in mice. *Physiol Bohemoslov.* 25(5), 419-426.
31. Fisher, J.W., Nakashima, J. (1992): The role of hypoxia in renal production of erythropoietin. *Cancer.* 70(4 Suppl), 928-939.
32. Flidner, T.M., Steinbach, K.H. (1988): Repopulating potential of hematopoietic precursor cells. *Blood Cells.* 14(2-3), 393-410.
33. Goodman, J.W., Hodgson, G.S. (1962): Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood.* 19(702-714).
34. Goodnough, L.T., Anderson, K.C., Kurtz, S., Lane, T.A., Pisciotto, P.T., Sayers, M.H., Silberstein, L.E. (1993): Indications and guidelines for the use of hematopoietic growth factors. *Transfusion.* 33(11), 944-959.
35. Hammond, W.P., Csiba, E., Canin, A., Hockman, H., Souza, L.M., Layton, J.E., Dale, D.C. (1991): Chronic neutropenia. A new canine model induced by human granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Invest.* 87(2), 704-710.

36. Hanazono, Y., Hosoi, T., Kuwaki, T., Matsuki, S., Miyazono, K., Miyagawa, K., Takaku, F. (1990): Structural analysis of the receptors for granulocyte colony-stimulating factor on neutrophils. *Exp Hematol.* 18(10), 1097-1103.
37. Hara, H., Ogawa, M. (1976): Erythropoietic precursors in mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Am J Hematol.* 1(4), 453-458.
38. Hara, H., Ogawa, M. (1977): Erythropoietic precursors in mice under erythropoietic stimulation and suppression. *Exp Hematol.* 5(2), 141-148.
39. Heit, W., Rich, I.W., Kubanek, B. (1981): Macrophage-dependent production of erythropoietin and colony-stimulating factor. *Haematol Blood Transfus.* 27(73-78).
40. Hellstrom-Lindberg, E., Ahlgren, T., Beguin, Y., Carlsson, M., Carneskog, J., Dahl, I.M., Dybedal, I., Grimfors, G., Kanter-Lewensohn, L., Linder, O., Luthman, M., Lofvenberg, E., Nilsson-Ehle, H., Samuelsson, J., Tangen, J.M., Winqvist, I., Oberg, G., Osterborg, A., Ost, A. (1998): Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients. *Blood.* 92(1), 68-75.
41. Hellstrom-Lindberg, E., Birgegard, G., Carlsson, M., Carneskog, J., Dahl, I.M., Dybedal, I., Grimfors, G., Merk, K., Tangen, J.M., Winqvist, I., et al. (1993): A combination of granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin may synergistically improve the anaemia in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 11(3-4), 221-228.
42. Hellstrom-Lindberg, E., Kanter-Lewensohn, L., Ost, A. (1997): Morphological changes and apoptosis in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes treated with granulocyte-CSF and erythropoietin. *Leuk Res.* 21(5), 415-425.
43. Hofmann, W.K., Koeffler, H.P. (2005): Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med.* 56(1-16).
44. Ikeda, K., Tasaka, T., Sasaki, K., Murata, M., Kitanaka, A., Nagai, M., Kawanishi, K., Takahara, J., Irino, S. (1994): Low-dose continuous subcutaneous infusion of granulocyte colony-stimulating factor for chemotherapy-induced neutropenia in acute myelogenous leukemia and its pharmacokinetics. *Leukemia.* 8(11), 1838-1841.
45. Imamura, M., Kobayashi, M., Kobayashi, S., Yoshida, K., Mikuni, C., Ishikawa, Y., Matsumoto, S., Sakamaki, S., Niitsu, Y., Hinoda, Y., et al. (1994): Failure of combination therapy with recombinant granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 68(4), 163-166.
46. Imamura, M., Kobayashi, M., Kobayashi, S., Yoshida, K., Mikuni, C., Ishikawa, Y., Matsumoto, S., Sakamaki, S., Niitsu, Y., Hinoda, Y., et al. (1995): Combination therapy with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in aplastic anemia. *Am J Hematol.* 48(1), 29-33.
47. Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W., Plzak, L. (1957): Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature.* 179(4560), 633-634.

48. Jeffreys, R.V., Napier, J.A., Reynolds, S.H. (1982): Erythropoietin levels in posterior fossa haemangioblastoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 45(3), 264-266.
49. Jilma, B., Hergovich, N., Homoncik, M., Jilma-Stohlawetz, P., Kreuzer, C., Eichler, H.G., Zellner, M., Pugin, J. (2000): Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. *Br J Haematol*. 111(1), 314-320.
50. Joshi, S.S., Miller, K., Jackson, J.D., Warkentin, P., Kessinger, A. (2000): Immunological properties of mononuclear cells from blood stem cell harvests following mobilization with erythropoietin + G-CSF in cancer patients. *Cytotherapy*. 2(1), 15-24.
51. Kasper, C., Zahner, J., Sayer, H.G. (2002): Recombinant human erythropoietin in combined treatment with granulocyte- or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 128(9), 497-502.
52. Kertesz, N., Wu, J., Chen, T.H., Sucov, H.M., Wu, H. (2004): The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*. 276(1), 101-110.
53. Khwaja, A., Carver, J., Jones, H.M., Paterson, D., Linch, D.C. (1993): Expression and dynamic modulation of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor in immature and differentiated myeloid cells. *Br J Haematol*. 85(2), 254-259.
54. Kliem, C. (2001): Entwicklung eines mathematisches Kompartimentmodells zur Regulation der murinen Thrombopoese auf der Basis von Störungsmustern der thrombopoetischen Zellreihe. Medizinische Dissertation. Leipzig.
55. Koury, M.J., Kelley, L.L., Bondurant, M.C. (1994): The fate of erythroid progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci*. 718(259-267; discussion 267-270).
56. Kribs, A. (1992): Ein mathematisches Modell der Interaktion von Thrombopoese und Stammzellhämopoese bei Ratte und Maus. Medizinische Dissertation. Köln.
57. Kullberg, B.J., Oude Lashof, A.M., Netea, M.G. (2004): Design of efficacy trials of cytokines in combination with antifungal drugs. *Clin Infect Dis*. 39 Suppl 4(S218-223).
58. Landschulz, K.T., Noyes, A.N., Rogers, O., Boyer, S.H. (1989): Erythropoietin receptors on murine erythroid colony-forming units: natural history. *Blood*. 73(6), 1476-1486.
59. Lapidot, T., Petit, I. (2002): Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 30(9), 973-981.
60. Layton, J.E., Hockman, H., Sheridan, W.P., Morstyn, G. (1989): Evidence for a novel in vivo control mechanism of granulopoiesis: mature cell-related control of a regulatory growth factor. *Blood*. 74(4), 1303-1307.
61. Lee, M.Y., Fukunaga, R., Lee, T.J., Lottsfeldt, J.L., Nagata, S. (1991): Bone modulation in sustained hematopoietic stimulation in mice. *Blood*. 77(10), 2135-2141.

