

Aus dem Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

**Bestimmung von CD40L, Erythropoetin und Thrombopoetin im
Rahmen der Spende hämatopoetischer Stammzellen**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Maximilian Hauser

2017

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Wenzel

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Decking

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Einheiten-Verzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Hämatopoetische Stammzelltherapie	1
1.1.1 Knochenmarkspende	4
1.1.2 Periphere Blutstammzell-Apherese	4
1.2 CD40/CD154-System, Erythropoetin und Thrombopoetin in Stammzellprodukten	5
1.2.1 CD40/CD154-System.....	5
1.2.2 Erythropoetin.....	6
1.2.3 Thrombopoetin	8
1.3 Zielsetzung	9
2. Material/Methoden	11
2.1 Spenderkollektiv	11
2.2 Proben-Gewinnung, -Lagerung und -Verarbeitung	11
2.2.1 Proben aus dem peripheren Blut	11
2.2.2 Proben aus den Stammzellprodukten	11
2.2.3 CD40L-Kinetik.....	12
2.2.4 CD40L-Verdünnung.....	12
2.2.5 TPO im peripheren Blut und Knochenmark.....	12
2.2.6 Zellsortierung im Rahmen der TPO-Untersuchungen.....	12
2.2.7 TPO-Clearance	14
2.3 Quantifizierung von CD40L, Erythropoetin und Thrombopoetin	14
2.3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	14
2.4 Statistische Auswertungen	15
3. Ergebnisse.....	16
3.1 CD40L.....	16
3.1.1 CD40L im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei allogenen Spendern.....	16
3.1.2 Kinetik der CD40L-Sekretion bei G-CSF-stimulierten Spendern im Vergleich zu nicht-stimulierten Spendern	18
3.1.3 CD40L-Konzentration im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende	21

3.1.4 CD40L-Verdünnung	21
3.2 Erythropoetin	22
3.2.1 Erythropoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei autologen Spendern	22
3.2.2 Erythropoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei allogenen Spendern	24
3.2.3 Erythropoetin im Rahmen der Knochenmarkspende	26
3.3 Thrombopoetin.....	28
3.3.1 Thrombopoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei autologen Spendern	28
3.3.2 Thrombopoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei allogenen Spendern	30
3.3.3 Thrombopoetin im Rahmen der Knochenmarkspende.....	32
3.3.4 Zellsortierung	35
3.3.5 Temperaturabhängige TPO- <i>Clearance</i>	37
4. Diskussion	38
4.1 CD40L.....	38
4.2 Erythropoetin	43
4.3 Thrombopoetin.....	45
5. Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	51
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Danksagung.....	VIII

Abkürzungs- und Einheiten-Verzeichnis

Abb.	Abbildung	at	Attogramm
Aph.	Apheresat	dl	Deziliter
CD	Cluster of Differentiation	°C	Grad Celsius
CD40L	löslicher CD40L Faktor	g	Gramm
CFU-E	colony forming unit erythroid	kDa	Kilodalton
COPD	Chronic Obstructive Lung Disease	kg	Kilogramm
CRH	cytokine receptor homology	KG	Körpergewicht
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation	l	Liter
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	µg	Mikrogramm
EPO	Erythropoetin	mIU	milli internationale Einheit
ESA	Erythropoiesis Stimulating Agents	ml	Milliliter
FACS	Fluorescence activated cell sorting	min	Minute
FSC	Forward Scatter	nl	Nanoliter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor	nm	Nanometer
HGB	Hämoglobin	n. s.	nicht signifikant
HIF	Hypoxia-inducible factors	pg	Pikogramm
HLA	Human Leukocyte Antigen	pmol	Pikomol
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen	h	Stunde
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltherapie		
IFN	Interferon		
IL	Interleukin		
JAK	Januskinase		
KM	Knochenmark		
MAP	mitogen-activated protein		
MMP	Matrix-Metalloproteinase		
MPL	myeloproliferative leukemia protein		
PB	peripheres Blut		
PBST	Periphere Blutstammzelltransplantation		
PLT	Blutplättchen/Thrombozyten		
PPP	platelet poor plasma		
PRP	platelet rich plasma		
SCCS	surface connected canalicular system		
SSC	Sidewards Scatter		
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription		
TNF	Tumor Nekrose Faktor		
TPO	Thrombopoetin		
TRALI	Transfusion-related acute lung injury		
WHO	World Health Organization		
ZS	Zellsammlung		

1. Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltherapie

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) sind adulte Stammzellen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung besitzen. Die pluripotente hämatopoetische Stammzelle besitzt das Differenzierungspotential in die myelo-, erythro- oder thrombopoetische sowie die lymphopoetische Linie und bildet somit den Ursprung der Hämatopoese. [1, 2]

Die hämatopoetische Stammzelltherapie (HSZT) ist definiert als ein Verfahren, bei dem HSZ mit dem Ziel der partiellen oder totalen Repopulation des Knochenmarks und damit dem Austausch des hämatopoetischen Systems transplantiert werden. [3] Hierzu bedarf es im Rahmen der Zelltherapie die hämatopoetischen Stammzellen zu isolieren, konservieren und letztlich zu transplantieren. Je nach Indikation, Therapieschema und individuellen Voraussetzungen können die Stammzellen vom Patienten selbst (=autolog) oder einem verwandten oder nicht-verwandten Spender (=allogen) gewonnen werden. [4] Die größte Bedeutung im Rahmen der Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen nehmen derzeit die peripheren Blutstammzellen ein. Neben dem Einsatz von Nabelschnurblut als Stammzellquelle besteht die Möglichkeit der Gewinnung von Stammzellen aus Knochenmark durch Knochenmarkpunktion. [5] Für eine autologe HSZT ist die Periphere Blutstammzelltransplantation (PBST) aufgrund der schnelleren hämatopoetischen Rekonstitution und damit Verkürzung der Aplasiezeit [6] sowie aufgrund des fehlenden Operations- bzw. Narkose-Risikos das Mittel der Wahl. Für die allogene HSZT werden alle drei Stammzellquellen herangezogen. [3] Die HSZT ist ein häufig kurativer Therapieansatz bei einer Vielzahl von Erkrankungen. Die Indikationsstellung umfasst unter anderem die Gruppe der Leukämien, lymphoproliferative Erkrankungen, solide Tumoren, aber auch nicht-maligne Erkrankungen. [7, 8] Die Relevanz dieser Therapiealternative spiegelt sich in den jährlich steigenden Transplantationszahlen wider. So wurden für Deutschland im Jahr 2012 für die beiden Transplantationsmodalitäten allogen und autolog 3147 bzw. 3094 Stammzelltransplantationen registriert. [9] Im Jahr 2014 wurden bereits 3220 allogene sowie 3241 autologe Stammzelltransplantationen durchgeführt. [10] Betrachtet man den gesamteuropäischen Raum so wurden für das Jahr 2014 von 656

Transplantationszentren 40 829 hämatopoetische Stammzelltransplantationen gemeldet. [8]

Besteht die Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation, wird eine Suchanfrage an eine Spenderdatei-führende Einheit gestellt. In Deutschland stellt das Zentrale Knochenmarkspenderregister die zentrale nationale Spenderdatenbank zur Verfügung und ist eng mit weiteren nationalen und internationalen Registern vernetzt. Neben Alter und Geschlecht sind vor allem die HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-Merkmale wichtige Auswahlkriterien bei der Suche nach einem passenden Spender. Die HLA-Antigene sind auf der Zelloberfläche verankerte Proteine und bilden die individuelle Signatur der Zelle. Mit Hilfe der HLA-Antigene wird die Histokompatibilität bestimmt und es können Voraussagen über den Erfolg oder Misserfolg (z.B. *Graft versus Host*-Reaktionen) von Transplantationen getroffen werden. Hierbei gilt, dass es lediglich für 15-30 % der transplantationsbedürftigen Patienten einen HLA-identischen (HLA-A, -B, -C sowie HLA-DRB1 und -DQB1) Geschwisterteil und somit den idealen Spender gibt. Fehlt ein familiärer Spender, werden nicht-verwandte Spender mit identischen oder nahezu identischen HLA-Merkmalen gesucht. Für den Fall der fehlenden Übereinstimmung kommen Stammzellen aus Nabelschnurblut sowie haploidente Stammzelltransplantationen, auf welche im Folgenden nicht näher eingegangen werden soll, in Frage. [11, 12, 13]

Vor der eigentlichen Stammzellspende gilt es, die Patienten bzw. Spender vorzubereiten. Hierzu zählt unter anderem die Feststellung der Eignung zur Stammzellspende durch Anamnese, körperliche Untersuchung sowie Erheben laborchemischer Parameter. Hierbei wird neben der Blutgruppenserologie u.a. ein erweitertes Infektionsscreening durchgeführt. Für den Fall der Knochenmarkspende muss zusätzlich die Narkoseeignung durch einen Anästhesisten festgestellt werden. Bei der peripheren Blutstammzellspende sind etwaige Kontraindikationen für die Gabe von Wachstumsfaktoren zu prüfen. Bei Frauen ist zusätzlich das Vorliegen einer Schwangerschaft auszuschließen. Ein weiterer wesentlicher Schritt vor der Stammzellspende ist die Aufklärung der Spender. Neben allgemeinen Inhalten wie der Aufklärung über Risiken und Nutzen über verschiedene Methoden der Stammzellgewinnung sowie Ablauf der Spende gilt es, je nach gewählter Modalität, spezifischere Aufklärungsinhalte zu vermitteln. So muss im Rahmen der peripheren Blutstammzellspende über die Apherese sowie die Apheresekomplikationen und die mit

der Antikoagulation verbundenen Risiken aufgeklärt werden. Die Risiken der G-CSF-Gabe (*granulocyte-colony stimulating factor*) im Rahmen der Mobilisierungsphase müssen erläutert und über die eventuelle Notwendigkeit eines zentral-venösen Zuganges mit den damit verbundenen Risiken aufgeklärt werden. Bei der Knochenmarkspende gilt es über die Risiken der Narkose, Knochenmarkentnahme und die ggf. notwendige Gabe von Fremdblut aufzuklären. Nach Feststellung der Spendetauglichkeit sowie schriftlicher Einverständniserklärung kann die eigentliche Stammzellgewinnung erfolgen. [4]

Die Spende hämatopoetischer Stammzellen gilt als etabliertes und sicheres Verfahren. Die meisten Nebenwirkungen stehen in direktem zeitlichem Zusammenhang mit der Stammzellspende. Je nach Modalität werden nach der Knochenmarkspende Knochenschmerzen an der Entnahmestelle und narkosebedingte Nebenwirkungen wie Übelkeit und Halsschmerzen berichtet. [14] In einer retrospektiven Studie der European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) zeigten sich bei 27.770 Knochenmarkspendern im Zeitraum von 1993 bis 2005 zwölf potenziell lebensbedrohliche Ereignisse (u.a. Herz-Kreislaufstillstand, Blutdruckkrisen, Lungenödem) sowie ein Todesfall. [15] Nebenwirkungen im Rahmen der peripheren Blutstammzellspende entstehen hauptsächlich in der Mobilisierungsphase mit G-CSF. Hierbei werden Knochenschmerzen, Kopfschmerzen und Müdigkeit angegeben. Weitere Komplikationen können durch die ggf. notwendige Anlage eines zentral-venösen Katheters sowie durch die Blutbildveränderungen (z.B. Thrombozytopenie) im Rahmen des Aphereseprozesses entstehen. [16, 17, 18] Auch für die periphere Blutstammzellspende sind ernsthaftere Nebenwirkungen selten. So wurden im o.g. Zeitraum bei 23.254 peripheren Blutstammzellspenden 25 potenziell lebensbedrohliche Ereignisse (u.a. Myokardinfarkt, tiefe Beinvenenthrombose/Lungenembolie, Transfusion-related acute lung injury (TRALI), Milzruptur) und vier Todesfälle angegeben. [15]

Im Folgenden soll näher auf den Ablauf der Stammzellgewinnung durch Knochenmarkspende und periphere Blutstammzell-Apherese in Deutschland eingegangen werden.

1.1.1 Knochenmarkspende

Die Knochenmarkspende erfolgt im Rahmen eines stationären Aufenthalts, da diese unter Allgemeinanästhesie oder Regionalanästhesie in Form der Spinalanästhesie durchgeführt wird.

Die Entnahme erfolgt bilateral an der Crista iliaca posterior durch spezielle Entnahmesysteme. Das Zielvolumen beträgt 15-20 ml Knochenmark pro kg Empfängerkörpergewicht, jedoch maximal 20 ml Knochenmarkblut pro kg Spendergewicht. Die angestrebte Zellzahl beträgt 2×10^8 kernhaltige Zellen pro kg Empfängergewicht. [19]

1.1.2 Periphere Blutstammzell-Apherese

Da im peripheren Blut nur sehr wenige hämatopoetische Stammzellen zirkulieren, bedarf es im Rahmen der PBST einer Mobilisierungsphase. Hierzu wird der Wachstumsfaktor G-CSF verwandt, welcher die Bildung von Granulozyten im Knochenmark und die Freisetzung von Blutstammzellen in das periphere Blut stimuliert. Allogene Spender erhalten hierzu eine tägliche Dosis von $2 \times 5 \mu\text{g/kgKG/Tag}$ über 4-6 Tage. [20] An diese Mobilisierungsphase schließt sich die eigentliche Stammzellgewinnung an. Es gibt verschiedene Apheresesysteme, welche nach dem gleichen Prinzip operieren. Mit Hilfe von Zentrifugalkraft wird antikoaguliertes Blut in einem extrakorporalen Kreislauf in seine Bestandteile aufgeteilt. So entstehen unterschiedliche Schichten in einer ansteigenden Reihenfolge entsprechend ihrem jeweiligen Gewicht. Um die Blutstammzellen zu gewinnen, muss die Schicht zwischen Granulozyten und Thrombozyten getrennt werden. Dabei lässt es sich nicht vermeiden, dass sowohl Thrombozyten als auch rote Blutkörperchen in das Stammzellprodukt gelangen. [21] Bei gesunden Spendern reichen in der Regel 1-2 Apheresen mit einer Zieldosis im Transplantat von $>5 \times 10^6 \text{ CD34}^+/\text{kgKG}$ (Empfängerkörpergewicht).

Bei der autologen Transplantation werden dem erkrankten Patienten 8-12 Tage nach konventioneller Chemotherapie $5 \mu\text{g G-CSF kgKG/Tag}$ verabreicht. Daran schließt sich bei Erreichen von mehr als $20 \text{ CD34}^+\text{-Zellen}/\mu\text{l}$ im peripherem Blut die Stammzellapherese an. Hierbei beträgt die Zieldosis $3\text{-}5 \times 10^6 \text{ CD34}^+\text{-Zellen/kgKG}$ und wird in der Regel durch 2-3 Apheresen erreicht. [20] So gewinnt man vor der eigentlichen Therapie, je nach Krankheitsentität des Patienten, Hochdosischemotherapie ggf. in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung, eine ausreichende Zahl an

hämatopoetischen Stammzellen. Nach der Konditionierung erfolgt eine intravenöse Reinfusion der blutbildenden Stammzellen, wodurch es zu einer Re-Population des Knochenmarks kommt. [22]

Die autologe HSZT ermöglicht somit nach myoablativer Therapie eine schnelle medulläre Hämatopoese und somit eine schnellere hämatopoetische Rekonstitution.

1.2 CD40/CD154-System, Erythropoetin und Thrombopoetin in Stammzellprodukten

1.2.1 CD40/CD154-System

CD40 und sein Ligand CD154 gehören zur Tumornekrosefaktor- bzw. TNF-R- Familie. CD40 ist ein transmembranäres Protein mit einem Molekulargewicht von 43-50 kDa, welches zuerst als Oberflächenantigen auf B-Lymphozyten beschrieben wurde. Der zugehörige Ligand CD154 ist ein aus 261 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einem molekularen Gewicht von 33 kDa und wurde zuerst auf der Oberfläche aktivierter T-Lymphozyten entdeckt.

Mittlerweile ist bekannt, dass eine Vielzahl von lymphatischen sowie nicht lymphatischen Zellen sowohl den Rezeptor als auch den zugehörigen Liganden exprimieren. Hierzu zählen u.a. Endothelzellen, Thrombozyten, lymphatische Zellen und glatte Muskelzellen. Nach der Bindung von CD154 an seinen Rezeptor werden zahlreiche inflammatorische sowie prothrombotische Gene, einschließlich der für die Interleukine 1, 6, 8, 12, TNF- α , IFN- γ , sowie der Chemokine und Adhäsionsmoleküle exprimiert. Das CD40/CD154-System nimmt eine zentrale Rolle in der Immun-Antwort und -Regulation ein. Es ist beteiligt an der T-Zell-abhängigen Aktivierung von B-Lymphozyten, der thymusabhängigen Immunglobulinsynthese und dem Immunglobulinklassenwechsel. [23, 24]

Das aktive Spaltprodukt des membrangebundenen Liganden CD40L (löslicher CD40-Ligand) mit einer Masse von 15-18 kDa wird enzymatisch durch die Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) von der Zelloberfläche abgespalten. [25] Es finden sich erhöhte Konzentrationen von CD40L im tumorinfiltrierten Magengewebe [26], bei Autoimmunerkrankungen [27] und bei atherosklerotischen Veränderungen [28]. Die Hauptquelle für CD40L im Blutplasma sind Thrombozyten. [29]

Da im Stammzellprodukt eine beachtliche Anzahl an Thrombozyten zu erwarten ist, lassen sich durch die zahlreichen Wechselwirkungen Veränderungen der CD40L-Konzentration sowohl im Produkt als auch im peripheren Blut des Spenders vermuten. Khan et al. und Wenzel F. et al. zeigen, dass es im Fall von Thrombozytenkonzentraten zu einem Anstieg der CD40L-Konzentration während der Lagerung kommt. Hierbei wird die CD40L-Konzentration in kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung adverser Transfusionsreaktionen wie dem akuten Lungenversagen gebracht. [30, 31] Die Arbeiten von Woods et al. zeigen bezüglich der Zytokin-Konzentrationen in Stammzellprodukten für wesentliche Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-7, IL-8 und CD40L keinen Anstieg in peripheren Blutstammzellapheresaten. Demgegenüber stehen die Arbeiten von Wenzel F. et al., welche bei autologen Spendern einen Trend zur Freisetzung von CD40L in peripheren Blutstammzellapheresaten nachweisen. [32, 33] Somit hat die CD40L-Konzentration und deren Veränderung im Rahmen der Stammzell-Spende, -Lagerung und -Transplantation nicht zuletzt Bedeutung für die Sicherheit der Stammzell-Spender und -Empfänger.

