

Aus dem Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Veränderungen des Differentialblutbildes und weiterer laborchemischer Parameter unter G-CSF Stimulation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kubilay Özcan

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Günther Giers

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Rainer Haas

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung.....1

1.1 Hämatopoese

1.2 Weiße Blutkörperchen

1.2.1 Granulozyten

1.2.2 Leukozyten

1.2.3 Monozyten

1.3 Rote Blutkörperchen

1.4 Blutplättchen

1.5 Blutvolumen und Blutbestandteile

1.6 Serumelektrophorese

1.7 Hämatopoetische Stammzellapherese

1.8 Charakterisierung der hämatopoetischen Vorläuferzelle

1.9 Hämapheresesystem Cobe Spectra

1.10 Granulozyten-Colonie stimulierender Faktor (G-CSF)

3.10.1 Morphologie, Funktion und Wirkungsweise von G-CSF

3.10.2 Spezielle Wirkung von G-CSF

3.10.3 Nebenwirkungen von G-CSF

2 Ziele der Arbeit.....13

3 Material und Methodik	14
3.1 Spender	
3.2 Statistische Auswertung	
4 Ergebnisse	16
4.1 G-CSF assoziierte Veränderungen des Blutbildes	
4.2 G-CSF assoziierte Veränderungen der Harnsäure	
4.3 G-CSF assoziierte Veränderungen des CRP	
4.4 G-CSF assoziierte Veränderungen der Thrombozyten	
4.5 G-CSF assoziierte Veränderungen der Serumelektrophorese	
4.6 G-CSF assoziierte Veränderungen der CD 34+-Zellen	
4.7 Korrelation Leukozytenzahl nach der Mobilisierung und Separationseffektivität von WBC	
4.8 Korrelation Leukozytenzahl nach der Mobilisierung und Separationseffektivität von CD34+ Zellen	
4.9 Korrelation Leukozytenzahl nach der Mobilisierung und Anzahl von gesammelten CD34+ Zellen in den Stammzellkonzentraten	
4.10 Korrelation der Separationseffektivität von CD34+ Zellen und dem Abfall der Leukozytenzahl nach der Apherese	
4.11 Korrelation zwischen “Knochenmarkdynamik“ und Separationseffektivität von CD34+ Zellen	
4.12 Korrelation Abfall der Thrombozytenzahl nach der Apherese und Separationseffektivität von CD34+ Zellen	
4.13 Korrelation Leukozytenzahl und Harnsäure nach Mobilisation mit G-CSF	
4.14 Korrelation Leukozytenzahl und CRP nach Mobilisation mit G-CSF	
5 Diskussion	33
6 Schlussfolgerung	41

7 Literatur- und Quellenverzeichnis	43
8 Anhang	48
8.1 Abbildungsverzeichnis	
8.2 Tabellenverzeichnis	
8.3 Danksagung	
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung	
9 Ethikvotum	50

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es Veränderungen des Differentialblutbildes und weiterer laborchemischer Parameter unter G-CSF Mobilisation, welche als begleitende „Nebenwirkung“ der Stimulierung der hämatopoetischen Stammzellen resultieren, zu erkennen. Ferner untersuchten wir die Effektivität der G-CSF Mobilisation und die anschließende Separation.

Dafür wurden 42 PBSC-Apherese-Spender sowie als Kontrollgruppe 14 Knochenmarkspender untersucht. Die Spender haben sich von Januar bis Dezember 2012 einer Stammzellspende unterzogen. Die PBSC-Apherese Spender wurden mobilisiert indem sie über 4 Tage hintereinander sowie am Tag der Apherese $10\mu\text{g}/\text{Kg}$ KG G-CSF s.c. injiziert bekamen. Als G-CSF wurde Lenograstim verwendet. Die Knochenmarkspender erhielten keine Vorbehandlung.

Bei den PBSC-Apherese Spendern kam es unter dieser Mobilisierung zu einem signifikanten Anstieg sämtlicher Leukozyten von $6,24 \times 10^9$ Zellen/l auf $44,74 \times 10^9$ Zellen/l, v.a. der neutrophilen Granulozyten auf das 11-fache des Ausgangswertes von $3,58 \times 10^9$ Zellen/l auf $38,15 \times 10^9$ Zellen/l. Die Monozyten stiegen ebenfalls absolut gesehen von $0,51 \times 10^9$ Zellen/l auf $2,02 \times 10^9$ Zellen/l, ebenso wie die Lymphozyten von $1,91 \times 10^9$ Zellen/l auf $3,70 \times 10^9$ Zellen/l.

Die roten Blutkörperchen sanken geringfügig von $5,12 \times 10^9$ Zellen/l auf $4,88 \times 10^9$ Zellen/l, wie auch das Hämoglobin von 14,81 g/dl auf 14,15 g/dl und der Hämatokrit von 44,68% auf 42,61%. In der Serumelektrophorese konnten signifikante Anstiege des $\alpha 1$ Globulinanteils von 3,66% auf 4,75%, sowie des $\alpha 2$ Globulinanteils von 9,01% auf 9,81% nachgewiesen werden. Ebenfalls signifikant war der Abfall der Albuminfraktion von 60,2% auf 59,3%.

Die Harnsäure stieg signifikant von 5,49mg/dl (SD +/-1,19 mg/dl) auf 6,44mg/dl (SD +/-1,26mg/dl), wie auch das CRP von <0,3 mg/dl auf 1,39 mg/dl (SD +/-0,94mg/dl).

Die Thrombozytenzahl fiel nach der Mobilisation durch G-CSF zunächst von $240,48 \times 10^9$ Zellen/l auf $217,69 \times 10^9$ Zellen/l um nach der darauffolgenden PBSC-Apherese weiter auf $134,17 \times 10^9$ Zellen/l abzufallen. Das MPV sank von 8,48fl auf 7,95fl, um nach der PBSC-Apherese weiter auf 7,07fl zu sinken.

Der Anteil der hämatopoetischen Vorläuferzellen im peripheren Blut stieg von 2,64 CD34+ Zellen pro μl auf 96,54 CD34+ Zellen pro μl . In den gewonnenen Stammzellkonzentraten (SZK) selber befanden sich im Durchschnitt 1790,4 CD34+ Zellen pro μl . Bei einem durchschnittlichen Stammzellkonzentrat von 321ml ergaben sich somit $5,7 \times 10^8$ CD34+ Zellen pro PBSC-Apherese. Mit der PBSC-Apherese konnte somit eine für die Stammzelltransplantation ausreichende Menge an HVZ gesammelt werden, ohne sie mit der klassischen Knochenmarkspende zu belasten.

Schwerwiegende Nebenwirkungen traten bei den PBSC-Apherese Spendern nicht auf.

Bei den Knochenmarkspendern war das rote- und weiße Blutbild in der Voruntersuchung und am Tag der Knochenmarkspende vor der Knochenmarkentnahme wie erwartet unverändert.

Abkürzungsverzeichnis

CE:	Separationseffektivität (engl. Collection Efficiency)
G-CSF:	hämatopoetische Wachstumsfaktoren (engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
HGB:	Diese Abkürzung steht für Hämoglobin und gibt den Hämoglobingehalt je Volumeneinheit Blut an. (Norm: Männer: 13-18g/dl, Frauen: 11-16g/dl)
HVZ:	hämatopoetische Vorläuferzellen
KM Tx:	Knochenmark Transplantation
KOD:	kolloidotischer Druck
MCH:	Diese Abkürzung steht für Mean Corpuscular Hämoglobin und gibt den Hämoglobin-Gehalt eines einzelnen Erythrozyten an. (Norm: 28 bis 33pg)
MCHC:	Diese Abkürzung steht für Mean Corpuscular Hämoglobin Concentration und gibt die Hämoglobin-Konzentration im Erythrozyten an. (Norm: 30 bis 36 g/dl)
MCV:	Diese Abkürzung steht für Mean Corpuscular Volume und gibt das Volumen eines einzelnen Erythrozyten an. (Norm: 83 bis 97fl)
nach ZS:	nach der Zellseparation (Apherese)
PBSC:	Periphere Blutstammzellen (engl. Peripheral Blood Stem Cell)
RBC:	Diese Abkürzung steht für Red Blood Cells und gibt die Erythrozytenanzahl an. (Norm: Männern 4,8-5,9 Mio./ μ l, Frauen 4,3-5,2 Mio./ μ l)
SZK:	Stammzellkonzentrat
μg/kg KG:	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht
VU:	Voruntersuchung (ca. 4-5 Wochen vor der Apherese)
vor ZS:	vor der Zellseparation (Apherese), nach der Mobilisierung mit G-CSF

1 Einleitung

1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese, auch Blutbildung genannt, erfolgt beim Menschen nach der Geburt v.a. im Knochenmark, und den sog. Lymphatischen Organen wie Milz und Thymus. Alle Blutzellen stammen dabei von hämatopoetischen Vorläuferzellen ab. Die Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen wird von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gesteuert. Da die meisten Blutzellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben, müssen sie ständig erneuert werden.

Die hämatopoetischen Stammzellen bilden dabei pro Tag bis zu 10×10^{11} neue Blutzellen.¹

Man unterscheidet dabei die Bildung von:

- **Weißen Blutkörperchen (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten)**
- **Roten Blutkörperchen (Erythrozyten)**
- **Blutplättchen (Thrombozyten)**

Ein Schema der Hämatopoese ist auf der folgenden Abbildung 1 zu sehen.

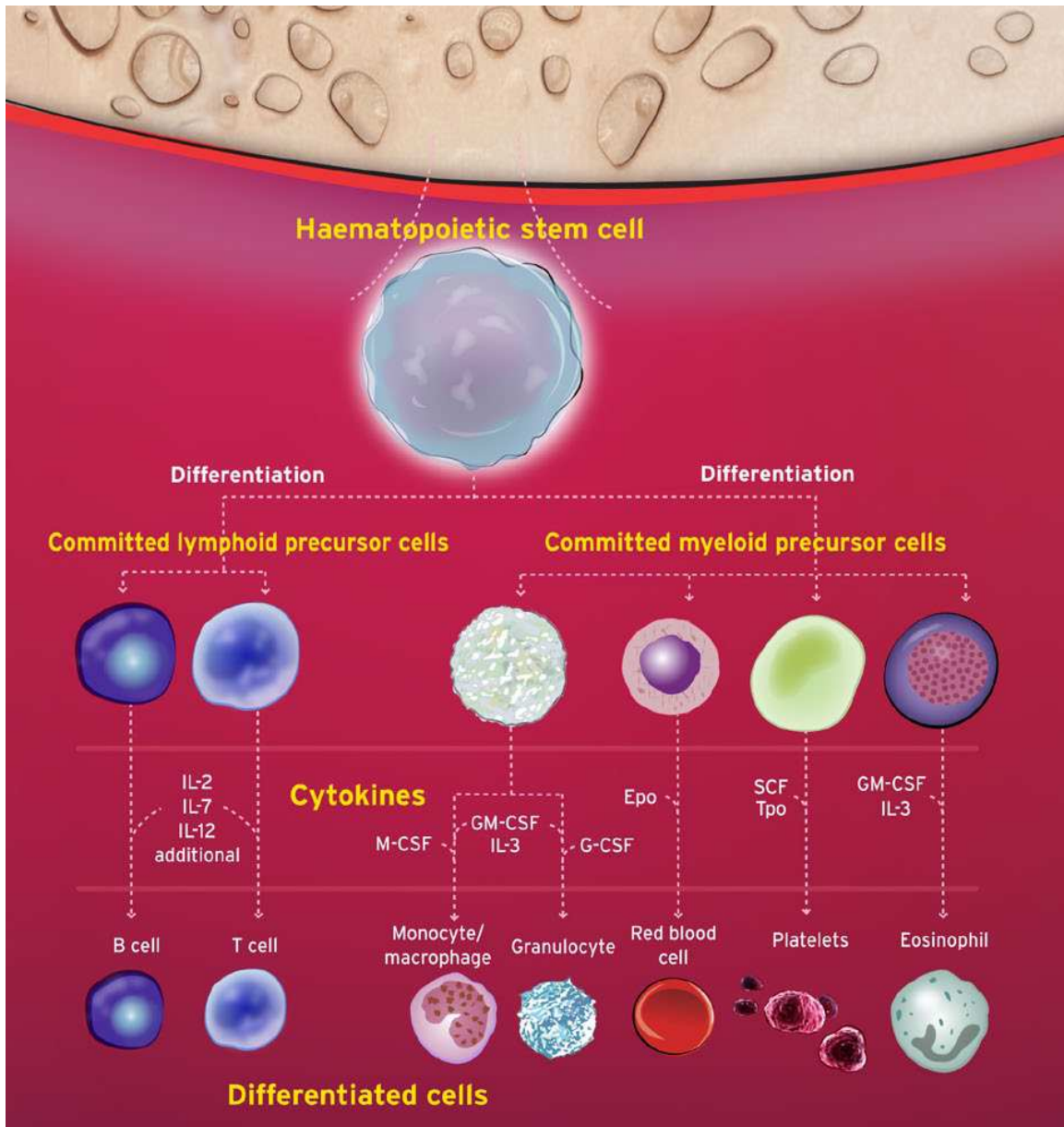


Abb.1: Schema der Hämatopoese aus Montiel MM. Bone marrow

IL = Interleukin, M-CSF = Monocyte Stimulating Factor, GM-CSF = Granulocyt/Monocyte Stimulating Factor, SCF TPO = Stem Cell Factor Thrombopoetin, Epo = Erythropoetin

1.2 Weiße Blutkörperchen

1.2.1 Granulozyten gehören zur Gruppe der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und sind Teil der zellulären Immunabwehr.