62. Lenhoff, S., Olofsson, T. (1996): Cytokine regulation of GM-CSF and G-CSF secretion by human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC). *Cytokine*. 8(9), 702-709.
63. Li, Z.Y. (2005): [Effect of recombinant human G-CSF combined with EPO in treatment of patients with MDS]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 13(3), 512-513.
64. Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F., Dunn, A.R. (1994): Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*. 84(6), 1737-1746.
65. Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., Link, D.C. (1996): Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity*. 5(5), 491-501.
66. Loeffler, M., Pantel, K., Wulff, H., Wichmann, H.E. (1989): A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part 1: Structure of the model. *Cell Tissue Kinet*. 22(1), 13-30.
67. Loeffler, M., Roeder, I. (2002): Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. *Cells Tissues Organs*. 171(1), 8-26.
68. Loeffler, M., Roeder, I. (2004): Conceptual models to understand tissue stem cell organization. *Curr Opin Hematol*. 11(2), 81-87.
69. Lord, B.I., Molineux, G., Pojda, Z., Souza, L.M., Mermod, J.J., Dexter, T.M. (1991): Myeloid cell kinetics in mice treated with recombinant interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor (CSF), or granulocyte-macrophage CSF in vivo. *Blood*. 77(10), 2154-2159.
70. Maiese, K., Li, F., Chong, Z.Z. (2005): New avenues of exploration for erythropoietin. *Jama*. 293(1), 90-95.
71. Mantovani, L., Lentini, G., Hentschel, B., Wickramanayake, P.D., Loeffler, M., Diehl, V., Tesch, H. (2000): Treatment of anaemia in myelodysplastic syndromes with prolonged administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin. *Br J Haematol*. 109(2), 367-375.
72. Matsuzaki, G., Li, X.Y., Ohyama, Y., Nomoto, K. (1996): Kinetics of serum granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) concentration and G-CSF receptor expression during G-CSF treatment of cyclophosphamide-treated mice. *Int J Immunopharmacol*. 18(6-7), 363-369.
73. McDonald, T.P., Clift, R.E., Cottrell, M.B. (1992): Large, chronic doses of erythropoietin cause thrombocytopenia in mice. *Blood*. 80(2), 352-358.

74. McKinstry, W.J., Li, C.L., Rasko, J.E., Nicola, N.A., Johnson, G.R., Metcalf, D. (1997): Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 89(1), 65-71.
75. McNiece, I.K., Briddell, R.A., Hartley, C.A., Smith, K.A., Andrews, R.G. (1993): Stem cell factor enhances in vivo effects of granulocyte colony stimulating factor for stimulating mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Stem Cells*. 11 Suppl 2(36-41).
76. Mirand, E.A., Prentice, T.C. (1957): Presence of plasma erythropoietin in hypoxic rats with or without kidney (s) and/or spleen. *Proc Soc Exp Biol Med*. 96(1), 49-51.
77. Molineux, G., Pojda, Z., Dexter, T.M. (1990a): A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 75(3), 563-569.
78. Molineux, G., Pojda, Z., Hampson, I.N., Lord, B.I., Dexter, T.M. (1990b): Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 76(10), 2153-2158.
79. Musto, P., Falcone, A., Carotenuto, M., Catalano, L., Cennamo, A., Rotoli, B. (1994): Granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin for the anemia of myelodysplastic syndromes: a real improvement with respect to erythropoietin alone? *Blood*. 84(5), 1687-1688.
80. Muta, K., Krantz, S.B. (1993): Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin. *J Cell Physiol*. 156(2), 264-271.
81. Neben, S., Marcus, K., Mauch, P. (1993): Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell subpopulations from the marrow to the blood of mice following cyclophosphamide and/or granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 81(7), 1960-1967.
82. Negrin, R.S., Stein, R., Doherty, K., Cornwell, J., Vardiman, J., Krantz, S., Greenberg, P.L. (1996): Maintenance treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin: evidence for in vivo synergy. *Blood*. 87(10), 4076-4081.
83. Negrin, R.S., Stein, R., Vardiman, J., Doherty, K., Cornwell, J., Krantz, S., Greenberg, P.L. (1993): Treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes using recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in combination with erythropoietin. *Blood*. 82(3), 737-743.
84. Nicola, N.A., Metcalf, D. (1985): Binding of 125I-labeled granulocyte colony-stimulating factor to normal murine hemopoietic cells. *J Cell Physiol*. 124(2), 313-321.
85. Nijhof, W., De Haan, G., Dontje, B., Loeffler, M. (1994): Effects of G-CSF on erythropoiesis. *Ann N Y Acad Sci*. 718(312-324; discussion 324-315).
86. Nijhof, W., de Haan, G., Pietens, J., Dontje, B. (1995): Mechanistic options of erythropoietin-stimulated erythropoiesis. *Exp Hematol*. 23(4), 369-375.