1.2.2 Erythropoetin

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoprotein mit 165 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 34 kDa. Strukturell relevant sind unter anderen zwei Disulfid-Brückenbindungen zwischen den Cytosinen an Position 29 und 33 sowie 6 und 161, da sie die molekulare Stabilität aufrechterhalten und somit die Bindungsfähigkeit an den EPO-Rezeptor und die biologische Aktivität garantieren. [34]

Das EPO-Gen befindet sich auf dem Chromosom 7 (Position 7q21-7q22). EPO wird hauptsächlich durch peritubuläre interstitielle Fibroblasten in Rinde und äußerer Markschiicht der Niere produziert. 10 % der Produktion stammen aus extrarenalen Geweben, hierzu zählen vor allem die Leber, in geringem Umfang auch Gehirn und Milz. Während der embryonalen Entwicklung ist die Leber das Hauptsyntheseorgan für EPO. Das Glykoprotein-Hormon wirkt hauptsächlich als Wachstumsfaktor für die Bildung der Erythrozyten, es gehört somit zu den '*erythropoiesis stimulating agents*' (ESA). EPO ist der einzige hämatopoetische Wachstumsfaktor, dessen Biosynthese durch den Sauerstoffgehalt des Blutes reguliert wird. [35] Systemisch-hypoxische Zustände erhöhen die Aktivität von '*hypoxia-inducible factors*' (HIFs), welche als Transkriptionsfaktoren O₂-abhängig die Gen-Transkription regulieren. Entgegen

früherer Annahmen nimmt HIF-2 eine Schlüsselrolle in der EPO-Synthese in Niere und Leber und somit der Erythropoese ein; zusätzlich hat es regulierenden Einfluss auf die intestinale Eisenaufnahme. [36] EPO-Plasmaspiegel belaufen sich unter physiologischen Bedingungen auf ca. 10-25 mIU/ml, können unter ausgeprägter Anämie bzw. Hypoxie jedoch bis zu 1000-fach gesteigert werden. [37, 38]

Der zugehörige EPO-Rezeptor (EPO-R) gehört zur Typ-1-Zytokin-Rezeptor-Familie. Nach Liganden-Bindung kommt es über eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade (JAK=Januskinase; STAT=*signal transducers and activators of transcription*). JAK-Tyrosinkinase sind an intrazellulären Domänen von Zytokinrezeptoren gebunden und werden durch Bindung ihres spezifischen Liganden in einen aktiven Zustand versetzt. Im Falle des EPO-Rezeptors wird die JAK-2-Kinase aktiviert, diese phosphoryliert Tyrosinreste der zytoplasmatischen Region des EPO-Rezeptors. Durch diese Phosphorylierung werden Bindungsstellen für Signalmoleküle wie dem Transkriptionsmolekül STAT5 frei. Nach Translokation von STAT5-Dimeren in den Zellkern kommt es zur Induktion der EPO-spezifischen Gen-Transkription. EPO zirkuliert mit einer Halbwertszeit von ca. 7-8 Stunden im Plasma und bindet an den EPO-Rezeptor, welcher eine hohe Affinität für seinen Liganden aufweist. Erythroide Vorläuferzellen (CFU-E) im blutbildenden Knochenmark exprimieren annäherungsweise 1000 Rezeptoren pro Zelle. Die durch EPO bedingte Genaktivierung fördert die Überlebensfähigkeit über die Inhibierung der Apoptose, die Proliferation und Ausdifferenzierung der Rezeptor-tragenden Zelle und damit die Erythropoese. [39]

Gegenstand aktueller Forschung sind die nicht-hämatopoetischen Effekte des EPO/EPO-Rezeptor-Systems. Während die früheren Arbeiten von Sinclair et al. die Anwesenheit von funktionstüchtigen EPO-Rezeptoren außerhalb von erythropoetischen Zellen in Frage stellen [40], zeigen aktuellere Publikationen die extra-erythropoetische Expression. Hiernach sind die Niere [41], das Herz [42], das Pankreas [43], der Uterus [44] und das zentrale Nervensystem [45] neben anderen Geweben weitere EPO-Produktionsorte bzw. Expressionsorte für den EPO-Rezeptor oder Rezeptor-Isotypen. Somit scheint EPO neben erythropoetischen Effekten u.a. neuro- oder kardio-protective Wirkung zu vermitteln. [46]

EPO bzw. die Behandlung mit Erythropoese-stimulierenden Substanzen zeigt jedoch auch verschiedene adverse Effekte. Laut einer Metaanalyse von über 50 randomisierten Studien zeigt sich eine um den Faktor 1,17 erhöhte Mortalität bei Krebspatienten, die mit Erythropoese-stimulierenden Substanzen behandelt werden. [47] Dies lässt sich über angiogenetische und damit wachstumsfördernde Einflüsse auf Tumorzellen erklären. [48] Außerdem lassen sich unter Erythropoese-stimulierender Behandlung prothrombotische Effekte vermuten. [49] Über eine Erhöhung der Erythrozytenzahl bzw. des Hämatokrits steigt die Gefahr für Bluthochdruck [50, 51] sowie für kardiovaskuläre Ereignisse [52].

Durch die Veränderung der Hämoglobinkonzentrationen im Rahmen der peripheren Blutstammzellspende sowie der Knochenmarkspende lassen sich Veränderungen der EPO-Konzentration im peripheren Blut der Spender erwarten. Eine Akkumulation von EPO in den Apheresaten bzw. im Präparat innerhalb des Lagerungszeitraums erscheint aufgrund des o.g. Regulationsmechanismus unwahrscheinlich.

1.2.3 Thrombopoetin

Im Rahmen der Entschlüsselung des Thrombopoetin (TPO) wurde die Sequenz für TPO im Jahr 1994 endgültig aufgeklärt. Das für TPO kodierende Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 3 im Bereich von Genlocus q26.3–27. Es kodiert für ein Glykoprotein, welches aus 332 Aminosäuren besteht und massenspektroskopisch gemessen ein Molekulargewicht von 57,5 kDa aufweist.

Zur Gruppe der Zytokine zugehörig wird TPO hauptsächlich in der Leber synthetisiert und ist der Hauptregulator der Megakaryozytopoese bzw. Thrombozytopoese. Darüber hinaus ist es essenziell für das Überleben und die Proliferation in frühen Phasen aller hämatopoetischen Stammzellen bzw. hämatopoetischen Vorläuferzellen. [53, 54]

Der Thrombopoetin-Rezeptor (TPO-R; mpl oder CD110) wird in hämatopoetischen Geweben einschließlich der hämatopoetischen Stammzellen, myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen, mit hoher Dichte auf den frühen und späten Megakaryozyten und auf Thrombozyten exprimiert. Mit einem Molekulargewicht von 85-92 kDa besitzt er zwei '*cytokine receptor homology*' (CRH)-Domänen, eine Transmembranregion und die zytoplasmatische Domäne, welche mit intrazellulären Signalmolekülen interagiert. Durch Bindung von TPO an die distale CRH-Domäne wird der Rezeptor aktiviert und

intrazelluläre Signalübertragungsmechanismen initiiert. Hierbei führt der JAK-STAT-Signalweg zu einem Zellwachstum. Darüber hinaus werden MAP-Kinase-Signalwege aktiviert, welche die Zellreifung anstoßen. Somit führt die TPO-Bindung zu Mitose, Endomitose, Reifung und anti-apoptischen Effekten bei Megakaryozyten-Vorläuferzellen sowie Megakaryozyten und letztendlich zur Thrombozytenbildung.

Unter physiologischen Bedingungen wird TPO ohne eine signifikante hepatische Reservoirbildung mit einer konstanten Rate in den Blutfluss abgegeben. Im Blut zirkulierende Thrombozyten besitzen 56 ± 17 mpl-Rezeptoren pro Thrombozyt und haben eine hohe Affinität für TPO von 163 pmol/l. Nach Bindung an den mpl-Rezeptor wird TPO internalisiert und abgebaut, somit der TPO-Plasmaspiegel reguliert, welcher in inversem Zusammenhang zu den Thrombozytenzahlen steht. [55, 56]

TPO-Spiegel bei gesunden Erwachsenen werden in der Literatur mit einem Referenzbereich von 20 bis 240 pg/ml angegeben. [57, 58] Ungebundenes TPO stimuliert konzentrationsabhängig die Proliferation und Reifung von Megakaryozyten-Vorläuferzellen im blutbildenden Knochenmark. Im Gegensatz zum EPO, bei dem in der Niere hypoxische Zustände registriert werden und daraufhin in die EPO-Genregulation eingegriffen wird, verfügt TPO über ein zwar primitives, aber sehr effektives *Feedback*-System zur Regulation der Thrombozytenproduktion. [59, 60]

Aufgrund der Ansammlung von Thrombozyten im Stammzellprodukt sollte es zu Veränderungen der TPO-Konzentration im Produkt durch Internalisierung des TPO oder aber durch Lyse der Thrombozyten im Rahmen der Lagerung kommen. Interessant ist hierbei auch, ob und inwiefern der Verlust der Blutplättchen beim Spender einen Reiz zur Thrombozytopoese über einen erhöhten TPO-Spiegel setzt.

1.3 Zielsetzung

Aufgrund der unterschiedlichen Voraussetzungen sind verschiedene Stammzellprodukte denkbar: allogene und autologe Produkte, sowie (aufgrund der Zellpräparation) durch periphere Blutstammzellapherese und Knochenmarkpunktion gewonnene Apheresate und Präparate. Diese Unterschiede lassen erwarten, dass es sowohl im Stammzellspender als auch im Stammzellprodukt zu Veränderungen der Hämatopoese regulierenden Zytokine TPO sowie EPO kommt. Aufgrund der hohen Konzentration

von Thrombozyten im Produkt lässt sich hier eine hohe Freisetzung von CD40L erwarten.

In dieser Arbeit soll der Verlauf der Konzentrationen der Zytokine CD40L, EPO und TPO sowohl im peripheren Blut der Spender als auch im Stammzellprodukt beschrieben werden. Unter Berücksichtigung des Aspekts der Spendersicherheit soll beobachtet werden, inwieweit physiologische Grenzen im peripheren Blut erreicht werden. Im Stammzellprodukt sollen die jeweiligen Unterschiede der Zytokinveränderungen, auch vor dem Hintergrund der Stammzellgewinnung und Stammzelllagerung, herausgearbeitet werden. Hierzu werden quantitative Messungen durch standardisierte Sandwich-ELISA-Tests (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt. Ergänzend soll näher auf die Kinetik der CD40L-Sekretion bei Patienten, die mit G-CSF vorbehandelt werden und bei nicht-stimulierten Patienten eingegangen werden. Bei den Untersuchungen bzgl. des Thrombopoetins werden die rein quantitativen Messungen durch Zellseparationsversuche sowie Bestimmungen der TPO-*Clearance* bei unterschiedlichen Temperaturniveaus ergänzt.

2. Material/Methoden

2.1 Spenderkollektiv

Das Spenderkollektiv setzt sich aus insgesamt 59 Personen zusammen (8 autologe, 51 allogene Spender), welche in den Jahren 2010 und 2011 im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf HSZ gespendet haben. Es werden Proben von 39 männlichen sowie 20 weiblichen Personen untersucht. Die Stammzellen werden in 34 Fällen durch periphere Blutstammzellspende gewonnen, bei 25 Personen erfolgt eine Knochenmarkspende. Die Altersspanne der autologen Spender beträgt 29-69 Jahre mit einem mittleren Alter von 50,1 Jahren. Bei den allogenen Spendern reicht das Alter von 18 bis 57 Jahren mit einem mittleren Alter von 38,7 Jahren. Die Anzahl der Proben in jedem der untersuchten Kollektive wurde als statistisch angemessen betrachtet.

2.2 Proben-Gewinnung, -Lagerung und -Verarbeitung

2.2.1 Proben aus dem peripheren Blut

Die Proben aus dem peripheren Blut der Spender werden unmittelbar vor, zur Hälfte sowie nach Ablauf der peripheren Blutstammzellspende steril aus einem peripheren Zugang entnommen. Bei Knochenmarkspendern erfolgt die Entnahme der Proben einen Tag vor dem OP-Tag, unmittelbar nach der Operation sowie einen Tag nach der Knochenmarkentnahme.

2.2.2 Proben aus den Stammzellprodukten

Aus den Stammzellprodukten werden bis zu 20 ml Volumen mittels eines sterilen Beutelsystems gewonnen. 10 ml werden direkt im Anschluss weiterverarbeitet, weitere 10 ml werden nach 24 h Lagerung bei 4 °C entnommen.

Nach Entnahme der Proben zu den definierten Zeitpunkten erfolgt eine Zentrifugation über 15 Minuten bei 15.000 G sowie die anschließende Kryokonservierung bei -80 °C. Die Spender willigten schriftlich in die Verwendung der Proben zu Zwecken der medizinischen Forschung ein. Das Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität mit dem/der Aktenzeichen/Studiennummer 2648 stammt vom 08.07.2005.

2.2.3 CD40L-Kinetik

Bei den Untersuchungen zur Kinetik der CD40L-Sekretion werden Proben von Spendern, die mit G-CSF vorbehandelt sind, mit Proben von unstimulierten Spendern verglichen. Die Probenentnahme erfolgt bei den unstimulierten Spendern zum Zeitpunkt der Voruntersuchung, die Proben der stimulierten Spender werden direkt vor der Apherese gewonnen. Von jeder Gruppe wird plättchenarmes Plasma (PPP) und plättchenreiches Plasma (PRP) herangezogen. Zur Herstellung von PRP wird Vollblut 10 Minuten bei 1000 G zentrifugiert und der Überstand als PRP verwendet. Zur PPP-Gewinnung erfolgt eine 15-minütige Zentrifugation der Proben bei 15.000 G. Die Ausgangsproben werden bei 37 °C über einen Zeitraum von insgesamt 90 Minuten inkubiert. Nach 15, 30, 45 und 90 Minuten werden jeweils Proben zur späteren Messung der CD40L Spiegel entnommen, zentrifugiert und kryokonserviert. n=7 (4× stimuliert, 3× unstimuliert).

2.2.4 CD40L-Verdünnung

Von drei Spendern wird PRP durch Zentrifugation von Vollblut bei 1000 G für 10 Minuten isoliert. Dieses PRP wird zum Teil zur späteren CD40L-Messung direkt kryokonserviert und gilt als Kontrollwert. Zudem erfolgte eine Verdünnung des PRP mit PPP im Verhältnis 1:2 und 1:10. Das unverdünnte PRP sowie die zwei Verdünnungsstufen werden über vier Stunden bei Raumtemperatur gelagert, anschließend zentrifugiert und zur späteren CD40L-Messung kryokonserviert. n=3.

2.2.5 TPO im peripheren Blut und Knochenmark

Nach simultaner steriler Entnahme von peripherem Blut aus einem peripher liegenden Katheter in der Cubitalvene und Entnahme von Knochenmarkblut im Rahmen der Knochenmarkentnahme werden die Proben bei 15.000 G für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend kryokonserviert. n=10.

2.2.6 Zellsortierung im Rahmen der TPO-Untersuchungen

Die Proben zur Zellsortierung stammen aus dem Blutstammzellapheresat im Anschluss an die allogene periphere Blutstammzellapherese. Aus den Apheresaten wird PRP gewonnen sowie die folgenden Fraktionen durch Konditionierung mit Antikörpern hergestellt: Monozyten, Lymphozyten, Granulozytensuspension sowie CD34⁺- Zellen. Nach Bereitstellung der Proben erfolgt eine Lagerung über 24 Stunden bei 4 °C.

Die Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie wird mit dem MoFlo XDP Cell Sorter (Beckman Coulter) durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, welches unter anderem zur quantitativen Bestimmung von Zellen herangezogen wird. Das zu untersuchende Reagenz wird hierbei vom Durchflusszytometer per Druck in die Messkammer (engl. *flow cell*) geleitet, wo die Probe von einem seitlichen Laser bestrahlt wird. Die den Laserstrahl passierende Zelle streut dabei Licht in verschiedene Richtungen. Man unterscheidet im Wesentlichen Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*), welches in Richtung des ursprünglichen Strahls von sog. Photomultipliern detektiert wird und Seitwärtsstreulicht (SSC = *sideways scatter*), welches im ca. 90° Winkel zum ursprünglichen Strahlenverlauf gemessen wird. Das SSC wird von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst. Das FSC ist abhängig vom Volumen der Zelle. Zusätzlich zur Detektion des Streulichtes messen Durchflusszytometer auch Fluoreszenzlicht. Beim *'Fluorescence activated cell sorting'* (FACS) müssen die Proben entsprechend aufbereitet werden. Meist werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper eingesetzt, welche sich gegen bestimmte Oberflächenproteine richten. Die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbten Zellen passieren die Messzelle, wo das Fluoreszenzlicht detektiert wird und somit eine eindeutige Zuordnung der Zelle erfolgen kann. Die erhaltenen Messergebnisse werden im Anschluss durch die Gerätesoftware graphisch dargestellt. Hierbei wählt man meist die Darstellung als Dot Plot.

Bei den Versuchen zur Zellsortierung im Rahmen der TPO-Messungen werden die Ausgangsproben mit den unten genannten Antikörpern vorbehandelt (Tab. 1). Durch diese Markierung und anschließende Messung durch den MoFlo XDP Cell Sorter gelingt eine Aufteilung entsprechend der oben genannten Fraktionen.

Die jeweiligen Zellsuspensionen werden anschließend bei 15.000 G zentrifugiert und kryokonserviert. Im Anschluss erfolgt die Quantifizierung von TPO mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) der Firma R&D Systems. n=3.

Fraktion	Antikörper
Lymphozyten	Anti-CD19, Anti-CD3
Monozyten	Anti-CD156
CD34 ⁺ -Zellen	Anti-CD34
Granulozyten	Anti-CD54

Tabelle 1: **Antikörper zur Markierung der unterschiedlichen Zelltypen im FACS.**

2.2.7 TPO-Clearance

Vollblut wird bei 10.000 G zehn Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand wird PRP gewonnen. Durch Zugabe von rekombinantem humanem TPO (Quantikine human TPO Immunoassay) erreicht man eine Ausgangskonzentration für TPO von 400 pg/ml. Das Ausgangsprodukt wird über einen Zeitraum von fünf Stunden bei 4 °C sowie bei 37 °C gelagert und anschließend 15 Minuten bei 15000 G zentrifugiert und kryokonserviert. n=3.

2.3 Quantifizierung von CD40L, Erythropoetin und Thrombopoetin

Die Quantifizierung der Zytokine CD40L, EPO und TPO erfolgt mittels ELISA. Hierzu werden Quantikine Human sCD40Ligand, Quantikine Human TPO sowie Quantikine Human Erythropoietin Test-Kits der Firma R&D Systems verwandt.