Nach ihrer mikroskopischen Morphologie und dem Färbeverhalten unterscheidet man folgende Formen von Granulozyten:

- **Neutrophile Granulozyten**
 - Jugendliche (neutrophile) Granulozyten 5 bis 10%
 - Stabkernige (neutrophile) Granulozyten 0% bis 5%
 - Segmentkernige (neutrophile) Granulozyten 50% bis 65%
- **Eosinophile Granulozyten** 2 bis 4%
- **Basophile Granulozyten** 0 bis 3%

Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten bilden mit bis zu 50-70% den Hauptbestandteil der Leukozyten dar. Ihr Hauptreservespeicher ist das Knochenmark, wobei etwa 5% der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut zirkuliert und z.T. an den Wänden kleiner Blutgefäße sitzt. Dieser marginale Pool kann sehr rasch bei Bedarf aktiviert werden, wie z.B. unter Cortisoneinfluss oder erhöhtem Blutdruck. Neutrophile Granulozyten können angelockt durch chemotaktische Reize ins Gewebe und in Exsudate einwandern und dort ihre Aufgaben wie Phagozytose und Zerstörung mikrobieller Erreger erfüllen. Hierfür sind ihre Granula von großer Bedeutung, die Peroxidasen und Esterasen enthalten, welche zytotoxisch für Bakterien und auch Pilze wirken. Eine Verminderung dieser Granula kann daher zu einer vermehrten Infektanfälligkeit führen.

Neutrophile Granulozyten sind 9- 12µm groß und haben eine grobe Chromatinstruktur.

Stabkernige Neutrophile haben einen bandförmigen Zellkern und sind die direkte Vorstufe der segmentkernigen Neutrophilen. Von segmentkernigen Neutrophilen spricht man wenn dieser

bandförmige Zellkern der stabkernigen Neutrophilen sich bis zu 2/3 einschnürt. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten ist oxyphil, fast farblos bis zart-rosa/violett und enthält feine stippchenförmige Granula welche oft kaum sichtbar sind.

Ein erwachsener Mensch produziert mehr als 10×10^{10} neutrophile Granulozyten pro Tag.¹ Granulozyten besitzen ein Zytoskelett, aus vornehmlich Aktin und Myosin, welche dem Granulozyten ermöglichen sich auf Oberflächen amöboid fortzubewegen.² Falls neutrophile Granulozyten innerhalb von 6 bis 8 Stunden nach Eintritt in die Blutbahn keinen Kontakt mit Infektionserregern und/ oder Entzündungsherden haben, verlassen sie das Gefäßsystem und erfahren einen programmierten Zelltod (Apoptose) in dessen Verlauf sie durch Makrophagen in der Leber oder der Milz abgebaut werden. Neutrophile Granulozyten haben außerhalb des Knochenmarks eine Lebensdauer von bis zu 4 Tagen.

Eosinophile Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten ähneln den neutrophilen Granulozyten und stellen 2- 4% der Leukozytenpopulation. Sie besitzen im Unterschied gröbere und mit Eosin intensiv rot färbbare Granula, mit zumeist nur 2 Kernsegmenten und sind ca. 12- 15µm groß und somit etwas größer als die neutrophilen Granulozyten. Eos (altgriechisch) bedeutet Morgenröte. Eosinophile Granulozyten haben bei Vorhandensein von als Allergen wirkenden Fremdproteinen immunregulatorische Fähigkeiten, weswegen es physiologisch bei Allergien zu einer vermehrten Eosinophilie kommt. Sie sind ferner zur Abwehr von Parasiten und zum Fibrinabbau bei Fibrinbildung im Rahmen von Entzündungsprozessen befähigt. Ihre Funktionen erfüllen die eosinophilen Granulozyten im Gewebe und in entzündlichen Exsudaten durch Freisetzung des toxischen Inhalts ihrer Granula. Gleichzeitig werden Zytokine freigesetzt die andere eosinophile Granulozyten anlocken, so dass z.B. die Parasitenabwehr verstärkt wird. Eosinophile Granulozyten besitzen außerdem die Fähigkeit zur Phagozytose.¹

Basophile Granulozyten

Die basophilen Granulozyten sind 8 -11 μ m groß und somit etwas kleiner als eosinophile- und neutrophile Granulozyten. Bis zu 3% der Leukozyten im Blut sind basophile Granulozyten. Sie spielen eine Rolle bei der allergischen Soforttypreaktion, da sie an Ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für spezifisches Immunglobulin E besitzen und in ihrem Zellinnern Histamin, Heparin und das gefäßaktive Serotonin speichern, welche bei Aktivierung freigesetzt werden können. Bei Aktivierung der Basophilen kann es daher zu einer allergischen Soforttypreaktion bis zum anaphylaktischen Schock des Patienten kommen.¹

1.2.2 Lymphozyten

Lymphozyten (20-40%) werden in 3 funktional unterscheidbare Typen unterteilt:

- **B-Lymphozyten** (80%)
- **T-Lymphozyten** (20%)
- **NK-Zellen (natürliche Killerzellen)** (<1%)

Lymphozyten haben einen Durchmesser von etwa 8-12 μ m, wobei B- und T-Lymphozyten etwas kleiner als die NK-Zellen sind. Der Zellkern der Lymphozyten ist rund oder ovaloid mit scholliger Chromatinstruktur. Der Zytoplasmasaum ist meist schmal und zart blau (basophil). Lymphozyten sind immunkompetente Zellen. Sie unterstützen die Phagozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten) bei der Abwehr gegen Infektionen und körperfremde Stoffe durch Bereitstellung spezifischer Antikörper.

Lymphozyten werden dafür in Knochenmark, Thymus, Milz und Lymphknoten „geprägt“, das bedeutet, dass sie lernen welche Zellstrukturen als fremd anzusehen sind und welche nicht. Damit gehören die Lymphozyten zur spezifischen Immunantwort. Durch Zellteilung der im Knochenmark „geprägten“ B-Lymphozyten entstehen Plasmazellen mit einer Lebensdauer von wenigen Wochen, sowie Gedächtniszellen die mehrere Jahre bis lebenslang im Körper verweilen können.¹

1.2.3 Monozyten

Monozyten stellen 2-10% der Leukozytenpopulation dar, sind 20-40µm groß und ihr oftmals gelappter Kern zeigt eine feine, aber unruhige Chromatinstruktur. Ihr Zytoplasma ist blaugrau und erscheint durch winzige Granulationen unruhig. Mitunter können Vakuolen beobachtet werden. Die eine Hälfte der Monozyten zirkuliert, die andere gehört dem marginalen (gefäßwandständigen) Pool an. Sie spielen eine wichtige Rolle als phagozytierende Abwehrzellen und besitzen ebenfalls die Fähigkeit sich amöboid zu bewegen. Sie gehören ferner zu den antigenpräsentierenden Zellen und können inflammatorische Zytokine freisetzen. Im Gewebe werden sie nach immunologischer Stimulation zu Makrophagen.

Der wichtigste Speicherort der Monozyten ist die rote Milzpulpa, von der sie bei akuten Entzündungsprozessen in großer Zahl freigesetzt werden können.¹

1.3 Rote Blutkörperchen (Erythrozyten)

Erythrozyten sind der zelluläre Hauptbestandteil des Blutes mit ca. 96 % der Zellen. Ihre durchschnittliche Lebenszeit beträgt in etwa 120 Tage. Erythrozyten besitzen keinen Zellkern und kein Zytoskelett und sind somit leicht verformbar. Dies ermöglicht ihnen die Passage von Arteriolen und kleinsten Gefäßen. Gealterte Erythrozyten werden im retikuloendothelialen System, vorwiegend in der Milz, abgebaut, wobei ihre Zellbestandteile zum Teil der Erythropoese wieder zurückgeführt werden. Im Blutkreislauf eines gesunden Erwachsenen zirkulieren zwischen 24 bis 30 Billionen Erythrozyten ($24-30 \times 10^{12}$ Zellen). Im Rahmen der Erythropoese werden täglich rund ein Prozent der Erythrozyten ausgetauscht. Dies entspricht einer Bildungsrate von mehr als 3.000.000 Erythrozyten pro Sekunde. Der Entwicklungszyklus eines Erythrozyten dauert etwa 5-7 Tage.¹

1.4 Blutplättchen (Thrombozyten)

Thrombozyten sind diskusförmige 2-3,5µm große und 0,5-0,75µm dicke Blutbestandteile, die durch Abschnürung der Megakaryozyten des Knochenmarks entstehen. Das Blut eines Erwachsenen enthält etwa 150.000-350.000 Blutplättchen pro µl. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt in etwa 7–10 Tage. Ihr Abbau erfolgt in der Milz, Leber und Lunge. Thrombozyten sind kernlos und besitzen im Zytoplasma zwei unterschiedliche Zonen: Das zentrale Granulomer, das unter anderem aus verschiedenen Granulumentypen, Ribosomen und Glykogenbestandteilen besteht, sowie das granulumfreie, periphere Hyalomer.

Die Kernaufgabe der Thrombozyten ist die Bildung von Thromben im Rahmen der physiologischen Blutstillung. Thrombozyten werden dabei durch Adhäsion an eine subendotheliale Basalmembran oder Kollagen in einen aktivierten Zustand versetzt, bei dem es nach intrazellulärer Freisetzung von ADP zu einer Verformung und Aggregation der Zelle kommt. Schreitet dieser Prozess weiter fort, führt er zu einer Freisetzung von Mediatoren, die zu einer irreversiblen Aggregation und zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade führen.¹

1.5 Blutvolumen

Der menschliche Körper besteht zu etwa 41% aus festen Stoffen und zu 59% aus Flüssigkeiten. In den Gefäßen eines Erwachsenen zirkulieren zwischen 4,5 und 6 l Blut. Die Größe des Blutvolumens verändert sich auch kurzfristig je nach Flüssigkeits- und Salzaufnahme um bis zu 1,5 l. Der prozentuale Anteil der Blutzellen am gesamten Blutvolumen wird als Hämatokrit bezeichnet. Da die Erythrozyten den Hauptteil der zellulären Bestandteile ausmachen, ist der Hämatokritwert auch ein Beurteilungskriterium für die Blutmenge.

Bei Frauen liegt der Hämatokrit bei ca. 40 – 44%, bei Männern geringfügig höher (43 – 47%). Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede sind hauptsächlich hormonell bedingt.³

1.6 Serumelektrophorese

Unter Serumelektrophorese versteht man allgemein die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Im engeren Sinn bezeichnet man damit Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Relationen der verschiedenen Proteinfractionen in Körperflüssigkeiten. Für diese Auftrennung der Eiweiße wird bei der Elektrophorese Blutserum verwendet.

Je nach Wanderung im elektrischen Feld unterscheidet man die folgenden Fraktionen:

- **-Albumine** 55 - 70%
- **- α_1 - Globuline** 2 - 5% (α_1 -Antitrypsin, α_1 -Lipoprotein (HDL))
- **- α_2 -Globuline** 5 - 10% (Coeruloplasmin, Haptoglobin)
- **- β -Globuline** 10 - 15% (β -Lipoprotein, Transferrin,
beta-2-mikroglobin, Plasminogen)
- **- γ -Globuline** 12 - 20% (Immunglobuline)

Für die Beurteilung der Elektrophorese ist zu berücksichtigen, dass die Summe der detektierten Proteine immer 100% der Serumproteine darstellen. Verringert sich eine Fraktion, erscheinen die übrigen Fraktionen relativ vermehrt, obwohl sie absolut betrachtet unverändert sind.⁴

1.7 Hämatopoetische Stammzellapherese

Apheresegeräte zur selektiven Separation von Blutbestandteilen werden seit den sechziger Jahren angewendet. Der Begriff Apherese (von griechisch ἀφαιρεῖν) bedeutet „abtrennen“.

Die Zellseparation für medizinische Anwendungen erfolgte erstmalig 1934 mit einer Art „Leukozytenpaste“, welche durch Zentrifugation von Vollblut gewonnen wurde. Bei der Zentrifugation trennen sich die Granulozyten, Leukozyten und Thrombozyten von den

Erythrozyten und lagern sich als dünne Schicht über dem Erythrozytensediment an. Diese dünne Schicht wird als buffy coat bezeichnet.⁸ Bei der peripheren Blutstammzellapherese (PBSC-Apherese) hatte sie jedoch zunächst kaum eine Bedeutung, da die hämatopoetischen Vorläuferzellen (HVZ) kaum im peripheren Blut zirkulieren, sondern sich primär im Knochenmark befinden und so der peripheren Blutstammzellapherese (PBSC-Apherese) nicht zugänglich waren. Die periphere Blutstammzellapherese (PBSC-Apherese) mit ausreichender Zellseparation von hämatopoetischen Vorläuferzellen (HVZ) wurde erst durch die Entwicklung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF) möglich. G-CSF stimuliert nicht nur das Überleben und die Proliferation von Vorläuferzellen des Hämatopoetischen Systems, sondern es führt außerdem dazu, daß sich diese hämatopoetischen Vorläuferzellen von ihrer gewohnten Umgebung, dem Knochenmark, lösen und in das periphere Blut abwandern. Dies ermöglicht erst diese vornehmlich CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen in ausreichender Anzahl für eine Transplantation aus dem peripheren Blut zu gewinnen.

Dem Spender wird dabei über mehrere Tage vor der Apherese täglich G-CSF s.c. injiziert. Hierbei wird mit Dosen zwischen 5 bis 15µg/kg Spenderkörpergewicht gearbeitet. Mit diesem Verfahren können bis etwa 5×10^6 CD34+ Zellen pro kg Spenderkörpergewicht gewonnen werden, ohne den Spender den Risiken einer Knochenmarksbiopsie auszusetzen.^{5,6,7}

1.8 Charakterisierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen

Die hämatopoetischen Vorläuferzellen (HVZ) zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Ausdifferenzierung in verschiedene Blutzelllinien aus. Sie werden in erster Linie benötigt, wenn es nach Hochdosischemotherapie maligner Tumoren zu einer stark verzögerten oder ausbleibenden Blutbildung kommt. Je nachdem, ob die Stammzellen vom Patienten selbst oder von einem gesunden (HLA-identischen) Spender stammen, spricht man von der Gewinnung autologer oder allogener Stammzellen. Etwa 0,1% aller hämatopoetischen Vorläuferzellen (HVZ) des Körpers befinden sich im peripheren Blut. Identifiziert werden sie durch ihre Fähigkeit zur Bildung von in vitro Zellkolonien auf bestimmten Nährböden

(Colony Forming Units) oder neuerdings durch den Stammzellmarker CD34. Zwischen 0,03% bis maximal 0,15% der Leukozyten im peripheren Blut gesunder Individuen exprimieren diesen Marker auf ihrer Zelloberfläche.