87. Nijhof, W., Goris, H., Dontje, B., Dresz, J., Loeffler, M. (1993): Optimal erythroid cell production during erythropoietin treatment of mice occurs by exploiting the splenic microenvironment. *Exp Hematol.* 21(4), 496-501.
88. Olivieri, A., Offidani, M., Cantori, I., Ciniero, L., Ombrosi, L., Masia, M.C., Brunori, M., Montroni, M., Leoni, P. (1995): Addition of erythropoietin to granulocyte colony-stimulating factor after priming chemotherapy enhances hemopoietic progenitor mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 16(6), 765-770.
89. Pantel, K., Loeffler, M., Bungart, B., Wichmann, H.E. (1990): A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part 4: Differences between bone marrow and spleen. *Cell Tissue Kinet.* 23(4), 283-297.
90. Panzenbock, B., Bartunek, P., Mapara, M.Y., Zenke, M. (1998): Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood.* 92(10), 3658-3668.
91. Patchen, M.L., MacVittie, T.J., Solberg, B.D., Souza, L.M. (1990): Therapeutic administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor accelerates hemopoietic regeneration and enhances survival in a murine model of radiation-induced myelosuppression. *Int J Cell Cloning.* 8(2), 107-122.
92. Pierelli, L., Menichella, G., Scambia, G., Teofili, L., Iovino, S., Serafini, R., Benedetti Panici, P., Salerno, G., Rumi, C., Zini, G., et al. (1994): In vitro and in vivo effects of recombinant human erythropoietin plus recombinant human G-CSF on human haemopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 14(1), 23-30.
93. Pierelli, L., Perillo, A., Greggi, S., Salerno, G., Panici, P.B., Menichella, G., Fattorossi, A., Leone, G., Mancuso, S., Scambia, G. (1999): Erythropoietin addition to granulocyte colony-stimulating factor abrogates life-threatening neutropenia and increases peripheral-blood progenitor-cell mobilization after epirubicin, paclitaxel, and cisplatin combination chemotherapy: results of a randomized comparison. *J Clin Oncol.* 17(4), 1288.
94. Pierelli, L., Scambia, G., Menichella, G., d'Onofrio, G., Salerno, G., Panici, P.B., Fodai, M.L., Vittori, M., Lai, M., Ciarli, M., Puglia, G., Mancuso, S., Bizzi, B. (1996): The combination of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor increases the rate of haemopoietic recovery with clinical benefit after peripheral blood progenitor cell transplantation. *Br J Haematol.* 92(2), 287-294.
95. Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., van Beurden, C.A., Baert, M.R., Chan, P.L. (1991): Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood.* 78(10), 2527-2533.
96. Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S., Brons, N.H. (1989): An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood.* 74(8), 2755-2763.

97. Pojda, Z., Molineux, G., Dexter, T.M. (1990): Hemopoietic effects of short-term in vivo treatment of mice with various doses of rhG-CSF. *Exp Hematol.* 18(1), 27-31.
98. Pojda, Z., Tanaka, K., Aoki, Y., Tsuboi, A. (1992): In vivo and in vitro interaction between interleukin 6 and granulocyte colony-stimulating factor in the regulation of murine hematopoiesis. *Exp Hematol.* 20(7), 874-878.
99. Potten, C.S., Loeffler, M. (1990): Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.* 110(4), 1001-1020.
100. Roberts, A.W., Metcalf, D. (1994): Granulocyte colony-stimulating factor induces selective elevations of progenitor cells in the peripheral blood of mice. *Exp Hematol.* 22(12), 1156-1163.
101. Roeder, I. (2006): Quantitative stem cell biology: computational studies in the hemato-poietic system. *Curr Opin Hematol.* 13(4), 222-228.
102. Roeder, I., de Haan, G., Engel, C., Nijhof, W., Dontje, B., Loeffler, M. (1998): Interactions of erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, stem cell factor, and interleukin-11 on murine hematopoiesis during simultaneous administration. *Blood.* 91(9), 3222-3229.
103. Roeder, I., Horn, M., Glauche, I., Hochhaus, A., Mueller, M.C., Loeffler, M. (2006): Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med.* 12(10), 1181-1184.
104. Roeder, I., Loeffler, M. (2002): A novel dynamic model of hematopoietic stem cell organization based on the concept of within-tissue plasticity. *Exp Hematol.* 30(8), 853-861.
105. Roeder, I., Loeffler, M., Quesenberry, P.J., Colvin, G.A., Lambert, J.F. (2003): Quantitative tissue stem cell modeling. *Blood.* 102(3), 1143-1144; author reply 1144-1145.
106. Scheduling, S., Loeffler, M., Schmitz, S., Seidel, H.J., Wichmann, H.E. (1992): Hemato-toxic effects of benzene analyzed by mathematical modeling. *Toxicology.* 72(3), 265-279.
107. Scott, C.L., Robb, L., Papaevangeliou, B., Mansfield, R., Nicola, N.A., Begley, C.G. (2000): Reassessment of interactions between hematopoietic receptors using common beta-chain and interleukin-3-specific receptor beta-chain-null cells: no evidence of functional interactions with receptors for erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, or stem cell factor. *Blood.* 96(4), 1588-1590.
108. Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K., Link, D.C. (2002): G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity.* 17(4), 413-423.
109. Shimoda, K., Okamura, S., Harada, N., Kondo, S., Okamura, T., Niho, Y. (1993): Identification of a functional receptor for granulocyte colony-stimulating factor on platelets. *J Clin Invest.* 91(4), 1310-1313.