2.3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Als Vorbereitung auf die eigentlichen Messungen werden alle Proben aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Der ELISA-Test basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein für das jeweilige Zytokin (CD40L, EPO, TPO) spezifischer Antikörper (monoklonale Mausantikörper beim TPO- und EPO-ELISA sowie polyklonale Antikörper beim CD40L-ELISA) befindet sich auf einer Mikrotiterplatte. Diese wird mit Proben und einer Standardreihe mit bekannten Zytokinkonzentrationen beimpft. Nach einer Inkubationszeit von je nach Test zwischen 120 bis 180 Minuten unter kontinuierlicher Agitation (beim CD40L-Elisa) binden die in den Proben jeweils vorhandenen Zytokine an den immobilisierten Antikörper im Sinne einer Antigen-Antikörper Reaktion. Nach Aspiration erfolgen vier Waschdurchgänge, um ungebundene Substanzen zu entfernen. Nun wird ein an eine Peroxidase gebundener polyklonaler Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet sich innerhalb der Inkubationszeit von 60 bis 120

Minuten (unter Agitation beim CD40L-Elisa) an die vorhandenen Antigen-Antikörper-Komplexe. Erneut erfolgen eine Aspiration und ein 4-facher Waschvorgang, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Folgenden wird die Substratlösung, bestehend aus dem Farbreagenz Tetramethylbenzidin und einer Wasserstoffperoxidase, hinzugefügt. Die an den zweiten Antikörper konjugierte Peroxidase oxidiert Tetramethylbenzidin zu einem blauen Farbstoff, wobei die Intensität der Farbreaktion proportional zu der in der jeweiligen Probe vorhandenen Menge an Zytokin ist. Diese Farbreaktion wird nach 30-minütiger Inkubation in Dunkelheit durch Zugabe von Schwefelsäure unterbrochen. Es resultiert ein Farbumschlag von blau zu gelb. Im letzten Schritt wird bei einer Wellenlänge von 450 nm und unter einer Korrekturwellenlänge von 570 nm durch einen Mikroplattenleser die optische Dichte bestimmt. Durch Vergleich mit einer aus rekombinantem CD40L, EPO und TPO hergestellten Standardkurve wird aus den gemessenen Werten die Konzentration in den jeweiligen Proben ermittelt.

2.4 Statistische Auswertungen

Die erhobenen Daten werden in das Programm Microsoft Excel 2010 implementiert. Mit dem gleichen Programm erfolgt die graphische Darstellung in Form von Graphen sowie einer Tabelle. Es werden Mittelwerte (arithmetisches Mittel), Standardabweichung und Standardfehler berechnet. Die statistische Auswertung wird mit dem Programm Graph Pad Prism durchgeführt. Signifikanztests werden mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $<0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 CD40L

3.1.1 CD40L im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei allogenen Spendern

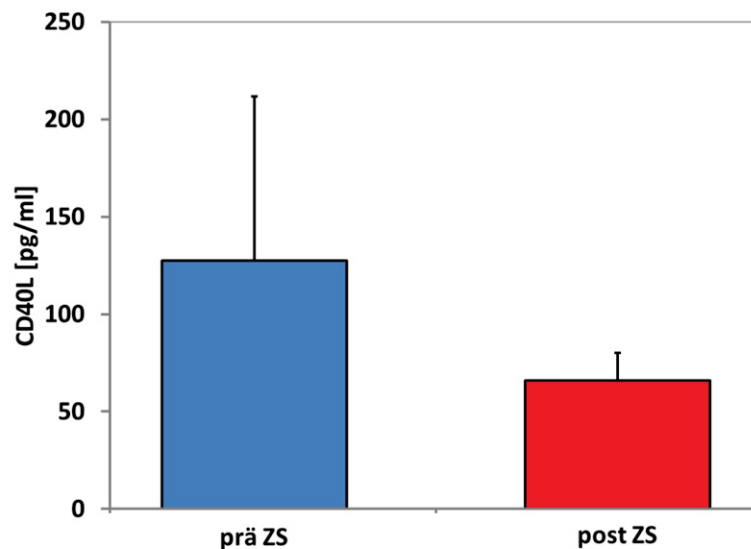


Abb. 1: **Konzentration von CD40L (pg/ml) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). n. s.

Abbildung 1 zeigt, dass es im Verlauf der Apherese zu einer Konzentrationsminderung von CD40L im peripheren Blut der Spender kommt. Die mittlere Apheresedauer beträgt 195 Minuten mit einer Spanne von 148-305 Minuten. Der im Vergleich hohe Standardfehler von 84 pg/ml bei einem Mittelwert von 127 pg/ml in den Proben vor der Stammzellspende ist auf einen hohen Einzelwert von 462 pg/ml zurückzuführen.

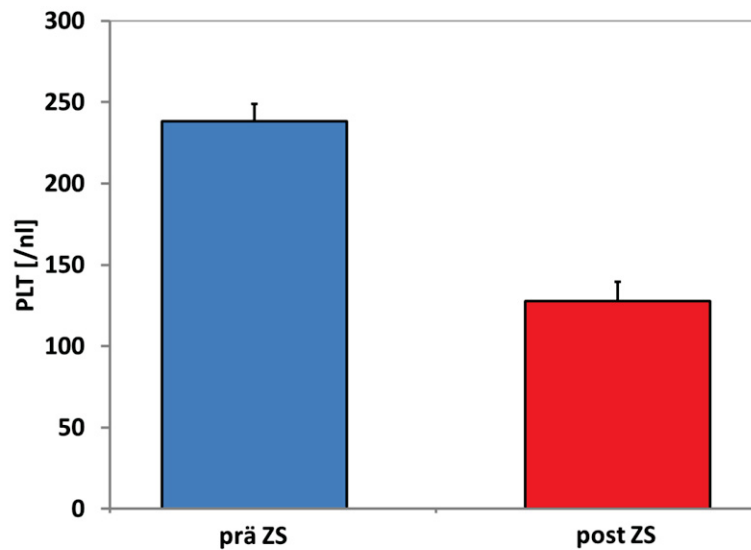


Abb. 2: Thrombozytenkonzentration (PLT/nl) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). n. s.

Diesem Muster entsprechend zeigt sich auch ein Abfall der Thrombozytenkonzentration im Vergleich der peripheren Blutwerte vor und nach der peripheren Blutstammzellapherese (Abb. 2).

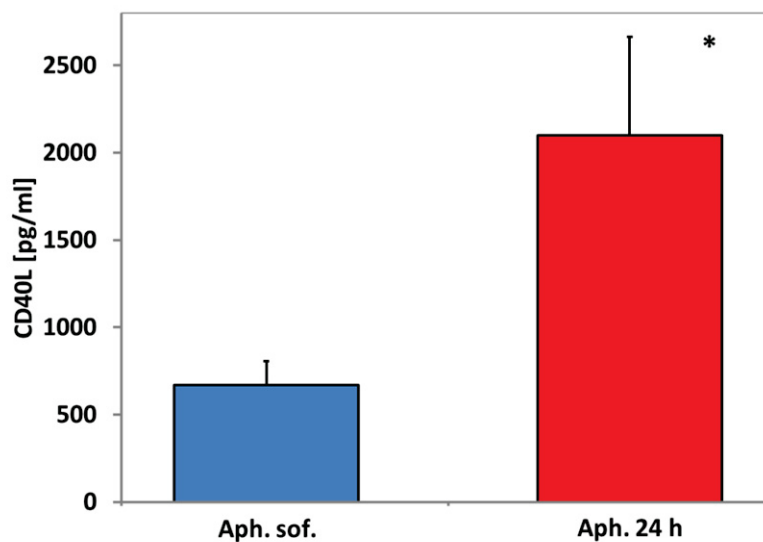


Abb. 3: Konzentration von CD40L (pg/ml) im Stammzellapheresat nach allogener peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=6). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte aus dem Aph. sof. und dem Aph. 24 h.

Abbildung 3 zeigt eine im Vergleich zum peripheren Blut deutlich erhöhte CD40L-Konzentration im Stammzellapheresat. Nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden bei 4 °C kommt es zu einem signifikanten Anstieg der CD40L-Konzentration im Stammzellapheresat. Die gemittelte Thrombozytenkonzentration im Apheresat beträgt 1902/nl.

3.1.2 Kinetik der CD40L-Sekretion bei G-CSF-stimulierten Spendern im Vergleich zu nicht-stimulierten Spendern

Zur Untersuchung der Kinetik der CD40L-Freisetzung wird Plasma von G-CSF-stimulierten Spendern mit dem von nicht-stimulierten Spendern über einen Zeitraum von 90 Minuten miteinander verglichen.

Es zeigt sich sowohl im Plasma unstimulierter als auch im Plasma stimulierter Spender ein Konzentrationsanstieg für CD40L zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Abb. 4).

Der Mittelwert (Standardfehler) der CD40L-Konzentration stimulierter Spender beträgt nach 15 Minuten 16 pg/ml (7 pg/ml), nach 30 Minuten 46 pg/ml (14 pg/ml), nach 45 Minuten 66 pg/ml (30 pg/ml) und nach 90 Minuten 154 pg/ml (81 pg/ml). Bei nicht-stimulierten Spendern liegt die CD40L-Konzentration nach 15 Minuten bei 50 pg/ml (15 pg/ml), nach 30 Minuten bei 60 pg/ml (14 pg/ml), nach 45 Minuten bei 61 pg/ml (8 pg/ml) und nach 90 Minuten bei 96 pg/ml (27 pg/ml). Nach 15 und 90 Minuten zeigt sich ein signifikanter Unterschied der CD40L-Konzentration im Plasma stimulierter sowie unstimulierter Spender.

Die Ausgangskonzentration (15 Minutenwert) von CD40L im Plasma unstimulierter Spender liegt mit 50 pg/ml im Vergleich zu dem Ausgangswert der stimulierten Spender höher. Über die Zeit erkennt man eine deutlich schnellere Freisetzung von CD40L im Plasma stimulierter Spender. Der prozentuale Anstieg der CD40L-Konzentration pro Minute beträgt bei stimulierten Spendern 5,05 %, bei unstimulierten Spendern 2,27 %.

Die gemittelten Thrombozytenzahlen, gemessen im peripheren Blut der Spender vor der Stammzellspende betragen im Kollektiv der stimulierten Spender 270/nl und im Kollektiv der unstimulierten Spender 249/nl.

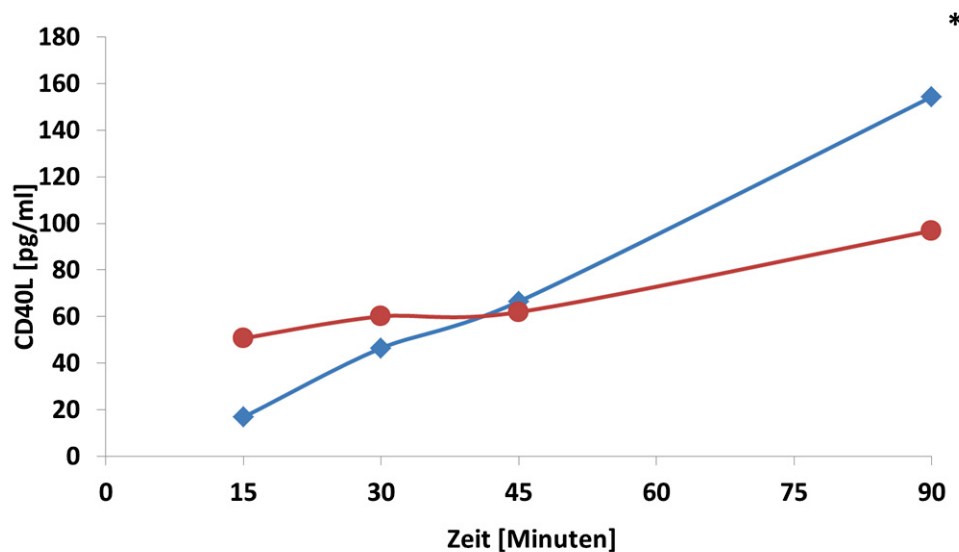


Abb. 4: Kinetik der CD40L-Sekretion (pg/ml) im Plasma G-CSF-stimulierter Spender (blau) sowie nicht-stimulierter Spender (rot) über die Zeit in Minuten. Dargestellt sind gemittelte Ergebnisse von insgesamt 4 stimulierten sowie 3 nicht-stimulierten Spendern zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten und 90 Minuten. Blau dargestellt ist die Kurve der Spender, welche eine tägliche Dosis von $2 \times 5 \mu\text{g/kgKG/Tag}$ G-CSF über 4-6 Tage erhielten. Rot eingezeichnet sind die CD40L-Konzentrationen von nicht stimulierten Spendern ($n=7$). Mittelwerte (Standardfehler) stimulierter Spender nach 15 Minuten 16 pg/ml (7 pg/ml), nach 30 Minuten 46 pg/ml (14 pg/ml), nach 45 Minuten 66 pg/ml (30 pg/ml), nach 90 Minuten 154 pg/ml (81 pg/ml). Mittelwerte (Standardfehler) nicht-stimulierter Spender nach 15 Minuten 50 pg/ml (15 pg/ml), nach 30 Minuten 60 pg/ml (14 pg/ml), nach 45 Minuten 61 pg/ml (8 pg/ml), nach 90 Minuten 96 pg/ml (27 pg/ml). * $p<0,05$; Signifikant beim Vergleich der 15- und 90-Minutenwerte innerhalb der jeweiligen Kurven.

In Abbildung 5 werden die gleichen Messungen, nun jedoch in plättchenreichem Plasma dargestellt. Der Mittelwert (Standardfehler) der CD40L-Konzentration stimulierter Spender beträgt nach 15 Minuten 34 pg/ml (23 pg/ml), nach 30 Minuten 47 pg/ml (15 pg/ml), nach 45 Minuten 103 pg/ml (28 pg/ml) und nach 90 Minuten 249 pg/ml (123 pg/ml). Bei nicht-stimulierten Spendern liegt die CD40L-Konzentration nach 15 Minuten bei 45 pg/ml (13 pg/ml), nach 30 Minuten bei 58 pg/ml (14 pg/ml), nach 45 Minuten bei 59 pg/ml (24 pg/ml) und nach 90 Minuten bei 164 pg/ml (50 pg/ml). Nach 15 und 90 Minuten zeigt sich ein signifikanter Unterschied der CD40L-Konzentration im PRP stimulierter sowie unstimulierter Spender. Nach 90 Minuten zeigt sich ein signifikanter Unterschied der CD40L-Konzentration im PRP zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Spendern.

Zu erkennen ist, dass die Ausgangskonzentrationen für CD40L im PRP im Vergleich zum Plasma keine großen Differenzen zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Proben aufweisen. Im PRP wird mit 249 pg/ml bei den stimulierten Proben und 164 pg/ml bei den unstimulierten Proben nach 90 Minuten deutlich mehr CD40L freigesetzt als im Plasma. Dort beläuft sich die CD40L-Konzentration nach 90 Minuten auf 154 pg/ml bei den stimulierten und auf 96 pg/ml bei den unstimulierten Proben. Die höchsten CD40L-Konzentrationen werden im PRP stimulierter Spender nach 90 Minuten erreicht. Entsprechend zeigen sich ein prozentualer CD40L-Anstieg von 23,79 % pro Minute im PRP der stimulierten Spender und ein prozentualer Anstieg pro Minute im PRP der unstimulierten Spender von 7,43 %.

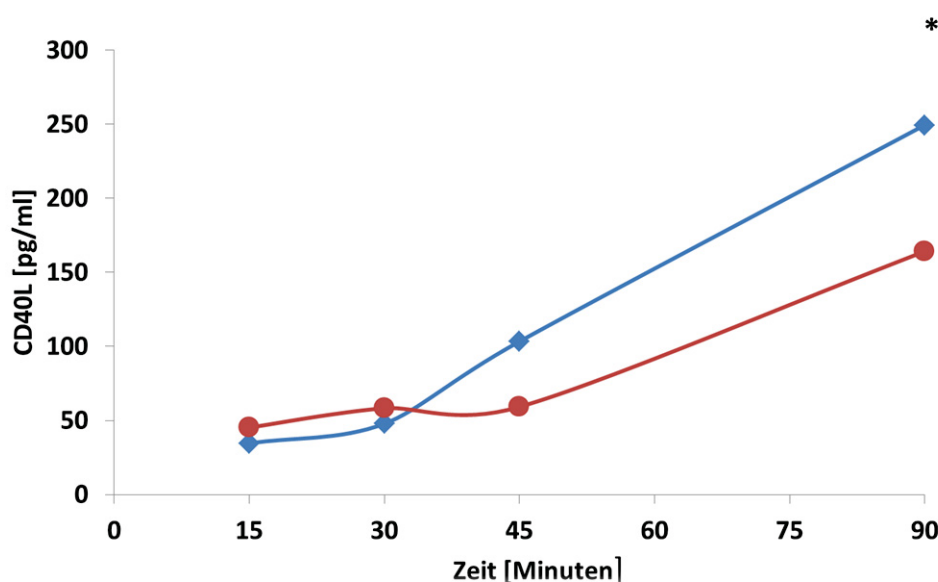


Abb. 5: Kinetik der CD40L-Sekretion (pg/ml) in plättchenreichem Plasma (PRP) G-CSF-stimulierter Spender (blau) sowie nicht-stimulierter Spender (rot) über die Zeit in Minuten. Dargestellt sind gemittelte Ergebnisse von insgesamt 4 stimulierten sowie 3 nicht-stimulierten Spendern zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten und 90 Minuten. Blau dargestellt ist die Kurve der Spender, welche eine tägliche Dosis von $2 \times 5 \mu\text{g/kgKG/Tag}$ G-CSF über 4-6 Tage erhielten. Rot eingezeichnet sind die CD40L-Konzentrationen von nicht stimulierten Spendern (n=7). Mittelwerte (Standardfehler) stimulierter Spender nach 15 Minuten 34 pg/ml (23 pg/ml), nach 30 Minuten 47 pg/ml (15 pg/ml), nach 45 Minuten 103 pg/ml (28 pg/ml), nach 90 Minuten 249 pg/ml (123 pg/ml). Mittelwerte (Standardfehler) nicht-stimulierter Spender nach 15 Minuten 45 pg/ml (13 pg/ml), nach 30 Minuten 58 pg/ml (14 pg/ml), nach 45 Minuten 59 pg/ml (24 pg/ml), nach 90 Minuten 164 pg/ml (50 pg/ml). * $p < 0,05$; Signifikant beim Vergleich der 15- und 90-Minutenwerte innerhalb der jeweiligen Kurven sowie beim Vergleich der 90-Minutenwerte beider Kurven.

3.1.3 CD40L-Konzentration im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende

In Abbildung 6 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der CD40L-Konzentration im Stammzellpräparat nach Knochenmarkentnahme während der Lagerungszeit von 24 h bei 4 °C. Vergleichend mit Abbildung 3 und somit dem Apheresat nach peripherer Blutstammzellspende zeigt sich eine erhöhte Ausgangskonzentration für CD40L im Präparat nach Knochenmarkspende. Die Thrombozytenzahlen im Knochenmarkprodukt liegen mit 117/nl deutlich unter den Thrombozytenzahlen im Apheresat nach peripherer Blutstammzellspende (1902/nl).

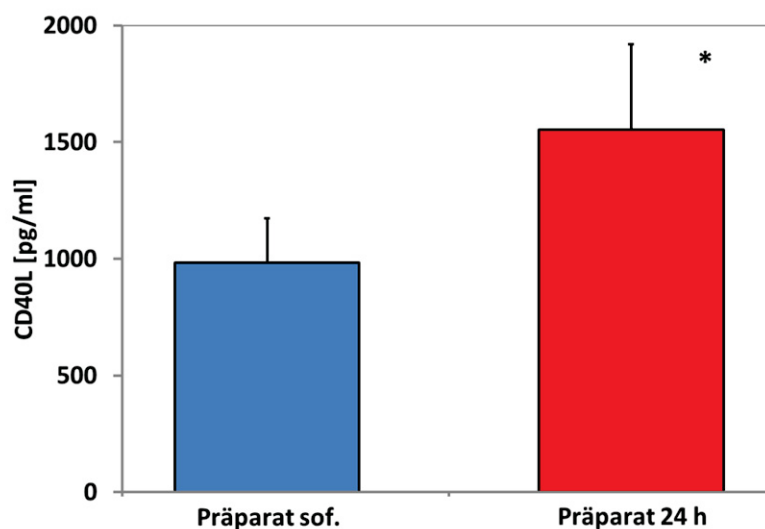


Abb. 6: Konzentration von CD40L (pg/ml) im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende (Präparat sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Präparat 24 h). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte aus dem Präparat sof. und dem Präparat 24 h.