Da die Expression von CD34 auf der Zelloberfläche von hämatopoetischen Vorläuferzellen während der Reifung abnimmt ist sie eher ein stadien- als ein linienspezifisches Differenzierungsantigen. Beim Erwachsenen sind 2–6% aller Knochenmarkszellen CD34+.⁹

Die hämatopoetischen Vorläuferzellen (HVZ) sehen morphologisch wie kleine bis mittelgroße Lymphozyten aus und sedimentieren bei Zentrifugation im Bereich der Lymphozyten und Monozyten. Bei der Stammzellapherese wird daher der Bereich der mononukleären Zellen, d.h. der Lympho- und Monozyten gewonnen. Da sich die mononukleären Zellen im Gegensatz zu Granulozyten vergleichsweise gut von den Erythrozyten im Schwerefeld trennen lassen, werden zur Stammzellapherese keine Sedimentationsbeschleuniger benötigt.

1.9 Hämapheresesystem Cobe Spectra

In unserer Klinik wird für die PBSC-Apherese das COBE Spectra Apheresesystem verwendet. Das COBE Spectra Apheresesystem der Firma Caridian BCT, Inc., Blood Component Technology ist ein automatisches Apherese-System. Das COBE Spectra System besteht aus Einwegteilen (vorbefestigter Trennkanal mit Blutschläuchen) und dem eigentlichen Separations-Apheresesystem. Bei der Apherese wird dem Spender bzw. dem Patienten über eine Armvene das Blut entnommen, dem Apherese-System zugeführt und nach Passage und Zellseparation der gewünschten Blutbestandteile über die kontralaterale Armvene wieder zurückgeführt. Das entnommene Blut wird durch ein geschlossenes, steriles Schlauchsystem geleitet, wobei eine geringe Menge Antikoagulans (Zitronensäure) zugesetzt wird, um die Gerinnung des Blutes im Apherese-System zu verhindern.

Die Zellseparation der gewünschten Blutbestandteile erfolgt dabei durch extrakorporale Zentrifugation, Filtration oder durch die Kombination beider Verfahren.

Auf der folgenden Abbildung 2 können wir ein in unserer Klinik verwendetes COBE Spectra Apheresesystem sehen.

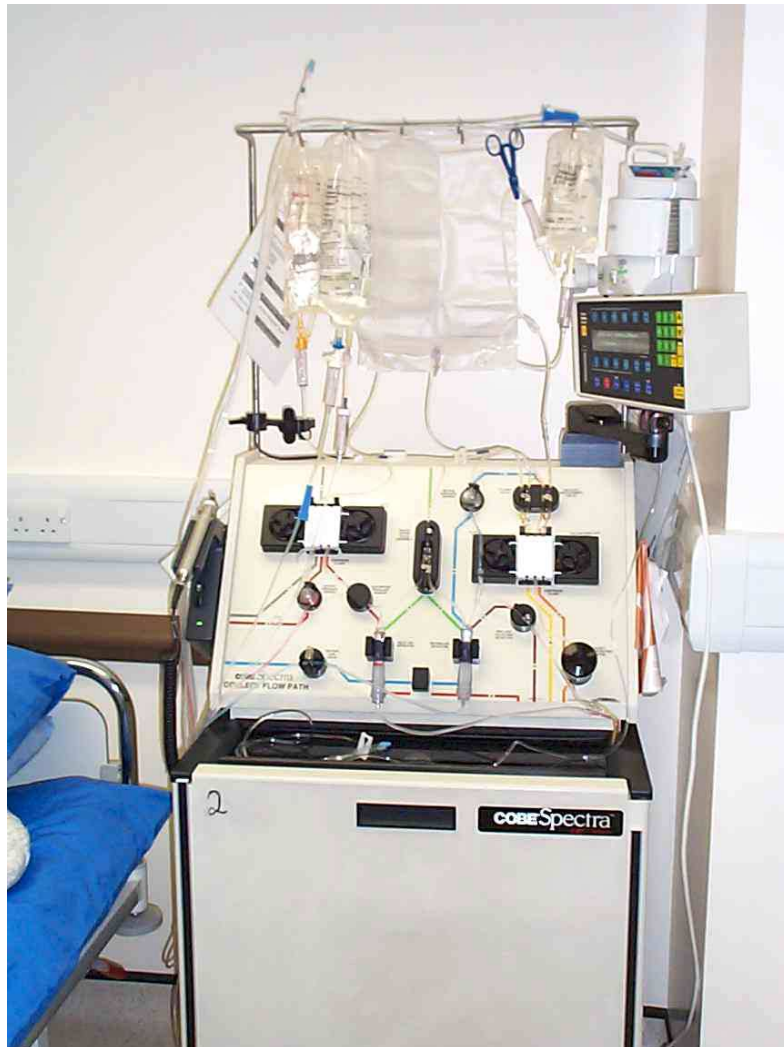


Abb.2: Apheresegerät Cobe Spectra

1.10 Granulozyten-Colonie stimulierender Faktor (G-CSF)

1.10.1 Morphologie, Funktion und Wirkungsweise von G-CSF

Burgess und Metcalf beschrieben 1980 erstmalig das humane G-CSF.¹⁰ Es ist ein Glykoprotein aus 204 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 19600 Dalton. Der

Genlocus befindet sich auf dem langen Arm von Chromosomen 17. Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und Stromazellen des Knochenmarkes haben die Fähigkeit G-CSF zu bilden. G-CSF Rezeptoren befinden sich auf reifen neutrophilen Granulozyten, Monozyten und deren Vorläuferzellen und haben eine wichtige Rolle in der Proliferation, Lebensdauer, Differenzierung und Funktion von neutrophilen Granulozyten und deren Vorläuferzellen. Der G-CSF Rezeptor besteht aus 812 Aminosäuren. G-CSF bindet an die extrazelluläre Domäne zweier Rezeptoren mit dem N-terminalen oder mit dem C-terminalen Ende. In der dadurch dimerisierten Form des Rezeptors werden die Signale über Phosphorylierung mittels aktivierter zellulärer Tyrosinkinasen weitergeleitet.¹¹

Lieschke et al.¹² zeigten, dass Mäuse mit fehlendem G-CSF eine persistierende Neutropenie mit Neutrophilenzahlen von etwa 30% der Norm haben. Diese Ergebnisse konnten die Wichtigkeit von G-CSF in der Entwicklung der neutrophilen Granulozyten unterstreichen. G-CSF steht in der Wirkung in enger Interaktion mit anderen Zytokinen insbesondere dem Interleukin 6, dessen Genlocus sich ebenfalls auf dem langen Arm vom Chromosom 17 befindet. G-CSF und Interleukin 6 stimulieren jeweils die Bildung des Anderen. Interleukin 6 ist ein wichtiges Zytokin in der Akuten Phase Reaktion und stimuliert die Bildung von Akute Phase Proteinen, wie z.B. die des CRP.^{13, 14}

1.10.2 Spezielle Wirkung von G-CSF

G-CSF stimuliert das Überleben sowie die Proliferation von Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems. Die Reifung der neutrophilen Granulozyten wird dabei extrem beschleunigt von 7 Tagen auf nur 1,5 Tage. Die Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems wandern sich unter G-CSF Stimulierung vermehrt in das periphere Blut. Bei der i.v. Gabe von G-CSF kommt es nach 5 bis 10 Minuten und nach der s.c. Injektion nach 30 bis 60 Minuten zu einem vorläufigen Abfall der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut, gefolgt von einem Anstieg auf das Mehrfache des Ausgangswertes. 12 Stunden nach der Injektion ist der Gipfel des Anstieges erreicht um nach 24 bis 48 Stunden wieder abzufallen. Bei wiederholten Dosen erreicht die Granulozytenzahl in der zweiten Behandlungswoche ein Plateau und beginnt dann langsam wieder zu sinken. Charakteristisch für den G-CSF-

abhängigen Anstieg ist eine Linksverschiebung der neutrophilen Granulozyten hin zu mehr stabkernigen Neutrophilen, sowie das Auftreten von Myelozyten, Promyelozyten und gelegentlich Myeloblasten im peripheren Blut.^{15, 16} G-CSF mobilisierte Granulozyten sind in ihrer Funktionsfähigkeit nicht eingeschränkt und zeigen eine unveränderte Halbwertszeit im peripheren Blut von etwa 8 Stunden.^{17,18}

1.10.3 Nebenwirkungen von G-CSF

Nebenwirkungen treten bei 70% der mit G-CSF behandelten Spendern bzw. Patienten auf und sind in der Regel eher Geringfügig, wie z.B. Knochenschmerzen, Myalgien, Arthralgien, Kopfschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit, Fieber und Hautrötungen. Die Schmerzen sind mit einfachen Analgetika gut zu behandeln. Schwerwiegende Nebenwirkungen wie Splenomegalie mit Milzruptur, eine neutrophile Dermatose wie Sweet's Syndrom, Pyoderma gangraenosum, leukozytoklastischen Vaskulitis, interstitielle Pneumonie und ARDS werden selten beobachtet.. Durch die gesteigerte Granulozytenaktivität kommt es zu einer reversiblen Erhöhung der Harnsäure, alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltransferase sowie der Laktatdehydrogenase.

2 Ziele der Arbeit

Die Anwendung von G-CSF führt nicht nur ausschließlich zur gewünschten Erhöhung der hämatopoetischen Vorläuferzellen, sondern ist auch mit zusätzlichen Veränderungen des Blutbildes verbunden, die in diesem Kontext als unerwünschte Nebenwirkungen bezeichnet werden könnten.

Das Ziel dieser retrospektiven Arbeit ist es, die blutbild- und laborchemischen Veränderungen, unter G-CSF Gabe, vor und nach der peripheren Blutstammzellapherese (PBSC-Apherese), sowie die Effektivität der G-CSF Stimulation und die anschließende Separation zu untersuchen.

3 Material und Methodik

Ausgewertet wurden retrospektiv die Daten von Spendern der peripheren Blutstammzellapherese (PBSC-Apherese) und im Vergleich dazu Daten von Knochenmarkspendern, die zwischen Januar und Dezember 2012 an der Universität Düsseldorf durchgeführt wurden. Die Daten wurden anhand der vorhandenen Krankenakten erfasst.

Alle Stammzellkonzentrate wurden im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf gewonnen. Die Daten der PBSC-Apherese-Spender und der Knochenmarkspender und der Stammzellkonzentrate (SZK) wurden anhand der Spenderakten und der Blutstammzellaphereseprotokolle erfasst.

3.1 Spender

Die Stammzellsubstrate wurden von 42 Spendern im Alter zwischen 22 und 57 Jahren gewonnen (6 Frauen und 36 Männer). Das Durchschnittsalter lag mit einer Standardabweichung von 8,31 Jahren bei 41,36 Jahren.

Die Knochenmarkspende erfolgte bei 14 Patienten im Alter zwischen 13 und 51 Jahren (4 Frauen und 10 Männer). Das Durchschnittsalter lag mit einer Standardabweichung von 11,28 bei 33,38 Jahren. Entsprechend den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten der Bundesärztekammer¹⁹ wurde jeder Spender durch Anwendung eines Fragebogens, einer persönlichen ärztlichen Befragung und Untersuchung vor jeder Spende für gesund und spendetauglich befundet. Vor der PBSC-Apherese erfolgte eine ausführliche Aufklärung über Wesen, Bedeutung, Durchführung, Nebenwirkung und Risiken des Verfahrens. Es war maximal eine vorausgegangene Separation in der Anamnese zulässig, welche mindestens vor 6 Monaten durchgeführt wurde. Die Voruntersuchung (VU) lag nicht länger als 5 Wochen vor der PBSC-Apherese zurück. Eingeschlossen wurden nur Spender mit einer Leukozytenzahl zwischen 3×10^9 Zellen/l - 13×10^9 Zellen/l vor medikamentöser Mobilisierung.

Weitere Spenderbedingungen vor der Apherese waren ein Hämoglobinwert $> 7,1$ mmol/l, eine Thrombozytenzahl $> 100 \times 10^9$ Zellen/l, ein Blutdruck systolisch zwischen 100 und 180 mmHg sowie diastolisch < 100 mmHg, einen Ruhepuls zwischen 50 und 110 Schlägen/min und eine Körpertemperatur $< 37,5^\circ\text{C}$. Der Spender musste weiterhin AB0- und Rhesus-kompatibel sein, sowie einen negatives „Leukozyten-Cross Match“ mit dem Empfänger vorweisen.

4 Tage hintereinander sowie am 5. Tag kurz vor der PBSC-Apherese erhielt jeder geeignete Spender $10 \mu\text{g/kg KG}$ G-CSF s.c. injiziert. Als Präparat wurde das Medikament Lenograstim (Granucyte34[®]) der Firma CHUGAI PHARMA verwendet, welches in immortalisierten Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters erzeugt wird und identisch zu endogenem G-CSF ist.²⁰

3.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 5 sowie mit Microsoft Excel.

Sie erfolgte durch die Berechnung der entsprechenden arithmetischen Mittelwerte, des Median und der Standardabweichung der einzelnen Werte.

Zur Beurteilung der Effektivitätsunterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen hinsichtlich Signifikanzen wurde der Student's T-Test angewendet.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 G-CSF assoziierte Veränderungen des Blutbildes

In Tabelle 1 sind jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Blutparameter der PBSC-Apherese Spender, sowie der Knochenmarkspender (KM Tx) aufgeführt.

Als Untersuchungszeitpunkte hatten wir bei den PBSC-Apherese Spendern und Knochenmarkspendern jeweils die Voruntersuchung (VU), sowie kurz vor der PBSC-Apherese (vor ZS) bzw. vor der Knochenmarkspende (vor KM Tx). Bei den PBSC-Apherese Spendern haben wir außerdem die Blut- und laborchemischen Parameter nach der PBSC-Apherese bestimmt (nach ZS).