110. Tamura, M., Hattori, K., Nomura, H., Oheda, M., Kubota, N., Imazeki, I., Ono, M., Ueyama, Y., Nagata, S., Shirafuji, N., et al. (1987): Induction of neutrophilic granulocytosis in mice by administration of purified human native granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Biochem Biophys Res Commun.* 142(2), 454-460.
111. Tehranchi, R., Fadeel, B., Forsblom, A.M., Christensson, B., Samuelsson, J., Zhivotovsky, B., Hellstrom-Lindberg, E. (2003): Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood.* 101(3), 1080-1086.
112. Testa, U. (2004): Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia.* 18(7), 1176-1199.
113. Testa, U., Fossati, C., Samoggia, P., Masciulli, R., Mariani, G., Hassan, H.J., Sposi, N.M., Guerriero, R., Rosato, V., Gabbianelli, M., Pelosi, E., Valtieri, M., Peschle, C. (1996): Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood.* 88(9), 3391-3406.
114. Thomas, J., Liu, F., Link, D.C. (2002): Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol.* 9(3), 183-189.
115. Till, J.E., Mc, C.E. (1961): A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 14(2)13-222.
116. Uchida, T., Yamagiwa, A. (1992): Kinetics of rG-CSF-induced neutrophilia in mice. *Exp Hematol.* 20(2), 152-155.
117. Ulich, T.R., del Castillo, J., McNiece, I.K., Yi, E.S., Alzona, C.P., Yin, S.M., Zsebo, K.M. (1991): Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. *Blood.* 78(8), 1954-1962.
118. Vannucchi, A.M., Bosi, A., Ieri, A., Guidi, S., Saccardi, R., Lombardini, L., Linari, S., Laszlo, D., Longo, G., Rossi-Ferrini, P. (1996): Combination therapy with G-CSF and erythropoietin after autologous bone marrow transplantation for lymphoid malignancies: a randomized trial. *Bone Marrow Transplant.* 17(4), 527-531.
119. Varas, F., Bernad, A., Bueren, J.A. (1996): Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes into peripheral blood the complete clonal repertoire of hematopoietic precursors residing in the bone marrow of mice. *Blood.* 88(7), 2495-2501.
120. Wagner, L.M., Billups, C.A., Furman, W.L., Rao, B.N., Santana, V.M. (2004): Combined use of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor does not decrease blood transfusion requirements during induction therapy for high-risk neuroblastoma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 22(10), 1886-1893.
121. Walker, F., Nicola, N.A., Metcalf, D., Burgess, A.W. (1985): Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell.* 43(1), 269-276.

122. Wang, G.L., Semenza, G.L. (1993): General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(9), 4304-4308.
123. Watari, K., Ozawa, K., Takahashi, S., Tojo, A., Tani, K., Kamachi, S., Asano, S. (1997): Pharmacokinetic studies of intravenous glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in various hematological disorders: inverse correlation between the half-life and bone marrow myeloid cell pool. *Int J Hematol.* 66(1), 57-67.
124. Weinberg, S.R., MacVittie, T.J. (1981): Hemopoiesis in the splenectomized-pregnant mouse following low-dose total-body irradiation. *Exp Hematol.* 9(8), 849-855.
125. Welte, K., Zeidler, C., Reiter, A., Muller, W., Odenwald, E., Souza, L., Riehm, H. (1990): Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in children with severe congenital neutropenia. *Blood.* 75(5), 1056-1063.
126. Wichmann, H.E., Loeffler, M.E. (1985): Mathematical modeling of cell proliferation: Stem cell regulation in hemopoiesis. Vol 1 and 2. CRC Press, Boca Raton, FL
127. Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P., Lodish, H.F. (1995): Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature.* 377(6546), 242-246.
128. Wulff, H., Wichmann, H.E., Pantel, K., Loeffler, M. (1989): A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part 3: Suppressed erythropoiesis. *Cell Tissue Kinet.* 22(1), 51-61.
129. Yamagiwa, A. (1991): Granulocyte kinetics in neutrophilia induced by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in mice. *Fukushima J Med Sci.* 37(1), 1-11.
130. Zanjani, E.D., Poster, J., Burlington, H., Mann, L.I., Wasserman, L.R. (1977): Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med.* 89(3), 640-644.