3.1.4 CD40L-Verdünnung

Abbildung 7 zeigt die CD40L-Freisetzung pro Minute in Abhängigkeit von der durch Dilution veränderten Thrombozytenkonzentration innerhalb einer Lagerungsdauer von 4 Stunden. Hierbei ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit Abnahme der CD40L-Freisetzung bei entsprechend reduzierter Thrombozytenanzahl.

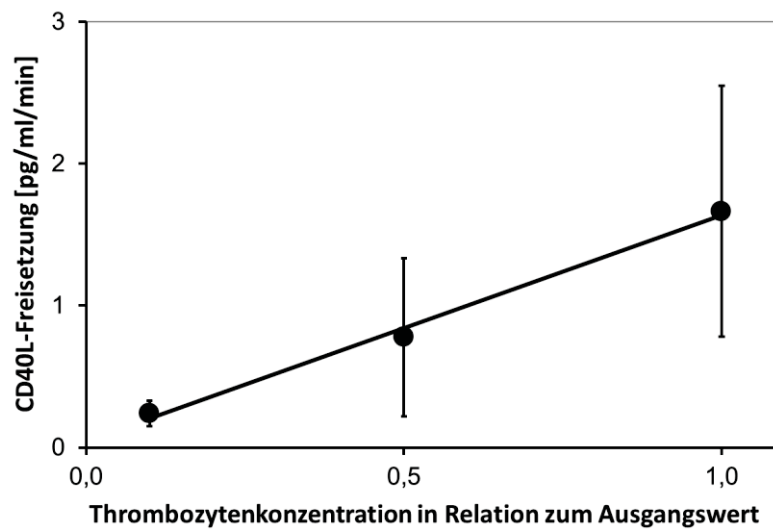


Abb. 7: CD40L-Freisetzung pro Minute [pg/ml/min] im PRP (1,0), bei PRP: PPP Dilution im Verhältnis 1:2 (0,5) und nach Dilution des PRP mit PPP im Verhältnis 1:10 (0,1). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=3).

3.2 Erythropoetin

3.2.1 Erythropoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei autologen Spendern

Im peripheren Blut autologer Blutstammzellspender zeigt sich ein tendenzieller Anstieg der Erythropoetinkonzentration im Vergleich der Werte vor der Stammzellspende sowie nach Beendigung der Apherese (Abb. 8). Die mittlere Apheresedauer beträgt 274 Minuten.

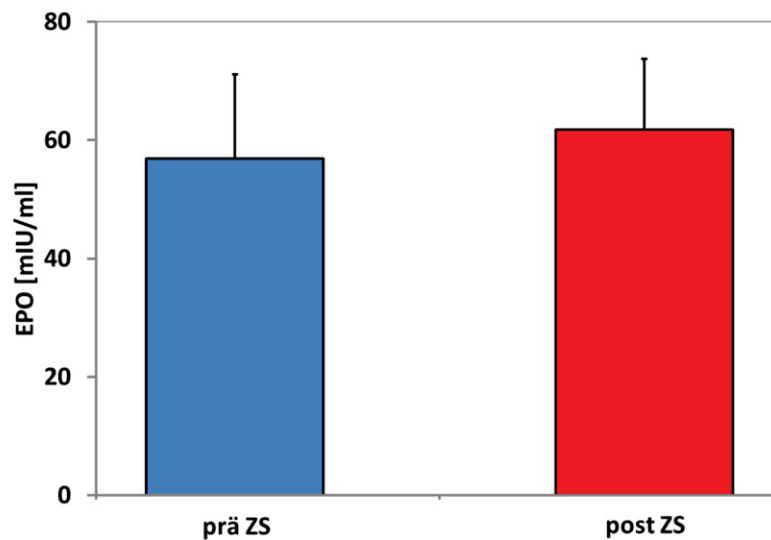


Abb. 8: **Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=3). n. s.

Entsprechend zeigt sich nach dem Ende der Blutstammzellapherese eine im Vergleich zum Ausgangswert nicht signifikant gesunkene Konzentration von Hämoglobin im peripheren Blut der autologen Spender (Abb. 9).

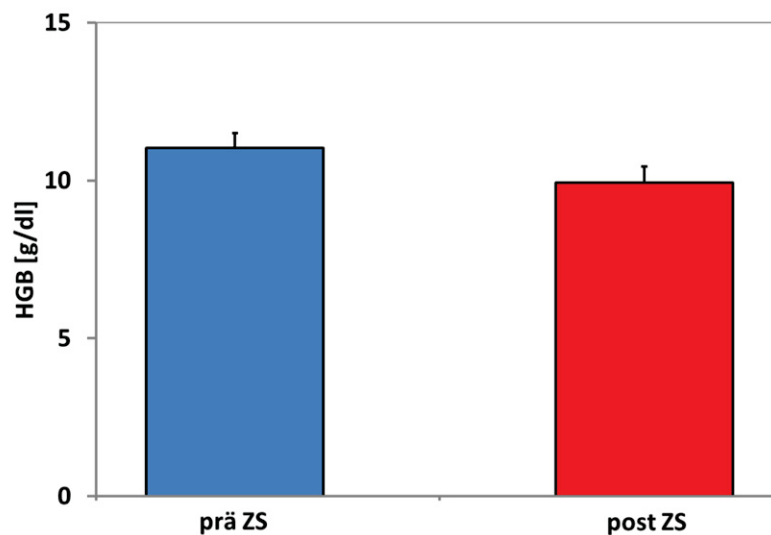


Abb. 9: **Konzentration von Hämoglobin (HGB) (g/dl) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=3). n. s.

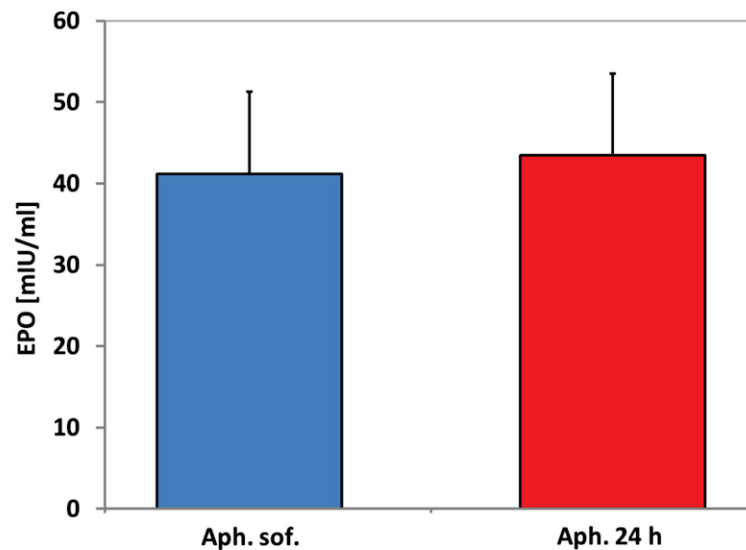


Abb. 10: **Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im Stammzellapheresat nach autologer peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=3). n. s.

Abbildung 10 veranschaulicht, dass es im Verlauf der Lagerungszeit von 24 h bei einer Temperatur von 4 °C im Apheresat nach autologer Blutstammzellspende bei tendenziellem Anstieg zu keiner signifikanten Veränderung der Erythropoetin-Konzentration kommt. Die Hämoglobinkonzentration im Apheresat nach Abschluss der Spende beträgt gemittelt 2,53 g/dl.

3.2.2 Erythropoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei allogenen Spendern

Über eine gemittelte Apheresedauer von 234 Minuten zeigt sich im peripheren Blut allogener Blutstammzellspender bei gering ansteigender Tendenz keine signifikante Konzentrationsänderung für EPO (Abb. 11).

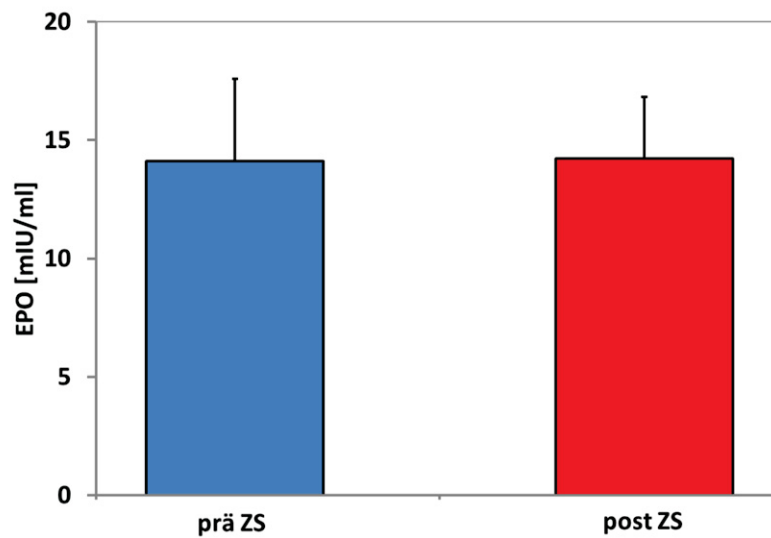


Abb. 11: **Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). n. s.

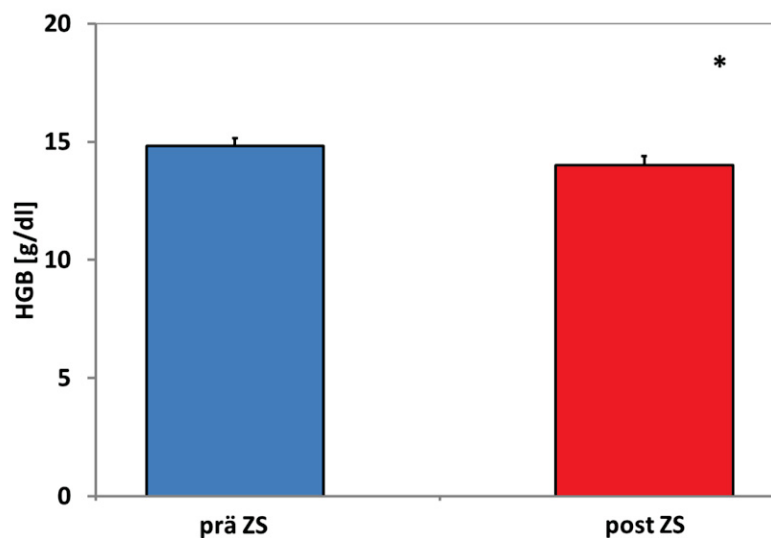


Abb. 12: **Konzentration von Hämoglobin (HGB) (g/dl) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte prä ZS und post ZS.

Während in Abbildung 11 eine geringe Tendenz zur erhöhten Erythropoetinfreisetzung zu erkennen ist, zeigt sich in Abbildung 12 eine fallende Konzentration für

Hämoglobin im Vergleich der peripheren Blutwerte vor sowie nach der allogenen Blutstammzellapherese.

Nach Einschluss von zwei weiteren Proben wird die Konzentration von EPO im Stammzellapheresat nach allogener Stammzellapherese sowie nach Ablauf einer Lagerungsdauer von 24 h bei 4 °C gemessen. Hierbei ist bei keiner signifikanten Konzentrationsänderung eine leichte Tendenz zur Abnahme der Erythropoetin-Konzentration im Rahmen der Lagerung zu erkennen. Der Hämoglobinwert im Apheresat beträgt gemittelt 0,52 g/dl (Abb. 13).

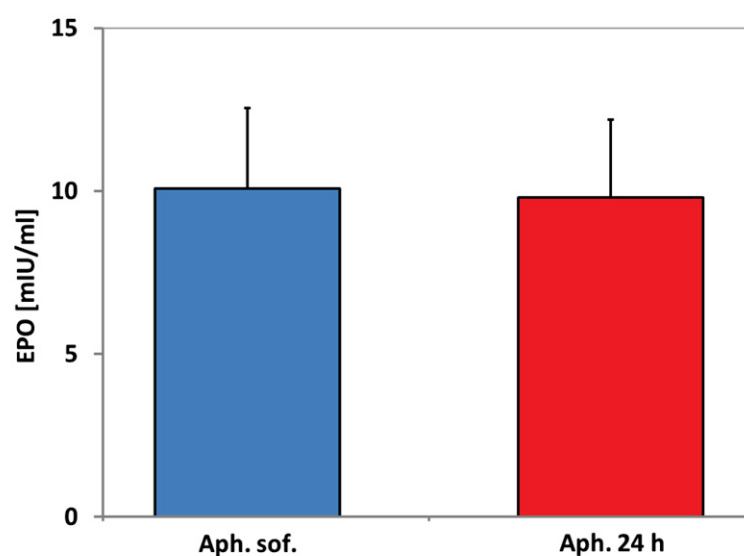


Abb. 13: Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im Stammzellapheresat nach allogener peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=7). n. s.

3.2.3 Erythropoetin im Rahmen der Knochenmarkspende

Im Verlauf der Knochenmarkspende kommt es im peripheren Blut der Spender direkt im Anschluss an die Operation zu einem signifikanten Abfall der Erythropoetinkonzentration. Mit einem Tag Abstand zum Eingriff zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Erythropoetinkonzentration im peripheren Blut auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes (Abb. 14).

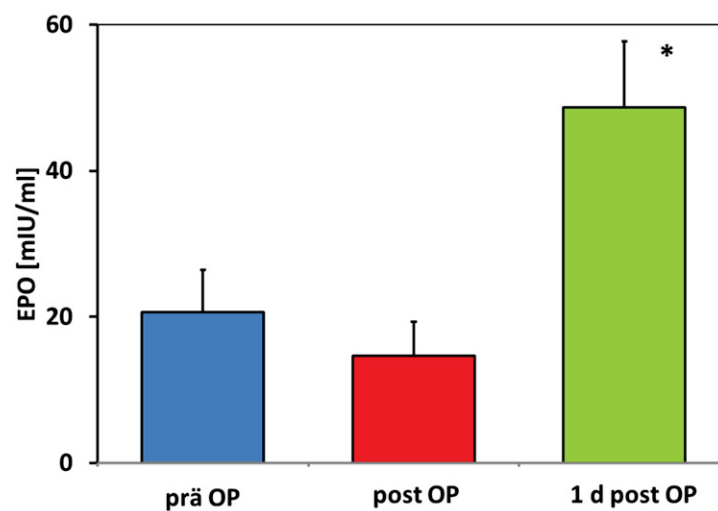


Abb. 14: **Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=6). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte prä OP und post OP sowie prä OP und 1 d post OP, post OP und 1 d post OP.

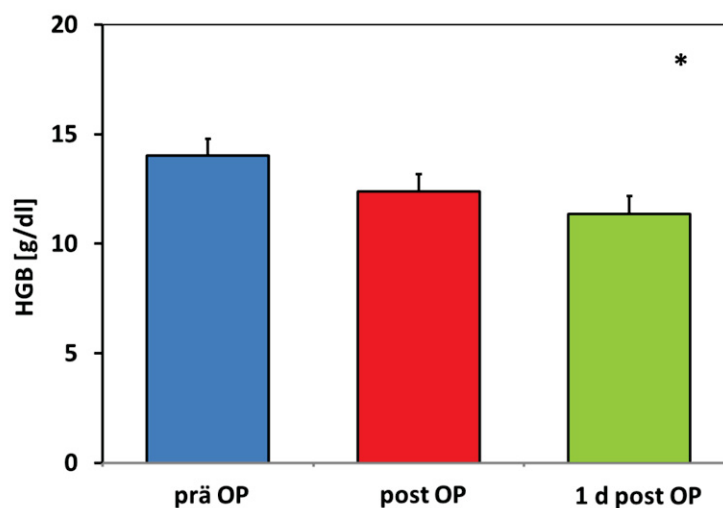


Abb. 15: **Konzentration von Hämoglobin (HGB) (g/dl) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=6). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte prä OP und post OP sowie prä OP und 1 d post OP.

In Abbildung 15 zeigt sich, dass die Konzentration von Hämoglobin im peripheren Blut der Knochenmarkspender mit der größten Reduktion direkt nach der Operation zu den jeweiligen Zeitpunkten kontinuierlich abnimmt.

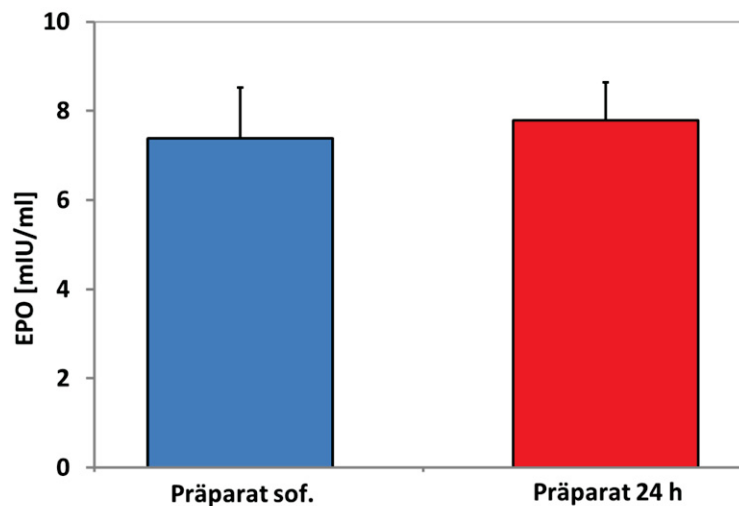


Abb. 16: Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende (Präparat sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Präparat 24 h). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=7). n. s.

Nach Ergänzung um eine weitere Probe wird in Abbildung 16 die Erythropoetinkonzentration im Stammzellpräparat im Anschluss an die Knochenmarkspende sowie nach einer Lagerungszeit von 24 h bei 4 °C dargestellt. Hierbei zeigt sich bei ansteigender Tendenz keine signifikante Konzentrationsänderung bzgl. der Erythropoetinspiegel.

3.3 Thrombopoetin

3.3.1 Thrombopoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei autologen Spendern

Im peripheren Blut autologer Blutstammzellspender zeigt sich ein insgesamt hohes TPO-Niveau. Nach Ablauf der Blutstammzellapherese mit einer gemittelten Dauer von 254 Minuten ergibt sich keine signifikante Veränderung der Thrombopoetinspiegel. (Abb. 17).