Tabelle 1: Veränderungen des Blutbildes

	Apherese Spender			KM Spender	
	VU	vor ZS	nach ZS	VU	vor KM Tx
WBC ($\times 10^9/l$)	6,24 $\pm 1,38$	44,74 $\pm 13,35$	41,10 $\pm 10,72$	6,57 $\pm 2,33$	6,73 $\pm 1,53$
Lymph ($\times 10^9/l$)	1,91 $\pm 0,61$	3,70 $\pm 1,26$	2,27 $\pm 0,77$	1,87 $\pm 0,67$	1,73 $\pm 0,53$
Neu ($\times 10^9/l$)	3,58 $\pm 0,91$	38,15 $\pm 11,82$	36,37 $\pm 9,94$	3,87 $\pm 1,64$	4,29 $\pm 1,14$
Mono ($\times 10^9/l$)	0,51 $\pm 0,14$	2,02 $\pm 1,44$	1,80 $\pm 0,89$	0,53 $\pm 0,18$	0,51 $\pm 0,14$
Eos ($\times 10^9/l$)	0,17 $\pm 0,11$	0,59 $\pm 0,28$	0,49 $\pm 0,24$	0,23 $\pm 0,14$	0,16 $\pm 0,13$
Baso ($\times 10^9/l$)	0,07 $\pm 0,03$	0,28 $\pm 0,21$	0,20 $\pm 0,12$	0,07 $\pm 0,04$	0,06 $\pm 0,03$
RBC ($\times 10^{12}/l$)	5,12 $\pm 0,40$	4,88 $\pm 0,41$	4,73 $\pm 0,43$	5,05 $\pm 0,40$	4,98 $\pm 0,35$
HGB (g/dl)	14,81 $\pm 1,31$	14,15 $\pm 1,25$	13,73 $\pm 1,25$	14,78 $\pm 1,63$	14,40 $\pm 1,53$
HCT (%)	44,68 $\pm 3,70$	42,61 $\pm 3,56$	41,24 $\pm 3,62$	44,15 $\pm 4,50$	43,44 $\pm 3,95$
MCV (fL)	87,28 $\pm 3,69$	87,38 $\pm 3,57$	87,33 $\pm 3,51$	87,32 $\pm 4,18$	87,28 $\pm 4,32$
MCH (pg)	28,93 $\pm 1,55$	29,00 $\pm 1,60$	29,07 $\pm 1,64$	29,24 $\pm 2,06$	28,93 $\pm 2,05$
MCHC (g/dl)	33,15 $\pm 0,78$	33,19 $\pm 0,91$	33,28 $\pm 0,98$	33,49 $\pm 1,61$	33,11 $\pm 0,97$

Abkürzungen: Apherese Spender= PBSC-Apherese-Spender, KM Spender= Knochenmarkspender, WBC= Leukozyten, Lymph= Lymphozyten, Neu= neutrophile Granulozyten, Mono= Monozyten, Eos bzw. Baso= eosinophile bzw. basophile Granulozyten, RBC= Erythrozyten, HGB= Hämoglobin, HCT= Hämatokrit, MCV= mittleres korpuskuläres Volumen, MCH= mittleres korpuskuläres Hämoglobin und MCHC= mittlere korpuskuläre Hämoglobin Konzentration, g= Gramm, l= Liter, fL= Femtoliter, pg= Pikogramm, dl= Deziliter

Bei den PBSC-Apherese-Spendern kam es unter der G-CSF Mobilisierung bis kurz vor der PBSC-Apherese (vor ZS) zu folgenden Blutbildveränderungen:

Ein signifikanter Anstieg der gesamten Granulozytenpopulation, insbesondere der neutrophilen Granulozyten von $3,58 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 0,91) auf $38,15 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 11,82).

Die Lymphozytenpopulation stieg absolut betrachtet signifikant von $1,91 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 0,61) auf $3,7 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 1,26) an. Relativ betrachtet war jedoch ein signifikanter Abfall des Lymphozytenanteils von ursprünglich 30,4% auf 8,7% zu verzeichnen, welche bedingt ist durch einen sehr deutlichen Anstieg der neutrophilen Granulozyten.

Der Anstieg der Monozyten bei den PBSC-Apherese Spendern war ebenfalls signifikant. Hier stieg der Ausgangswert von $0,51 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 0,14) auf $2,02 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 1,44). Relativ betrachtet sank auch dieser Wert signifikant von 8,2% auf 4,5%.

Dadurch kam es zu einem signifikanten Gesamtanstieg der WBC von ursprünglich $6,24 \times 10^9$ Zellen /l (SD +/- 1,38) auf $44,74 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 13,35).

Die roten Blutkörperchen hingegen sanken signifikant ab von $5,12 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 0,40) auf $4,88 \times 10^9$ Zellen/l (SD +/- 0,41), wie auch das Hämoglobin von 14,81 g/dl (SD +/- 1,31) auf 14,15 g/dl (SD +/- 1,25) und das Hämatokrit von 44,68% (SD +/- 3,70) auf 42,61% (SD +/- 3,56).

Nach der PBSC-Apherese kam es zu einem signifikanten Abfall der WBC Zahl von $44,74 \times 10^9$ Zellen /l (SD +/- 13,35) auf $41,10 \times 10^9$ Zellen /l (SD +/- 10,72).

Bei der Kontrollgruppe der Knochenmarkspender, die keine Vorbehandlung bekamen, waren weder bei den weißen Blutkörperchen, noch bei den roten Blutkörperchen signifikante Veränderungen der Blutparameter bei der Voruntersuchung (VU), sowie kurz vor der Knochenmarkspende (vor KM Tx) zu erkennen.

4.2 G-CSF assoziierte Veränderungen der Harnsäure

Die Harnsäure wurde bei 32 PBSC-Apherese-Spendern zum Zeitpunkt der Voruntersuchung (VU) sowie nach der PBSC-Apherese (nach ZS) erfasst.

Hierbei kam es zu einem signifikanten Anstieg der Harnsäure von 5,49mg/dl (SD +/-1,19) auf 6,44mg/dl (SD +/-1,26), wie in der folgenden Abb. 3 dargestellt.

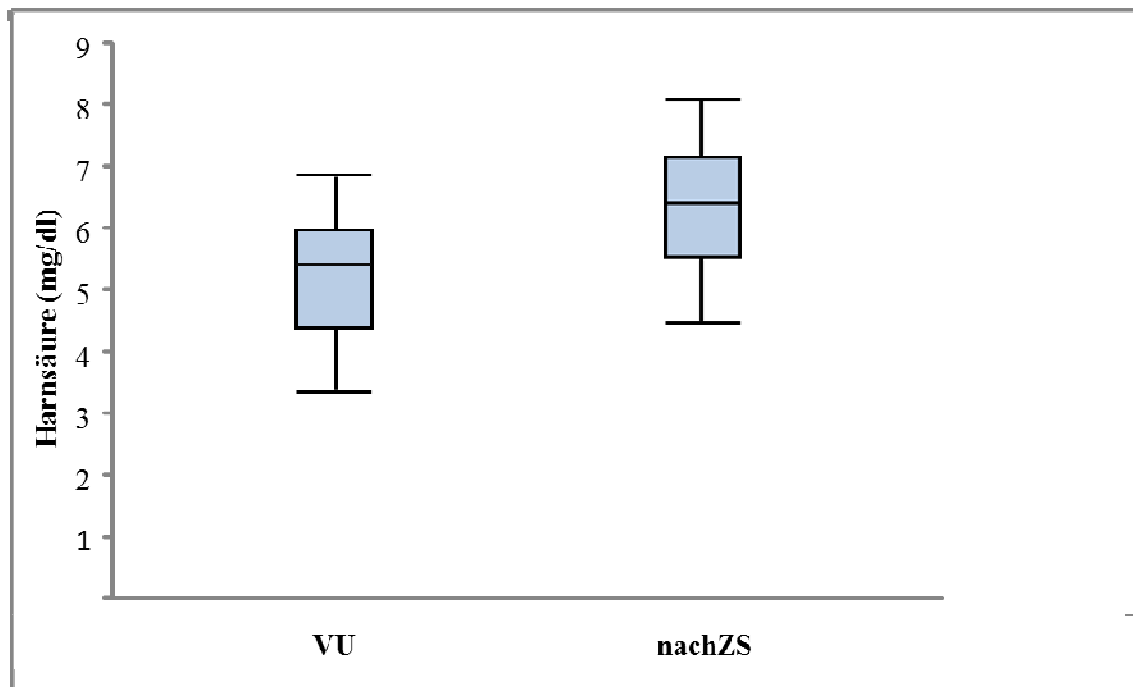


Abb.3: G-CSF assoziierte Veränderungen der Harnsäure

Der Boxplot stellt den Median (schwarzer Balken), das 25%-75%-Intervall (grauer Kasten), sowie das 5%-95%-Intervall (T-Striche) dar. Die Harnsäurewerte wurden von 32 PBSC-Apherese Spendern ermittelt. VU= Voruntersuchungstermin, nach ZS= nach der PBSC-Apherese, mg= Milligramm, dl=Deziliter

4.3 G-CSF assoziierte Veränderungen des CRP

Das C-Reaktive Protein (CRP) wurde bei 14 Apherese Spendern am Voruntersuchungstermin (VU) sowie nach der G-CSF Stimulation am Tag der PBSC-Apherese (nach ZS) untersucht.

Auch hier konnte unter G-CSF Mobilisierung eine signifikante Steigerung des CRP von ursprünglich $<0,3\text{mg/dl}$ auf $1,3\text{mg/dl}$ (SD $\pm 0,94$) beobachtet werden.

Die CRP Steigerung wurde in Abb.4 mit einem Vierfelderdiagramm veranschaulicht, wobei CRP-Werte $<0,3\text{mg/dl}$ als negativ und CRP-Werte $>0,3\text{mg/dl}$ als positiv angesehen wurden.

	VU	nach ZS
Positiv (CRP $>0,3\text{mg/ml}$)	0	13
Negativ (CRP $<0,3\text{mg/ml}$)	14	1

Abb.4 G-CSF assoziierte Veränderungen des CRP

Insg. wurden die CRP Werte von 14 Patienten bestimmt. VU = Voruntersuchungstermin, nach ZS = nach der PBSC-Apherese, CRP= C-Reaktives Protein, mg= Milligramm, ml= Milliliter

4.4 G-CSF assoziierte Veränderungen der Thrombozyten

Unter der G-CSF Mobilisierung konnte eine signifikante Abnahme der Anzahl der Blutplättchen (PLT) sowie deren durchschnittlichem Volumen (MPV) im peripheren Blut beobachtet werden, wie in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: G-CSF assoziierte Veränderungen der Thrombozyten

	VU	vor ZS	nach ZS	SZK
PLT($\times 10^9$)	240,48 \pm 43,37	217,69 \pm 41,57	134,17 \pm 39,00	1992,57 \pm 744,48
MPV(fl)	8,48 \pm 1,15	7,95 \pm 1,03	7,07 \pm 1,06	9,51 \pm 1,50

PLT= Anzahl der Blutplättchen, MPV= Plättchenvolumen, VU= Voruntersuchungstermin, fl= Femtoliter, vor ZS= nach der Mobilisierung mit G-CSF, nach ZS= nach der PBSC-Apherese, SZK= Stammzellkonzentrate

Ein weiterer signifikanter Abfall des PLT und MPV im peripheren Blut folgte nach der PBSC-Apherese.

In den Stammzellkonzentraten selber war das MPV nach der PBSC-Apherese im Durchschnitt deutlich erhöht auf 9,51fl (SD \pm 1,50), wo hingegen im peripheren Blut selber nach der PBSC-Apherese nur ein MPV von 7,07fl (SD \pm 1,06) bestand.

Die Verteilung der Thrombozytenvolumen in der Voruntersuchung, nach der Mobilisierung, vor der PBSC-Apherese sowie in den Stammzellkonzentraten(SZK) kann man in Abb.5 ansehen in dem für das MPV jeweils 3 Gruppen gebildet wurden.

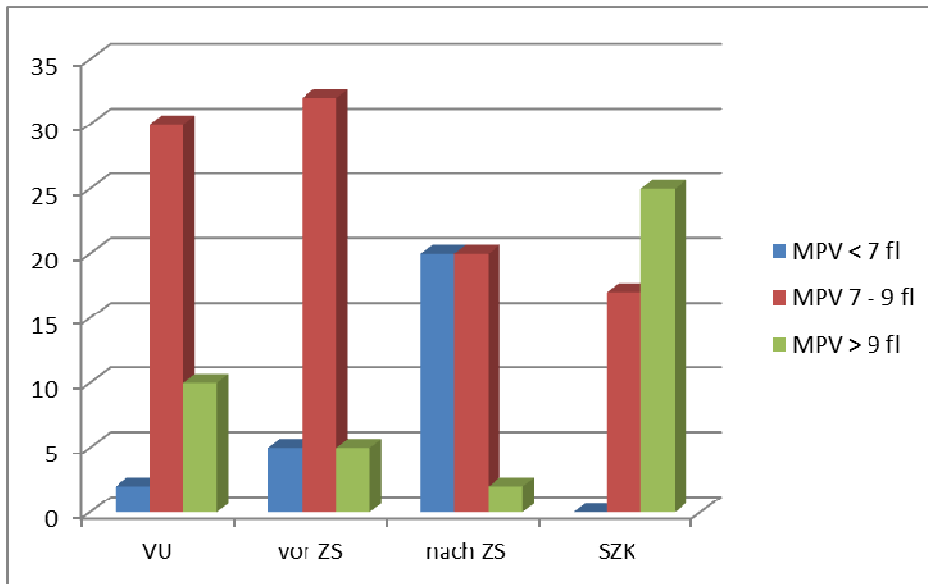


Abb.5: Verteilung der Thrombozytenvolumen

Blaue Säule : Anzahl der Spender bzw. Produkte MPV < 7fl

Rote Säule : Anzahl der Spender bzw. Produkte MPV 7 - 9fl

Grüne Säule : Anzahl der Spender bzw. Produkte MPV > 9fl

Im 1.Säulendiagramm Verteilung der MPV bei der Voruntersuchung (VU)

Im 2.Säulendiagramm Verteilung der MPV vor der PBSC-Apherese (vor ZS)

Im 3. Säulendiagramm Verteilung der MPV nach der PBSC-Apherese (nach ZS)

Im 4. Säulendiagramm Verteilung der MPV im Stammzellkonzentrat (SZK)

MPV= mittleres Plättchenvolumen, fl= Femtoliter

Im peripheren Blut kam es nach der PBSC-Apherese unter Berücksichtigung des geschätzten Blutvolumens zu einer Thrombozytenabnahme von im Durchschnitt $453,35 \times 10^9$ Thrombozyten je Spender. In den Stammzellkonzentraten waren im Durchschnitt jedoch nur $338,79 \times 10^9$ Thrombozyten nachweisbar. Nach der PBSC-Apherese haben wir also in den Stammzellkonzentraten im Durchschnitt 115×10^9 Thrombozyten weniger als erwartet.