Granulopoese im Knochenmark

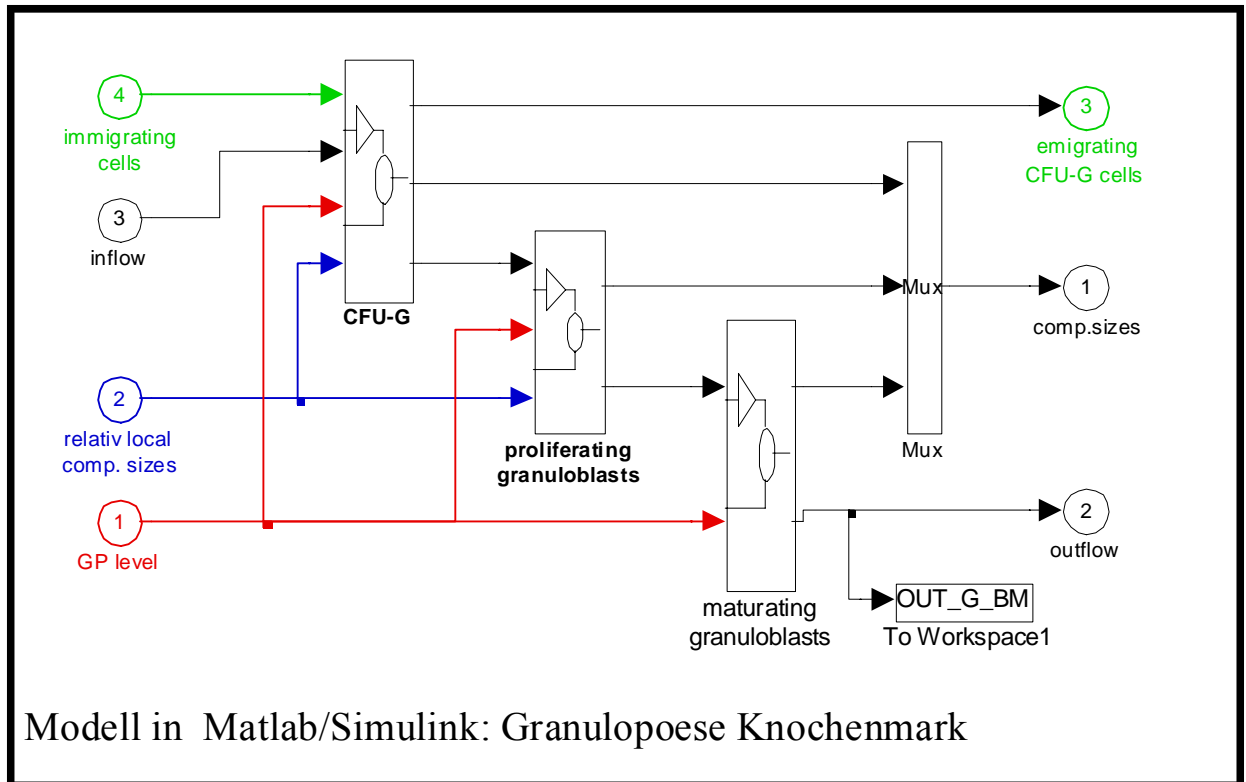


Abbildung 29: Modelloberfläche unter Matlab/Simulink, Ebene der Granulopoese im Knochenmark: aufeinanderfolgende Kompartimente der CFU-GM, PGP und MGB

CFU-GM im Knochenmark

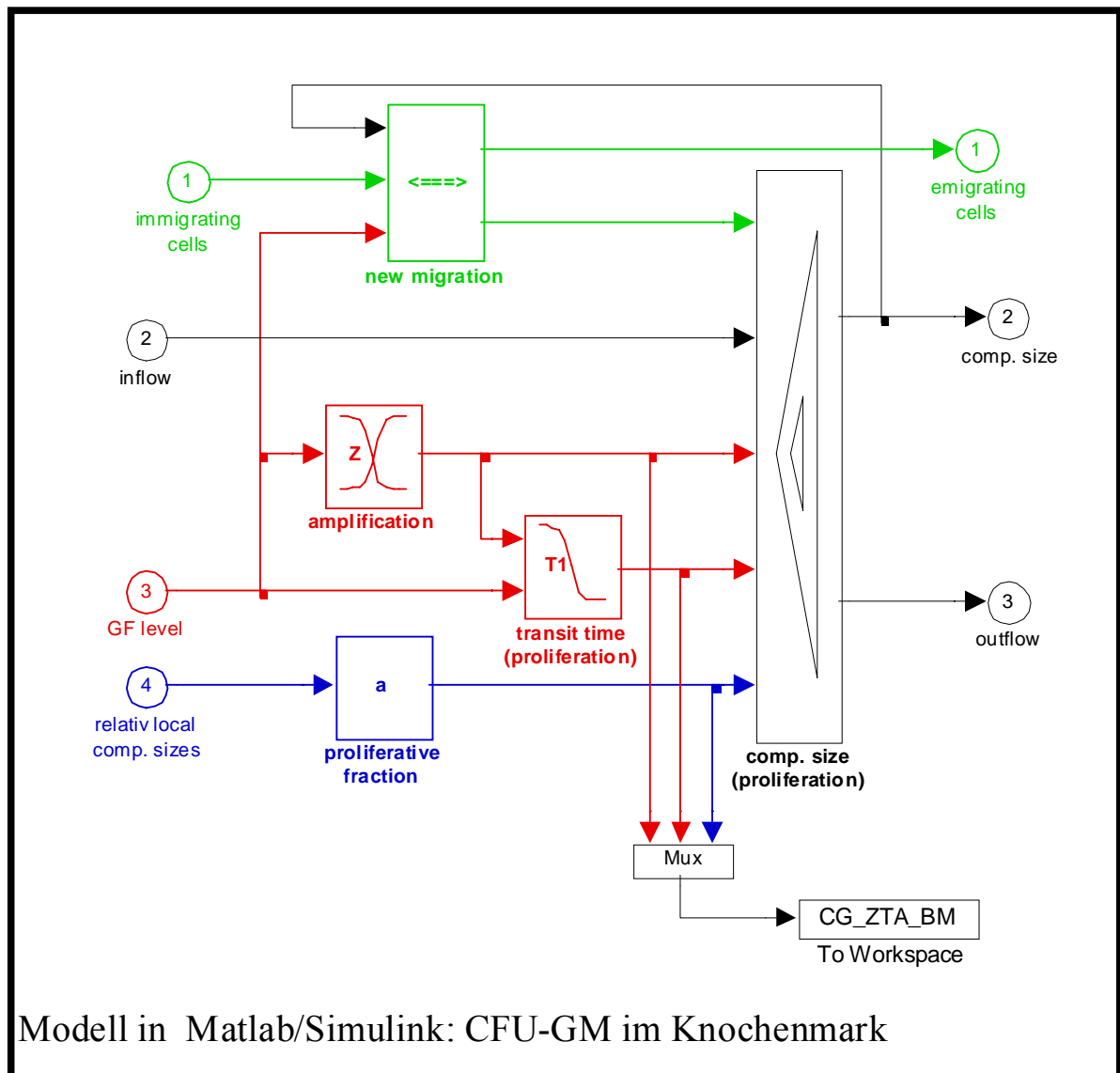


Abbildung 30: Modelloberfläche unter Matlab/Simulink, Ebene der CFU-GM im Knochenmark: G-CSF-abhängige Einflussgrößen der Migration, Amplifikation und Transitzeit

Standardparametersatz

Tabelle 16: Standardparametersatz der Modelle für normale und splenektomierte Maus