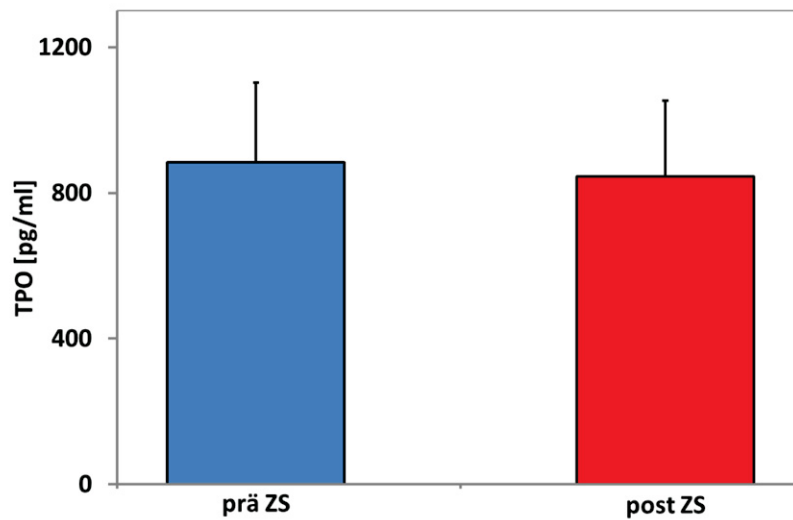


Abb. 17: **Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=8). n. s.

In Abbildung 18 zeigt sich ein signifikanter Abfall der Thrombozytenkonzentration im Vergleich der Konzentrationen im peripheren Blut der autologen Spender vor sowie nach der Blutstammzellspende.

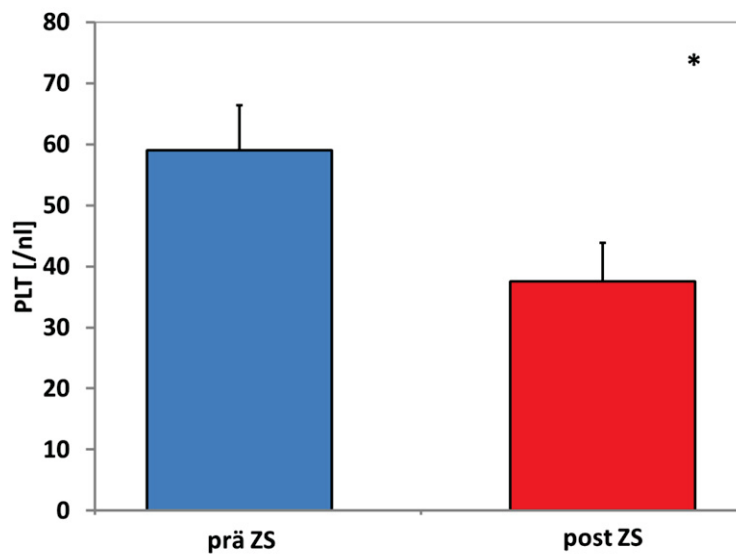


Abb. 18: **Thrombozytenkonzentration (PLT/nl) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=8). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte prä ZS und post ZS.

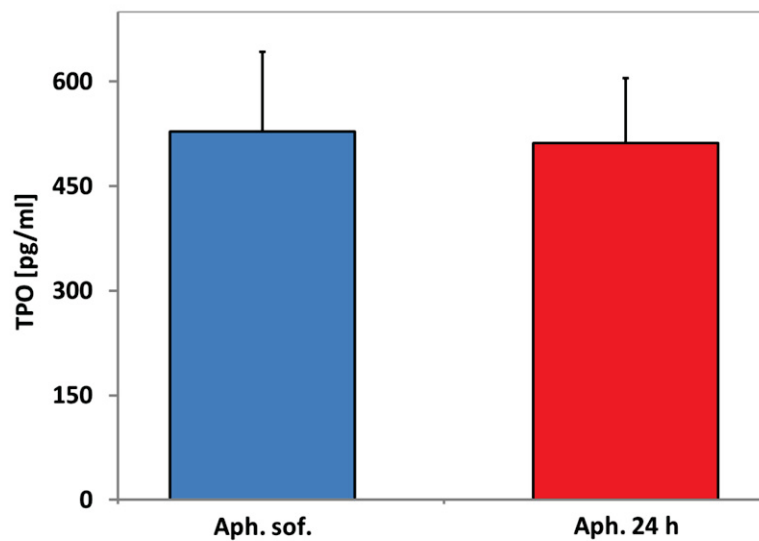


Abb. 19: **Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Stammzellapheresat nach autologer peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=8). n. s.

Bei leicht abnehmender Tendenz und sehr hohem TPO-Niveau zeigt sich keine signifikante Veränderung der Thrombopoetinspiegel während der Lagerung des Apheresates (Abb. 19). Die Konzentration von Thrombozyten im Apheresat beträgt gemittelt 661,1/nl.

3.3.2 Thrombopoetin im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese bei allogenen Spendern

Im peripheren Blut der allogenen Spender fällt ein im Vergleich zu den autologen Spendern deutlich niedrigeres TPO-Niveau auf. Nach dem Ende der allogenen Blutstammzellapherese mit einer gemittelten Apheresedauer von 237 Minuten zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Thrombopoetinspiegel im peripheren Blut der Spender (Abb. 20).

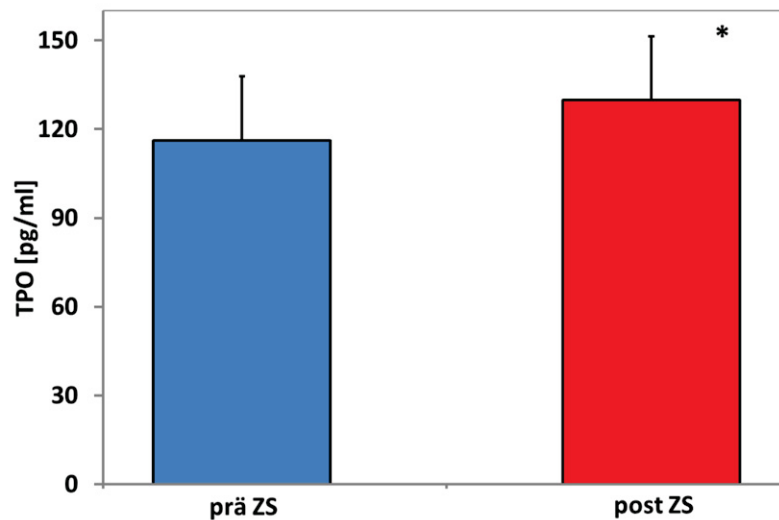


Abb. 20: **Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=6). * $p < 0,05$; Signifikant beim Vergleich der Werte prä ZS und post ZS.

Abbildung 21 zeigt das gegenläufige Verhalten der Thrombozytenkonzentration mit einem zum Ausgangswert signifikanten Abfall im peripheren Blut nach der Blutstammzellapherese.

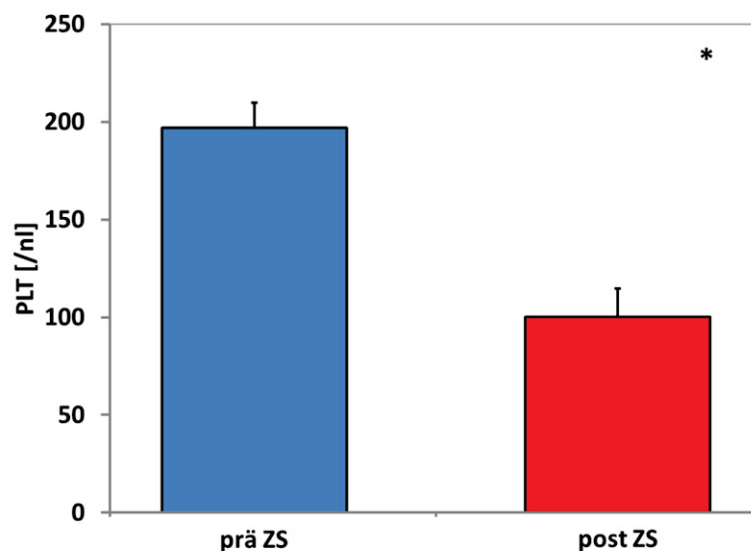


Abb. 21: **Thrombozytenkonzentration (PLT/nl) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=6). * $p < 0,05$; Signifikant beim Vergleich der Werte prä ZS und post ZS.

Ein signifikanter Anstieg der Thrombopoetinspiegel lässt sich auch im Stammzellprodukt nach der definierten Lagerungsdauer feststellen. Bei einer Ausgangskonzentration von 58 pg/ml kommt es nach 24-stündiger Lagerung bei 4 °C zu einer um ca. den Faktor 2,8 gesteigerten Thrombopoetinfreisetzung auf 164 pg/ml (Abb. 22). In den Apheresaten befinden sich gemittelt 1280 Thrombozyten pro Nanoliter.

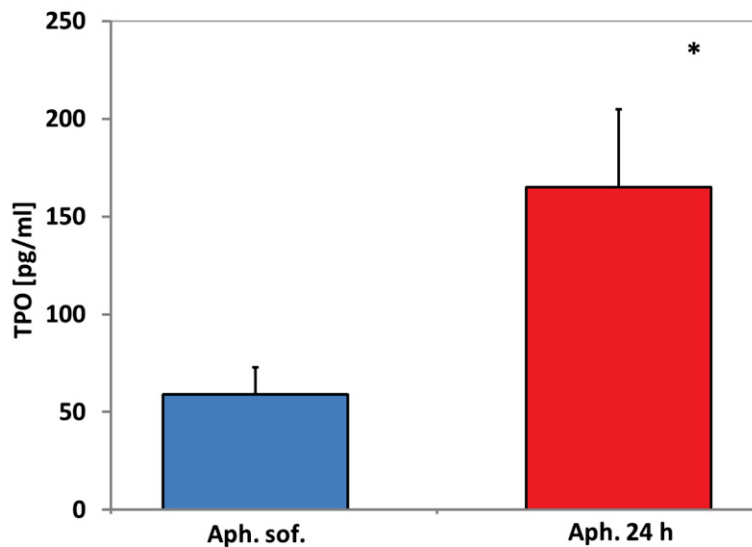


Abb. 22: Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Stammzellapheresat nach allogener peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=6). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte aus dem Aph. sof. und dem Aph. 24 h.

3.3.3 Thrombopoetin im Rahmen der Knochenmarkspende

Abbildung 23 zeigt, dass es im Verlauf der Knochenmarkspende zu einem kontinuierlichen Anstieg der Thrombopoetinkonzentration im peripheren Blut der allogenen Spender mit größter Veränderung direkt im Anschluss an die Operation kommt.

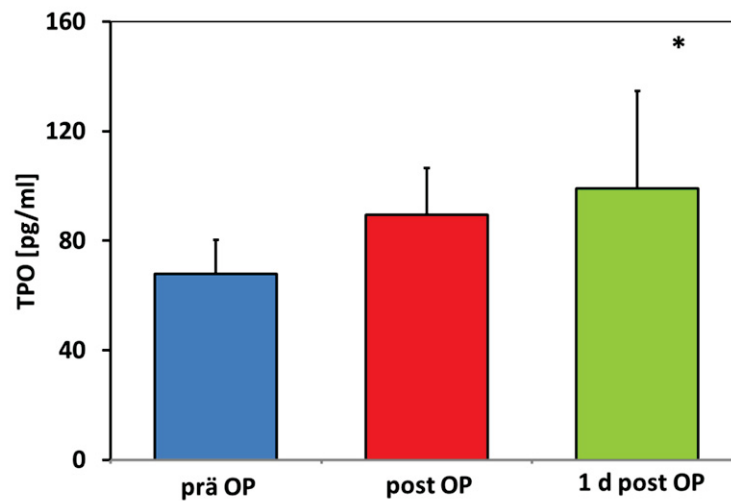


Abb. 23: Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). * $p < 0,05$; Signifikant beim Vergleich der Werte prä OP und post OP sowie prä OP und 1 d post OP.

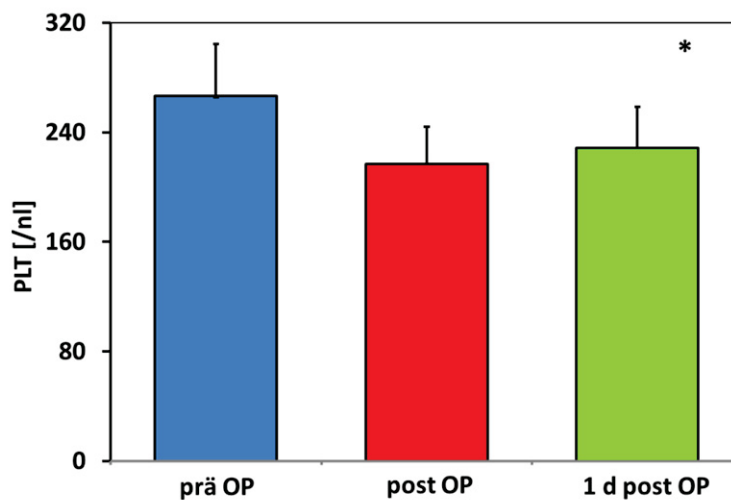


Abb. 24: Thrombozyten (PLT/nl) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). * $p < 0,05$; Signifikant beim Vergleich der Werte prä OP und post OP sowie prä OP und 1 d post OP.

Im Vergleich mit dem Ausgangswert einen Tag vor der Operation zeigt sich unmittelbar nach der Knochenmarkentnahme ein signifikanter Abfall der Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut der Spender. Mit einem Tag Abstand zum Eingriff kommt es bereits zu einer Erholung der Thrombozytenkonzentration (Abb. 24).

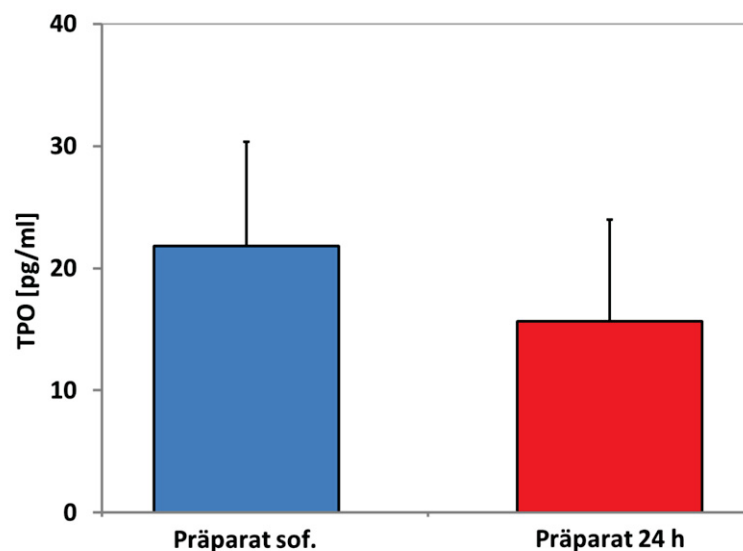


Abb. 25: **Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende (Präparat sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Präparat 24 h).** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=5). n. s.

In Abbildung 25 zeigt sich ein im Vergleich zu den Apheresaten geringes TPO-Niveau in den Knochenmarkpräparaten. Innerhalb der Lagerungszeit von 24 Stunden zeigt sich ein tendenzieller, nicht signifikanter Abfall der TPO-Konzentration. Im Stammzellpräparat befinden sich gemittelt 107 Thrombozyten pro Nanoliter.

Abbildung 26 vergleicht die Thrombopoetinspiegel im Knochenmark und peripheren Blut miteinander. Es zeigt sich eine geringere Konzentration von TPO im Knochenmarkblut als im peripheren Blut.

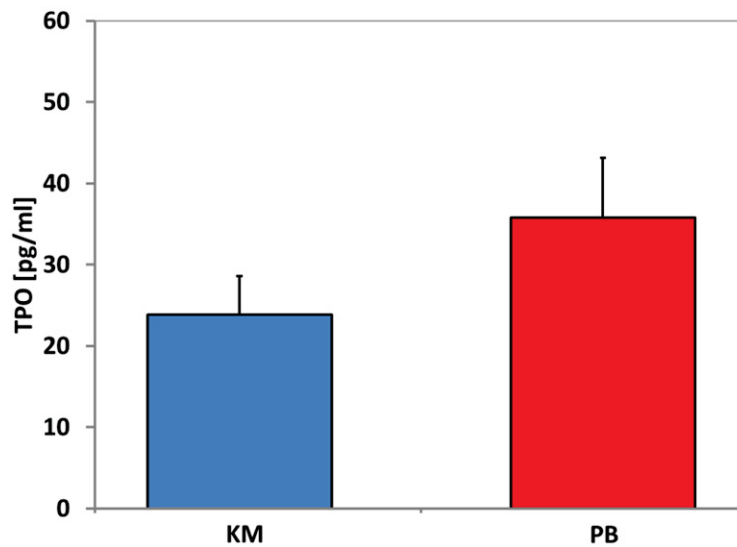


Abb. 26: Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Knochenmark (KM) sowie im peripheren Blut (PB). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=10). n. s.

3.3.4 Zellsortierung

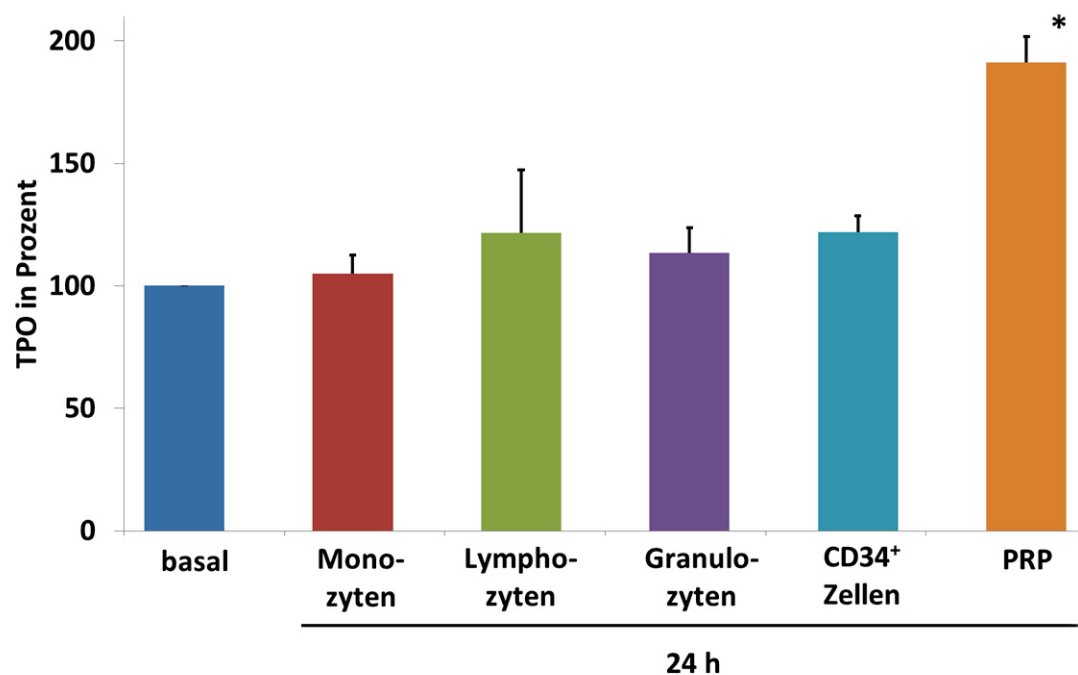


Abb. 27: Thrombopoetin (TPO) in Prozent zum Basalwert (PRP aus dem Aph. sof.) in den jeweiligen Zellsuspensionen Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten und CD34⁺-Zellen sowie dem PRP nach 24 stündiger Lagerung bei 4 °C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=3). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich des Basalwertes und dem PRP nach 24 h Lagerung.