In der Kontrollgruppe der KM Spender konnte keine signifikante Veränderung der PLT sowie der MPV von der VU bis zur KM Spende festgestellt werden, wie in der Tabelle 3 zu erkennen ist.

Tabelle 3: PLT und MPV der Knochenmarkspender

	VU	vor KM TX
PLT($10^9/l$)	243,53 \pm 48,80	242,08 \pm 40,18
MPV(fl)	8,59 \pm 0,86	8,38 \pm 0,85

PLT= Anzahl der Blutplättchen, MPV= Volumen der Blutplättchen, fl= Femtoliter
 VU= Voruntersuchungstermin, vor KM TX= vor der Knochenmarkspende, l= Liter

4.5 G-CSF assoziierte Veränderungen der Serumelektrophorese

In der folgenden Tabelle 4 sind die Veränderungen der Serumelektrophorese bei insgesamt 13 Apherese Spendern aufgeführt.

Die Laborparameter wurden in der Voruntersuchung(VU), sowie kurz nach der PBSC-Apherese (nach ZS) ermittelt.

Tabelle 4: G-CSF assoziierte Veränderungen der Serumelektrophorese

	VU	nach ZS
ges.Eiweiß g/dl	7,11 \pm 0,28	7,06 \pm 0,39
Albumin %	60,2 \pm 2,64	59,3 \pm 2,52
g/dl	4,42 \pm 0,17	4,22 \pm 0,15
A1 Globulin %	3,66 \pm 0,38	4,75 \pm 0,56
g/dl	0,27 \pm 0,05	0,32 \pm 0,04
A2 Globulin %	9,01 \pm 0,69	9,81 \pm 1,19
g/dl	0,65 \pm 0,07	0,69 \pm 0,10
Beta Globulin %	11,16 \pm 1,46	11,61 \pm 1,54
g/dl	0,80 \pm 0,13	0,82 \pm 0,14
Gamma Globulin %	14,18 \pm 2,59	14,01 \pm 2,76
g/dl	0,99 \pm 0,21	1,00 \pm 0,23

VU= Voruntersuchung, nach ZS = nach der PBSC-Apherese, g= Gramm, dl= Deziliter

Unter der G-CSF Mobilisation konnte ein signifikanter Anstieg des $\alpha 1$ Globulinanteils von 3,66% (SD +/-0,38) auf 4,75%(SD +/-0,56) bzw. 0,27 g/dl (SD +/-0,05) auf 0,32 g/dl (SD +/-0,04), sowie des $\alpha 2$ Globulinanteils von 9,01% (SD +/-0,69) auf 9,81% (SD +/-1,19) bzw. 0,65 g/dl (SD +/-0,07) auf 0,69 g/dl (SD +/-0,10) festgestellt werden. Ebenfalls signifikant war der Abfall der Albuminfraktion von 60,2% (SD +/-2,64) auf 59,3% (SD +/-2,52) bzw. 4,42 g/dl (SD +/-0,17) auf 4,22 g/dl (SD +/-0,15).

Die ges. Eiweißkonzentration, sowie die Beta-und die Gamma- Globuline waren nicht signifikant verändert.

4.6 G-CSF assoziierte Veränderungen der CD 34+ Zellen

Unter G-CSF Stimulation kam es zu einer signifikanten Zunahme der CD34+ Zellen im peripheren Blut auf etwa das 36-fache der Norm.

Dies ermöglichte im Durchschnitt eine erfolgreiche Separation von 1790,4 CD34+ Stammzellen pro μ l Stammzellkonzentrat, wie in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: G-CSF assoziierte Veränderungen der CD 34+ Zellen

	VU	vor ZS	SZK
CD 34+ Zellen /ul	2,65 \pm 1,36	96,54 \pm50,73	1790,4 \pm907,8

VU= Voruntersuchung, vor ZS= nach der Mobilisierung mit G-CSF, SZK= Stammzellkonzentrate

Bei im Durchschnitt 332 ml je SZK ergibt das im Durchschnitt $5,9 \times 10^8$ CD34+ Zellen pro Spende.

Die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut sank unter Berücksichtigung des geschätzten Blutvolumens im Durchschnitt pro Spender absolut um 20846×10^6 Zellen, wohingegen in den Stammzellsubstraten selber im Durchschnitt 63510×10^6 Leukozyten separiert wurden.

Dies bedeutet, dass insgesamt mehr Leukozyten separiert wurden, als der Abfall der Leukozyten im peripheren Blut rechnerisch vermuten ließe.

4.7 Korrelation Leukozytenzahl nach der Mobilisierung und Separationseffektivität von WBC

Eine höhere Leukozytenzahl vor der PBSC-Apherese führte zu einer signifikant erniedrigten Zellseparationseffektivität von Leukozyten, wie in Abb.6 zu erkennen ist.

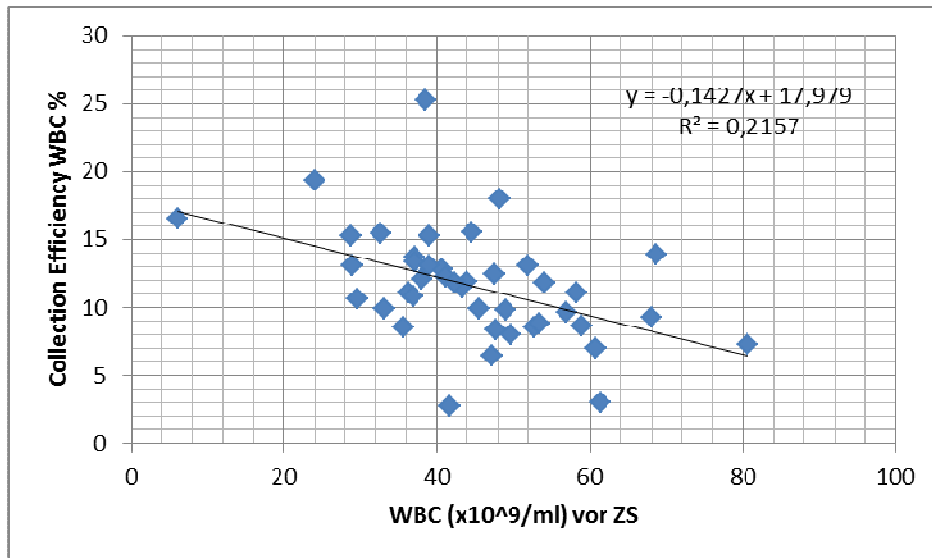


Abb.6: Korrelation WBC vor ZS und Separationseffektivität von WBC
WBC= Leukozyten, vor ZS= nach der Mobilisierung mit G-CSF, ml= Milliliter
Collection Efficiency = Separationseffektivität

4.8 Korrelation Leukozytenzahl nach der Mobilisierung und Separationseffektivität von CD34+ Zellen

Bei steigender Leukozytenzahl vor der PBSC-Apherese nimmt die Separationseffektivität von CD34+ Zellen signifikant ab, siehe dazu Abb. 7.

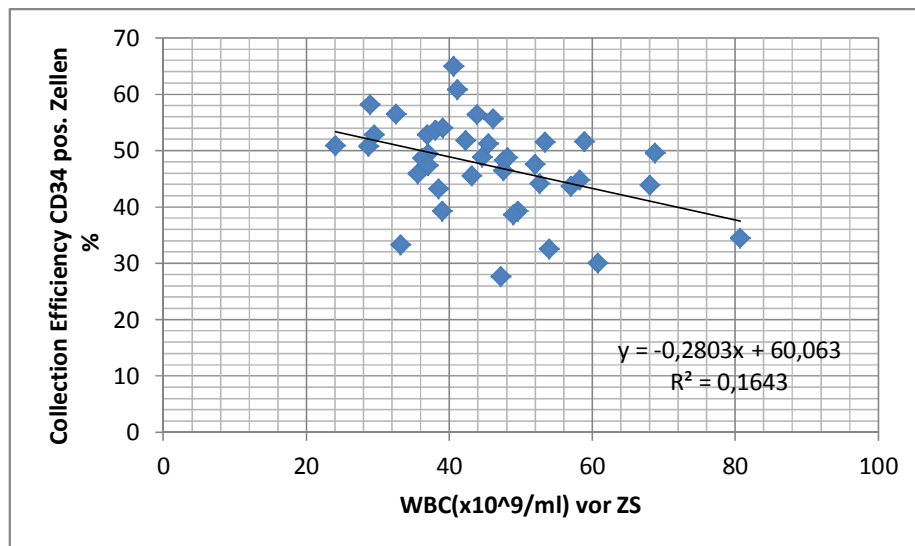


Abb.7: Korrelation WBC vor ZS und Separationseffektivität von CD34+ Zellen
WBC=Leukozyten, vor ZS = nach der Mobilisierung mit G-CSF, ml= Milliliter,
Collection Efficiency= Separationseffektivität,

Um dies eingehender zu untersuchen wurden die Spender in 2 Gruppen unterteilt.

In die 1. Gruppe kamen die Spender die eine Separationseffektivität für CD34+ Zellen (CE) <45% vorwiesen, in die 2. Gruppe kamen die Spender mit einer CE von >45%.

Wir konnten feststellen, dass die 1. Gruppe mit einer CE < 45% eine signifikant höhere Anzahl an WBC vor ZS hatte als die 2. Gruppe mit einer CE >45%. Dies bedeutet, dass ein höherer Leukozytenausgangswert vor ZS zu einer geringeren CE von CD 34+ Zellen führte, s. Abb.8.

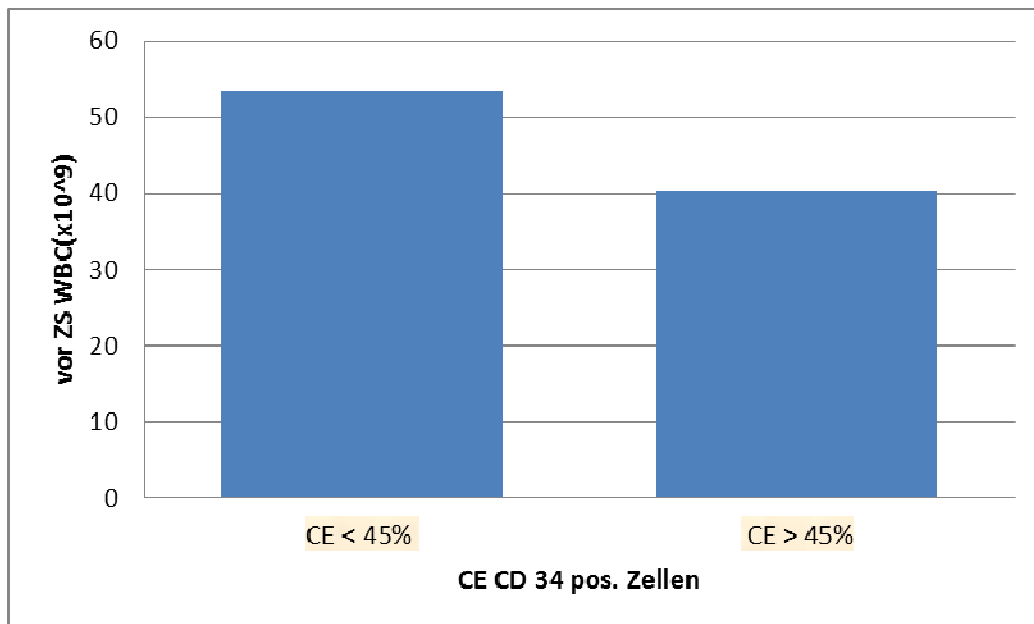


Abb.8: Abhängigkeit WBC vor ZS und CE CD 34+ Zellen

14 Spender haben einen CE <45% und Median eine WBC vor ZS von $53,54 \times 10^9$ Zellen, 27 Spender haben einen CE >45% und Median eine WBC vor ZS von $40,29 \times 10^9$ Zellen, CE= Separationseffektivität, WBC= Leukozyten

4.9 Korrelation Leukozytenzahl nach der Mobilisierung und Anzahl von gesammelten CD34+ Zellen in den Stammzellkonzentraten

Eine hohe Anzahl von Leukozyten (WBC) nach der Mobilisierung (vor ZS) korrelierte signifikant mit einem besseren Separationsergebnis von CD34+ Zellen während der gesamten Apheresedauer, wie in Abb.9 zu erkennen ist.

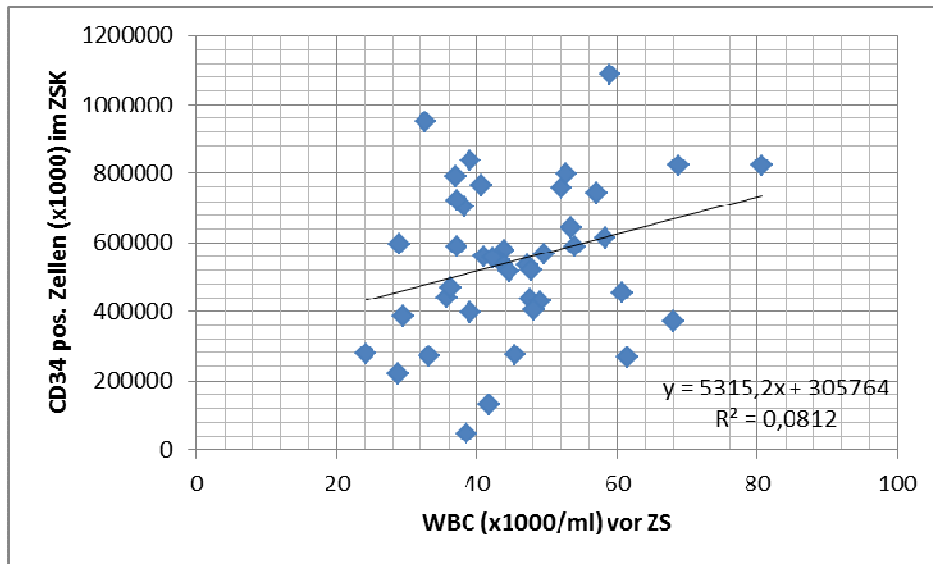


Abb.9: Korrelation WBC vor ZS und Anzahl CD34+ Zellen in den SZK
 SZK= Stammzellkonzentrate, vor ZS= nach der Mobilisierung mit G-CSF,
 WBC=Leukozyten, ml= Milliliter

4.10 Korrelation der Separationseffektivität von CD34+ Zellen und dem Abfall der Leukozytenzahl nach der Apherese

Die Separationseffektivität von CD34+ Zellen zeigt keine signifikante Korrelation mit dem Abfall der Leukozyten während der PBSC-Apherese, wie in Abb. 10 dargestellt.