Kompartiment	Parameter	Knochenmark	Milz
SC	a_{\min}	0,01	0,01
	a_{nor}	0,15	0,15
	a_{int}	0,45	0,45
	a_{\max}	1	1
	p_{\min}	0,4	0,4
	p_{nor}	0,5	0,5
	p_{\max}	0,6	0,6
	$k_{\min}^{\text{mig}}(GP)$	-0,0025	0
	$k_{\text{nor}}^{\text{mig}}(GP)$	0	0
	$k_{\max}^{\text{mig}}(GP)$	0,5	0
	PEM	1,5	0
	$k_{\min}^{\text{Seed}}(GP)$	0	0,4
	$k_{\text{nor}}^{\text{Seed}}(GP)$	0	0,4
	$k_{\max}^{\text{Seed}}(GP)$	0	0,4
	PEM	0	0,7
	TC	8	8
	f_{BM}^E	0,15	
	f_{SP}^E		0,15
	f_{BM}^G	0,8	
	f_{SP}^G		0,8
ERYTHROPOESE			
BE	a_{\min}	0,3	0,3
	a_{nor}	0,33	0,33
	a_{int}	0,66	0,66
	a_{\max}	1	1
	A_{\min}	32	32
	A_{nor}	32	32
	A_{int}	32	32
	PEZ	0,7	0,7
	TC_{\min}	40	40
	TC_{nor}	40	40

	TC_{\max}	40	40
	PET	0,7	0,7
	$k_{\min}^{mig}(EPO)$	-0,1	0
	$k_{nor}^{mig}(EPO)$	0	0
	$k_{\max}^{mig}(EPO)$	0,13	0
	PEM	0,8	0,7
	$k_{\min}^{Seed}(EPO)$	0	-0,015
	$k_{nor}^{Seed}(EPO)$	0	0
	$k_{\max}^{Seed}(EPO)$	0	1
	PEM	0	0,75
	$k_{\min}^{mig}(GP)$	-0,04	
	$k_{nor}^{mig}(GP)$	0	
	$k_{\max}^{mig}(GP)$	0,32	
	PEM	0,7	
	$k_{\min}^{Seed}(GP)$	0	0,5
	$k_{nor}^{Seed}(GP)$	0	0,5
	$k_{\max}^{Seed}(GP)$	0	0,5
	PEM	0	1,3
CE	a_{\min}	1	1
	a_{nor}	1	1
	a_{int}	1	1
	a_{\max}	1	1
	A_{\min}	1	1
	A_{nor}	8	16
	A_{int}	44	510
	PEZ	1,3	1,8
	TC_{\min}	7	7
	TC_{nor}	11	11
	TC_{\max}	25	25
	PET	0,7	0,7
	$k_{\min}^S(GP)$	1,4	
	$k_{nor}^S(GP)$	1	
	$k_{\max}^S(GP)$	0,01	
	PEM	0,7	
PEB	a_{\min}	1	1
	a_{nor}	1	1
	a_{int}	1	1
	a_{\max}	1	1
	A_{\min}	1	20

	A_{nor}	16	16
	A_{int}	18,5	8,68
	PEZ	0,95	0,44
	TC_{min}	7	7
	TC_{nor}	11	11
	TC_{max}	25	25
	PET	0,7	0,7
MEB	TT_{min}	2	2
	TT_{nor}	6	6
	TT_{max}	7	7
	PET	1,17	1,17
RETR	TT_{min}	0,1	0,1
	TT_{nor}	12	12
	TT_{max}	20	20
	PET	0,95	0,95

GRANULOPOESE

CG	a_{min}	0,33	0,33
	a_{nor}	0,33	0,33
	a_{int}	0,33	0,33
	a_{max}	0,33	0,33
	A_{min}	32	3
	A_{nor}	32	11
	A_{int}	32	3000
	PEZ	0,7	1,3
	$A_{min}(EPO)$		0,5
	$A_{nor}(EPO)$		1
	$A_{max}(EPO)$		2
	PEZ		0,7
	TC_{min}	9	9
	TC_{nor}	9	9
	TC_{max}	9	9
	PET	0,7	0,7
	$k_{min}^{mig}(GP)$	-0,0025	0
	$k_{nor}^{mig}(GP)$	0	0
	$k_{max}^{mig}(GP)$	0,4	0
	PEM	1,5	0
	$k_{nor}^{Seed}(GP)$	0	0,4
PGB	a_{nor}	0,36	0,36

	A_{\min}	4	110
	A_{nor}	16	87
	A_{int}	128	64
	PEZ	0,7	0,7
	TC_{nor}	18	18
MGB	TT_{\min}	16	16
	TT_{nor}	120	120
	TT_{\max}	126	126
	PET	0,7	0,7
	A_{\min}	0,1	0,1
	A_{nor}	0,2	0,2
	A_{int}	1,05	1,05
	PEZ	0,7	0,7

PERIPHERES BLUT

RETC	TT	18
	$RETC [\%]$	0,0175
ERYa	TT	1080 h
ERYr	TT	360 h
GRA	TT	3,3 h
EPO	TT	3
GP	TT	2 h

13 Anlagen

13.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift

13.2 Lebenslauf

Name: Corinna Mirjam Gebauer
geboren: 20.2.1974 in Hof/Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch
Religion: evangelisch-lutherisch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1982-1986 Alexander-von-Humboldt-Grundschule Bad Steben
1986-1993 Gymnasium Naila
Juli 1993 Abitur

Hochschulstudium:

Oktober 1993 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Universität Leipzig
September 1995 Ärztliche Vorprüfung
August 1996 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1999 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1999 - März 2000 Praktisches Jahr an den Universitätskliniken Leipzig
Wahlfach Kinderheilkunde
Mai 2000 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote "gut"

Berufliche Tätigkeit und Qualifikation:

Mai 2000 - heute Ärztin im Praktikum, Ärztin in Weiterbildung und Fach-
ärztin für Kinder- und Jugendheilkunde an der Klinik und
Poliklinik für Kinder und Jugendliche des Universitätskli-
nikums Leipzig
März 2003 - August 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Koordinierungszen-
trum für Klinische Studien der Universität Leipzig
seit Juni 2006 Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin
seit Januar 2008 Schwerpunktbezeichnung Neonatologie
seit 2008 Deutsche Delegierte für die European Milk Bank Associa-
tion (EMBA)

13.3 Publikationen und Vorträge

Publikationen in begutachteten Zeitschriften:

Gebauer CM, Borte M, Schille R, Scholz R, Schuster V, Handrick W.
Gonarthrititis due to Salmonella enteritidis in a patient with systemic lupus erythematosus.
Klin Padiatr. 2002 Sep-Oct;214(5):319-23.