Im Vergleich zur TPO-Konzentration im plättchenreichem Plasma aus dem Apheresat im Anschluss an die Stammzellspende ohne Lagerungszeit (Basalwert ,100 %) zeigt sich in allen hergestellten Zellsuspensionen nach der definierten Lagerungszeit von 24 h prozentual eine vermehrte Thrombopoetinfreisetzung. Ein signifikanter Anstieg um nahezu das Doppelte des Ausgangswertes zeigt sich im PRP nach 24-stündiger Lagerungszeit (Abb. 27).

Abbildung 28 zeigt die Thrombopoetinspiegel der einzelnen Zellsuspensionen in absoluter Relation zum Basalwert mit auch hierbei ersichtlichem Anstieg nach der Lagerungszeit in allen Zellsuspensionen, vor allem aber im PRP.

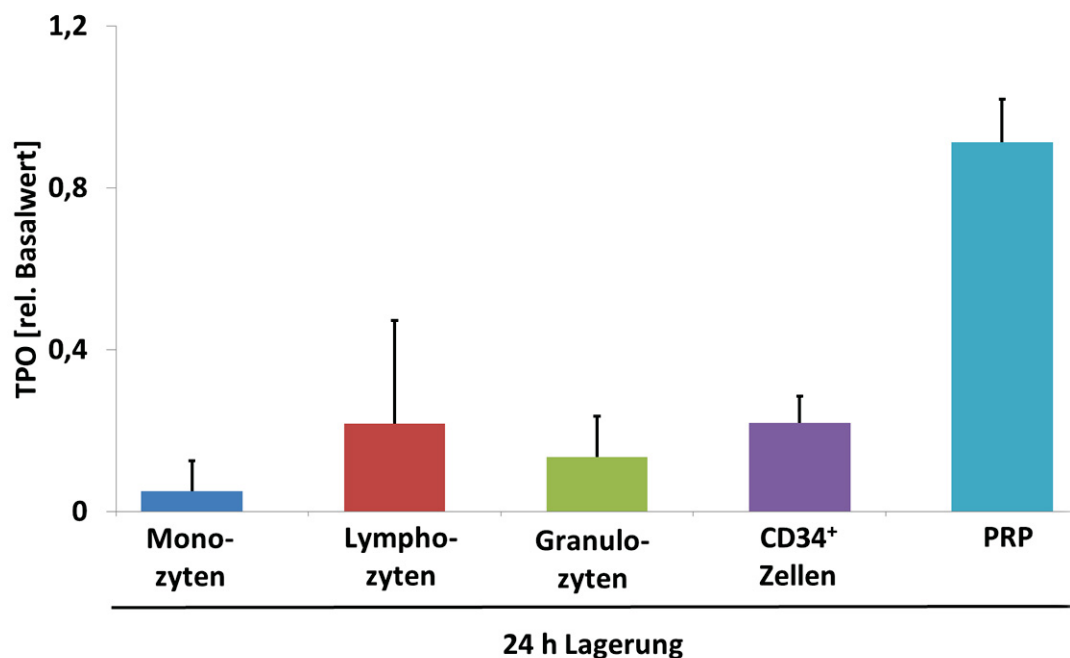


Abb. 28: Thrombopoetin in absoluter Relation zum Basalwert (PRP aus dem Aph. sof.) bei den verschiedenen Zellsuspensionen Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten, CD34⁺-Zellen sowie dem PRP nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=3).

3.3.5 Temperaturabhängige TPO-Clearance

Abbildung 29 zeigt den Einfluss des Temperaturniveaus auf die TPO-Clearance mit signifikant höherer TPO-Elimination pro Stunde bei 37 °C.

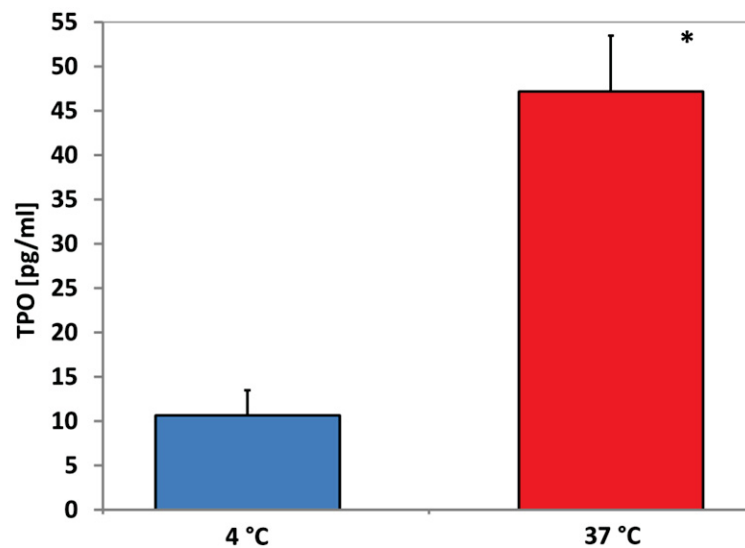


Abb. 29: Thrombopoetin (TPO)-Clearance (pg/ml) pro Stunde bei unterschiedlichen Temperaturniveaus, 4 °C und 37 °C. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n=3). *p<0,05; Signifikant beim Vergleich der Werte bei 4 °C und bei 37 °C.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden Konzentrationen sowie Konzentrationsverläufe der drei Zytokine CD40L, EPO und TPO im Rahmen der hämatopoetischen Stammzellspende untersucht. Hierbei werden die Stammzellen durch periphere Blutstammzellapherese und durch Knochenmarkspende gewonnen. Die Zytokine werden im peripheren Blut der Spender sowie in den Stammzellprodukten nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden bei 4 °C gemessen. Ergänzend erfolgen für CD40L Untersuchungen zur Freisetzungskinetik bei G-CSF-stimulierten Spendern sowie Dilutionsversuche. Im Rahmen der TPO-Messungen werden Zellsortierungsversuche sowie Versuche zur temperaturabhängigen TPO-Elimination unternommen. Im Anschluss erfolgt vor dem Hintergrund relevanter Literatur eine kritische Betrachtung der Ergebnisse gegliedert nach den einzelnen Zytokinen.

4.1 CD40L

Im peripheren Blut der allogenen Spender beträgt die gemittelte Thrombozytenkonzentration 238/nl. Dies deckt sich mit den Angaben aus der Literatur, wo physiologische Thrombozytenzahlen von 150.000 bis 400.000 pro Mikroliter, entsprechend 150 bis 400 pro Nanoliter, angegeben werden. [61] CD40L-Konzentrationen in gesunden Kontrollgruppen finden sich in der Literatur mit 25 pg/ml +/- 40 pg/ml [62], 290 pg/ml +/- 340 pg/ml [63] bis hin zu 380 pg/ml +/-500 pg/ml [64]. Im peripheren Blut der allogenen Spender liegt die Konzentration von CD40L mit 127 pg/ml somit im physiologischen Bereich.

Die Arbeiten von Andre P. et al. sowie Danese S. et al. zeigen, dass Thrombozyten die Hauptquelle für CD40L im peripheren Blut darstellen. [27, 66] Als genaue Lokalisierung innerhalb der Thrombozyten werden die α -Granula bestätigt. [67] Die geschilderten Zusammenhänge spiegeln sich in den vorliegenden Ergebnissen wider. Durch die periphere Blutstammzellapherese kommt es zu einem 47-prozentigem Verlust an Thrombozyten im Blut der allogenen Blutstammzellspender. Mit 49 % zeigt sich die prozentuale Abnahme der CD40L-Konzentration im peripheren Blut nach der Blutstammzellspende nahezu identisch (vgl. 3.1.1).

Der direkte Zusammenhang zwischen Thrombozytenkonzentration und CD40L-Freisetzung wird auch durch die erfolgten Dilutionsversuche unterstrichen, wo eine Halbierung der Thrombozytenzahl zu einer Abnahme der CD40L-Freisetzung auf die Hälfte des Vergleichswertes führt (vgl. 3.1.4).

Der thrombozytären CD40L-Freisetzung liegen im Wesentlichen zwei Mechanismen zu Grunde. Auf der einen Seite kann für Thrombozytenkonzentrate gezeigt werden, dass es im Rahmen der Herstellung sowie Lagerung zu einer partiellen Aktivierung der Thrombozyten kommt. [68, 69] Die partielle Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer vermehrten Expression des membrangebundenen CD40-Liganden (CD154). Dieser Prozess der Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran und Präsentation des membrangebundenen Liganden dauert lediglich Sekunden bis Minuten. [70] In der Folge wird CD40L enzymatisch durch die MMP-2 [71] sowie die MMP-9 [72] abgespalten. Prasad et al. zeigen, dass CD40L wiederum agonistische Effekte auf die Thrombozytenaktivierung hat, so dass der Effekt der CD40L-Freisetzung verstärkt wird. [73] Andererseits ist die CD40L-Freisetzung in Folge einer Zelllyse der Thrombozyten denkbar.

In den durch periphere Blutstammzellapherese gewonnenen Stammzellprodukten zeigen die Messergebnisse, dass es bereits während der Apherese innerhalb einer gemittelten Laufzeit von 195 Minuten zu einer vermehrten CD40L-Freisetzung in das Apheresat kommt. Die CD40L-Konzentration zu Beginn der Lagerung des Apheresates ist signifikant höher als im peripheren Blut vor der Blutstammzellspende. Die Freisetzung von CD40L in das Apheresat pro Minute beträgt während der Apherese 2,42 at/min und ist damit mehr als doppelt so hoch wie im anschließend bei 4 °C gelagerten Stammzellapheresat (0,99 at/min). Auch die Korrelation mit den Thrombozytenzahlen zeigt eine wesentlich schnellere CD40L-Freisetzung in das Apheresat schon während der Apherese (0,11 at/PLT/h) als im fertigen Stammzellprodukt (0,04 at/PLT/h). Demnach scheint es bereits im Rahmen des Aphereseprozesses zu einer vermehrten Aktivierung und/oder Lyse der Thrombozyten zu kommen. Aufgrund des Zellseparationsprozesses kommt es im Apheresat zu einer deutlich höheren Thrombozytenkonzentration als im peripheren Blut der Spender (1992/nl vs. 238/nl im peripheren Blut). Bei Vorhandensein einer großen CD40L-Quelle sowie möglichen weiteren aktivierenden und/oder schädigenden Einflüssen auf die Thrombozyten kommt

es auch innerhalb der Lagerungszeit von 24 h bei 4 °C zu einer signifikanten Akkumulation von CD40L im Apheresat.

Die Beobachtungen aus den Apheresaten lassen sich teilweise auch auf die durch Knochenmarkspende gewonnenen Präparate anwenden. Bereits zu Beginn der Lagerung weist das durch Knochenmarkspende gewonnene Präparat im Vergleich zum Apheresat deutlich höhere CD40L-Konzentrationen auf. Trotz deutlich niedrigerer Thrombozytenzahlen kommt es auch hier zu einem signifikanten Anstieg der CD40L-Konzentration im Rahmen der Lagerung des Präparates. Die Tatsache der hohen CD40L-Konzentration zu Beginn der Lagerung sowie der weiteren signifikanten CD40L-Freisetzung innerhalb der Lagerungsdauer trotz verhältnismäßig geringer Thrombozytenzahlen führt zu der Vermutung, dass auch die im Knochenmark vorhandenen Zellen, insbesondere die Megakaryozyten, als CD40L-Quelle dienen. Zusätzlich scheint die Stammzellgewinnung im Rahmen des operativen Eingriffs äquivalent zum Aphereseprozess zu einer Aktivierung der Thrombozyten und/oder zu einer Zelllyse zu führen. Dies wird deutlich, wenn man die CD40L-Freisetzung während der Operation mit der Freisetzung im fertigen Präparat vergleicht. Bei einer pauschalisierten OP-Dauer von 150 Minuten wird im Laufe der Operation (gemessen als Differenz aus peripherem Blut vor der OP und Präparat zu Beginn der Lagerungszeit) 190 pg/ml/h CD40L in das Präparat abgegeben, während in der anschließenden Lagerungsdauer lediglich 23 pg/ml/h CD40L im Stammzellprodukt akkumulieren.

Die Entdeckung der für die proteolytische Abspaltung von CD40L verantwortlichen Matrix-Metalloproteinasen geschah in der Vergangenheit durch deren Inhibierung. [71, 74] Die Versuche zur Kinetik der CD40L-Freisetzung im PPP und PRP bei G-CSF-stimulierten sowie nicht-stimulierten Spendern verfolgen einen anderen Ansatz. G-CSF stimuliert den G-CSF-Rezeptor, woraufhin es u.a. zur Ausreifung, Apoptose-Inhibierung und letztlich funktioneller Aktivierung der Granulozyten kommt. [75, 110] Im Rahmen von Untersuchungen zur COPD werden Granulozyten als Hauptquelle für MMP-9 beschrieben. [77] Die Verabreichung des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF sorgt somit über eine Erhöhung der Granulozytenkonzentration für eine vermehrte Expression der für die CD40L-Abspaltung verantwortlichen proteolytischen Enzyme MMP-2 und MMP-9. [78, 79] Darüber hinaus sezernieren auch CD 34⁺-Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren die o.g. proteolytischen Enzyme. [80] Die

erhobenen Messergebnisse bestätigen, dass in Anwesenheit großer Thrombozytenzahlen wie im PRP deutlich mehr CD40L freigesetzt wird als im PPP. So beträgt die gemessene CD40L-Konzentrationssteigerung pro Minute bei unstimulierten Spendern 0,62 at/min im PPP und ist im PRP mit 1,57 at/min mehr als doppelt so hoch. Unter zusätzlicher Bereitstellung einer hohen proteolytischen Aktivität durch G-CSF-Stimulation zeigen sich die höchsten CD40L-Umsätze mit 1,83 at/min im PPP und 2,86 at/min im PRP. Der Einfluss der Stimulation zeigt sich besonders bei Betrachtung der Korrelation mit den Thrombozytenzahlen. Im PRP unstimulierter Spender beträgt die CD40L-Steigerung pro Minute pro Plättchen 0,004 at/PLT/min, im PRP von stimulierten Spendern kann dieser Wert auf 0,01 at/PLT/min gesteigert werden (vgl. Abb. 4 und Abb. 5).

Blumberg et al. stellen 2006 erstmalig eine Verbindung zwischen CD40L und febrilen und allergischen Transfusionszwischenfällen nach Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten her. [81] Bei 8 von 12 Patienten mit einem dokumentierten TRALI lassen sich erhöhte Plasmakonzentrationen von CD40L nach der Transfusion nachweisen. Erhöhte Konzentrationen von CD40L im Transplantat werden somit als Kofaktor bei der Entwicklung eines TRALI diskutiert. [30] Die Inhibierung von CD40L oder die Blockade der Rezeptor-Ligand-Interaktion wird als möglicher Ansatzpunkt zur Reduktion von Transfusionszwischenfällen bei prädisponierten Patienten angeführt. [82]

CD40L hat immunmodulatorische, proinflammatorische sowie prothrombotische Eigenschaften. Es ist beteiligt an der Entstehung der Atherosklerose und wirkt darüber hinausgehend plaquedestabilisierend. [83, 84, 85, 86] Ebenso werden über CD40L vermittelte endotheliale Dysfunktionen beschrieben. [87] Erhöhte CD40L-Spiegel werden bei Patienten mit einer akuten Lungenembolie gemessen. [88] Zudem kann eine Beteiligung des CD40/CD40L-Systems am Pathomechanismus des akuten Koronarsyndroms nachgewiesen werden. [28, 65, 89, 90]

Die proinflammatorische Bedeutung zeigt sich in erhöhten Konzentrationen beim systemischen Lupus erythematodes [62, 63], bei chron. entzündlichen Darmerkrankungen [91] sowie bei der rheumatoiden Arthritis [92, 93].

Für verschiedene Blutkomponenten wird eine Akkumulation von CD40L im Rahmen der Herstellung sowie der anschließenden Lagerung berichtet. In

Thrombozytenkonzentraten können erhöhte Konzentrationen für CD40L nachgewiesen werden. [94] Wenzel et al. zeigen eine deutliche Konzentrationserhöhung für CD40L sowohl in gepoolten Thrombozytenkonzentraten als auch in Thrombozytenapheresekonzentraten im Rahmen der Lagerung. [95] Zudem können S.Y. Khan et al. einen Anstieg der CD40L-Konzentration auch in der Plasmafraktion von Vollblut sowie in Erythrozytenkonzentraten mit höchster Konzentration in Thrombozytenkonzentraten nachweisen. [30]

Die zitierte Literatur beschreibt erhöhte CD40L-Konzentrationen in Blutprodukten im Rahmen der Herstellung sowie der Lagerung. Zudem wird CD40L wesentliche Bedeutung als prothrombotischer sowie proinflammatorischer Mediator zugeschrieben, welcher mitverantwortlich für Transfusionsreaktionen gemacht wird. Die vorliegende Arbeit kann den direkten Zusammenhang zwischen CD40L-Freisetzung und Thrombozytenkonzentration bestätigen. Während Wenzel F. et al. einen Trend zur CD40L-Freisetzung in autologen Stammzellpräparaten nachweisen [33], zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es in allogenen Blutstammzellprodukten innerhalb der definierte Lagerungsdauer sowohl nach peripherer Blutstammzellapherese als auch nach Knochenmarkspende zu einem signifikanten Anstieg der CD40L-Konzentration kommt. Hierbei kommt es, mutmaßlich in Folge einer Aktivierung der Thrombozyten oder einer Thrombozytolyse, vor allem während der Apherese bzw. im Verlauf der Operation zu einer vermehrten CD40L-Freisetzung in das Stammzellprodukt. Zudem kann der Einfluss der G-CSF-Stimulation über eine vermehrte Bereitstellung der proteolytischen Aktivität auf die CD40L-Freisetzung demonstriert werden.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass die Transplantation des Stammzellproduktes vor allem nach einer längeren Lagerung mit einer Einschwemmung von CD40L in den Empfängerorganismus einhergeht. Dies kann unter prädisponierenden Faktoren adverse Effekte im Empfänger-Organismus mitverursachen. Die vorliegenden Ergebnisse repräsentieren lediglich einen Lagerungszeitraum von 24 Stunden, während allogene Stammzellprodukte bis zu 72 Stunden bei 4 °C gelagert werden dürfen. Hier ergibt sich weiterer Forschungsbedarf über die gesamte mögliche Lagerungszeit.

4.2 Erythropoetin

Bei in der Literatur angegebenen physiologischen Hämoglobin-Konzentrationen von 12-16 g/dl für Frauen und 14-18 g/dl für Männer [96] zeigen sich die im peripheren Blut der allogenen Spender gemessenen Hämoglobinwerte normwertig. Laut WHO-Definition spricht man ab einem Hämoglobinwert von unter 12 g/dl bei Frauen sowie unter 13 g/dl bei Männern von einer Anämie. [97] Demnach befinden sich die autologen Spender in einer anämen Situation. Die EPO-Konzentration zeigt bei gesunden Personen stabile Plasmaspiegel und liegt bei 10-25 U/l. [38] Eine vermehrte Freisetzung von EPO aus renalen peritubulären interstitiellen Fibroblasten und somit Stimulation der Erythropoese erfolgt als Reaktion auf hypoxische Zustände. [35, 36, 98]

Durch die präexistente Anämie der autologen Spender ist der Hypoxiereiz bereits vor der peripheren Blutstammzellspende vorhanden und führt zu einer deutlichen Erhöhung der EPO-Spiegel auf nahezu das Dreifache des physiologischen Wertes. Bei geringem, nicht signifikantem weiterem Abfall des Hämoglobin-Wertes durch die Blutstammzellspende zeigt EPO eine gering steigende Tendenz.