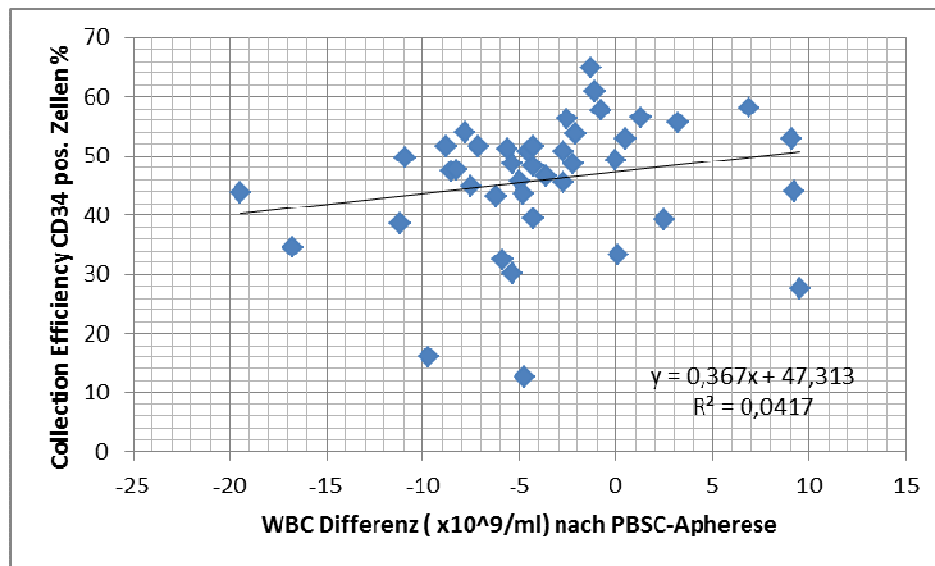


Abb.10: Korrelation CE CD34+ Zellen und WBC Abfall nach der Apherese
Collection Efficiency = Separationseffektivität, WBC= Leukozyten, ml= Milliliter
PBSC-Apherese= periphäre Stammzellapherese

4.11 Abhängigkeit zwischen “Knochenmarkdynamik“ und Separationseffektivität von CD34+ Zellen

Spender reagieren auf die PBSC-Apherese von Leukozyten im peripheren Blut sehr unterschiedlich. Es gibt Spender die keinen wesentlichen Rückgang der Leukozyten im peripheren Blut vorweisen und es gibt Spender die mit einem wesentlichen Rückgang der Leukozyten reagieren. Da die Leukozyten hauptsächlich ihren Reservepool im Knochenmark besitzen, scheint eine gewisse “Knochenmarkdynamik“ zu bestehen. Spender mit einer guten “Knochenmarkdynamik“, also Spender, die die Leukozytenverluste im peripheren Blut durch die PBSC-Apherese gut durch das Ausschwemmen von Leukozyten aus dem Knochenmark kompensieren, haben im Gegensatz zu den Patienten die kaum dynamisch auf die Leukozytenverluste während der PBSC-Apherese reagieren, keinen signifikanten Vorteil bei der Separationseffektivität von CD 34+ Zellen, wie in Abb. 11 zu erkennen.

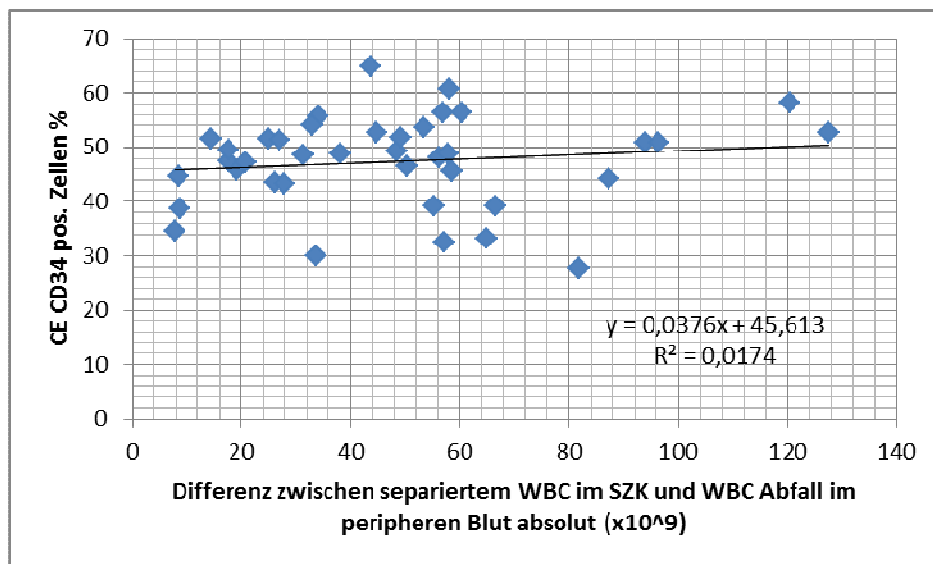


Abb.11: Abhängigkeit “Knochenmarkdynamik“ und CE CD34+ Zellen
 CE= Separationseffektivität, WBC= Leukozyten, SZK= Stammzellkonzentrat

4.12 Korrelation Abfall der Thrombozytenzahl nach der Apherese und Separationseffektivität von CD34+ Zellen

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Abfall der Thrombozyten nach der PBSC-Apherese und der Zellseparationseffektivität von CD34+ Zellen konnte festgestellt werden, s. Abb. 12.

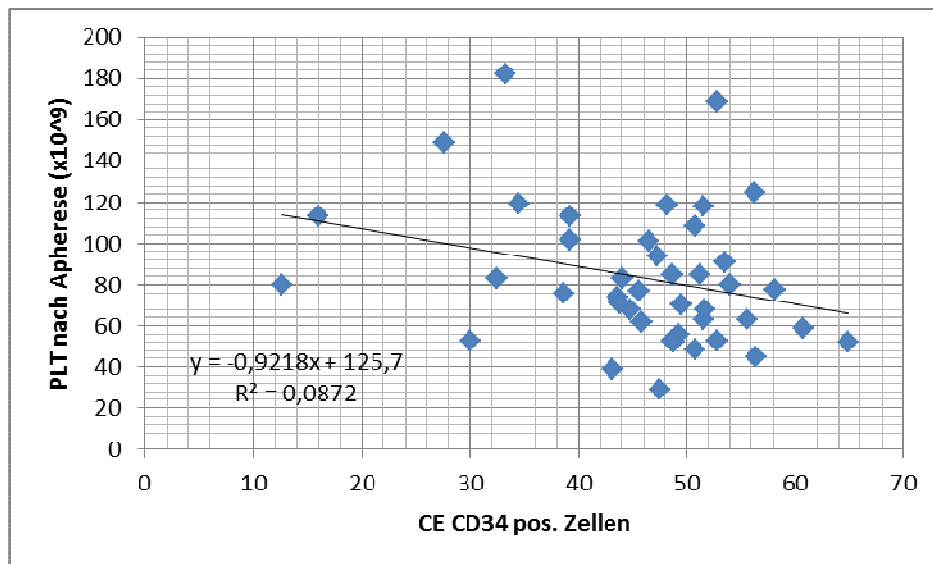


Abb.12: Korrelation PLT nach der Apherese und CE CD34+ Zellen
PLT = Thrombozytenzahl, CE = Separationseffektivität

4.13 Korrelation Leukozytenzahl und Harnsäure nach Mobilisation mit G-CSF

Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen Zunahme der Leukozytenzahl und der Harnsäure nach Mobilisierung mit G-CSF Stimulation, wie in Abb. 13 aufgeführt.

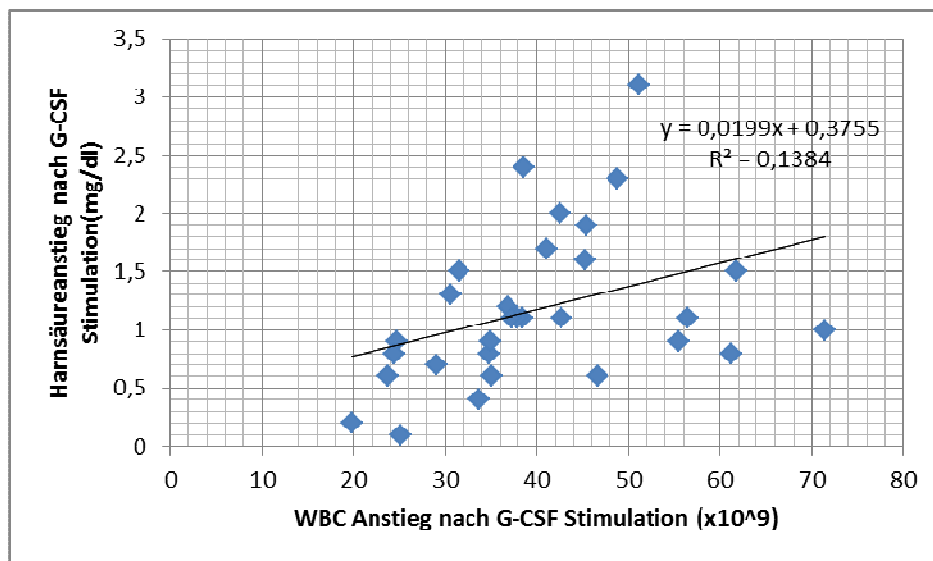


Abb.13: Korrelation WBC und Harnsäure nach Mobilisation mit G-CSF
WBC= Leukozyten, mg= Milligramm, dl= Deziliter

4.14 Korrelation Leukozytenzahl und CRP nach Mobilisation mit G-CSF

Eine signifikante Korrelation zwischen WBC Anstieg nach der Mobilisierung und CRP Anstieg nach der Mobilisierung konnte nachgewiesen werden, s. Abb. 14.

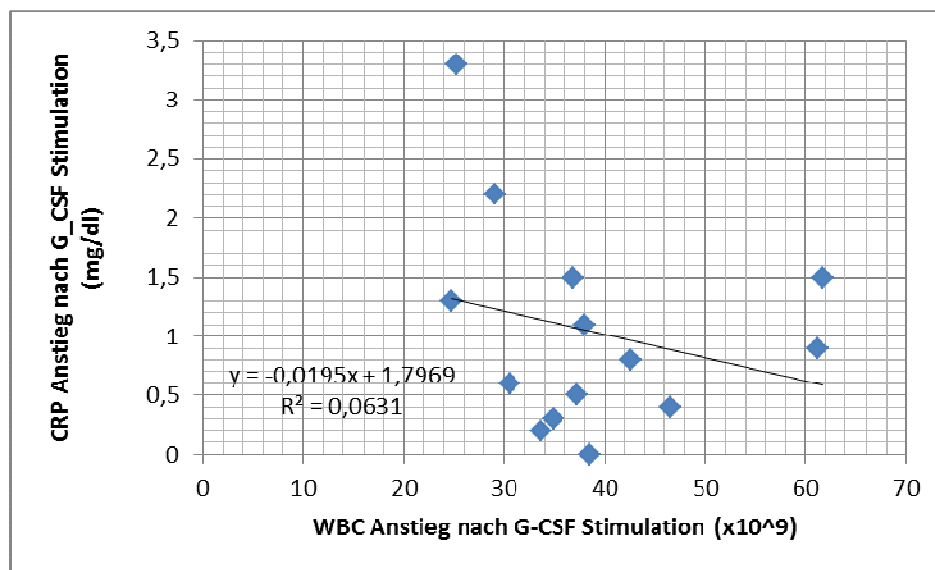


Abb.14: Korrelation WBC und CRP nach Mobilisation mit G-CSF
CRP = C-Reaktives Protein, WBC = Leukozyten

5 Diskussion

In unseren Untersuchungen haben wir die Blutbild- und laborchemischen Veränderungen, die unter G-CSF Mobilisierung bei der peripheren Blutstammzellapherese (PBSC-Apherese) auftreten können und die Effektivität der G-CSF-Stimulation sowie der anschließenden Separation untersucht. Wir analysierten dafür 42 PBSC-Apherese-Spender (6 Frauen, 36 Männer), sowie als Kontrollgruppe 14 Knochenmarkspender (4 Frauen und 10 Männer), welche sich von Januar bis Dezember 2012 einer Stammzellspende unterzogen.

Die PBSC-Apherese Spender erhielten zur Mobilisierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen das G-CSF Lenograstim. Lenograstim ist ein O-glykosyliertes Protein. Es gibt auch nicht O-glykolisierte hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie z.B. das Filgrastim, sowie dessen Nachfolgepräparat das PEGylierte PEGfilgrastim, wobei keine wesentlichen Unterschiede bei der klinischen Wirksamkeit zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem Protein bestehen.

Das O-glykolisierte Lenograstim zeigt eine größere Stabilität gegenüber Polymerisation und Denaturierung auf, als das nicht glykolisierte Filgrastim, weswegen es eine geringfügig höhere Kapazität zur Wachstumsstimulation hat.²¹

Das Mobilisationsergebnis unter G-CSF ist sehr Dosisabhängig, wobei üblicherweise Dosen von 5-15µg/kg KG s.c. appliziert werden.