Knüpfer M, Pulzer F, **Gebauer C**, Robel-Tillig E, Vogtmann C.
Predictive value of umbilical cord blood bilirubin for postnatal hyperbilirubinaemia.
Acta Paediatr. 2005 May;94(5):581-7.

Gebauer CM, Knuepfer M, Robel-Tillig E, Pulzer F, Vogtmann C.
Hemodynamics among neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy during whole-body hypothermia and passive rewarming.
Pediatrics. 2006 Mar;117(3):843-50.

Enders J, **Gebauer C**, Pulzer F, Robel-Tillig E, Knüpfer M.
Morphine-related apnoea in CPAP-treated preterm neonates.
Acta Paediatr. 2006 Sep;95(9):1087-92.

Herbertz S, Pulzer F, **Gebauer C**, Panhofer M, Robel-Tillig E, Knüpfer M.
The effect of maturation and sedation on amplitude-integrated electroencephalogram of the preterm neonate: results of a prospective study.
Acta Paediatr. 2006 Nov;95(11):1394-9.

Pulzer F, Robel-Tillig E, Knüpfer M, Foja C, **Gebauer C**, Kiess W.
Ocular complications at the limits of viability.
Acta Paediatr. 2007 Mar;96(3):353-7.

Spiegler J, Kattner E, Vochem M, Küster H, Möller J, Müller D, Kribs A, Segerer H, Wieg C, Niki-schin W, von der Wense A, **Gebauer C**, Herting E, Göpel W.
Very low birth weight infants as a model to study genetic influences on neonatal weight gain.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008 Jan;46(1):113-6.

Enders J, **Gebauer C**, Pulzer F, Robel-Tillig E, Knüpfer M.
Analgesedation with low-dose morphine for preterm infants with CPAP: risks and benefits.
Acta Paediatr. 2008 Jul;97(7):880-3. Epub 2008 May 16.

Völkel W, Genzel-Boroviczeny O, Demmelmair H, **Gebauer C**, Koletzko B, Twardella D, Raab U, Fromme H.
Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study.
Int J Hyg Environ Health. 2008 Jul;211(3-4):440-6. Epub 2007 Sep 17.

Kapellen TM, **Gebauer CM**, Brosteanu O, Labitzke B, Vogtmann C, Kiess W.
Higher rate of cord-related adverse events in neonates with dry umbilical cord care compared to chlorhexidine powder. Results of a randomized controlled study to compare efficacy and safety of chlorhexidine powder versus dry care in umbilical cord care of the newborn.
Neonatology. 2009;96(1):13-8. Epub 2009 Feb 7.

Härtel C, Haase B, Browning-Carmo K, **Gebauer C**, Kattner E, Kribs A, Segerer H, Teig N, Wense A, Wieg C, Herting E, Göpel W.

Does the enteral feeding advancement affect short-term outcomes in very low birth weight infants?
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009 Apr;48(4):464-70.

Kribs A, Härtel C, Kattner E, Vochem M, Küster H, Möller J, Müller D, Segerer H, Wieg C, **Gebauer C**, Nikischin W, Wense A, Herting E, Roth B, Göpel W.
Surfactant without intubation in preterm infants with respiratory distress: first multi-center data.
Klin Padiatr. 2010 Jan-Feb;222(1):13-7. Epub 2010 Jan 18.

Hümer M, Scheller G, Kapellen T, **Gebauer C**, Schmidt H, Kiess W.
Use of herbal medicine in German children - prevalence, indications and motivation.
Dtsch Med Wochenschr. 2010 May;135(19):959-64. Epub 2010 May 5.

Spiegler J, Gilhaus A, König IR, Kattner E, Vochem M, Kuster H, Moller J, Muller D, Kribs A, Segerer H, Wieg C, Nikischin W, von der Wense A, **Gebauer C**, Herting E, Gopel W.
Polymorphisms in the Renin-Angiotensin system and outcome of very-low-birthweight infants.
Neonatology. 2010;97(1):10-4. Epub 2009 Jul 2.

Publikationen als Collaborator in begutachteten Zeitschriften:

Schoefer Y, Zutavern A, Brockow I, Schäfer T, Krämer U, Schaaf B, Herbarth O, von Berg A, Wichmann HE, Heinrich J; **LISA study group**.
Health risks of early swimming pool attendance.
Int J Hyg Environ Health. 2008 Jul;211(3-4):367-73. Epub 2007 Sep 14.

Morgenstern V, Zutavern A, Cyrys J, Brockow I, Koletzko S, Krämer U, Behrendt H, Herbarth O, von Berg A, Bauer CP, Wichmann HE, Heinrich J; GINI Study Group; **LISA Study Group**.
Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children.
Am J Respir Crit Care Med. 2008 Jun 15;177(12):1331-7. Epub 2008 Mar 12.

Herberth G, Gubelt R, Röder S, Krämer U, Schins RP, Diez U, Borte M, Heinrich J, Wichmann HE, Herbarth O, Lehmann I; **LISAplus study group**.
Increase of inflammatory markers after indoor renovation activities: the LISA birth cohort study.
Pediatr Allergy Immunol. 2009 Sep;20(6):563-70. Epub 2009 May 31.

Sausenthaler S, Rzehak P, Chen CM, Arck P, Bockelbrink A, Schäfer T, Schaaf B, Borte M, Herbarth O, Krämer U, von Berg A, Wichmann HE, Heinrich J; **LISA Study Group**.
Stress-related maternal factors during pregnancy in relation to childhood eczema: results from the LISA Study.
J Investig Allergol Clin Immunol. 2009;19(6):481-7.