Bei physiologischen Hämoglobinwerten im peripheren Blut der allogenen Spender vor sowie nach der Apherese und bei ausbleibendem Hypoxiereiz im Rahmen des Zellseparationsprozesses zeigt sich erwartungsgemäß keine signifikante Veränderung im Verhalten des Erythropoetins; es bleibt innerhalb der physiologischen Grenzen.

Die genauen Mechanismen zur Elimination von EPO aus dem Plasma bleiben derzeit noch weitestgehend unbekannt. Frühere Annahmen, dass eine organbezogene Elimination durch Leber und Niere erfolgt, können widerlegt werden. [99, 100] Nur ein geringer Anteil von EPO wird über den Urin ausgeschieden. [101] Ein wesentlicher Faktor der EPO-Elimination scheint die Rezeptor-Ligand-Interaktion mit EPO-R tragenden Zellen zu sein, wobei es durch Endozytose zu einer Internalisierung kommt, auf welche der lysosomale Abbau folgt. [102] Die Zielstruktur der lysosomalen Protease Cathepsin L ist eine $\alpha 3$ - $\alpha 4$ inter-helikale Loopregion im EPO-Molekül. [103] Glaspy J. et al. zeigen eine deutlich verminderte EPO-Clearance nach Chemotherapie bzw. myoablativer Therapie, wodurch die Rolle des Knochenmarks mit seinen EPO-R tragenden Zellen in der EPO-Elimination bekräftigt wird. [104] In Tierversuchen zeigt sich über eine geänderte EPO-Molekularstruktur und somit veränderte Rezeptorbindungseigenschaften, dass auch Rezeptor-unabhängige Wege zur EPO-

Elimination beitragen. [105] Somit scheint die EPO-Elimination durch Internalisierung ein wichtiger, aber nicht der einzige Mechanismus zum Abbau des Erythropoetins zu sein.

In den Apheresaten nach autologer und allogener peripherer Blutstammzellapherese sind aufgrund des o.g. Regulationsmechanismus keine signifikanten EPO-Anstiege zu erwarten gewesen. Die EPO-Konzentration in den durch periphere Blutstammzellapherese gewonnenen Apheresaten bleibt innerhalb der Lagerungszeit von 24 Stunden weitestgehend konstant. In den durch Knochenmarkspende gewonnenen Präparaten fällt ein im Vergleich zu den Apheresaten niedrigerer EPO-Spiegel auf, was mit der Internalisierung durch EPO-R tragende Zellen im Knochenmark erklärt werden kann. Entsprechend der Apheresate nach peripherer Blutstammzellapherese zeigen auch die durch Knochenmarkspende gewonnenen Präparate keine signifikante Veränderung der EPO-Spiegel im Rahmen der Lagerung.

Während ein Anstieg der EPO-Spiegel innerhalb der Lagerungsdauer nicht zu erwarten gewesen ist, führt die Tatsache der fehlenden Abnahme der EPO-Konzentration zu der Hypothese, dass EPO im Apheresat bzw. Präparat auf Bedingungen trifft, welche die EPO-Elimination stören. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Halbwertszeit von EPO im Plasma ca. 7-8 Stunden. [39] Ursächlich für die gestörte EPO-Clearance im Rahmen der Lagerungsdauer von 24 h kann einerseits die Temperatur andererseits das umgebende Zellmilieu sein.

Im peripheren Blut der Knochenmarkspender zeigt sich das Hämoglobin präoperativ im unteren Normbereich, entsprechend liegt die EPO-Konzentration im oberen physiologischen Bereich. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Abfall der EPO-Spiegel im Anschluss an die Operation bei, durch den Blutverlust bedingtem, signifikantem Abfall des Hämoglobins. Die Knochenmarkspende selbst scheint also entweder durch die Immobilität der Spender und/oder durch die Narkose trotz eines signifikanten Hämoglobin-Abfalls zu keiner vermehrten EPO-Produktion zu führen. Erst mit einem Tag Verzögerung und damit der Mobilisierung der Spender steigt die EPO-Konzentration im peripheren Blut auf mehr als das Doppelte des oberen Grenzbereichs an. Dieser Sachverhalt kann damit erklärt werden, dass einerseits die Narkose durch die Immobilität der Spender sowie durch die verwandten Narkotika die Zellaktivität verringert und damit den Sauerstoffverbrauch reduziert. Andererseits

herrscht im Rahmen der Narkose/Operation ein mutmaßliches Überangebot an O₂ durch maschinelle Beatmung im Rahmen der Allgemeinanästhesie sowie O₂-Verabreichung im Rahmen der Regionalanästhesie. Beide Faktoren führen zu einem normalen oder sogar hohen Sauerstoffpartialdruck und verhindern somit einen Hypoxiereiz im Spender. Tanake T. et al. untersuchen zudem den Einfluss der Allgemeinanästhesie auf die EPO-Produktion in murinen Gehirnen. Hierbei zeigt sich, dass die Allgemeinanästhesie (Isoflurane, Sevofluran, Halothan, N₂O, Phentobarbital, Ketamin, und Propofol) die Akkumulation des HIF-2 α Proteins in Astrozyten selbst unter hypoxischen Zuständen unterdrückt und somit zu einer signifikant geringeren EPO-Produktion führt. [106] Weiterhin wird eine vermehrte EPO-Produktion als Reaktion auf hypoxische Zustände bereits innerhalb von 30 Minuten gemessen. [76] Der Faktor Zeit kann also nicht als alternativer Erklärungsversuch für den fehlenden EPO-Anstieg nach der Knochenmarkspende in Betracht gezogen werden.

Die EPO-Konzentrationen im peripheren Blut der Spender folgen im Wesentlichen physiologischen Grenzen. Bemerkenswert sind die stabilen EPO-Spiegel im Rahmen der Lagerung der Stammzellprodukte sowie die inhibierenden Einflüsse der Knochenmarkspende auf die EPO-Freisetzung.

4.3 Thrombopoetin

TPO ist der Hauptregulator der Thrombozytopoese [53], welcher nach hauptsächlich hepatischer Produktion mit einer konstanten Rate in den Blutfluss abgegeben wird. Unter physiologischen Bedingungen wird der Großteil der produzierten TPO-Moleküle fortlaufend von mpl-Rezeptor-tragenden Zellen gebunden und nachfolgend internalisiert. Da der mpl-Rezeptor hauptsächlich auf Thrombozyten sowie auf Megakaryozyten und deren Vorläufern sitzt, besteht ein inverser Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und TPO-Konzentration. [55, 56] Für den Fall geringer Thrombozytenzahlen steigt die Konzentration von TPO aufgrund geringerer Internalisierung an und stimuliert konzentrationsabhängig die Thrombozytopoese im Knochenmark. [60]

Erwartungsgemäß befindet sich die Thrombopoetinkonzentration im thrombozytopenen peripheren Blut der autologen Blutstammzellspender deutlich oberhalb der in der Literatur angegebenen Normwerte von 20-240 pg/ml. [57, 58] Trotz weiterem

signifikanten Abfall der Plättchenzahlen nach Ablauf der Apherese zeigt sich in Anbetracht des bereits hohen TPO-Niveaus mit Werten oberhalb von 800 pg/ml keine signifikante Veränderung der TPO-Spiegel.

Im peripheren Blut der allogenen Blutstammzellspender zeigt sich nach Ablauf der Blutstammzellapherese eine Abnahme der Thrombozytenzahl von vorher normwertigen Konzentrationen in den thrombozytopen Bereich. Entsprechend des o.g. Regulationsmechanismus kommt es in der Folge durch einen signifikanten TPO-Anstieg zu einem Reiz zur Thrombozytopoese im Spender.

Im peripheren Blut der Knochenmarkspender zeigt sich ein Anstieg des TPO, obwohl im Verlauf der Knochenmarkspende keine thrombozytopen Zustände erreicht werden. Dieser Sachverhalt lässt sich mit der Rolle von TPO als akute-Phase-Protein erklären. In akute-Phase-Situationen wie entzündlichen Prozessen, Infektionen oder Operationen wird, vermittelt durch Interleukin-6, die TPO-Produktion in Hepatozyten hochreguliert. Hierüber kann auch erklärt werden, dass im Fall einer reaktiven Thrombozytose nach Entzündungsprozessen der inverse Zusammenhang zwischen Thrombozytenkonzentration und TPO aufgehoben ist. [107, 108] Dieser Effekt der Entkopplung lässt sich auch mit einem Tag Abstand zur Operation beobachten, wo es trotz leichtem Anstieg der Plättchenzahlen zu einem weiteren Anstieg von TPO im peripheren Blut kommt.

In den Arbeiten von Wenzel F. et al. zeigt sich für Thrombozytenapheresepräparate, dass die TPO-Spiegel bereits während der Apherese auf ein Zehntel der Konzentration im peripheren Blut fallen. Nach 24-stündiger Lagerung unter standardisierten Lagerungsbedingungen sind die TPO-Spiegel unter die Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Tests gefallen. [31]. Der Abbau von TPO erfolgt weder proteolytisch im Plasma noch durch membrangebundene Proteasen. Der einzige Mechanismus zur Elimination von TPO ist die Internalisierung durch mpl-Rezeptor-tragende Zellen. Dies sind im Wesentlichen Megakaryozyten und Thrombozyten, aber auch weitere CD34⁺-Zellen. Hierbei kommt es nicht zur Neusynthese oder zum Wiederverwerten genutzter mpl-Rezeptoren. [55]

Demgegenüber stehen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse, welche im Apheresat nach autologer peripherer Blutstammzellspende bei 661/nl Thrombozyten lediglich einen minimalen Abfall der TPO-Konzentration innerhalb der Lagerungsdauer von 24

Stunden zeigen. Im Apheresat nach allogener Blutstammzellspende zeigt sich trotz hoher Thrombozytenkonzentration von 1280/nl sogar ein signifikanter Anstieg um mehr als das Doppelte des Ausgangswertes. Die TPO-Konzentration im Knochenmarkpräparat liegt weit unterhalb derjenigen im Apheresat nach peripherer Blutstammzellapherese und zeigt auch nach der Lagerungszeit bei tendenzieller Abnahme keine signifikante Veränderung. Der generell geringere TPO-Gehalt im Knochenmark kann auch im Vergleich mit dem peripheren Blut bestätigt werden (vgl. Abb. 26). Aufgrund der o.g. Expression des mpl-Rezeptors ist dieser Sachverhalt mit der vermehrten Internalisierung von TPO durch Megakaryozyten, deren Vorläufer sowie andere CD34⁺-Zellen zu erklären. [55]

Da die Internalisierung durch mpl-Rezeptor-tragende Zellen, wie bereits geschildert, der einzige Weg zur Elimination von TPO ist, scheint diese im Stammzellapheresat sowie im Knochenmarkpräparat und unter den gewählten Lagerungsbedingungen gestört zu sein. Dies wird auch durch die durchgeführten Messungen zur temperaturabhängigen TPO-Clearance im Kapitel 3.3.5 deutlich. Im Einklang mit den Ergebnissen aus den Apheresaten und Präparaten zeigt sich eine deutlich verminderte TPO-Elimination bei 4 °C, wohingegen die TPO-Clearance in 37 °C Umgebungstemperatur bei 47 pg/ml pro Stunde liegt.

Klinger MH. et al. machen als subzelluläre Lokalisierung für TPO das thrombozytäre Zytoplasma sowie das SCCS (*surface connected canalicular system*) aus. Zusätzlich werden in Thrombozytenkonzentraten Aktivierungsversuche mit Thrombin sowie Lysierungsversuche durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen unternommen. Im Vergleich zum unstimulierten Plättchenkonzentrat (100 %) kann nach Aktivierung mit Thrombin eine Steigerung der TPO-Freisetzung um 535 % sowie um 1625 % nach Lysierung erreicht werden. [109] In Anbetracht dieser Ergebnisse ist die Steigerung der TPO-Konzentration im Apheresat nach allogener peripherer Blutstammzellapherese entweder mit einer vermehrten Zelllyse oder aber ablaufender Aktivierung der Plättchen zu erklären. Die Untersuchungen zur Zellsortierung stützen die These, dass erhöhte TPO-Konzentrationen in den Apheresaten wesentlich auf eine Thrombozytolyse oder Thrombozytenaktivierung zurückzuführen sind. Im Gegensatz zum PRP werden weder in der Lymphozyten-, der Monozyten- noch in der CD 34⁺-Suspension signifikante Mengen TPO nach der Lagerungsdauer von 24 Stunden freigesetzt.

Als, die Thrombozytopoese regulierendes, Zytokin zeigt die TPO-Konzentration im peripheren Blut der Spender ein inverses Verhältnis zur Thrombozytenzahl. Die Rolle von TPO als akute-Phase-Protein wird im Rahmen der Knochenmarkspende in der Entkopplung von der Thrombozytenkonzentration deutlich. Im Gegensatz zum zitierten TPO-Verhalten in Thrombozytenapheresekonzentraten kommt es weder in den peripheren Blutstammzellapheresaten noch in den Präparaten nach Knochenmarkspende zu einem signifikanten Abfall der TPO-Spiegel im Rahmen der Lagerung. Dies kann mit der gestörten Internalisierung durch mpl-Rezeptor-tragende Zellen bei 4 °C erklärt werden. Darüber hinaus kommt es im gelagerten Apheresat nach allogener Stammzellspende sogar zu einem signifikanten Anstieg der TPO-Konzentration, wobei die Thrombozyten als TPO-Quelle im Rahmen der Zellsortierungsversuche bestätigt werden können.

5. Zusammenfassung

Die HSZT ermöglicht einen häufig kurativen Therapieansatz bei einer Reihe maligner sowie nicht-maligner Erkrankungen. Die vorliegende Arbeit untersucht das Verhalten der die Hämatopoese regulierenden Zytokine –Erythropoetin und Thrombopoetin– sowie von CD40L im Rahmen der peripheren Blutstammzellapherese und der Knochenmarkspende. Hierbei werden Konzentrationsänderungen im peripheren Blut der Spender sowie im Stammzellprodukt nach einer Lagerung von 24 Stunden bei 4 °C gemessen. Ergänzend erfolgen für CD40L Messungen zur Freisetzungskinetik unter G-CSF-Stimulation sowie für TPO Untersuchungen zur temperaturabhängigen *Clearance* und Versuche zur Zellsortierung im Stammzellprodukt.

CD40L als Spaltprodukt des membrangebundenen Liganden CD154 wird als proinflammatorischer, immunmodulatorischer und prothrombotischer Mediator in Verbindung mit Transfusionszwischenfällen, chronisch-entzündlichen Geschehen und Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom gebracht. Die Thrombozyten stellen im peripheren Blut die Hautquelle für CD40L dar. Entsprechend zeigt sich nach der peripheren Blutstammzellapherese eine der Abnahme der Thrombozytenkonzentration proportionale Reduktion der CD40L-Spiegel im peripheren Blut der allogenen Spender. Es kann gezeigt werden, dass die Stimulation mit G-CSF über eine vermehrte Bereitstellung proteolytischer Aktivität zu einer, im Vergleich zu nicht-stimulierten Proben, signifikanten Zunahme der CD40L-Freisetzung führt. Thrombozyten sezernieren CD40L in Folge einer Aktivierung und/oder einer Zelllyse. Bereits durch die Stammzellgewinnung im Rahmen der Blutstammzellapherese sowie der Knochenmarkspende kommt es zu einer vermehrten CD40L-Freisetzung. Über die anschließende Lagerung kann eine weitere signifikante Akkumulation in den allogenen Stammzellprodukten beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit untersucht einen Lagerungszeitraum von 24 Stunden, während allogene Blutstammzellprodukte bis zu 72 Stunden nach Herstellung transplantiert werden dürfen. Unter prädisponierenden Faktoren sind adverse Effekte im Empfängerorganismus durch die CD40L-Einschwemmung nach der Stammzelltransplantation denkbar.

Eine EPO-Produktion durch renale peritubuläre interstitielle Fibroblasten wird als Reaktion auf hypoxische Zustände beobachtet. Der Hypoxiereiz im peripheren Blut der

autologen Spender entsteht durch die präexistente Anämie und zeigt sich in einer deutlichen Erhöhung der EPO-Konzentration, welche sich nach der Blutstammzellapherese unverändert zeigt. Im Rahmen der Knochenmarkspende können inhibierende Effekte der Narkose auf die EPO-Produktion trotz eines signifikanten Blutverlustes festgestellt werden. Aufgrund des EPO-Regulationsmechanismus sind in den Apheresaten und Präparaten keine Konzentrationsanstiege für EPO zu erwarten gewesen. Bei einer EPO-Halbwertszeit im Plasma von 7-8 Stunden zeigt sich in den gelagerten Stammzellprodukten keine signifikante Abnahme der EPO-Konzentration nach 24 Stunden. Unter der Annahme des wahrscheinlichsten Eliminationsweges für EPO, in Form der Rezeptor-Ligand-Interaktion mit nachfolgender Internalisierung, scheint diese unter den gewählten Lagerungsbedingungen gestört zu sein.

TPO ist der Hauptregulator der Thrombozytopoese und wird nach fortlaufend hepatischer Freisetzung von mpl-Rezeptor-tragenden Zellen internalisiert und somit abgebaut. Im peripheren Blut der Spender zeigt sich das inverse Verhältnis der TPO-Spiegel zur Thrombozytenkonzentration, welches im Rahmen der Knochenmarkspende durch die akute-Phase-Funktion des TPO aufgehoben ist. Während in der Literatur eine Abnahme der TPO-Spiegel in gelagerten Blutprodukten beschrieben wird, zeigt sich im allogenen Blutstammzellapheresat eine signifikante TPO-Akkumulation innerhalb der Lagerungszeit. Wie in den Zellsortierungsversuchen bestätigt wird, scheint eine ablaufende Aktivierung oder Lyse der Thrombozyten im Stammzellapheresat zu einer TPO-Freisetzung zu führen. Die geringe TPO-Elimination im Knochenmarkpräparat und autologen Stammzellapheresat kann durch die deutlich verminderte TPO-*Clearance* bei 4 °C erklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass sowohl die Herstellung als auch die Lagerung hämatopoetischer Stammzellen Einfluss auf das Verhalten der drei Zytokine CD40L, EPO und TPO hat. Während die Konzentrationen im peripheren Blut weitestgehend physiologischen Grenzen folgen, zeigt sich für CD40L eine signifikante Akkumulation im allogenen Blutstammzellapheresat und Knochenmarkpräparat im Rahmen der Lagerung.