Die Mobilisierung erfolgte bei unseren PBSC-Apherese-Spendern mit 10µg/kg KG Lenograstim s.c. über 5 Tage. Dieses Mobilisierungsregime wird in anderen Fachliteraturquellen als pharmakologisch sehr effektiv angesehen, so dass wir von einer optimalen Stimulierung der Vorläuferzellen bei unseren PBSC-Apherese-Spendern ausgehen.

Das Mobilisierungsschema wurde von allen Spendern sehr gut toleriert und es traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf.

Unter der Mobilisierung mit G-CSF nach dem o.g. Schema kam es zu einem deutlichen Anstieg der Leukozyten bei allen Spendern, insbesondere der neutrophilen Granulozyten. Der WBC stieg von $6,24 \times 10^9$ Zellen/l auf $44,74 \times 10^9$ Zellen/l. Die neutrophilen Granulozyten stiegen von $3,58 \times 10^9$ Zellen/l auf $38,15 \times 10^9$ Zellen/l, welches eine Steigerung um das knapp 11-fache des Ausgangswertes bedeutet. Dieser massive Anstieg hatte einen relativen Abfall der Lymphozyten von 30,6% auf 8,3%, sowie der der Monozyten von 8,2% auf 4,5% zur Folge, obwohl absolut betrachtet die Lymphozytenanzahl sich verdoppelte und der Monozytenanteil sich sogar vervierfachte (s. Tabelle 1)

Der Anteil der hämatopoetischen Vorläuferzellen im peripheren Blut stieg von 2,64 CD34+ Zellen pro μl Blut auf 96,54 CD34+ Zellen pro μl Blut. Im gewonnenen Zellsubstrat selber befanden sich 1790,4 CD34+ Zellen pro μl . Bei einem durchschnittlichen Zellsubstrat von 321ml ergeben sich somit $5,7 \times 10^8$ CD34+ Zellen pro Stammzellkonzentrat bei insgesamt $6,3 \times 10^{10}$ Zellen pro PBSC-Apherese (s. Tabelle 5).

Von anderen Autoren publizierte Untersuchungen zeigten Separationsergebnisse mit Werten von bis zu 4,1 bis $6,8 \times 10^{10}$ Zellen pro Leukapherese. Dabei erfolgte die Mobilisierung ebenfalls mit G-CSF 5 bis 10 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$.^{24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32}

Durch die Mobilisierung mit G-CSF konnten somit aus dem peripheren Blut ausreichend CD34+ hämatopoetische Vorläuferzellen für eine Stammzelltransplantation gewonnen werden.

Die absolute Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut bei geschätztem Blutvolumen sank nach der PBSC-Apherese im Durchschnitt pro Spender um $2,0 \times 10^{10}$ Zellen, wo hingegen im Zellsubstrat im Durchschnitt $6,3 \times 10^{10}$ Leukozyten separiert wurden.

Dies bedeutet, dass insgesamt mehr Leukozyten separiert wurden, als der Abfall der

Leukozyten im peripheren Blut rechnerisch vermuten ließe. Es gibt also Reservemechanismen des Körpers um verlorenen Leukozyten auszugleichen in dem es weitere Leukozyten in das zirkulierende, periphere Gefäßsystem ausschwemmt.

Bekannt sind dabei 3 folgende Reservemechanismen:

Die „mitotische Reserve“, welche durch eine Zunahme der Geschwindigkeit der Zellzyklen bei vermehrtem Umsatz in der Myelopoese gekennzeichnet ist.

Die „postmitotische Reserve“, welche durch im Knochenmark befindliche, ausgereifte Granulozyten auf Abruf basiert.

Der sog. „marginale Zellpool“, welche durch wandständige Granulozyten besteht, die bei Bedarf in den sog. „zirkulierenden Zellpool“ übertreten können. Die Hälfte der peripheren Granulozyten befindet sich in diesem „marginalen Zellpool“.

Zu berücksichtigen ist, dass der Wert für Leukozyten ausschließlich aus dem „zirkulierenden Pool“ bestimmt wird.

Die Leukozytenwerte während der Apherese zeigten jedoch sehr unterschiedliche Dynamiken. Bei einigen Patienten sanken diese ab und bei anderen Patienten stiegen diese wiederum weiter an. Wir führten diese unterschiedliche Dynamik in der Reserve v.a. auf das im Knochenmark befindliche „postmitotische Reservepool“ zurück, da die „mitotische Reserve“ durch die G-CSF Stimulation angereizt ist, und der „marginale Zellpool“ nur bestimmte Kapazitätsgrenzen aufweist, welche diese große Spannbreite der Ergebnisse nicht erklären kann.^{33,34}

Diese „Knochenmarkdynamik“ scheint bei jedem Spender unterschiedlich zu reagieren. Dies würde auch erklären warum eine hohe Separationseffektivität bei den Spendern nicht automatisch auch zu einem hohen WBC Abfall nach der Apherese führt. (s. Abb.10)

Um dies differenzierter zu untersuchen haben wir die PBSC-Apherese-Spender in 2 Gruppen unterteilt. Die 1. Gruppe (10 Spender) stieg mit der Anzahl der WBC nach der Apherese, die 2. Gruppe (32 Spender) hingegen zeigte einen WBC Rückgang nach der Apherese. Die Separationseffektivität für CD34+ Zellen betrug in der 1. Gruppe 47% und in der 2. Gruppe 46%. Ein Zusammenhang zwischen dem Abfall oder Anstieg der WBC nach der PBSC-Apherese (nach ZS) und der Zellseparationseffektivität konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Die Knochenmarkdynamik kann man in etwa abschätzen, indem man den WBC Abfall bzw. Zunahme nach der Apherese mit den gesammelten WBC im Stammzellsubstrat vergleicht.

Um eine mögliche Korrelation zwischen Separationseffektivität für CD34+ Zellen und der vermuteten „Knochenmarkdynamik“ zu untersuchen haben wir diese Parameter verglichen und sahen dabei keine signifikante Korrelation zwischen Separationseffektivität für CD34+ Zellen und der „Knochenmarkdynamik“. (s. Abb.11)

Diese vermutete „Knochenmarkdynamik“ kann man auch mit folgendem Ansatz bestimmen.

Die Thrombozyten wie auch die Leukozyten werden von dem Apheresesystem separiert. Die Thrombozytenzahl zeigt dabei bei sämtlichen Patienten einen Abfall, obwohl auch hier ein Reservepool in der Milz besteht, der der Zellseparation in etwa entspricht. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei den Thrombozyten nicht die Möglichkeit besteht aus der Milz so schnellen Nachschub zu generieren, wie die Leukozyten aus dem Knochenmark anscheinend der Fall ist. Um die Knochenmarkdynamik der Spender zu beurteilen kann somit der Abfall der Thrombozyten in Relation zu dem Rückgang der WBC bei der Apherese hilfreich sein. Weitere Arbeiten zum Verständnis dieser „Knochenmarkdynamik“ bei der Apherese wären sinnvoll.

Überraschenderweise führten hohe Leukozytenzahlen vor der Apherese nicht zwingenderweise zu einer höheren Zellseparationseffektivität, weder für die Leukozyten gesamt, noch speziell für die CD 34+ Zellen (s.Abb.6 und Abb.7). Wir sahen hingegen einen Zusammenhang zwischen einer hohen Leukozytenzahl vor der PBSC-Apherese (vor ZS) und einer höheren Ausbeute an CD34+ Zellen während der gesamten Apheresedauer (s. Abb.9).

Um die Ergebnisse genauer zu untersuchen wurden die Spender in 2 Gruppen unterteilt (s.Abb.8). Die eine Gruppe hatte für CD34+ Zellen einen CE < 45%, die andere Gruppe einen CE > 45%. Die Gruppe mit einem CE < 45% hatte einen signifikant höheren Leukozytenzahl vor ZS mit $53,54 \times 10^9$ Zellen/ml, als die Gruppe mit dem höheren CE mit $40,29 \times 10^9$ Zellen/ml. Wir erklärten uns das damit, dass das Apheresesystem seine Grenzen bei der Separationsmenge hat und somit ab einem bestimmten „Sättigungswert“ nicht die Effektivität der Separation weiter so aufrechterhalten kann. Dieser Wert scheint an Hand unserer Daten grob bei einem Wert um ca. 40×10^9 Leukozyten pro ml zu liegen.

Die G-CSF Stimulation führte zu einem leichten Abfall bei den roten Blutkörperchen von $5,12 \times 10^9$ Zellen/l auf $4,88 \times 10^9$ Zellen/l, beim Hämoglobin von 14,81g/dl auf 14,15g/dl und beim Hämatokrit von 44,68% auf 42,61% (s. Tabelle 1). Dieser Rückgang des Hämoglobin, des Hämatokrits, sowie der Erythrozytenzahl werden in vergleichbarer Weise auch in weiteren Veröffentlichungen beschrieben.^{14, 31, 35}

Die Erythrozytopoese braucht bis zum Reifen Erythrozyten ca. 5- 9 Tage, hingegen dauert die Granulozytopoese unter G-CSF Stimulation nur 1,5 Tage. Die Laboranalysen in unserer Studie umfassen jedoch nur 5 Tage nach Beginn der Mobilisierung. Eine Zunahme der Erythrozytenzahl wäre daher in dieser Zeitspanne nicht zu erwarten gewesen.

Einen positiven Effekt auf die Erythrozytopoese, durch Interaktion des G-CSF mit Interleukin 6, welches wiederum auf die Erythrozytopoese stimulierend wirkt, war also in unserer Studie so nicht nachweisbar, ist aber anzunehmen.³⁶

Eine Veränderung des Hämatokrit, des Hämoglobin, oder der Erythrozytenzahl in der Kontrollgruppe der Knochenmarkspender zwischen der VU und kurz vor der Knochenmarkspende bestand wie erwartet nicht (s. Tabelle 1).

Unter der Mobilisierung kam es zu einem signifikanten Anstieg der Harnsäure von 5,49mg/dl auf 6,44mg/dl (s. Abb.3). Eine Korrelation zwischen der Zunahme der Harnsäure und der Leukozyten unter der Mobilisierung war zu erkennen, d.h. dass die Harnsäure umso mehr Anstieg, je mehr Leukozyten vom Spender gebildet wurden (s. Abb.13).

Die Erhöhung der Harnsäure ist durch den erhöhten Umsatz an Leukozyten unter der G-CSF Mobilisierung bedingt und ist reversibel. Pathologische Werte, die evtl. einen Gichtanfall bei dem Spender induzieren könnten, verzeichneten wir jedoch nicht.

Das C-Reaktive Protein (CRP) stieg ebenfalls unter der G-CSF Stimulation von $<0,30$ mg/dl auf 1,39mg/dl. Bei allen untersuchten Spendern kam es unter der Mobilisierung zu einer pathologischen Zunahme des CRP (s. Abb.4).

Eine stärkere Zunahme des CRP war mit einer geringeren Zunahme der Leukozyten unter der Mobilisierung vergesellschaftet (s. Abb.14).

Bei den mobilisierten Spendern fiel ferner ein signifikanter Anstieg weiterer Akut Phase Proteine in der Serumelektrophorese auf, wie z.B. $\alpha 1$ Globulin von 3,66% auf 4,75% bzw. 0,27g/dl auf 0,32g/dl, sowie des $\alpha 2$ Globulin von 9,01% auf 9,81% bzw. 0,65g/d auf 0,69g/dl (s. Tabelle 4).

Der Anteil von Albumin sank signifikant von 60,2% auf 59,3% bzw. 4,42 g/dl auf 4,22 g/dl.

G-CSF assoziierter Anstieg von Akut Phase Proteinen wird auch in anderen Publikationen beschrieben.^{37, 23, 32}

Inwiefern die massive Granulozytose und der Anstieg der Akute Phase Proteine im Sinne einer Entzündungsreaktion ohne Erreger zu einem Abfall des Hämatokrit durch Beeinflussung des koloidosmotischen Druck führt, ist nicht abschließend zu klären, zumal der verminderter Albumingehalt nach G-CSF Stimulation dem entgegensinnig wirkt.

Der verminderte Hämatokrit verschleiert den absoluten Anstieg der Akut-Phase Proteine wie die des CRP, sowie die der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ Globuline, sowie den relativen Abfall der Lymphozyten.

Der Anstieg der Akut-Phase Proteine, sowie der relative Abfall der Lymphozyten ist also höher zu erwarten, als die absoluten Zahlen es vermuten ließen, gäbe es keinen erniedrigten Hämatokrit.

Die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut verringerte sich unter der G-CSF Stimulation zunächst geringfügig um ca. 10 %.

Einen wesentlich deutlicheren Abfall der Thrombozytenzahlen sahen wir jedoch nach der PBSC-Apherese um weitere 40% (s. Tabelle 2). Vergleichbare Thrombozytenabfälle werden ebenfalls von anderen Autoren beschrieben.^{37, 23, 32}

Einen prognostischen Zusammenhang zwischen dem Thrombozytenabfall nach der PBSC-Apherese und der Zellseparationseffektivität konnten wir erkennen (s. Abb.12). Die PBSC-Apherese Spender haben eine umso bessere Separationseffektivität für CD34+ Zellen, je weniger das Apheresesystem fälschlicherweise auch Thrombozyten apherisiert. Dies würde die Vermutung eines sog. Sättigungswertes wie oben beschrieben unterstützen.

Der Thrombozytenabfall war jedoch nicht ausschließlich dadurch bedingt, dass die Thrombozyten in das Zellsubstrat filtriert wurden, denn in den gewonnenen Substraten hatten wir im Schnitt nur $338,79 \times 10^9$ Thrombozyten pro Spende, wobei rechnerisch $453,35 \times 10^9$ Thrombozyten im peripheren Blut fehlten.

Diese Thrombozytendifferenz von im Schnitt 115×10^9 Thrombozyten pro Spender kann durch mechanische Beanspruchung, Filtrationseffekte oder durch eine Gerinnungsaktivierung im Sinne einer Aggregatbildung bei der Apherese, aber auch z.T. durch Messfehler bedingt sein, die beim Zell-Counter bei zunehmender Thrombozytenzahl auftreten können (z.B. durch zunehmende Zellüberlappung).

Auch hier muss Berücksichtigt werden, dass das Blutvolumen nur geschätzt wurde, und somit mit einer Ungenauigkeit behaftet ist.