Herberth G, Heinrich J, Röder S, Figl A, Weiss M, Diez U, Borte M, Herbarth O, Lehmann I; **LISA study group**.
Reduced IFN-gamma- and enhanced IL-4-producing CD4+ cord blood T cells are associated with a higher risk for atopic dermatitis during the first 2 yr of life.
Pediatr Allergy Immunol. 2010 Feb;21(1 Pt 1):5-13. Epub 2009 Jun 23.

Vorträge auf nationalen und internationalen Fachtagungen:

Bakterielle Gonarthrit durch Salmonella enteritidis bei einer Patientin mit systemischem Lupus erythematoses

C. M. Gebauer, M. Borte, R. Schille, R. Scholz, V. Schuster, W. Handrick
AGKJR, 2001, Bad Bramstedt

Cytomegalovirus (CMV) infection as a posttransplant complication of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) in a 2-year-old boy

C.M. Gebauer, M. Borte, W. Friedrich, V. Schuster
Convir, 2002, München

Subkutane Infusion von Immunglobulinen als Heimtherapie bei Kindern mit primären Immundefekterkrankungen

C.M. Gebauer, P. Kießling, B. Labitzke, V. Schuster, M. Borte
DGPI, 2002, Leipzig

Nasale positiver endexpiratorischer Druck mittels Sauerstoffbrille („Mini-CPAP“) im Vergleich zu konventioneller CPAP-Atemhilfe bei Frühgeborenen

C. Gebauer, M. Überreiter, F. Pulzer, E. Robel-Tillig, C. Vogtmann, M. Knüpfer
GNPI, 2007, Hamburg

Human milk banking in Germany

C. Gebauer, S. Springer
Second international milk banking conference, 2008, Mailand, Italien

Ein Blick in moderne Frauenmilchbanken (FMB) in Deutschland – die FMB der Universitätskinderklinik Leipzig

C. Gebauer, E. Robel-Tillig, S. Springer
DGKJ, 2008

Human milk banking

ABM's 3rd European Regional Conference for Physicians, 2010, Torun, Polen

Postervorträge

Lineage interactions during prolonged combined administration of EPO and G-CSF explained by a comprehensive model of murine erythro- and granulopoiesis

C. Gebauer, C. Engel, M. Wilkens, W. Nijhof, M. Loeffler
ISEH, 1998, Vancouver, Canada

Hämatogene bakterielle Gonarthrit durch Salmonella enteritidis bei einer Patientin mit systemischem Lupus erythematoses

C. Gebauer, M. Borte, R. Schille, V. Schuster, R. Scholz, W. Handrick
DGPI, 2000, Dresden

Akute fokale bakterielle Nephritis (AFBN) bei einem sechsjährigen Jungen

C. Gebauer, G. Borte, R. Schille, M. Borte, W. Handrick
DGPI, 2001, Leipzig

Das CINCA-Syndrom - Ein Fallbericht

M. Borte, C.M. Gebauer, B.M. Seidel, V. Schuster
AGKJR, 2002, Garmisch-Partenkirchen

Schwerer klinischer Verlauf eines Wiskott-Aldrich-Syndroms (WAS) bei einem 2 Jahre alten Knaben

C. Gebauer, M. Borte, W. Friedrich, V. Schuster
DGPI, 2002, Leipzig

Mycophenolatmofetil - Erfahrungen in der Behandlung zweier Jugendlicher mit systemischem Lupus erythematodes bzw. Wegenerscher Granulomatose und schwerer Nierenbeteiligung

C.M. Gebauer, G. Bürk, R. Schille, V. Schuster
AGKJR, 2003, Halle

Schwere persistierende pulmonale Hypertension (PPHN) bei einem Frühgeborenen der 29,3 SSW mit primärer Resistenz gegen inhalatives Stickstoffmonoxid (iNO)

Gebauer CM, Knüpfer M, Pulzer F, Robel-Tillig E, Vogtmann C
GNPI, Berlin, 2003

Systemischer Lupus erythematodes und Wegener'sche Granulomatose im Kindesalter - Erhaltungstherapie mit Mycophenolat Mofetil

Corinna Gebauer, Regine Schille, Guido Bürk, Volker Schuster
AGKJR, 2005, Dresden

Mycophenolat Mofetil – eine alternative Therapieoption zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen im Kindesalter? Erfahrungen bei schwerer Nierenbeteiligung bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und Wegener'scher Granulomatose

C. Gebauer, G. Bürk, V. Schuster
DGPI, 2005, Düsseldorf

Einfluss der postnatalen Dexamethasontherapie auf die Entwicklung des Kopfumfanges zur Entlassung bei Frühgeborenen $\leq 30,0$ SSW

Corinna Gebauer, Matthias Knüpfer, Ferdinand Pulzer, Eva Robel-Tillig
GNPI, 2006, Wien

Frauenmilchbanken (FMB) in Deutschland – Aktueller Überblick

C.M. Gebauer, F. Pulzer, M. Knüpfer, E. Robel-Tillig, U. Thome
GNPI, 2009, Berlin

Blickdiagnose: Neonatale kalte Staphylokokken-Abszesse

C.M. Gebauer, S. Syrbe, D. Kluth, M. Knüpfer, U. Thome
STKJM, 2010, Erfurt

13.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. Markus Löffler angefertigt, dem ich für die Überlassung des Themas und die engagierte Förderung danke.

Für die kompetente, geduldige Betreuung, die vielen wertvollen Ratschläge und kritische Durchsicht des Manuskripts während der Anfertigung der Arbeit danke ich besonders Herrn Dr. med. Christoph Engel.

Herrn Dipl.-Phys. Dr. Horst Franke danke ich für die Einführung in die mathematischen Einzelheiten des Modells, sowie Herrn Jochen Dress für die Einführung in die programmtechnischen Einzelheiten des Modells und die technische Unterstützung.

Für die Durchführung der Tierexperimente bedanke ich mich bei Herrn Dr. Willem Nijhof, Frau Marga Wilkens, Bert Dontje, Henk Jan Vosselman und besonders bei Herrn Dr. Gerald de Haan.