Literaturverzeichnis

- 1 Kiefel V. Transfusionsmedizin und hämatologische Immunhämatologie 4. Auflage 2010: S. 18.
- 2 Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: an overview. Transfus Apher Sci. 2014 Dec;51(3):68-82.
- 3 Ljungman P et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. Bone Marrow Transplant. 2010 Feb; 45(2):219-234.
- 4 Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von hämatopoetischen Stammzellzubereitungen. Dtsch Arztebl 18. August 2014; DOI: 10.3238/arztebl.2014.rl_haematop_sz01.
- 5 Bron D. et al. Hematopoietic stem cells: source, indications and perspectives. Bull Mem Acad R Med Belg. 2002;157(1-2):135-145.
- 6 Ringdén O. et al. Faster engraftment of neutrophils and platelets with peripheral blood stem cells from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2000 May;25 Suppl 2: 6-8.
- 7 Boyiadzis M. et al. Haematopoietic stem cell transplantation: indications, clinical developments and future directions. Expert Opin Pharmacother. 2004 Jan;5(1):97-108.
- 8 Passweg JR. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. Bone Marrow Transplant. 2016 Jun;51(6):786-792.
- 9 Deutsches Register für Stammzelltransplantation, Jahresbericht 2012: 19-28.
- 10 Deutsches Register für Stammzelltransplantation, Jahresbericht 2014: 13-22.
- 11 Christopher G. Kanakry Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. Nat Rev Clin Oncol. 2016 Jan; 13(1): 10–24.
- 12 Nowak J. Role of HLA in hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2008 Oct;42 Suppl 2:71-76.

- 13 Koh LP et al. Haploidentical hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2008 Aug;42 Suppl 1:60-63.
- 14 Miller JP. et al. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: experience of the National Marrow Donor Program. Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Sep;14(9 Suppl):29-36.
- 15 Halter J. et al. Severe events in donors after allogeneic hematopoietic stem cell donation. Haematologica. 2009 Jan;94(1):94-101.
- 16 Horowitz MM. et al. Evaluation of hematopoietic stem cell donors. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:469-475.
- 17 Pulsipher MA. et al. Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. Blood. 2009 Apr 9; 113(15): 3604–3611.
- 18 Michael A. Pulsipher et al. Acute toxicities of unrelated bone marrow versus peripheral blood stem cell donation: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. Blood. 2013 Jan 3; 121(1): 197–206.
- 19 Chen SH. et al. Hematopoietic stem cell donation. Int J Hematol. 2013 Apr;97(4):446-455.
- 20 Kiefel V. Transfusionsmedizin und hämatologische Immunhämatologie 4. Auflage 2010: S. 245-260.
- 21 Reddy RL. et al. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. Transfus Apher Sci. 2005 Feb;32(1):63-72.
- 22 Hamadani M. Autologous hematopoietic cell transplantation: an update for clinicians. Ann Med. 2014 Dec;46(8):619-632.
- 23 Schönbeck U. et al. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci. 2001 Jan; 58(1):4-43.
- 24 Schönbeck U. et al. CD154 (CD40 ligand). Int J Biochem Cell Biol. 2000 Jul; 32(7):687-693.

- 25 Wenzel F. et al. Release of soluble CD40L by matrix metalloprotease-2 (MMP-2)-dependent shedding of platelets and its subsequent accumulation in stem cell products of autologous donors. *J Stem Cells Regen Med.* 2010 Oct 23; 6(2):66-67.
- 26 Li R. et al. CD40 signal expression in gastric cancer tissue and its correlation with prognosis of gastric cancer patients. *Mol Biol Rep.* 2012 Sep;39(9):8741-8747.
- 27 Danese S. et al. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients. *Gut.* 2003 Oct; 52(10):1435-1441.
- 28 Christopher H. et al. Soluble CD40 Ligand in Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20;348(12):1104-1111.
- 29 Wenzel F. et al. Different behaviour of soluble CD40L concentrations can be reflected by variations of preanalytical conditions. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 39(1-4):417-422.
- 30 Khan SY. et al. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood.* 2006 Oct 1; 108(7):2455-2462.
- 31 Wenzel F. et al. Determination of thromboxane formation, soluble CD40L release and thrombopoietin clearance in apheresis platelet concentrates. *Platelets.* 2012; 23(2):150-156.
- 32 Woods I. et al. Pilot analysis of cytokines levels in stored granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cell concentrates. *Transfusion.* 2010 Sep; 50(9):2011-2015.
- 33 Wenzel F. et al. Soluble CD40 ligand in stem cell products of autologous donors. *Transfusion.* 2011 Jan; 51(1):226-227.
- 34 Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist.* 2003; 8 Suppl 1:15-18.
- 35 Kowalczyk M. et al. Erythropoietin update 2011. *Med Sci Monit.* 2011 Nov; 17(11):RA240-247.

- 36 Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013 Jan; 27(1):41-53.
- 37 Elliott S. et al. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics.* 2012; 6:163-189.
- 38 Herold G. et al. *Innere Medizin.* 2013. Kap. I Seite 27.
- 39 Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Mar 1; 3(3):3-13.
- 40 Sinclair AM. et al. Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells. *Blood.* 2010 May 27;115(21):4264-4272.
- 41 Brines M. et al. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: Biology and clinical promise. *Kidney Int.* 2006 Jul; 70(2):246-250.
- 42 Ruifrok WP. et al. Erythropoietin in cardiac disease: new features of an old drug. *Eur J Pharmacol.* 2008 May 13; 585(2-3):270-277.
- 43 Fenjves ES. et al. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation.* 2003 Apr 27; 75(8):1356-1360.
- 44 Yasuda Y. et al. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem.* 1998 Sep 25; 273(39):25381-25387.
- 45 Juul SE. et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res.* 1998 Jan; 43(1):40-49.
- 46 Ogunshola OO. et al. Epo and non-hematopoietic cells: what do we know? *Methods Mol Biol.* 2013; 982:13-41.
- 47 Bohlius J. et al. Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2009 May 2; 373(9674):1532-1542.
- 48 Ribatii D. Erythropoietin and Tumor Angiogenesis. *Stem Cells Dev.* 2010 Jan; 19(1):1-4.
- 49 Jaar B. et al. Effects of long-term treatment with recombinant human erythropoietin on physiologic inhibitors of coagulation. *Am J Nephrol.* 1997; 17(5):399-405.

- 50 Lubas A et al. Renal vascular response to angiotensin II inhibition in intensive antihypertensive treatment of essential hypertension. Arch Med Sci. 2010 Aug 30; 6(4):533-538.
- 51 Banach M. et al. Controversies in hypertension treatment. Curr Vasc Pharmacol. 2010 Nov; 8(6):731-732.
- 52 Marchioli R. et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. N Engl J Med. 2013 Jan 3; 368(1):22-33.
- 53 Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production. Thromb Haemost. 1995 Jul;74(1):521-525.
- 54 Kaushansky K. Thrombopoietin. N Engl J Med. 1998 Sep 10;339(11):746-754.
- 55 Li J. et al. Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. Br J Haematol. 1999 Aug;106(2):345-356.
- 56 de Sauvage FJ. et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. J Exp Med. 1996 Feb 1;183(2):651-656.
- 57 Jelkmann W. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001 Jul;13(7):791-801.
- 58 Wolber EM. et al. Thrombopoietin: the novel hepatic hormone. News Physiol Sci. 2002 Feb;17:6-10.
- 59 Kuter DJ. The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. Int J Hematol. 2013 Jul; 98(1):10-23.
- 60 Deutsch VR. et al. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. Br J Haematol. 2013 Jun; 161(6):778-793.
- 61 Klinke R. et al. Physiologie. 2005. 5. Auflage. Kap. 32.7 Seite 875.
- 62 Vakkalanka RK. et al. Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. Arthritis Rheum. 1999 May;42(5):871-881.

- 63 Kato K. et al. The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1999 Oct 1; 104(7): 947–955.
- 64 Unek IT. et al. The Levels of Soluble CD40 Ligand and C-Reactive Protein in Normal Weight, Overweight and Obese People. *Clin Med Res.* 2010 Jul; 8(2): 89–95.
- 65 Gururajan P. et al. Increased serum concentrations of Soluble CD40 Ligand as a prognostic marker in patients with Acute Coronary Syndrome. *Indian J Clin Biochem.* 2009 Jul;24(3):229-233.
- 66 André P. et al. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation.* 2002 Aug 20;106(8):896-899.
- 67 Charafeddine AH. et al. Platelet-derived CD154: Ultrastructural localization and clinical correlation in organ transplantation. *Am. J. Transplant.* 2012 Nov, 12, 3143–3151.
- 68 Rinder HM. et al. Platelet activation and its detection during the preparation of platelets for transfusion. *Transfus Med Rev.* 1998 Oct;12(4):271-287.
- 69 Rinder HM. et al. Activation of platelet concentrate during preparation and storage. *Blood Cells.* 1992;18(3):445-456.
- 70 Henn V. et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998 Feb 5;391(6667):591-594.
- 71 Reinboldt S. et al. Preliminary evidence for a matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-dependent shedding of soluble CD40 ligand (sCD40L) from activated platelets. *Platelets.* 2009 Sep;20(6):441-444.
- 72 Fernández Bello I. et al. Platelet soluble CD40L and matrix metalloproteinase 9 activity are proinflammatory mediators in Behçet disease patients. *Thromb Haemost.* 2012 Jan;107(1):88-98.
- 73 Prasad KS. et al. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Okt 14;100(21):12367-12371.

- 74 Furman MI. et al. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jun 16;43(12):2319-2325.
- 75 Roberts AW. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors.* 2005 Mar;23(1):33-41.
- 76 Eckardt KU. et al. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 1989 Apr;66(4):1785-1788.
- 77 Vlahos R. et al. Glucocorticosteroids differentially regulate MMP-9 and neutrophil elastase in COPD. *PLoS One.* 2012;7(3):1-8.
- 78 Shirvaikar N. et al. Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. *Biochem Res Int.* 2012; 2012: Article ID 685267:1-8.
- 79 Lévesque JP. et al. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol.* 2002 May;30(5):440-449.
- 80 Janowska-Wieczorek A. et al. Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34(+) cells and their transmigration through reconstituted basement membrane. *Blood.* 1999 May 15;93(10):3379-3390.
- 81 Blumberg N. et al. An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions. *Transfusion.* 2006 Oct;46(10):1813-1821.
- 82 Sahler J. et al. CD40 ligand (CD154) involvement in platelet transfusion reactions. *Transfus Clin Biol.* 2012 Jun;19(3):98-103.
- 83 Mach F. et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 4;94(5):1931-1936.
- 84 Phipps RP. Atherosclerosis: The emerging role of inflammation and the CD40–CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20; 97(13): 6930–6932.

- 85 Lutgens E. et al. Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 20; 97(13): 7464–7469.
- 86 Lutgens E. et al. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med*. 1999 Nov;5(11):1313-1316.
- 87 Chen C. et al. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3205-3216.
- 88 Kaya Z. et al. Soluble CD40 ligand levels in acute pulmonary embolism: a prospective, randomized, controlled study. *Heart Vessels*. 2012 May;27(3):295-299.
- 89 Pamukcu B. et al. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med*. 2011 Aug;43(5):331-340.
- 90 Aukrust P. et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999 Aug 10;100(6):614-620.
- 91 Senhaji N. et al. The Contribution of CD40/CD40L Axis in Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Front Immunol*. 2015 Oct 16;6(529): 1-5.
- 92 Toubi E. et al. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. *Autoimmunity*. 2004 Sep-Nov;37(6-7):457-464.
- 93 Alaaeddine N. et al. CD154: An Immunoinflammatory Mediator in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: Article ID 490148: 1-7.
- 94 Kaufman J. et al. Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion. *J Thromb Haemost*. 2007 Apr; 5(4): 788-796.
- 95 Wenzel F. et al. Comparison of soluble CD40L concentrations and release capacities in apheresis and prestorage pooled platelet concentrates. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2011;47(4):269-278.
- 96 Klinke R. et al. *Physiologie*. 2005. 5. Auflage. Kap. 9.2 Seite 224.

- 97 Cappellini MD. et al. Anemia in Clinical Practice-Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging? *Semin Hematol.* 2015 Oct;52(4):261-269.
- 98 Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 2004 Aug;43(8):649-659.
- 99 Dinkelaar RB. et al. Metabolic studies on erythropoietin (EP): II. The role of liver and kidney in the metabolism of Ep. *Exp Hematol.* 1981 Aug;9(7):796-803.
- 100 Widness JA. et al. In vivo ¹²⁵I-erythropoietin pharmacokinetics are unchanged after anesthesia, nephrectomy and hepatectomy in sheep. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Dec;279(3):1205-1210.
- 101 Macdougall IC. et al. Clinical pharmacokinetics of epoetin (recombinant human erythropoietin). *Clin Pharmacokinet.* 1991 Feb;20(2):99-113.
- 102 Gross AW. et al. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *J Biol Chem.* 2006 Jan 27;281(4):2024-2032.
- 103 Sebastian Samuel J. et al. Probing protease sensitivity of recombinant human erythropoietin reveals $\alpha 3$ - $\alpha 4$ inter-helical loop as a stability determinant. *Proteins.* 2015 Oct;83(10):1813-1822.
- 104 Glaspy J. et al. Effects of chemotherapy on endogenous erythropoietin levels and the pharmacokinetics and erythropoietic response of darbepoetin alfa: a randomised clinical trial of synchronous versus asynchronous dosing of darbepoetin alfa. *Eur J Cancer.* 2005 May;41(8):1140-1149.
- 105 Agoram B. et al. Investigation of the effects of altered receptor binding activity on the clearance of erythropoiesis-stimulating proteins: Nonerythropoietin receptor-mediated pathways may play a major role. *J Pharm Sci.* 2009 Jun;98(6):2198-2211.
- 106 Tanaka T. et al. General anesthetics inhibit erythropoietin induction under hypoxic conditions in the mouse brain. *PLoS One.* 2011;6(12):e29378:1-13.
- 107 Wolber EM. et al. Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B. *J Interferon Cytokine Res.* 2000 May;20(5):499-506.

- 108 Wolber EM. et al. Hepatic thrombopoietin mRNA is increased in acute inflammation. *Thromb Haemost.* 2001 Dec;86(6):1421-1424.
- 109 Klinger MH. et al. Subcellular localization of thrombopoietin in human blood platelets and its release upon thrombin stimulation. *Br J Haematol.* 2001 Nov;115(2):421-427.
- 110 Demetri GD. et al. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 1991 Dec 1;78(11):2791-2808.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Konzentration von CD40L (pg/ml) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	16
Abbildung 2	Thrombozytenkonzentration (PLT/nl) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	17
Abbildung 3	Konzentration von CD40L (pg/ml) im Stammzellapheresat nach allogener peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h).	17
Abbildung 4	Kinetik der CD40L-Sekretion (pg/ml) im Plasma G-CSF-stimulierter Spender (blau) sowie nicht-stimulierter Spender (rot) über die Zeit in Minuten.	19
Abbildung 5	Kinetik der CD40L-Sekretion (pg/ml) in plättchenreichem Plasma (PRP) G-CSF-stimulierter Spender (blau) sowie nicht-stimulierter Spender (rot) über die Zeit in Minuten.	20
Abbildung 6	Konzentration von CD40L (pg/ml) im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende (Präparat sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Präparat 24 h).	21
Abbildung 7	CD40L-Freisetzung pro Minute [pg/ml/min] im PRP (1,0), bei PRP: PPP Dilution im Verhältnis 1:2 (0,5) und nach Dilution des PRP mit PPP im Verhältnis 1:10 (0,1).	22
Abbildung 8	Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	23
Abbildung 9	Konzentration von Hämoglobin (HGB) (g/dl) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	23
Abbildung 10	Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im Stammzellapheresat nach autologer peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h).	24

Abbildung 11	Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	25
Abbildung 12	Konzentration von Hämoglobin (HGB) (g/dl) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	25
Abbildung 13	Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im Stammzellapheresat nach allogener peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h).	26
Abbildung 14	Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP).	27
Abbildung 15	Konzentration von Hämoglobin (HGB) (g/dl) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP).	27
Abbildung 16	Konzentration von Erythropoetin (EPO) (mIU/ml) im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende (Präparat sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Präparat 24 h).	28
Abbildung 17	Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	29
Abbildung 18	Thrombozytenkonzentration (PLT/nl) im peripheren Blut autologer Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	29
Abbildung 19	Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Stammzellapheresat nach autologer peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h).	30
Abbildung 20	Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	31
Abbildung 21	Thrombozytenkonzentration (PLT/nl) im peripheren Blut allogener Spender vor (prä ZS) sowie nach der peripheren Blutstammzellapherese (post ZS).	31

Abbildung 22	Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Stammzellapheresat nach allogener peripherer Blutstammzellapherese (Aph. sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Aph. 24 h).	32
Abbildung 23	Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP).	33
Abbildung 24	Thrombozyten (PLT/nl) im peripheren Blut von Knochenmarkspendern einen Tag vor (prä OP), unmittelbar nach (post OP) sowie 24 h nach der Operation (1 d post OP).	33
Abbildung 25	Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Stammzellpräparat nach allogener Knochenmarkspende (Präparat sof.) sowie nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C (Präparat 24 h).	34
Abbildung 26	Konzentration von Thrombopoetin (TPO) (pg/ml) im Knochenmark (KM) sowie im peripheren Blut (PB).	35
Abbildung 27	Thrombopoetin (TPO) in Prozent zum Basalwert (PRP aus dem Aph. sof.) in den jeweiligen Zellsuspensionen Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten und CD34+-Zellen sowie dem PRP nach 24 stündiger Lagerung bei 4 °C.	35
Abbildung 28	Thrombopoetin in absoluter Relation zum Basalwert (PRP aus dem Aph. sof.) bei den verschiedenen Zellsuspensionen Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten, CD34+-Zellen sowie dem PRP nach 24 h Lagerungszeit bei 4 °C.	36
Abbildung 29	Thrombopoetin (TPO)- <i>Clearance</i> (pg/ml) pro Stunde bei unterschiedlichen Temperaturniveaus, 4 °C und 37 °C.	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Antikörper zur Markierung der unterschiedlichen Zellsuspensionen im FACS.	14
------------------	---	----

Danksagung

Zu allererst möchte ich allen Personen danken, die bei der Erstellung der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen. Neben allen medizinisch-technischen Assistentinnen im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) danke ich Frau Dipl. Ing. Katharina Raba, mit deren Hilfe die FACS-Analysen durchgeführt wurden. Für die Arbeit als Zweitgutachter danke ich Prof. Dr. Ulrich Decking. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Folker Wenzel, zu dem ich als Betreuer der Dissertation ein freundschaftliches Verhältnis entwickelt habe und der mir auch über seine Zeit im ITZ in Düsseldorf hinaus in allen Belangen eine unersetzlich große Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift war. Für Korrekturen danke ich Dr. rer. nat. Julia Driesen und Sebastian Stöcker.

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern Ingrid Hauser und Dr. med. dent. Helmut Hauser sowie meiner ganzen Familie danken, welche mir stets den Rücken freihalten, immer ein offenes Ohr für mich haben und nicht müde ihrer fortwährenden Unterstützung werden. Von Herzen danke ich meiner Freundin Inga für ihre Liebe und für ihre Freundschaft.

Eidesstattliche Versicherung

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

Köln, 21.04.2016 (revidierte Fassung 15.08.17)

Maximilian Hauser