Wir konnten ebenfalls einen zunächst moderaten Abfall des mittleren Thrombozytenvolumens nach der Mobilisierung von 8,48fl auf 7,98fl feststellen, der nach der Apherese noch weiter abfiel auf 7,07fl. In den Stammzellsubstraten selber war jedoch ein deutlich erhöhtes mittleres Thrombozytenvolumen von 9,51fl nachweisbar. Wir führten dieses Ergebnis darauf zurück, dass technisch bedingt das Apheresesystem bevorzugt größere Thrombozyten apherisiert (s.Abb.5).

Aber auch hier muss berücksichtigt werden, dass bei zunehmender Zellzahl der Zell-Counter fälschlicherweise, womöglich Aufgrund von steigenden Zellüberlappungen, insgesamt größere Volumina berechnet. Diese Überlappungen der Zellen würden zum geringen Teil auch die rechnerisch fehlenden Thrombozyten bei den Zellsubstraten erklären.

Andererseits muss berücksichtigt werden, dass in der Volumenberechnung der Thrombozyten im peripheren Blut EDTA zum Einsatz kommt und in den Zellsubstraten Zitrat. Da Zellen im Zitrat-Milieu eher schrumpfen als im Vergleich zum EDTA-Milieu, ist sogar zu erwarten, dass in einem EDTA-Milieu die Thrombozyten in den Zellsubstraten weiter an Volumen zunehmen würden.

So gesehen heben sich die Messabweichungen für das Blättchenvolumen durch den Zell-Counter und das Zitrat Milieu z.T. gegenseitig auf.

Anderlini et al.³⁸ beschreiben unter anderem das Risiko von Thrombozytopenien bei Granulozytenspenden, deren Ursache neben der G-CSF-Wirkung auch im Aphereseverfahren zu sehen ist. Die Thrombozytenabfälle im peripheren Blut der Spender dieser Arbeit waren alle klinisch irrelevant und können demnach als nicht therapiebedürftige, moderate Nebenwirkung der G-CSF-Stimulation gesehen werden. Sie lagen in dieser Arbeit im Schnitt bei $453,35 \times 10^9$ Thrombozyten pro Spender.

In der Kontrollgruppe der Knochenmarkspender, welche keine spezifische Vorbehandlung erhielten, war die PLT und MPV in der Voruntersuchung, sowie kurz vor der Knochenmarkspende wie erwartet unauffällig (s. Tabelle 3).

6 Schlussfolgerung

Die Anwendung von G-CSF führt zu einer deutlichen Steigerung von CD 34+ Stammzellen im peripheren Blut, welche durch Separation mittels Aphereseautomaten dann in ausreichender Anzahl für eine Stammzelltransplantation gesammelt werden kann. Das Mobilisierungsregime wurde von den Patienten ohne schwerwiegende Komplikationen vertragen.

Die Veränderungen auf das Blutbild, die wir in diesem Kontext als unerwünschte Nebenwirkung bezeichneten, waren eine massive relative und absolute Erhöhung der neutrophilen Granulozyten, einen absoluten Anstieg der Monozyten und Lymphozyten, bei jedoch relativen Abfall dieser durch die massive Erhöhung der neutrophilen Granulozyten.

Im roten Blutbild war ein geringfügiger Abfall der Erythrozyten, des Hämoglobins und des Hämatokrits zu erkennen.

Die Akut Phase Proteine wie α 1- und α 2 Globuline, wie auch das CRP stiegen unter der G-CSF Mobilisierung, wie auch die Harnsäure, als Folge des erhöhten Leukozytenumsatzes.

Unter Berücksichtigung des geringeren Hämatokrit muß der relative Abfall der Lymphozyten und der Anstieg der Akut Phase Proteine kritischer betrachtet werden.

Der CRP- und Harnsäure-Anstieg war in Korrelation mit dem WBC-Anstieg, wobei keine pathologischen Harnsäurewerte bei den Spendern erreicht wurden.

Die Thrombozytenzahlen waren unter der Mobilisierung, insbesondere aber nach der Apherese durch mechanische Belastung, Filtrationseffekte, sowie durch eine Gerinnungsaktivierung im Sinne einer Aggregatbildung deutlich rückläufig. Bei unserem Patientenkollektiv traten dadurch keine Komplikationen auf, wie sie in der Literatur z.T. beschrieben werden.

Es zeigte sich, dass das Apheresesystem bevorzugt voluminöse Thrombozyten separiert, wobei ein Fehler bei dem Zellcounter bei zunehmender Thrombozytenzahl vermutet werden muss. Genauere Untersuchungen hierzu wären sinnvoll. Ein niedrigerer Abfall der Thrombozytenzahl während der Apherese war mit einer besseren Separationseffektivität verbunden.

Der Abfall der Leukozyten während der Apherese war hingegen nicht mit einer besseren Separationseffektivität vergesellschaftet. Wir führten diesen Befund darauf zurück, dass das Knochenmark dynamisch auf den Rückgang der WBC reagiert im Sinne eines Reservepools. Eine genauere Untersuchung zum Verständnis dieser „Knochenmarkdynamik“ wäre ebenfalls sinnvoll.

Das Apheresesystem zeigt bei der Separation der WBC einen gewissen „Sättigungswert“ für die Separationseffektivität der WBC, ab der die Separationseffektivität bei zunehmender WBC abnimmt. Der optimale „Sättigungswert“ für WBC lag bei unserem Kollektiv sehr grob geschätzt bei ca. 40×10^9 Zellen/l.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Jürgen Hallbach. 2001. Klinische Chemie und Hämatologie. Georg Thieme Verlag, 1.Auflage 396- 405
2. R. Klink, H. Pape, A. Kurtz & S. Silbernagl. 2010. Physiologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 6. Auflage, 195 und 893–894
3. Schwegler u. a., Der Mensch, 2011. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 35-36
4. Wirnt Rick. 1990. Klinische Chemie und Mikroskopie. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 6.Auflage, S.263
5. Nash RA.. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. 1999. Haematopoietic stem cell transplantation. Wintrobe's Clinical Haematology, 10. Edition, Williams & Wilkins Baltimore
6. Possinger K, Regierer AN, Facharzt Hämatologie Onkologie, 1.Auflage 2007. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München
7. Reiffers J, Goldman JM, Armitage JO, Blood stem cell transplantation, 1998. Martin Dunitz Ltd London
8. Strumia MM. 1934. The effect of leukocytic cream injections in the treatment of the neutropenias. Am J Med Sci 187: 527–544
9. Wonder EW, Henon PR. 1993. Peripheral blood stem cell autografts. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

10. Burgess A, Metcalf D. 1980. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemia cells. *Int J Cancer* 26: 647
11. Thomson AW. 1998. *The Cytokine Handbook*. 3. Edition, Academic Press San Diego/London
12. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G et al. 1994. Mice lacking granulocyte colony stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilisation. *Blood* 84: 1737-1746
13. Aouifi A, Piriou V, Blanc P *et al.* 1999. Effect of cardiopulmonary bypass on serum procalcitonin and C-reactive protein concentrations. *Br J Anaesth.* 83: 602–607
14. Hannen M, Banning U, Bonig H *et al.* 1999. Cytokine-mediated regulation of granulocyte colony-stimulating factor production. *Scand J Immunol.* 50: 461–468.
15. Lieschke GJ, Burgess A. 1992. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N Engl J Med* 327: 28-35
16. Robinson SP, Marks DI. 2004. Granulocyte transfusion in the G-CSF era. Where do we stand? *Bone Marrow Transplant* 34: 839-846
17. Demetri GD, Griffin JD. 1991. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor. *Blood* 78: 2791-2808
18. Spiekermann K, Roesler J, Emmerdoerfer A, Elsner J, Welte K. 1997. Functional features of neutrophils induced by B-CSF and GM-CSF treatment: differential effects and clinical implications. *Leukemia* 11: 466-478
19. Bundesärztekammer. 2005. Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Köln Deutscher Ärzte Verlag

20. Kubota N, Orita T, Hattori K et al. 1990. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors. *Journal of Biochemistry* 107: 486-492
21. Oh-Eda M, Hasegawa M, Hattori K et al. 1990. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity. *J Biol Chem* 265: 11432-11435
22. Adkins DR, Goodnough LT, Shenoy S et al. 2000. Effect of leukocyte compatibility on neutrophil increment after transfusion of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized prophylactic granulocyte transfusions and on clinical outcomes after stem cell transplantation. *Blood* 95: 3605-3612
23. McCullough J, Clay M, Herr G et al. 1999. Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors. *Transfusion* 39: 1136-1140
24. Bensinger WI, Price TH, Dale DC et al. 1993. The effects of daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. *Blood* 81: 1883-1888
25. Caspar CB, Seger, RA, Burger J, Gmür J. 1993. Effective stimulation of donors for granulocyte transfusions with recombinant methionyl granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 81: 2866-2871
26. Hester JP, Dignani MC, Anaissie EJ et al. 1995. Collection and transfusion of granulocyte concentrates from donors primed with granulocyte stimulating factor and response of myelosuppressed patients with established infection. *J Clin Apheresis* 10: 188 – 193

27. Heuft HG, Goudeva L, Sel S, Blasczyk R. 2002. Equivalent mobilization and collection of granulocyte for transfusion after administration of glycosylated G-CSF (3 µg/kg) plus dexamethasone versus glycosylated G-CSF (12 µg/kg) alone. *Transfusion* 42: 928-934
28. Jendiroba DB, Lichtiger B, Anaissie E et al. 1998. Evaluation and comparison of three mobilisation methods for the collection of granulocytes. *Transfusion* 38:722-728
29. Joos, K, Herzog R, Einsele H et al. 2002. Characterization and functional analysis of granulocyte concentrates collected from donors after repeated G-CSF stimulation. *Transfusion* 42: 603-611
30. Lee JJ, Cheung IJ, Park MR et al. 2001. Clinical efficacy of granulocyte transfusion therapy in patients with neutropenia-related infections. *Leukaemia* 15:203-207
31. Peters C, Minkov M, Matthes-Martin S et al. 1999. Leukocyte transfusions from rhG-CSF or prednisolone stimulated donors for treatment of severe infections in immunocompromized neutropenic patients. *Br J Haematol* 106: 689-696
32. Worel N, Kurz M, Peters C, Höcker P. 2001. Serial granulocytapheresis under daily administration of fHuG-CSF: effects on peripheral blood counts, collection efficiency and yield. *Transfusion* 41: 390-395
33. Neppert J, Busch H. 1979. Niedrige Leukozytenzahl bei Blutspendern. *Münchener Med Wochenschr* 121: 1573-1574
34. Neppert J. 1983. Die Granulozytentransfusion. *Dtsch Med Wochenschr* 108: 3-5
35. McLeod BC, Price TH, Drew MJ. 1997. *Apheresis: Principles and Practice*, 1. Auflage, MD: AABB (American Association of Blood Banks) Press, Bethesda, Maryland, USA, 1-40, 85-106, 465-470

36. Ulich TR, del Castillo J, Jin SM, Egrie JC. 1991. The erythropoietic effects of Interleukin 6 and Erythropoietin in vivo. *Exp Hematol* Jan;19(1):29-34.

37. Beelen DW, Ottinger H, Kolbe K et al. 2002. Filgrastim mobilization and collection of allogeneic blood progenitor cells from adult family donors: first interim report of a prospective German multicenter study. *Ann Hematol* 81: 701-709

38. Anderlini P, Körbling M, Dale DC et al. 1997. Allogeneic blood stem cell transplantation: consideration for donors. *Blood* 90: 903-908

8 Anhang

8.1 Abbildungszerzeichnis

Abb. 1: Schema der Hämatopoese Montiel MM. Bone marrow. In: Harmening D, ed Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis. Philadelphia, PA: F A. Davis Company; 1997: 40- 53.....	2
Abb. 2: Apheresesystem Cobe Spectra (eig. Aufnahme).....	11
Abb. 3: G-CSF assoziierte Veränderungen der Harnsäure.....	18
Abb. 4: G-CSF assoziierte Veränderungen des CRP.....	19
Abb. 5: Verteilung der Thrombozytenvolumen.....	21
Abb. 6: Korrelation WBC vor ZS und Separationseffektivität.....	24
Abb. 7: Korrelation WBC vor ZS und Separationseffektivität von CD34+ Zellen.....	25
Abb. 8: Abhängigkeit WBC vor ZS und CE CD 34+ Zellen.....	26
Abb. 9: Korrelation WBC vor ZS und Anzahl CD34+ Zellen in den SZK.....	27
Abb.10: Korrelation CE CD34+ Zellen und WBC Abfall nach der Apherese.....	28
Abb.11: Abhängigkeit "Knochenmarkdynamik" und CE CD34+ Zellen.....	29
Abb.12: Korrelation PLT nach der Apherese und CE CD34+ Zellen.....	30
Abb.13: Korrelation WBC und Harnsäure nach Mobilisation mit G-CSF.....	31
Abb.14: Korrelation WBC und CRP nach Mobilisation mit G-CSF.....	32

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Veränderungen des Blutbildes.....	15
Tabelle 2: G-CSF assoziierte Veränderungen der Thrombozyten.....	20
Tabelle 3: PLT und MPV der Knochenmarkspender.....	22
Tabelle 4: G-CSF assoziierte Veränderungen der Serumelektrophorese.....	22
Tabelle 5: G-CSF assoziierte Veränderungen der CD 34+ Zellen.....	23

8.3 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Günther Giers für die Überlassung der Doktorarbeit, für sein Mitwirken bei der Ausarbeitung, v.a. aber für sein Engagement die Doktorarbeit auch mit Erfolg zu beenden.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Folker Wenzel, der bei der Entstehung der Doktorarbeit und seiner Ausarbeitung durch wertvolle Anregungen und Ideen maßgeblich beteiligt war.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Praxiskollegen Dr. Hans-Werner Momberger, der durch Mehrarbeit in der Praxis mir den Zeitrahmen für die Bearbeitung der Arbeit ermöglicht hat.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

9. Ethikvotum

Die Studiennummer des Ethikvotum lautet: **3623 vom 12.05.2011**

Die Überprüfung des Ethikantrags ergab keine ethischen oder rechtlichen Bedenken.